



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira interrogans*  
em trabalhadores do Saneamento básico da Região  
de Lisboa e Vale do Tejo**

Maria do Rosário Campos Oliveira Fernandes

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde Tropical

Especialidade de Patologia Tropical

Janeiro, 2017



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira interrogans*  
em trabalhadores do Saneamento básico da Região  
de Lisboa e Vale do Tejo**

Maria do Rosário Campos Oliveira Fernandes

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde Tropical

**Orientadoras:**

Doutora Rosa Maria Figueiredo Teodósio, Professora Auxiliar da Unidade de Ensino e Investigação em Clínica Tropical, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL)

Doutora Maria Luísa Jorge Vieira, Investigadora Auxiliar da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica (Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL).

Janeiro, 2017

No final desta jornada dou por mim a não saber como agradecer a todos aqueles que de formas diferentes estiveram comigo e contribuíram para que esta dissertação acontecesse. Então, a todas essas pessoas quero dar o meu “*Muito Obrigado!*”, apesar de ser pouco para tudo aquilo que foi feito e dito.

Quero agradecer, em primeiro lugar às minhas orientadoras, pela dedicação e empenho que demonstraram durante este ano, principalmente nestes últimos meses.

Professora Doutora Maria Luísa Vieira, obrigada pelas belíssimas reuniões onde sentia que aprendia como se estivesse numa aula privada e, sobretudo, obrigada pela sua direção, dicas valiosas e entusiasmo durante todas as etapas do projeto, principalmente nos tempos que passei em laboratório.

Professora Doutora Rosa Teodósio, obrigada pela sua exigência e apoio valiosos, os quais me ajudaram a “construir” um projeto importante para mim. Não me esqueço que foi a primeira a ouvir a minha ideia “embrionária” e que desde cedo me deu o entusiasmo suficiente para avançar.

Um especial agradecimento à Técnica Superior e Mestre Teresa Carreira pelo acompanhamento prestado durante todo o tempo que estive no laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme do IHMT/UNL. Os seus conselhos e boa disposição foram fundamentais para o meu desempenho. Agradeço também à Mestre (quase Doutora) Mónica Nunes pelas suas dicas e apoio em tantos momentos. E, claro, obrigada Céu pela sua ajuda e simpatia.

Um agradecimento sincero a todas as Câmaras Municipais, Entidades Privadas e a todos os profissionais que aceitaram participar neste projeto e que, incansavelmente, deram do seu tempo para me acompanhar e para transmitir a mensagem aos trabalhadores.

E, obrigada a todos os trabalhadores do Saneamento básico que confiaram em mim e, também eles, deixaram momentaneamente o seu posto de trabalho, de modo a assistirem à sessão de esclarecimentos, participando ativamente neste projeto. Um bem haja a todos aqueles que demonstraram um interesse genuíno em aprender um pouco mais acerca da doença leptospirose, colocando perguntas e participando voluntariamente no teste de rastreio.

Obrigada aos meus colegas de Mestrado em Saúde Tropical, principalmente à Iolanda e Madalena pela sua amizade, companheirismo e presença constante na minha vida.

Obrigada à minha família, especialmente aos meus pais, avós, sogros e cunhados pelas palavras de ânimo, preocupação constante e sobretudo pela paciência em tantos momentos deste último ano.

Um especial agradecimento ao meu marido Carlos, por ter sido o meu companheiro em todas as horas, demonstrando sempre um interesse genuíno pelo meu trabalho. E, claro, pela sua tão grande paciência em todos os segundos, a qual foi tão importante para que conseguisse redigir as páginas que se seguem.

E, por último, mas talvez o mais importante, estarei eternamente grata a Deus pela força que me deu em todos os momentos. Em todos os telefonemas difíceis para as Câmaras Municipais, em todas as reuniões com potenciais colaboradores, em todas as sessões junto de trabalhadores.

**OBRIGADA!**

A leptospirose é uma doença infecciosa, cuja importância a nível global tem vindo a aumentar. As manifestações clínicas decorrentes da infeção por *Leptospira interrogans* sensu lato são de amplo espectro, podendo caracterizar-se por uma infeção inaparente, assim como por casos fulminantes, os quais são quase sempre fatais para o doente.

A manifestação mais comum é a forma leve, a qual se assemelha aos sintomas de uma Síndrome Gripal pelo vírus *Influenza* (febre, calafrios, cefaleia, mialgias). Por esse motivo, na maioria dos países, a leptospirose continua a ser uma doença subestimada, o que pode levar a um subdiagnóstico, principalmente junto das populações consideradas de risco.

O contacto com a bactéria responsável pela infeção só é detectado através do título de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., tornando-se especialmente importante nos casos assintomáticos ou semelhantes a uma síndrome gripal. Estes anticorpos podem permanecer no organismo da pessoa infetada durante meses a anos, ocorrendo, ao longo deste tempo, um declínio variável do título.

A leptospirose é uma zoonose importante que infeta pelo menos 160 espécies de mamíferos. No entanto, os roedores, mais especificamente os ratos, continuam a ser os reservatórios mais comuns e, por isso, os mais importantes na disseminação do agente causador da doença.

A transmissão aos humanos dá-se pelo contacto direto com urina, sangue ou tecidos de roedores ou de um animal infetado, sendo necessária uma porta de entrada, que pode ser uma escoriação na pele ou através das mucosas.

Existem grupos ocupacionais que, por estarem mais frequentemente em contacto com roedores, são considerados grupos de risco para o desenvolvimento desta doença. São exemplos os veterinários, agricultores, trabalhadores do saneamento básico, empregados de matadouros, entre outras. Neste estudo, foi dado especial destaque aos trabalhadores do saneamento básico, dos quais fazem parte trabalhadores de ETAR, trabalhadores de Câmaras Municipais (águas residuais e resíduos sólidos) e também trabalhadores de empresas privadas de desratização ou limpeza de esgotos.

Foram recolhidas amostras de sangue de 347 participantes deste setor laboral, aplicando-se igualmente um questionário clínico-epidemiológico, a fim de se descreverem algumas características sócio-demográficas, grau de conhecimento acerca da leptospirose, exposição a roedores, sintomatologia da doença, entre outras. Todos os participantes do estudo tiveram também a oportunidade de assistir a uma sessão de esclarecimento acerca da doença (características epidemiológicas, sintomas e medidas de prevenção).

As amostras foram testadas no laboratório para a Leptospirose e Borreliose de Lyme do IHMT/UNL, com o teste de rastreio MACROLepto, investigando-se os soros quanto à presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l.. As amostras “Não Conclusivas” foram testadas de seguida na TAM, método de referência no diagnóstico da leptospirose.

Apesar do desconhecimento que a maioria dos trabalhadores possui em relação à *L. interrogans* s.l. e da presença regular de roedores no espaço onde exercem funções, a utilização dos EPI's (Equipamentos de Proteção Individual) e medidas de higiene gerais, pela grande maioria dos participantes, bem como a desratização periódica, demonstraram ser ferramentas comumente utilizadas no seu quotidiano laboral.

Leptospirosis is an infectious disease, whose global importance has been increasing over time. Clinical manifestations due to *Leptospira interrogans* sensu lato infection are broad-spectrum and may be characterized by an inapparent infection, as well as fulminant cases, which are often fatal to the patient.

The most common manifestation is the mild form, which resembles the symptoms of a flu-like illness by *Influenza* virus (fever, chills, headache, myalgia). For this reason, in most countries, leptospirosis remains an underestimated disease, which can lead to misdiagnosis, especially within populations considered under risk.

The contact with the bacteria responsible for the infection is only detected by the antibodies titers against *L. interrogans* s.l., making it especially important in asymptomatic cases or the ones resembling *Influenza* syndrome. These antibodies can last in the infected person body from months to years, occurring a variable titer decline over time.

Leptospirosis is an important zoonotic disease, infecting at least 160 species of mammals around the world. However, rodent, more particularly rats and mice, remains the most common reservoirs and therefore, of particular relevance in the spread of the disease's agent.

The transmission to humans occurs through direct contact with urine, blood or tissues of rodents or of an infected animal, per inlet port, which can be an abrasion on the skin or the mucous.

There are occupational groups that for being frequently in contact with rodents are considered at risk to developing this disease. Veterinary, farmers, sanitation workers, and employees of slaughterhouses are examples. In this study, it was given special attention to sanitation workers, of which belong WWTP workers, town hall workers (waste water and solid waste) and also workers of private companies responsible for disinfestation or sewer cleaning.

Blood samples were collected from 347 sanitation workers' participants, being also applied a clinical-epidemiological survey in order to describe demographic data characteristics, the degree of leptospirosis knowledge, exposure to rodents, disease symptoms, among others. All participants also had the opportunity to attend an

information session about the disease (epidemiological characteristics, symptoms and preventive measures).

The samples were tested in the laboratory for leptospirosis and Lyme borreliosis of IHMT/UNL with Macro-agglutination test (screening), investigating the sera for the presence of antibodies against-*L. interrogans* s.l.. The “Non conclusive” samples were then tested with MAT, the reference method for the diagnosis of leptospirosis.

Despite the lack of knowledge that most workers have in respect to *L. interrogans* s.l. and the regular presence of rodents in their labor area, the use of PPE (Personal Protective Equipment) and general hygiene measures by a wide range of participants, as well as a regular rodent extermination, shown to be tools commonly used in their daily work routine.

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE QUADROS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 - Revisão da Literatura.....	<b>2</b>
1.1.1 - <i>Leptospira</i> spp. ....	<b>2</b>
1.1.1.1 - Taxonomia e Morfologia.....	<b>2</b>
1.1.1.2 - Classificação Fenotípica e Molecular.....	<b>3</b>
1.1.2 - Ciclo biológico.....	<b>5</b>
1.1.2.1 - Ciclo de transmissão.....	<b>5</b>
1.1.2.2 - <i>Leptospira</i> spp. como agente zoonótico.....	<b>6</b>
1.1.2.3.1 - O papel dos roedores como reservatórios de leptospiras.....	<b>7</b>
1.1.2.4 - Transmissão ao ser humano.....	<b>8</b>
1.1.3 - Distribuição.....	<b>9</b>
1.1.3.1 - A leptospirose no mundo.....	<b>9</b>
1.1.3.2 - A leptospirose em Portugal.....	<b>14</b>
1.1.4 - Epidemiologia/Grupos de risco.....	<b>16</b>
1.1.4.1 - Grupos de risco de infeção por <i>L. interrogans</i> s.l. ....	<b>16</b>
1.1.4.2 - Leptospirose em trabalhadores do Saneamento básico.....	<b>20</b>
1.1.5 - Patogenicidade no ser humano.....	<b>22</b>
1.1.5.1 - Patogenia .....	<b>22</b>
1.1.5.2 - Imunologia.....	<b>23</b>
1.1.5.3 - Manifestações clínicas e sintomatologia .....	<b>25</b>

1.1.5.3.1 - Leptospirose anictérica.....	26
1.1.5.3.2 - Síndrome de Weil.....	27
1.1.6 - Diagnóstico.....	30
1.1.6.1 - Diagnóstico diferencial.....	30
1.1.6.2 - Perfil hematológico.....	31
1.1.6.3 - Diagnóstico laboratorial.....	32
1.1.6.3.1 - Exame microscópico.....	32
1.1.6.3.2 - Cultura e Isolamento.....	33
1.1.6.3.3 - Testes serológicos.....	34
1.1.6.3.4 - Métodos moleculares.....	35
1.1.7 - Tratamento, Manutenção e Prevenção.....	37
1.2 - Justificação do tema.....	40
1.3 - Objetivos.....	42
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 - Área geográfica de estudo.....	44
2.2 - População alvo e seleção da amostra.....	45
2.2.1 - Instituições participantes.....	45
2.2.2 - Critérios de inclusão no estudo.....	47
2.2.3 - Seleção dos trabalhadores participantes.....	47
2.3 - Recolha de dados.....	48
2.3.1 - Consentimento Informado .....	48
2.3.2 - Questionário Clínico-Epidemiológico.....	48
2.3.3 - Ação de sensibilização.....	49
2.3.4 - Recolha e tratamento das amostras de sangue.....	50
2.4 - Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto) .....	52
2.4.1 - Preparação do antigénio.....	52
2.4.2 - Metodologia da Técnica .....	53
2.4.3 - Interpretação e seguimento dos participantes no estudo.....	54

2.5 - Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM).....	56
2.5.1 - Preparação da bateria de antígenos.....	56
2.5.2 - Metodologia da Técnica.....	57
2.5.3 - Leitura das microplacas.....	58
2.6 - Análise e tratamento de dados .....	59
<b>3 - RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
3.1 - Caracterização da Amostra.....	62
3.1.1 - Dados sócio-demográficos.....	62
3.1.2 - Grupos Profissionais.....	64
3.1.3 - Conhecimento prévio da doença.....	66
3.1.4 - Contacto com reservatórios.....	68
3.2 - Caracterização do espaço laboral e dos comportamentos .....	70
3.2.1 - Equipamento de Proteção Individual (EPI).....	70
3.2.2 - Práticas preventivas (individuais e coletivas).....	76
3.3 - Saúde Ocupacional.....	81
3.3.1 - Sintomatologia compatível com leptospirose.....	81
3.3.2 - Saúde Ocupacional - exames realizados.....	82
3.4 - Testes serológicos.....	84
3.4.1 - Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto).....	84
3.4.2 - Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM).....	84
<b>4 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>107</b>

- Figura 1.1.** Representação esquemática da estrutura espiralada das leptospiras
- Figura 1.2.** Visualização de espiroquetas da espécie *L. interrogans* em microscopia electrónica de varrimento
- Figura 1.3.** Ciclo de transmissão da leptospirose, ilustrando as interações entre os reservatórios animais e o ser humano
- Figura 1.4.** Trabalhadores numa plantação de arroz em Colombo, Sri Lanka
- Figura 1.5.** Contexto epidemiológico de transmissão da bactéria na região do Peru. **A-** Pessoa a andar descalça numa zona de desflorestação da Amazónia, junto da aldeia de Iquitos. **B-** Um lago na periferia da aldeia de Iquitos usado pela população para tomar banho. **C-** Poço usado pela população para a água de consumo. **D-** Lavagem de roupa a ser efetuada num poço próximo de Iquitos
- Figura 1.6.** Cheias nas Filipinas, em 2009, causando um surto de leptospirose na população
- Figura 1.7.** Departamento florestal a proceder a uma desinfeção do parque recreacional Jeram Toi, na Malásia, após um mergulho de um estudante ter originado leptospirose fatal
- Figura 1.8.** Crianças a brincar após a ocorrência de cheias nas Filipinas, em Setembro de 2003. Nas semanas seguintes foram reportados mais de uma centena de casos de leptospirose na região
- Figura 1.9.** Trabalhadores do Saneamento Básico. **A-** Trabalhadores de uma empresa privada de limpeza de esgotos domésticos nos Estados Unidos. **B-** Trabalhador do Saneamento Básico em Havana, Cuba
- Figura 1.10.** Rim extraído durante uma autópsia, mostrando aumento de volume e com congestão capilar causada por leptospirose
- Figura 1.11.** Leptospiras em microscopia de fundo escuro
- Figura 1.12.** Representação em gel agarose da amplificação de *L. interrogans* s.l., em diluições seriadas
- Figura 2.1.** Representação do mapa da Região de Lisboa e Vale do Tejo dividido em zonas e concelhos. Os concelhos que participaram no estudo estão assinalados com círculo preto

**Figura 2.2.** A- Ação de sensibilização sobre o tema “Leptospirose” em trabalhadores do Saneamento Básico. B- Preparação para ação de sensibilização em trabalhadores da rede de abastecimento

**Figura 2.3.** Material utilizado na colheita de sangue aos participantes do estudo

**Figura 2.4.** Soros dos participantes em processo de armazenamento no laboratório

**Figura 2.5.** Bancada de trabalho para a execução da técnica MACROLepto, no laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme do IHMT/UNL

**Figura 2.6.** Representação esquemática dos diferentes resultados obtidos na MACROLepto e respectiva Interpretação

**Figura 2.7.** Representação esquemática das diferentes percentagens de aglutinação que podem ser observadas na TAM. A- Testemunha; B1- 75% de células livres; B2- 50% de células livres; B3- 25% de células livres; B4 - B5- ± 0% de células livres

**Figura 3.1.** Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo o género

**Figura 3.2.** Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) por faixa etária, segundo o género

**Figura 3.3.** Representação gráfica da distribuição da amostra (n=343 dos participantes) segundo o Grau de escolaridade

**Figura 3.4.** Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo as Entidades Empregadoras das quais fazem parte

**Figura 3.5.** Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo a área laboral

**Figura 3.6.** Representação gráfica da distribuição da amostra (n=322 dos participantes) segundo o Conhecimento prévio da doença

**Figura 3.7.** Representação gráfica da distribuição da amostra (n=55) segundo os diversos aspetos do conhecimento prévio da doença, por parte dos participantes no estudo

**Figura 3.8.** Representação gráfica da distribuição da amostra (n=343 dos participantes) segundo o avistamento de roedores (ratos) no espaço laboral ou área envolvente, no ano anterior à aplicação do questionário

**Figura 3.9.** Representação gráfica da distribuição da amostra (n=265 dos participantes) segundo a frequência com que os trabalhadores avistaram roedores (ratos) no espaço laboral ou área envolvente no ano anterior ao início do estudo

**Figura 3.10.** Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo a utilização de EPI's pelos trabalhadores

**Figura 3.11.** Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo os EPI's fornecidos por parte da Entidade empregadora e sua utilização pelos trabalhadores

**Figura 3.12.** Representação gráfica da distribuição da amostra (n=346 dos participantes) segundo os EPI's fornecidos por parte da Entidade empregadora e sua utilização pelos trabalhadores

**Figura 3.13.** Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo a frequência com que aplicam determinadas medidas de higiene na sua rotina laboral

**Figura 3.14.** Representação gráfica da distribuição da amostra (n=342 dos participantes) segundo a existência de área destinada à recolha ou armazenamento de EPI's no local de trabalho

**Figura 3.15.** Representação gráfica da distribuição da amostra (n=320 dos participantes) segundo a frequência com que a Entidade empregadora procede à desratização do espaço laboral

**Figura 3.16.** Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo a ocorrência de sintomatologia compatível com leptospirose ligeira, no ano anterior ao início do estudo

**Figura 3.17.** Representação gráfica da distribuição dos participantes (n=175) segundo a ocorrência, no último ano, de cada um dos sintomas em particular, bem como de um quadro sintomático completo

**Figura 3.18.** Representação gráfica da distribuição das respostas (n=340) dos participantes segundo a frequência com que os mesmos realizam Medicina do Trabalho

**Figura 3.19.** Representação gráfica da distribuição da amostra (n=337 dos participantes) segundo a presença de um teste de rastreio para a pesquisa de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. nos exames pela Medicina do Trabalho

**Figura 3.20.** Representação gráfica da distribuição do total de participantes (N=347), de acordo com o resultado laboratorial obtido no teste MACROLepto

**Quadro 1.1.** Média anual do número de casos de leptospirose, por 100 000 habitantes, reportados desde Janeiro de 1970 a Outubro de 2008 em regiões tropicais e temperadas.

(*Adaptado de Costa et al., 2015*)

**Quadro 2.1.** Número de concelhos que participaram no estudo, distribuídos por zonas, segundo dois tipos de divisão: Área laboral (Águas Residuais ou Resíduos Sólidos) e Entidade empregadora (Câmara Municipal e Empresa Privada).

**Quadro 2.2.** Antígenos de *L. interrogans* s.l. e de *L. biflexa* s.l. selecionados para integrarem a bateria utilizada no Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) deste estudo.

**Quadro 3.1.** Distribuição da amostra (N=347) por faixa etária, segundo o género.

**Quadro 3.2.** Distribuição da amostra (N=347) por Entidade empregadora, segundo a área de atividade laboral na qual exercem funções.

**Quadro 3.3.** Distribuição da amostra (n=319 dos participantes) por grau de escolaridade, segundo o conhecimento prévio da doença.

**Quadro 3.4.** Distribuição da amostra (n=265) por área de atividade laboral segundo a frequência com que os trabalhadores avistam roedores no local de trabalho.

**Quadro 3.5.** Distribuição da amostra (N=347) pelos EPI's fornecidos pela Entidade empregadora e usados pelo trabalhador, bem como a diferença entre ambos.

**Quadro 3.6.** Distribuição da amostra (n=346 dos participantes) pelos EPI's estudados, segundo a frequência que os usam no seu quotidiano laboral.

**Quadro 3.7.** Distribuição da amostra (n=346 dos participantes) por faixa etária, segundo a frequência que usam "Luvas" (EPI) no seu quotidiano laboral.

**Quadro 3.8.** Distribuição da amostra (n=343 dos participantes) por grau de escolaridade, segundo a frequência que usam "Luvas" (EPI) no seu quotidiano laboral.

**Quadro 3.9.** Distribuição da amostra (N=347) segundo a frequência com que aplicam medidas de higiene na sua rotina laboral.

**Quadro 3.10.** Distribuição da amostra (N=347) por área de atividade laboral, segundo a frequência que aplicam a medida preventiva "Proteção das feridas".

**Quadro 3.11.** Distribuição da amostra (N=347) por faixa etária, segundo a frequência com que aplicam a medida preventiva "Proteção das feridas".

**Quadro 3.12.** Distribuição da amostra (n=343 dos inquiridos) por grau de escolaridade, segundo a frequência com que aplicam a medida preventiva “Proteção das feridas”.

- % - Percentagem
- μL - Microlitro
- μm - Micrometro
- °C - Graus Celsius
- CAAT - *Cross agglutinin absorption test*
- CDC - *Centre for Diseases Control*
- CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono
- DGS - Direção Geral de Saúde
- DNA - *Deoxyribonucleic acid*
- ECG - Electrocardiograma
- EMS - *Event Management System*
- EMJH - *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris agar*
- EPI's - Equipamentos de Proteção Individual
- ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais
- EUA - Estados Unidos da América
- h - horas
- IgG - Imunoglobulina G
- IHMT/UNL - Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa
- kDa - KiloDalton
- Km<sup>2</sup> - Quilómetro quadrado
- LCR - Líquido Céfalo-Raquidiano
- Lig - *Leptospiral immunoglobulin-like*
- LPS - Lipopolissacárido
- Lsa - *Leptospiral surface adhesin*
- LVW - *Leptospira Vanaporn Wuthiekanun agar*
- M - Molar
- MACROLepto - Teste de Aglutinação Macroscópico
- MAT - *Micro-agglutination test*

mL - Mililitro

mm - Milímetro

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - *phosphate buffered saline*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PCR - Proteína C reativa

pH - Potencial de Hidrogénio

PLG - Plasminogénio humano

PPE - *Personal protective equipment*

rpm - rotações por minuto

ssp. - Espécie

s.l. - sensu lato

SMAS - Serviços Municipalizados das Águas e Saneamento

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema de Notificação Espontânea

TAM - Teste de Aglutinação Microscópica

TLR-2 - *Toll-Like receptors 2*

WHO - *World Health Organization*

WWTP - *Wastewater treatment plant*

VS - Velocidade de Sedimentação eritrocitária



# **1. INTRODUÇÃO**

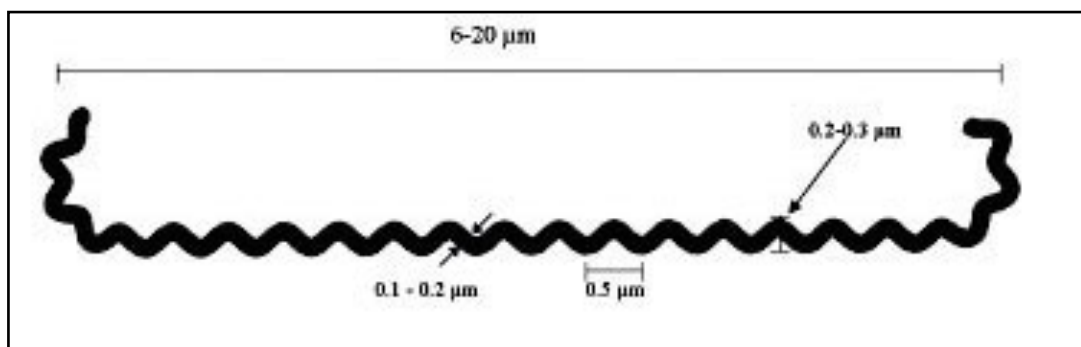
## 1.1 - Revisão da Literatura

### 1.1.1 - *Leptospira* spp.

#### 1.1.1.1 - Taxonomia e Morfologia

As leptospiros são bactérias (espiroquetas) pertencentes à ordem Spirochaetales e à família Leptospiraceae. O género *Leptospira* é usualmente dividido pela classificação fenotípica, nas espécies *Leptospira interrogans* sensu lato e *Leptospira biflexa* sensu lato. A primeira espécie é considerada patogénica, enquanto a segunda, saprófita, pode ser encontrada no meio ambiente. Ambas as espécies se dividem em inúmeros serovares, os quais são detetados através de reações de aglutinação (Levett, 2001; Fauci *et al.*, 2008).

As leptospiros são bactérias espiraladas, finas e com elevada motilidade (**Figura 1.1.**), tendo as suas extremidades em forma de gancho e dois flagelos periplasmáticos, responsáveis pela migração nos tecidos dos organismos que infetam. Os flagelos também conferem à bactéria a habilidade de poder girar e deslizar facilmente em meio líquido (Murray *et al.*, 2006; Fauci *et al.*, 2008; Pádua, 2009).

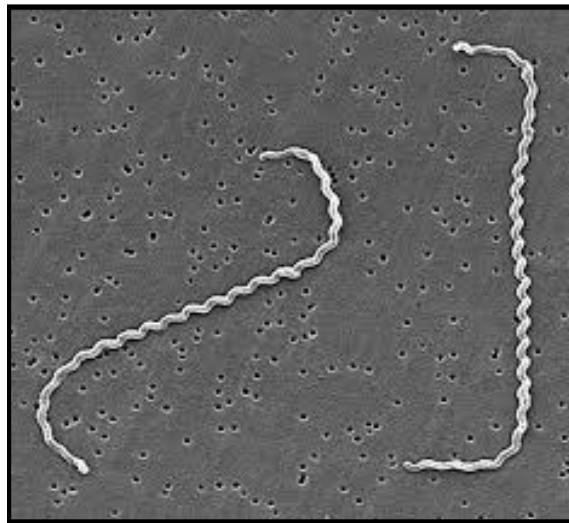


**Figura 1.1.** - Representação esquemática da estrutura espiralada das leptospiros.  
(Adaptado de Schreier *et al.*, 2009)

Estas bactérias são revestidas por um invólucro constituído por 3 a 5 camadas de proteínas, polissacáridos e lípidos. Os flagelos estão posicionados entre a parede e a bainha externa, sendo que a primeira, juntamente com a membrana celular, formam o

cilindro protoplasmático. Os flagelos estendem-se desde as extremidades da bactéria, ao longo de todo o seu comprimento (Pádua, 2009).

As leptospiras medem 6 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento e aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  de largura (**Figura 1.2.**) (Fauci *et al.*, 2008). Quanto às características de crescimento, sabe-se que são aeróbios obrigatórios, tendo crescimento ótimo em meios onde a temperatura ronda os 28°C a 30°C, com presença de vitaminas, ácidos gordos e sais de amónio (Levett, 2001; Murray *et al.*, 2006).



**Figura 1.2.** - Visualização de espiroquetas da espécie *L. interrogans* em microscopia electrónica de varrimento.  
(Adaptado de Levett, 2001)

### 1.1.1.2 - Classificação Fenotípica e Molecular

As leptospiras podem ser divididas segundo a classificação fenotípica, comumente utilizada, ou molecular, a mais recente (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003; Fauci *et al.*, 2008; Adler *et al.*, 2010; Evangelista *et al.*, 2010). Apesar destas duas formas de classificação, o género é tradicionalmente dividido segundo as suas características antigénicas, serologia e patogenicidade. Por motivos clínicos e epidemiológicos, esta classificação continua a ser a mais utilizada na prática corrente (Fauci *et al.*, 2008).

Na classificação fenotípica, o género *Leptospira* é dividido, segundo a patogenicidade, em duas espécies: *L. interrogans* sensu lato (patogénica) e *L. biflexa* sensu lato (saprófita) (Levett, 2001; Evangelista *et al.*, 2010).

Para cada espécie de *Leptospira*, foram definidos serogrupos, os quais por sua vez, se dividem em aproximadamente 250 serovares. Estes são organizados de acordo com as interações antigénio-anticorpo, as quais são observadas através do *Cross agglutinin absorption test* (CAAT) (Bharti *et al.*, 2003; Fauci *et al.*, 2008; Adler *et al.*, 2010; Evangelista *et al.*, 2010).

No entanto, com os avanços ocorridos na área da biologia molecular na última década, novos conhecimentos foram adquiridos, trazendo um renovado entendimento acerca deste microorganismo (Almeida *et al.*, 1994; Picardeau *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014). A sequenciação do genoma das duas espécies patogénicas mais comuns (*L. interrogans* e *L. borgpetersenii*), juntamente com a espécie saprófita *L. biflexa*, foram fundamentais na aquisição de novas perspetivas evolutivas (Picardeau *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

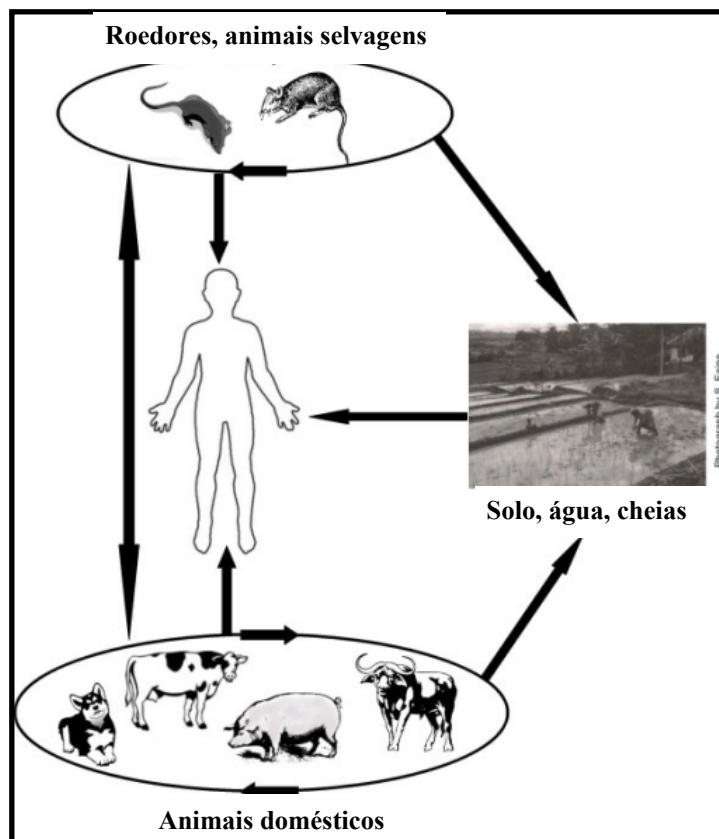
Utilizando-se técnicas de hibridização do DNA, foi possível definir-se as espécies genómicas integrantes na classificação molecular, as quais se dividem em patogénicas e saprófitas. Até agora, foram descritas 21 espécies genómicas, das quais 12 patogénicas, três intermédias e seis saprófitas. Das espécies patogénicas conhecidas, sabe-se que sete são especialmente importantes, por serem os principais agentes responsáveis pela leptospirose no ser humano. Assim, as espécies genómicas maioritariamente associadas à doença são: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* e *L. alexanderi* (Evangelista *et al.*, 2010).

A classificação molecular distancia-se da fenotípica na medida em que apoia a existência de 21 espécies genómicas, facto desconhecido até ao ano de 1989 (Levett, 2001). Esta baseia-se na análise dos ácidos nucleicos, ao contrário da classificação fenotípica, que se apoia nas características serológicas (Bharti *et al.*, 2003).

## 1.1.2 - Ciclo biológico

### 1.1.2.1 - Ciclo de transmissão

O reservatório animal é o elemento mais importante no ciclo de transmissão da espécie *L. interrogans* s.l. (**Figura 1.3.**). São várias as espécies de mamíferos que podem servir de reservatório. Os mais importantes são os roedores, gado bovino e porcos. No entanto, existem outros mamíferos (domésticos, pecuários ou selvagens) igualmente responsáveis pela transmissão das leptospiras ao ser humano (cão, cavalo, ovelha, bode e veado) (Ayanegui-Alcerreca *et al.*, 2007; Maele *et al.*, 2008; Lilenbaum *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2013). Quanto aos humanos, desempenham o papel de hospedeiros acidentais no ciclo de transmissão, sendo que a doença pode, em alguns casos, tornar-se fatal (Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).



**Figura 1.3.** - Ciclo de transmissão da leptospirose, ilustrando as interações entre os reservatórios animais e o ser humano.  
(Adaptado de Victoriano *et al.*, 2009)

Os reservatórios animais (roedores), responsáveis por infectar o ser humano, mantêm os agentes (leptospiras) no organismo através de uma colonização crónica dos túbulos renais (Fauci *et al.*, 2008; Sykes *et al.*, 2010; Farrar *et al.*, 2014). As leptospiras são geralmente transmitidas, entre animais, por contacto direto. Após ser infectado, o animal inicia a excreção da bactéria na urina, situação que se mantém por longos períodos de tempo, ou mesmo por toda a sua vida, evidenciando-se a relação comensal estabelecida entre eles. A fase mais importante na manutenção do ciclo de transmissão dá-se aquando da excreção das leptospiras com a urina, a qual será responsável pela infeção no ser humano (Rojas *et al.*, 2010; Farrar *et al.*, 2014).

As leptospiras excretadas com a urina conseguem sobreviver por várias semanas ou até mesmo meses, em condições favoráveis, tais como, solo húmido e quente, águas estagnadas com pH neutro ou ligeiramente alcalino (Farrar *et al.*, 2014).

Desta forma, a urina de animais infectados torna-se um veículo importante de transmissão para os seres humanos, a qual pode ocorrer quer por contacto direto, quer por contacto indireto (água ou solos), sendo a última hipótese a mais comum. Outras formas de infeção já reportadas são ingestão de água ou leite materno contaminados, e transmissão por via sexual ou vertical, embora estas sejam situações raras (Adler *et al.*, 2010; Farrar *et al.*, 2014).

### **1.1.2.2 - *Leptospira* spp. como agente zoonótico**

A leptospirose é um agente zoonótico importante a nível mundial, com mais de um milhão de casos/ano e afetando mais de 160 espécies de mamíferos (Fauci *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2015). Apesar dos roedores serem o principal reservatório, sendo um importante veículo na transmissão ao ser humano, é de salientar a contribuição de outros mamíferos silvestres, domésticos e pecuários, na perpetuação da doença, tal como descrito anteriormente (Ayanegui-Alcerreca *et al.*, 2007; Maele *et al.*, 2008; Lilenbaum *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2013).

Os diferentes serovares das leptospiras estão frequentemente associados a determinadas espécies de animais, pelos quais parecem demonstrar um certo tropismo.

Alguns exemplos que o demonstram são: o *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*, frequentemente encontrados em ratos; *Grippotyphosa*, comum nas ratazanas; *Hardjo*, próprio do gado bovino; *Canicola*, associado aos cães; e *Pomona*, nos suínos. No entanto, este tropismo dos serovares por determinadas espécies de mamíferos, não significa uma total ausência nos restantes reservatórios (Bharti *et al.*, 2003; Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

### 1.1.2.2.1 - O papel dos roedores como reservatórios de leptospiras

Apesar da importância dos mamíferos em geral na perpetuação da doença, são os roedores sinantrópicos os principais responsáveis pela transmissão aos seres humanos. Dentro deste grupo, as espécies *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato preto) e *Mus musculus* (rato caseiro), são as mais relevantes (Collares-Pereira *et al.*, 2000; Fortes-Gabriel *et al.*, 2016).

A prevalência dos serovares responsáveis pela doença no ser humano varia não só com as condições ambientais e ocupacionais de cada local, mas também com o tipo de reservatório animal presente. Estudos demonstram que há uma relação ubíqua entre certos serovares e espécies de roedores, assim como existe na restante população de mamíferos (Bharti *et al.*, 2003). Alguns exemplos que o comprovam são a alta prevalência do serovar *Icterohaemorrhagiae* nas espécies *Rattus*, enquanto que na espécie *Mus musculus*, o serovar *Ballum* é o mais comum. No entanto, este facto não é exclusivo para todas as regiões geográficas, já que a prevalência de determinados serovares nas espécies de roedores está também dependente de outros fatores, como o ambiente em que estão inseridos. Desta forma, dependendo da região geográfica em que cada espécie de roedor se encontra, diferentes serovares poderão ser encontrados (Bharti *et al.*, 2003).

### 1.1.2.3 - Transmissão ao ser humano

A libertação das leptospiras pela urina dos roedores provoca a contaminação de rios, águas paradas e solos húmidos, sendo que a bactéria tem a capacidade de sobreviver nestes ambientes por longos períodos de tempo (entre semanas a meses) (Trueba *et al.*, 2004). A água contaminada ou o contacto com animais colonizados está na origem da transmissão das leptospiras aos humanos, considerados hospedeiros acidentais (Bharti *et al.*, 2003; Farrar *et al.*, 2014; Haake *et al.*, 2015).

A maior parte das infeções são causadas por águas recreacionais contaminadas (lagos ou rios) ou por exposição ocupacional a águas ou animais colonizados (como é o caso de agricultores ou trabalhadores do saneamento básico) (Fauci *et al.*, 2008).

A entrada das leptospiras no organismo do ser humano dá-se através de escoriações ou abrasões existentes na superfície da pele ou na mucosa intacta, como a conjuntiva, orofaringe e nasofaringe (Fauci *et al.*, 2008; Haake *et al.*, 2015). Apesar da água contaminada ser a causa mais importante de infeção nos seres humanos, e de extrema relevância epidemiológica, existem outras formas de transmissão das leptospiras, embora mais raras (Fauci *et al.*, 2008). Destas causas fazem parte o contacto com sangue, tecidos e órgãos de animais infectados, contacto acidental em laboratório e ingestão de águas ou alimentos contaminados (Levett, 2001; Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

A infeção por ingestão de água ou alimentos contaminados dá-se ao nível da mucosa bucal, garganta ou esófago, onde a bactéria faz a sua introdução no organismo do hospedeiro (Fauci *et al.*, 2008). Quanto à transmissão entre seres humanos é muito rara, estando a sua ocorrência relacionada com o manuseio de sangue, urina, secreções ou tecidos de uma pessoa infetada; ingestão de água ou leite materno contaminados; e por via sexual ou vertical (Bharti *et al.*, 2003; Farrar *et al.*, 2014).

### 1.1.3 - Distribuição

#### 1.1.3.1 - A leptospirose no Mundo

A distribuição da leptospirose no mundo é abrangente, apresentando diferentes níveis de prevalência consoante a região. A incidência da doença é mais elevada em países tropicais do que em regiões temperadas (**Quadro 1.1.**) (Costa *et al.*, 2015), apesar de se verificar a transmissão quer em países industrializados quer em países de baixo rendimento (Hartskeerl *et al.*, 2011). Em comum têm o facto de subnotificarem a doença, quer seja pela dificuldade num rápido e assertivo diagnóstico, quer pela falta de conhecimento ou consciencialização por parte da população (Bharti *et al.*, 2003; Farrar *et al.*, 2014).

**Quadro 1.1.** Média anual do número de casos de leptospirose, por 100 000 habitantes, reportados desde Janeiro de 1970 a Outubro de 2008 em regiões tropicais e temperadas. (*Adaptado de Costa et al., 2015*)

	Morbilidade $\bar{x}$ (% $\infty\infty\infty$ )
Região tropical	50 (63% $\infty\infty\infty$ )
Região temperada	30 (37% $\infty\infty\infty$ )
Total	80 (100% $\infty\infty\infty$ )

A distribuição dos diferentes serovares em cada região está dependente das espécies de animais que a habitam, bem como dos serovares presentes no seu organismo. Contudo, as condições ambientais e as ocupações da população (por exemplo, a agricultura) também representam um importante papel na manutenção dos serovares existentes num determinado meio (Bharti *et al.*, 2003).

Outra questão a considerar na manutenção da bactéria é a apetência dos diferentes serovares por determinadas espécies de mamíferos, numa dada região. Apesar desta predisposição ser conhecida, há estudos que demonstram a possibilidade de ocorrer variações, consoante a região, tendo-se comprovado a existência de diferentes serovares a infetar uma determinada espécie de mamífero, em zonas geográficas distintas. Um exemplo claro é o pequeno mangusto indiano (*Herpestes auro punctatus*), o qual mantém os serovares Sejroe e Icterohaemorrhagiae no Hawai, Icterohaemorrhagiae e Djatzi em Porto Rico, Icterohaemorrhagiae e Jules na Jamaica e o serovar Canicola em Trinidad (Alexander *et al.*, 1963; Sulzer, 1975; Tomich, 1979; Everard *et al.*, 1980; Bharti *et al.*, 2003).

Importa também referir a relevância que as comunidades isoladas de mamíferos têm para a manutenção de serovares menos comuns, como é o caso do serovar Bim, pelo rato doméstico (*Mus musculus*), nos Barbados (Matthias *et al.*, 2002; Bharti *et al.*, 2003).

A leptospirose foi inicialmente considerada uma doença ocupacional, a qual estaria maioritariamente associada a determinadas atividades profissionais, tais como, extração de minério, manutenção de esgoto, criação e abate de gado, medicina veterinária e atividades militares (Bharti *et al.*, 2003; Fauci *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2013). Contudo, com o tempo, surgiram medidas de proteção específicas para estes grupos, as quais contribuíram para a diminuição do risco, inicialmente elevado. Desta forma, a maior parte dos casos que ocorrem em países desenvolvidos estão relacionados com condições precárias de higiene, ou com a prática de atividades recreacionais que envolvam a imersão em água (St John *et al.*, 2000; Bharti *et al.*, 2003).

Em regiões tropicais, a prática de certas atividades laborais, como a agricultura, ainda constitui um risco importante para a transmissão da bactéria (**Figura 1.4.**). Quanto ao risco de exposição por parte da população em geral, está comumente associado à prática das atividades quotidianas em condições de higiene precária (**Figura 1.5.**), bem como à ocorrência de fortes chuvas sazonais (Bharti *et al.*, 2003; WHO, 2003; Fauci *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2013).

A maioria dos casos de leptospirose ocorre no gênero masculino, com uma maior incidência durante os meses de Verão e Outono, no caso dos países desenvolvidos, e na estação das chuvas, em regiões tropicais (Fauci *et al.*, 2008).

Um fator que se tem tornado cada vez mais importante no que diz respeito à transmissão das leptospirosas, é a predisposição para o surgimento de surtos após a prática de eventos desportivos, tais como canoagem, *windsurf*, natação e esqui aquático (Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014). Em 1998, após um triatlo em Illinois, nos EUA, surgiu um surto de leptospirose entre os participantes, o qual foi explicado pela chuva intensa que se fez sentir dias antes da competição. A contaminação do lago poderá ter ocorrido devido ao escoamento dos produtos de agricultura, existente na região circundante (Morgan *et al.*, 2002). Mais tarde, em 2000, a natação foi o fator de risco determinante para que 80 participantes de uma prova de resistência, a decorrer na Malásia, contraíssem a doença (Fauci *et al.*, 2008).



**Figura 1.4.** - Trabalhadores numa plantação de arroz em Colombo, Sri Lanka.  
(Adaptado de <http://www.irinnews.org/report/82011/sri-lanka-rise-rat-fever-among-farmers-causes-concern>)

Ao longo da história começaram a surgir dados precisos acerca da distribuição da leptospirose no mundo. Em 1999, foram notificados mais de 500 000 casos na China, com uma taxa de mortalidade a variar entre 0,9% e 7,9%. Nesse mesmo ano, o Brasil apresentou 28 000 novos casos da doença. Todos os anos, o *Centre for Diseases Control*

(CDC) é notificado da existência de 40 a 120 novos casos de leptospirose nos EUA, algo que se julga ser uma subestimativa da dimensão real de infetados nesse país (Fauci *et al.*, 2008).



**Figura 1.5.** - Contexto epidemiológico de transmissão das leptospirosas na região do Peru. **A-** Pessoa a andar descalça numa zona de desflorestação da Amazônia, junto da aldeia de Iquitos. **B-** Um lago na periferia da aldeia de Iquitos usado pela população para tomar banho. **C-** Poço usado pela população para a água de consumo. **D-** Lavagem de roupa a ser efetuada num poço próximo de Iquitos.

(Adaptado de Bharti *et al.*, 2003)

Atualmente, estima-se que, em cada ano, existam um milhão de pessoas afetadas pela doença por todo o mundo. No entanto, acredita-se que este número seja novamente uma subestimativa do problema real (WHO, 2010; Schneider *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2015).

Ao longo dos anos, também o número de casos associados a desastres naturais e cheias tem sido divulgado, com as mais importantes epidemias a ocorrer a partir de 1995, na Nicarágua. Seguiu-se o Peru e Equador (1998), Orissa (1999), Malásia (2000),

Jacarta (2002), Mumbai (2000 e 2005) e Filipinas (2009) (**Figura 1.6.**) (Schneider *et al.*, 2013).

Analisando-se os alertas mundiais de leptospirose, no período entre 2007 e 2013, percebe-se que 67% são provenientes do continente Americano, com especial incidência no Brasil, Nicarágua e Argentina (Schneider *et al.*, 2013). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas, nesta região, sejam afetadas por tempestades e inundações, as quais aumentam o risco de transmissão da bactéria. Apesar disso, apenas metade das cidades reportaram casos de leptospirose, o que sugere o facto de nem toda a população estar consciencializada para esta doença, como um problema de saúde pública (Schneider *et al.*, 2012; 2013).



**Figura 1.6.** - Cheias nas Filipinas, em 2009, causando um surto de leptospirose na população.

(Adaptado de <http://www.healthmap.org/site/diseasedaily/article/leptospirosis-outbreak-follows-flooding-philippines-1412>)

O continente Africano é o que apresenta uma percentagem mais baixa de todos os casos reportados a nível global (1%), sendo um indicador sugestivo da dificuldade em se proceder a um diagnóstico efetivo da doença. Quanto ao panorama no restante globo, sabe-se que a região Oeste do Pacífico apresenta 15% dos casos reportados a nível mundial, seguido do Sueste da Ásia (14%) e Europa (8%) (Schneider *et al.*, 2013).

A doença tem um importante impacto social e económico, maioritariamente nas populações vulneráveis. A principal consequência está aliada à necessidade de hospitalização, a qual implica o afastamento temporário do trabalhador da sua fonte de

rendimentos. No entanto, importa referir o impacto económico que a leptospirose animal causa ao setor agro-pecuário, verificando-se em muitos casos o aumento de abortos e a diminuição da produção de leite (Acha *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2013).

Apesar da leptospirose ser uma doença negligenciada a nível global, ela continua a estar entre as dez infecções mais reportadas à OMS, através da plataforma *Event Management System* (EMS) (Schneider *et al.*, 2013).

### 1.1.3.2 - A leptospirose em Portugal

Em Portugal, a espécie *L. interrogans* s.l. foi isolada pela primeira vez em 1931, mas só em 1980 começou a ser amplamente estudada. Ao longo do tempo, tem-se verificado que o número de casos reportados em Portugal Continental mantém-se baixo, quando comparado com algumas ilhas dos Açores (São Miguel e Terceira), onde a gravidade da doença está na origem de um número considerável de episódios fatais (Vieira *et al.*, 2006).

Um estudo retrospectivo efetuado na população do Arquipélago dos Açores e Portugal Continental, cobrindo um período temporal de 18 anos (1986-2003), foi fundamental para o entendimento da doença como um problema de saúde pública em expansão (Vieira *et al.*, 2006).

Com este estudo foi possível verificar a ocorrência de subnotificação associada a esta doença, quando, a partir de 1997, se verificou um aumento significativo no número de casos, facto explicado pelo surgimento do Sistema de Notificação Espontânea (SNE) da Direção Geral de Saúde (DGS) (Vieira *et al.*, 2006).

Os Açores obtiveram uma incidência anual média (1992-2003) de 11,1 casos por 100 000 habitantes, colocando a região com um risco de exposição muito semelhante a alguns países tropicais, como é o caso do Tahiti (11,3 casos por 100 000). Este risco é explicado pelo clima semi-tropical e ambiente rural em que vive a população nos Açores, a qual está exposta a agentes passíveis de causar infeção (Vieira *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2010).

O ambiente rural em que vivem os seus habitantes está relacionado com o clima e fertilidade dos solos, fatores estes que favorecem a agricultura nestas ilhas. Desta forma, a maioria da população açoriana mantém, quer em contexto rural como urbano, uma zona de cultivo na proximidade das suas casas (Witmer *et al.*, 2004).

Além da agricultura, a produção de leite e seus derivados é também uma atividade importante nesta região, existindo um número considerável de açorianos que subsistem da criação de gado bovino. Estima-se que o número destes animais, em toda a região dos Açores, seja da ordem dos 200 000, distribuídos por 18 000 famílias, numa média de 20-30 animais em cada uma delas. A proximidade a que o gado bovino se encontra da população é especialmente importante, quando está descrito que a percentagem de animais infetados com leptospiros se situa entre 30%-40% (Witmer *et al.*, 2004).

O estudo demonstrou também uma transmissão sazonal das leptospiros, facto explicado pelos elevados níveis de humidade nos meses de Inverno na região dos Açores, onde a precipitação é regular e abundante em todo o território (Witmer *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2006).

A predominância da infeção que o género masculino parece demonstrar em zonas temperadas, continua a verificar-se em Portugal (especialmente em São Miguel e Terceira), por toda a faixa etária que compreende os adultos em idade ativa. Esta observação é explicada pelos fatores de risco presentes no quotidiano laboral do homem adulto, o qual vive maioritariamente do setor agro-pecuário, onde proliferam roedores (Vieira *et al.*, 2006). Estes são uma importante fonte de transmissão da doença à população, como ficou comprovado através do isolamento da bactéria em 53% dos roedores, na ilha de São Miguel, e em 46% na Terceira (Collares-Pereira *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2006).

Um estudo igualmente esclarecedor acerca dos serogrupos predominantes na região dos Açores foi realizado no período de 2006-2008, em doentes do Hospital de São Miguel com quadro sugestivo de leptospirose. Analisando-se estes doentes foi possível identificar os serogrupos Icterohaemorrhagiae e Ballum como os mais

frequentes nesta região (Gonçalves *et al.*, 2010), sendo que os mesmos já haviam sido isolados, anteriormente, nos roedores (Witmer *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2006).

Os fatores de risco existentes nos Açores, aliados à manutenção das leptospiros nos reservatórios animais, favorecem o contacto frequente desta população com o agente infeccioso. Esta constante estimulação do sistema imunitário, por sua vez, mantém um nível constante de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. no organismo, os quais conferem proteção e atenuam sintomas, em caso de reinfeção. Esta é a conclusão obtida através de um estudo retrospectivo realizado em 2011, onde se percebeu que a primeira infeção atuava como vacina nos habitantes desta região (Esteves *et al.*, 2014).

### 1.1.4 - Epidemiologia/Grupos de risco

#### 1.1.4.1 - Grupos de risco de infeção por *Leptospira interrogans* s.l.

O risco de transmissão da bactéria à população está dependente do grau de exposição a que a mesma está sujeita. Desta forma, foi possível identificar vários grupos detentores de um risco mais elevado, o qual pode estar associado à ocupação profissional (trabalhadores agro-pecuários, veterinários, trabalhadores de matadouros ou trabalhadores do saneamento básico), ambiente em que vivem (clima tropical ou predisposição à ocorrência de cheias), ou estilo de vida (praticantes de desportos aquáticos, por exemplo) (**Figura 1.7.**) (Sarkar *et al.*, 2002; Fauci *et al.*, 2008).

Em algumas regiões, a existência destes grupos de risco não é tão clara, nem tão pouco um fator que os distancia da restante população. Esta realidade é sobretudo verificada em regiões rurais, países com condições de higiene precárias, ou zonas onde toda a população contacta com águas contaminadas nas suas atividades diárias (plantação de arroz, por exemplo) (Anagnani *et al.*, 2003; Bharti *et al.*, 2003).

Ao longo do tempo, os grupos profissionais em risco de infeção têm vindo a ser descritos um pouco por todo o mundo, conseguindo-se obter conclusões importantes, as

quais contribuem para a proteção, cada vez mais eficaz, do trabalhador (Bharti *et al.*, 2003).

Em 2003, na região da Índia, um conjunto de doentes de alguns grupos laborais de risco, como veterinários e trabalhadores do setor agro-pecuário, entre outros, foi estudado, a fim de se obter um entendimento acerca da prevalência de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. Este estudo vem no contexto da disseminação das leptospirosas em animais domésticos e pecuários, por toda a região da Índia, mas também no seguimento do baixo número de casos registados neste país, facto sugestivo de um subdiagnóstico (Angnani *et al.*, 2003). As razões são transversais a outras regiões tropicais de baixa renda, as quais parecem demonstrar um défice no conhecimento acerca desta doença, aliado à dificuldade no diagnóstico laboratorial (Bharti *et al.*, 2003; Farrar *et al.*, 2014).



**Figura 1.7.** - Departamento florestal a proceder a uma desinfeção do parque recreacional Jeram Toi, na Malásia, após um mergulho de um estudante ter originado leptospirose fatal.

(Adaptado de <http://www.nst.com.my/news/2016/05/145761/student-dies-leptospirosis-after-dip-jeram-toi-recreation-park>)

O estudo demonstrou que 35,71% dos veterinários e 32% dos trabalhadores do setor agro-pecuário tinham anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. em circulação (Angnani *et al.*, 2003).

Estudos recentes nesta região, procuraram demonstrar quais os principais fatores de risco, na rotina laboral destes trabalhadores, os quais poderão estar na origem de uma possível contaminação. A exposição a água contaminada ou lama representa, assim, um

risco significativo, o qual pode elevar-se, caso o trabalhador tenha um corte ou ferida na zona do corpo onde o contacto foi estabelecido. A exposição direta a animais, principalmente a roedores, representa também um fator de risco na transmissão da infecção (Kamath *et al.*, 2014).

Atividades desportivas onde haja um contacto direto com água ou solos são também responsáveis pelos casos reportados desta doença, em todo o mundo. A água e o solo podem ficar contaminados com leptospiras durante meses, elevando o risco do ser humano se infectar acidentalmente, enquanto pratica atividades recreativas, tais como a canoagem. Além das epidemias que ocorreram no passado, por ocasião de competições desportivas, foram descritos casos recentes na Europa, de pessoas infectadas por *L. interrogans* s.l., após a prática de atividades ao ar livre (Fauci *et al.*, 2008; Monahan *et al.*, 2009; Wasinski *et al.*, 2013).

Na França, em 2011, foi reportado um caso de leptospirose num nadador de um lago na região dos Alpes. Mais tarde, associou-se o episódio a outros casos da doença que ocorreram em praticantes de outras modalidades (*kayaking*, *rafting* e pesca), os quais tinham estado neste mesmo lago (Wasinski *et al.*, 2013).

Um ano depois, em 2012, um surto de leptospirose foi descrito num grupo de rapazes, os quais tinham participado, recentemente, num acampamento de escoteiros na periferia de um lago, no Luxemburgo. Confirmou-se que a fonte de infecção teria sido um rato infetado com leptospiras, através da captura de alguns exemplares, os quais continham a bactéria nos rins (Wasinski *et al.*, 2013).

De acordo com um estudo desenvolvido na Alemanha num conjunto de doentes confirmados com leptospirose, compreendendo o período temporal de 1977-2000, observou-se que 30% estavam relacionados com uma exposição ocupacional, 30% com uma exposição recreacional e 37% com uma exposição doméstica. Comprovou-se, adicionalmente, que 31% dos casos eram motivados por um contacto direto com animais, sobretudo ratos e cães (Jansen *et al.*, 2005). Os resultados obtidos neste estudo permitiram aos investigadores demonstrar a importância que a proliferação acentuada de roedores, a par da crescente infecção dos cães, poderá ter no futuro da população.

Adiantam ainda ser expectável o aumento no número de casos de leptospirose neste país (Jansen *et al.*, 2005).

A ocorrência de cheias representa um fator de risco acrescido, em habitantes de regiões tropicais. Os solos afetados pelas cheias podem permanecer contaminados por longos períodos de tempo, aumentando a probabilidade da população ser infetada (**Figura 1.8.**) (Wasinski *et al.*, 2013).



**Figura 1.8.** - Crianças a brincar após a ocorrência de cheias nas Filipinas, em Setembro de 2003. Nas semanas seguintes foram reportados mais de uma centena de casos de leptospirose na região.

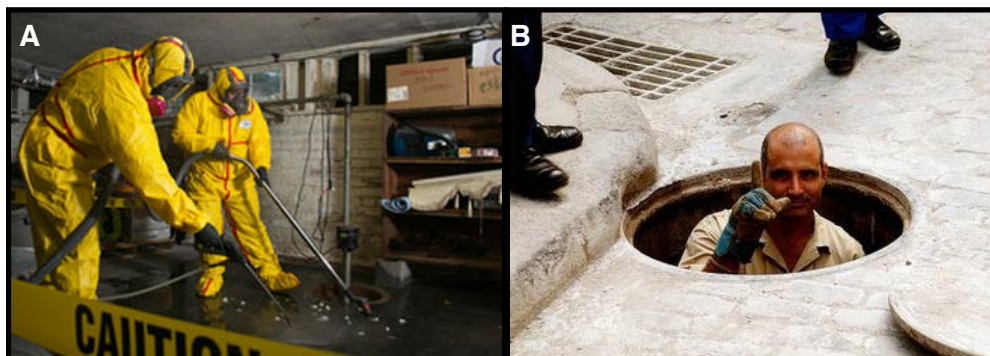
(Adaptado de <http://newsinfo.inquirer.net/503239/over-100-leptospirosis-cases-reported-in-olongapo-after-floods>)

Apesar desta realidade ser particularmente importante em climas tropicais, com as leptospiras a sobreviverem durante um período prolongado de tempo, foi possível, após a ocorrência destes desastres naturais em alguns países da Europa, verificar-se uma percentagem significativa de casos. A República Checa e a Polónia servem-nos de exemplo, quando após as grande cheias, no período entre 1997-2002, os casos diagnosticados de leptospirose aumentaram três vezes (Pappas *et al.*, 2008; Wasinski *et al.*, 2013).

## 1.1.4.2 - Leptospirose em trabalhadores do saneamento básico

Os trabalhadores do saneamento básico são um dos grupos laborais de risco no que respeita à bactéria em estudo (Tiwari, 2008). Este conhecimento foi adquirido ao longo dos anos e vários estudos já demonstraram que a maioria dos casos de infeção acontecem através de roedores, os quais são responsáveis pela contaminação das águas residuais (Serres *et al.*, 1995; López *et al.*, 2015).

No seu quotidiano laboral, os trabalhadores do saneamento básico podem entrar em contacto com águas residuais. Apesar de, atualmente, a utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's), como botas, uniforme ou luvas, estar generalizada pelos países industrializados, os trabalhadores continuam susceptíveis a uma exposição, quer seja acidental ou por negligência (**Figura 1.9.**) (Serres *et al.*, 1995; Tiwari, 2008).



**Figura 1.9.** - Trabalhadores do Saneamento Básico. **A-** Trabalhadores de uma empresa privada de limpeza de esgotos domésticos nos Estados Unidos. **B-** Trabalhador do Saneamento Básico em Havana, Cuba.

(Adaptado de A- [http://www.bestcleanup.com/?\\_escaped\\_fragment\\_=blk-wtr/ccd5;](http://www.bestcleanup.com/?_escaped_fragment_=blk-wtr/ccd5;)

B- <http://ens-newswire.com/2012/10/03/sewage-troubles-in-havana/>)

Em muitos países industrializados as operações encontram-se mecanizadas, mas a manutenção das águas favorece a ocorrência de aerossóis, os quais são um fator de risco na transmissão de leptopiras aos trabalhadores expostos. Para executar trabalhos mecanizados, a generalidade dos trabalhadores não usa máscara que proteja a face, o que favorece o contacto dos aerossóis com a superfície cutânea, vias respiratórias e mucosas (Serres *et al.*, 1995; Tiwari, 2008).

Um estudo realizado no Canadá, pesquisando anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. em 76 trabalhadores do saneamento básico exercendo funções de limpeza de esgotos, demonstrou a presença dos mesmos em 12% dos participantes. Apesar deste resultado, nenhum dos trabalhadores com anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. referiu ter sentido sintomatologia típica da doença, nos cinco anos anteriores ao estudo. Não foi verificada qualquer correlação entre os anos de trabalho e a observação de anticorpos no sangue destes trabalhadores (Serres *et al.*, 1995).

No sul do Brasil, um estudo foi igualmente desenvolvido em trabalhadores do saneamento básico, englobando áreas profissionais mais abrangentes, tais como, águas de abastecimento, drenagem, águas residuais, resíduos sólidos e limpeza pública. Este estudo foi executado num contexto laboral onde era notória a ausência de recursos tecnológicos e equipamentos de segurança dos trabalhadores. Estes, por sua vez, eram mal remunerados e apresentavam um déficit de qualificações literárias (Almeida *et al.*, 1994). Num contexto geral, o estudo demonstrou a presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. em 10,4% dos trabalhadores. Analisando estes resultados por área profissional, obteve-se a seguinte distribuição: 16,7% em trabalhadores das águas de abastecimento, 16,2% em águas residuais, 13,6% na recolha de resíduos sólidos, 11,4% na drenagem e 7,6% na limpeza pública. Analisando-se as amostras de sangue que demonstraram a presença de anticorpos, foi também possível determinar os serovares predominantes (Castelonis e Australis) (Almeida *et al.*, 1994).

Este estudo não foi pioneiro no Brasil, no entanto, foi a primeira vez que se obtiveram percentagens tão altas de positividade, no que respeita ao setor laboral em questão. Com os resultados obtidos foi possível determinar com segurança o risco que estes trabalhadores estão sujeitos no seu quotidiano laboral, manuseando elementos do meio ambiente, suscetíveis de serem contaminados pela urina de roedores (Almeida *et al.*, 1994). Em relação ao risco atribuível a cada área profissional, não se verificou predominância estatística de uma dada área sobre as restantes, concluindo-se que todas as atividades integrantes no setor do saneamento básico representam um risco semelhante de infeção para os trabalhadores (Almeida *et al.*, 1994).

Um estudo recente, elaborado num município da Malásia, focou-se nos trabalhadores em contato com resíduos sólidos, quer seja na recolha ou tratamento dos mesmos. Os resultados obtidos mostraram, novamente, uma percentagem significativa de trabalhadores com anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. em circulação (34,8%). Todos os casos positivos foram assintomáticos, o que vem reforçar a questão da elevada prevalência de casos subdiagnosticados (Samsudin *et al.*, 2015).

Os estudos anteriormente descritos têm em comum o facto de serem originários de zonas com prevalência significativa de casos de leptospirose, o que eleva o risco de uma possível exposição por parte destes trabalhadores (Almeida *et al.*, 1994; Serres *et al.*, 1995; Samsudin *et al.*, 2015).

### 1.1.5 - Patogenicidade no ser humano

#### 1.1.5.1 - Patogenia

Depois das leptospiros penetrarem no organismo do hospedeiro, começam a desenvolver-se, disseminando-se por todos os órgãos (Farrar *et al.*, 2014). A multiplicação é feita essencialmente no sangue e nos tecidos, tornando possível a sua deteção durante os primeiros 4 a 10 dias da infeção. O isolamento do microorganismo pode ser feito no sangue, mas também no Líquido Céfalo-Raquidiano (LCR), este último apresentando pleocitose, na maioria dos casos. Apesar de ser possível identificar a bactéria nesta fase aguda da infeção, os sintomas de meningite são apenas observáveis numa pequena fração dos doentes (Fauci *et al.*, 2008).

As leptospiros são também responsáveis pelo dano na parede dos pequenos vasos sanguíneos, o que origina vasculite, associada a hemorragias (Mohammed *et al.*, 2011). A vasculite é uma manifestação importante da doença, a qual é conhecida pelas suas propriedades patogénicas de aderência a superfícies celulares, causando toxicidade celular (Ballard *et al.*, 1986; Levett, 2001; Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

Apesar das leptospiros se localizarem preferencialmente nos rins, o fígado também é comumente acometido, entre outros órgãos do hospedeiro. Quando estas

infetam o rim, posicionam-se no interstício, túbulos renais e lúmen tubular, dando origem a nefrite intersticial e necrose tubular (Levett, 2001; Mohammed *et al.*, 2011). A alteração da permeabilidade capilar daí resultante, poderá levar ao desenvolvimento de insuficiência renal (Penna *et al.*, 1963; Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

Quanto ao acometimento do fígado, ele provoca geralmente uma necrose centrolobular (Mohammed *et al.*, 2011), paralelamente a uma proliferação das células de Kupffer. Importa referir que os casos em que se verifica necrose hepática grave não são típicos de leptospirose (de Brito *et al.*, 1967; Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

No que respeita ao envolvimento pulmonar (Mohammed *et al.*, 2011), este está associado a hemorragias, sendo característica da doença em questão (Areán, 1962; Zaki *et al.*, 1996). Já o envolvimento do músculo esquelético é responsável pela formação de edema, vacuolização das miofibrilas e necrose focal (Fauci *et al.*, 2008).

Quando se trata de uma leptospirose grave, a vasculite pode originar um aumento da permeabilidade capilar a nível da microcirculação, o que provoca um extravasamento de líquido e hipovolémia (Areán, 1962; Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

A resposta imunológica do hospedeiro, através de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., faz com que a bactéria seja eliminada de quase todo o organismo, exceto olhos, túbulos renais proximais e, geralmente, cérebro, onde podem permanecer durante semanas a meses. Esta mesma resposta imunológica sistémica, geralmente eficaz a eliminar as leptospiras, pode provocar um processo inflamatório, o qual é sintomático para o hospedeiro. Um exemplo disso é o aparecimento de meningite quando os títulos de anticorpos se elevam (Tong *et al.*, 1971; Fauci *et al.*, 2008).

### 1.1.5.2 - Imunologia

Desde a fase inicial da infeção que a bactéria consegue evadir-se à resposta imunitária, fazendo-o através de mecanismos ainda pouco claros. As leptospiras demonstram um certo grau de resistência à via alternativa do complemento, especificamente no que diz respeito ao factor H, factor regulador do complemento, entre

outros da mesma família. A resistência a certos reguladores do complemento processa-se através de ligantes, como a proteína endostatina-Like A, presente nas leptospiros (Farrar *et al.*, 2014).

Estudos recentes clarificaram algumas questões respeitantes ao processo de resistência das leptospiros, demonstrando que as espécies patogénicas têm a capacidade de se ligar ao plasminogénio humano (PLG) (Evangelista *et al.*, 2010). Além disso, a atividade da plasmina na sua superfície interfere com o C3b do complemento e com o depósito de IgG (Farrar *et al.*, 2014).

As leptospiros patogénicas também contêm polissacáridos, os quais têm um papel importante na ativação dos receptores Toll-Like 2 (TLR2), estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais são responsáveis pelos danos típicos nos tecidos dos órgãos infetados (Farrar *et al.*, 2014; Marinho *et al.*, 2014).

Analisando as características que distinguem uma espécie patogénica de uma saprófita (*L. biflexa*), foi possível dividir os processos patogénicos em três componentes: i) adesinas; ii) evasão às defesas do hospedeiro por fagocitose; e iii) resistência ao complemento. Dentro do capítulo das adesinas, as mais relevantes no processo patogénico são os proteoglicanos, 36kDa (proteína de superfície de membrana), proteínas ligantes da laminina (Lsa24 e Lsa21) e proteínas Imunoglobulina-Like (proteínas Lig A, Lig B e Lig C) (Evangelista *et al.*, 2010; Farrar *et al.*, 2014; Marinho *et al.*, 2014).

No caso específico das leptospiros patogénicas são as lipoproteínas da superfície externa da membrana, como a Lip32 ou Loa22, que têm um papel mais ativo na virulência da bactéria, enquanto os lipopolissacáridos (LPS) são responsáveis por uma baixa endotoxicidade (Evangelista *et al.*, 2010; Farrar *et al.*, 2014; Marinho *et al.*, 2014).

Os componentes patogénicos acima enunciados são os responsáveis pelos processos inflamatórios que ocorrem durante a infeção, causando os danos teciduais nos órgãos afetados (Marinho *et al.*, 2014). Apesar do processo inflamatório não ser intenso numa fase inicial da doença, é possível que ocorra dano hepatocelular e tubular (Farrar *et al.*, 2014).

### 1.1.5.3 - Manifestações clínicas e sintomatologia

A espécie *L. interrogans* s.l. tem um período de incubação médio de 5-14 dias, que pode variar até 2-30 dias. A clínica da doença varia de caso para caso, podendo apresentar-se com um quadro assintomático, ou na sua forma mais grave, a qual pode ser fatal para o doente (Levett, 2001; Farrar *et al.*, 2014). Dentro dos casos sintomáticos, estes podem variar na gravidade da sintomatologia, sendo que a forma leve, geralmente anictérica, apresenta-se como a mais comum (mais de 90% dos casos) (Fauci *et al.*, 2008).

Em área endêmica, grande parte das manifestações são assintomáticas, sendo que a leptospirose, nestes indivíduos sem doença aparente, é detectada através da presença de anticorpos específicos no sangue (Farrar *et al.*, 2014).

A leptospirose provoca, por vezes, um quadro febril agudo indiferenciado, sem que se saiba a causa da sua ocorrência. Estudos efetuados nas ilhas Seicheles demonstraram que 37% dos inquiridos com história de infeção no passado, não apresentaram quaisquer sintomas típicos da doença, mas unicamente um quadro febril agudo, o mesmo tendo acontecido a 9% dos inquiridos, com história de infeção recente (Yersin *et al.*, 1998; Farrar *et al.*, 2014).

Numa pequena percentagem dos indivíduos com quadro febril agudo, outros sintomas inespecíficos podem surgir também, tais como: cefaleia, mialgia, dores nas costas e abdómen, calafrios, diarreia, anorexia, *rash* transitório, tosse, dor de garganta, entre outros (Hartskeerl *et al.*, 2011; Farrar *et al.*, 2014).

As razões para a discrepância que se verifica na clínica da doença podem estar relacionadas com o serovar infetante, julgando-se existir uma sintomatologia típica para cada um, assim como diferentes graus de gravidade (Levett, 2001; Hartskeerl *et al.*, 2011). Exemplos que o demonstram são o caso do serovar Bataviae, que apresenta uma predominância no que respeita ao envolvimento neurológico, enquanto o serovar Icterohaemorrhagiae está relacionado com o síndrome hepatorenal (Farrar *et al.*, 2014).

As manifestações clínicas da doença são muitas vezes descritas como um padrão bifásico (Kelley, 1998; Levett, 2001), o qual começa com uma fase leptospirémica

aguda, de sintomatologia não-específica, que dura aproximadamente uma semana, evoluindo para uma fase imune, a qual está associada às complicações inerentes da leptospirose, anteriormente enunciadas (Farrar *et al.*, 2014). A exata distinção entre a primeira fase e a segunda nem sempre é fácil de definir, além de que há a hipótese da segunda nunca chegar a ocorrer, no caso de uma leptospirose leve (Fauci *et al.*, 2008).

O padrão bifásico da doença deve ser considerado no que diz respeito à análise laboratorial, necessária ao diagnóstico, tendo em conta que a resposta imunológica do hospedeiro só vai ser perceptível após a primeira semana de leptospirose (Fauci *et al.*, 2008).

Numa fase inicial da doença, as manifestações clínicas típicas podem estar relacionadas com icterícia, lesão renal aguda, hemorragia (frequentemente pulmonar), meningite asséptica, miocardite e choque (Hartskeerl *et al.*, 2011). Já numa fase tardia, depois de ter ocorrido a invasão da espécie *L. interrogans* s.l. pelo organismo do hospedeiro, com a subsequente resposta imunitária, os sintomas mais importantes estão relacionados com o dano dos órgãos atingidos (Vijayachari *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

A maioria dos casos de leptospirose são, no entanto, em tudo parecidos com uma síndrome gripal, com os indivíduos a apresentarem uma sintomatologia inespecífica, associada a um quadro febril agudo indiferenciado (Farrar *et al.*, 2014).

### 1.1.5.3.1 - Leptospirose anictérica

Como mencionado no parágrafo anterior, a leptospirose pode estar associada a uma sintomatologia típica do vírus *Influenza*, sendo que os doentes reportam frequentemente febre, calafrios, cefaleia intensa, náuseas, vômitos e mialgias. As mialgias localizadas nas costas, abdómen e gêmeos são as manifestações mais comuns de um doente com leptospirose. Quanto à cefaleia, ela é intensa e localiza-se preferencialmente na parte frontal ou retroorbitária, acompanhada algumas vezes por fotofobia e confusão mental (Kelley, 1998; Fauci *et al.*, 2008; Sunil *et al.*, 2016).

Além das manifestações típicas de uma síndrome gripal, existe também a possibilidade de ocorrência de comprometimento pulmonar, o qual é evidenciado geralmente através de dor torácica, tosse e, em alguns casos, hemoptise. (Fauci *et al.*, 2008).

Após uma semana de sintomatologia, a maioria dos doentes torna-se assintomática. No entanto, ao fim de um intervalo de 1-3 dias, alguns casos sofrem uma recidiva, explicada pelo início da segunda fase (imune) (Sunil *et al.*, 2016). Nestes casos, a sintomatologia vai diferir da fase leptospirémica, com os doentes a demonstrarem febre e mialgias menos intensas, as quais duram apenas alguns dias, na maior parte dos casos (Fauci *et al.*, 2008).

Adicionalmente, a meningite asséptica constitui uma das manifestações mais importantes desta segunda fase (Sunil *et al.*, 2016), embora só 15% dos afetados apresentem uma sintomatologia típica, com os restantes a evidenciar apenas pleocitose no LCR. A meningite tem uma duração geralmente curta, de alguns dias, enquanto a pleocitose se estende por duas semanas. Apesar de ser este o período temporal mais comum, existem casos em que se observa meningite asséptica durante semanas e pleocitose durante meses (Levett, 2001; Fauci *et al.*, 2008). Os casos de meningite são, no entanto, mais comuns em crianças do que em adultos (Fauci *et al.*, 2008; Sunil *et al.*, 2016).

A leptospirose anictérica tem uma taxa de mortalidade baixa em todo o mundo, embora possa elevar-se em situações de epidemia, como a que ocorreu na China, onde 2,4% dos afetados morreram com hemorragia pulmonar (Wang *et al.*, 1965; Fauci *et al.*, 2008).

### **1.1.5.3.2 - Síndrome de Weil**

A síndrome de Weil é a forma mais grave de Leptospirose, a qual se traduz por icterícia, disfunção renal, diátese hemorrágica e comprometimento pulmonar (este último evidente em muitos doentes). Ao contrário do que se verifica numa leptospirose

anicterica, os indivíduos com síndrome de Weil têm uma taxa de mortalidade significativamente mais alta, a qual varia entre 5-15% (Fauci *et al.*, 2008; Levett, 2011).

A forma mais grave, quando observada na Europa, está muito associada aos serovares *Icterohaemorrhagiae* ou *Copenhageni*, no entanto, podem existir exceções. O início da doença é em tudo semelhante a uma leptospirose anictérica, diferindo na sintomatologia após quatro a nove dias. Após este período de tempo, o indivíduo infectado começa a manifestar icterícia, disfunção renal e vascular. A icterícia associada ao síndrome de Weil é profunda, conferindo um tom de pele amarelo-alaranjado ao indivíduo. No entanto, está estudado que não tem relação evidente com uma possível necrose hepática (Abdulkader, 1997; Fauci *et al.*, 2008; Levett, 2011).

Quando se trata de uma leptospirose severa, ela está associada a um envolvimento multi-sistêmico (Levett, 2011), sendo que 60% dos doentes desenvolvem as seguintes complicações durante o curso da doença: hipotensão, disfunção hepática, comprometimento orgânico (rins, pulmões, coração, sistema vascular, olhos e sistema neurológico), hemorragias, entre outras complicações (Farrar *et al.*, 2014).

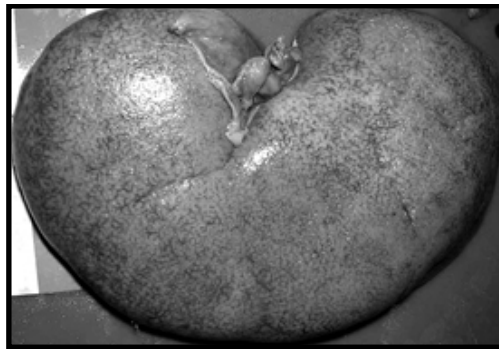
A ocorrência de hipotensão é um sinal comum de leptospirose, acontecendo em 45% dos casos. As causas estão sobretudo associadas a hipovolêmia, resultante da vasodilatação e do aumento na permeabilidade dos capilares. A vasodilatação, por sua vez, é uma consequência da febre alta, desregulação microvascular e resposta inflamatória do organismo aos elevados níveis de bacteriemia (Niwattayakul *et al.*, 2002; Farrar *et al.*, 2014).

A disfunção hepática é perceptível pela icterícia observada nos casos severos da doença, sendo que a proporção de doentes com este sintoma varia entre os 20% e os 70%. A sua ocorrência está relacionada com a colestase, e não com dano hepático, o que pode ser comprovado laboratorialmente. A icterícia ocorre geralmente no período entre três a seis dias depois do início da doença. A acompanhar este sintoma está também o aumento pronunciado do fígado, o qual pode acontecer nos casos mais severos (Farrar *et al.*, 2014; Wysocki *et al.*, 2014).

As complicações renais ocorrem nos casos graves de leptospirose, sendo uma importante manifestação da doença. A insuficiência renal encontra-se normalmente

acompanhada de icterícia, manifestando-se entre três a quatro dias do início da doença (**Figura 1.10.**) (Abdulkader, 1997; Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

O comprometimento pulmonar está presente em 20%-70% dos casos e na sua maioria traduz-se numa sintomatologia moderada (Farrar *et al.*, 2014). No entanto, o nível de gravidade pode variar, originando consequências mais graves, as quais podem levar à morte (Levett, 2001). A ocorrência de hemorragias pulmonares é um indicador da gravidade da doença e do prognóstico do doente (Vinetz, 2001; Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).



**Figura 1.10.** - Rim extraído durante uma autópsia, mostrando aumento de volume e com congestão capilar causada por leptospirose.  
(Adaptado de Rupani *et al.*, 2006)

No que respeita ao envolvimento cardíaco, este é comum, mas pode passar despercebido (Levett, 2001). O electrocardiograma (ECG) é útil na deteção das arritmias presentes no decurso da doença, que podem variar no seu tipo (Rajiv *et al.*, 1996; Farrar *et al.*, 2014).

O derrame conjuntival com hemorragia subconjuntival é uma complicação ocular importante em doentes com leptospirose. Contudo, manifestações mais sérias são hemorragias da retina ou uveíte, as quais podem originar distúrbios oculares a longo prazo (Martins *et al.*, 1998; Levett, 2001; Farrar *et al.*, 2014).

Em termos neurológicos, sabe-se que existem diferentes graus de comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC) durante a leptospirose. A forma mais comum é a meningite linfocítica asséptica que está presente em 11-25% dos

doentes. Nestes casos, a bactéria pode ser isolada do LCR cinco dias após o surgimento de febre (Farrar *et al.*, 2014).

Para além das hemorragias que se verificam ao nível dos pulmões, existem outras áreas do corpo onde estas também acontecem, como na região gastrointestinal, nas gengivas, ou na pele. Esta última na forma de petéquias ou equimoses (Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

Concluindo, o quadro clínico típico do Síndrome de Weill caracteriza-se por icterícia, disfunção renal e hemorragias, as quais acontecem especialmente ao nível dos pulmões (Levett, 2001; Farrar *et al.*, 2014).

### **1.1.6 - Diagnóstico**

#### **1.1.6.1 - Diagnóstico Diferencial**

A leptospirose deve fazer parte do diagnóstico diferencial num doente que apresente um conjunto de sintomas típicos da doença, tais como, síndrome febril agudo, icterícia e insuficiência renal (Dutta *et al.*, 2005; Farrar *et al.*, 2014). A probabilidade de se confirmar a infeção aumenta quando há história prévia de exposição a água contaminada ou contacto direto com animais, quer seja em contexto ocupacional ou recreacional (Farrar *et al.*, 2014).

O surgimento de vários casos com sintomas semelhantes, numa determinada comunidade, poderá ser um indicador da ocorrência de um surto ou epidemia. No entanto, há que ter em atenção o quão inespecíficos estes sintomas podem ser, havendo a possibilidade de não se tratar de leptospirose (Farrar *et al.*, 2014). Este facto é especialmente importante nos países tropicais, onde outras doenças, como a malária e o dengue, são igualmente endémicas (Vinetz, 2001; Dutta *et al.*, 2005; Fauci *et al.*, 2008). Esta evidência foi descrita num estudo elaborado nos Barbados, tendo-se verificado a ocorrência de subdiagnóstico associado ao dengue (Levett *et al.*, 2000). Nesta região, o diagnóstico diferencial da leptospirose inclui, para além das referidas, outras doenças,

como febre tifóide, hepatite viral e a seroconversão do vírus da Imunodeficiência Humana (Levett *et al.*, 2000).

Como a leptospirose é uma doença existente em todo o mundo, o seu diagnóstico diferencial varia de acordo com a região e os sintomas clínicos observados no doente (Dutta *et al.*, 2005; Izurieta *et al.*, 2008). Assim, na Europa, aquando a ocorrência de síndrome febril agudo, o diagnóstico diferencial está associado a um síndrome viral benigno (febre entérica, *Influenza*), enquanto nos casos mais graves, são consideradas a meningite e a sépsis (Farrar *et al.*, 2014).

A possibilidade de co-infeções também representa um problema em algumas regiões do globo, dificultando, em muitos casos, o diagnóstico. A infeção por *Hantavirus* é um exemplo, por apresentar características epidemiológicas e clínicas semelhantes à leptospirose. Este vírus é transmitido ao ser humano através do contacto com roedores e tem uma sintomatologia associada a febre hemorrágica, com ocorrência de síndrome renal (Farrar *et al.*, 2014).

### 1.1.6.2 - Perfil hematológico

O achado hematológico mais relevante em doentes com leptospirose é a observação de anemia, especialmente nos casos severos. Esta surge num contexto de hemorragia e hemólise. A contagem de glóbulos brancos pode estar aumentada em 50% dos casos, com um número de neutrófilos bastante superior. Esta ocorrência poderá fazer-se acompanhar de um aumento na proteína C reativa (PCR) e da velocidade de sedimentação eritrócitaria (VS) . Um importante indicador hematológico de gravidade da doença é o desenvolvimento de trombocitopenia, a qual está associada a um risco aumentado de hemorragia (Farrar *et al.*, 2014).

### 1.1.6.3 - Diagnóstico Laboratorial

#### 1.1.6.3.1 - Exame microscópico

As leptospiros são visualizadas apenas ao microscópio de fundo escuro (**Figura 1.11.**) e/ou de contraste de fase, podendo pesquisar-se a sua presença num produto biológico, como sangue, urina ou LCR. A utilização de métodos diretos só é possível durante o período de leptospirémia, enquanto a bactéria se encontra em circulação no sangue, o que inviabiliza a realização deste exame após a primeira semana de sintomatologia (Levett, 2001).

Em microscópio de fundo escuro, para que seja visível um microorganismo por campo são necessárias cerca de  $10^4$  leptospiros/mL de sangue, o que representa uma desvantagem do método (Turner *et al.*, 1970). Com os avanços na metodologia, surgiram novos métodos, como o *buffy coat* quantitativo, o qual tem demonstrado uma maior sensibilidade, reduzindo o número de células necessárias para  $10^3$  leptospiros/mL de sangue (Levett, 2001).



**Figura 1.11.** - Leptospiros em microscopia de fundo escuro.  
(Adaptado de <http://www.austincc.edu/microbio/2704x/li.htm>)

Apesar da microscopia de fundo escuro ser a melhor opção no que respeita à visualização de leptospiros no sangue, as desvantagens associadas a este método conferem-lhe uma certa inutilidade quanto à aplicação na rotina de laboratório. Para além de ser necessário garantir um número específico de leptospiros na amostra do

doente, como enunciado acima, impõe-se também a questão da presença de artefactos nas preparações, os quais podem originar falsos positivos, sobretudo se não se dispuser de técnicos preparados e treinados (Turner *et al.*, 1970).

### 1.1.6.3.2 - Cultura e Isolamento

A leptospirémia surge antes dos primeiros sintomas se verificarem, persistindo até uma semana após início de sintomatologia aguda adversa (Levett, 2001). Desta forma, o diagnóstico de leptospirose por cultura, só é possível caso o isolamento seja feito no início da infeção, preferencialmente até cinco dias após o surgimento da sintomatologia (Wuthiekanun *et al.*, 2007; Farrar *et al.*, 2014).

O isolamento deve ser realizado a partir do sangue ou do LCR do doente (Fauci *et al.*, 2008), de preferência antes do início da terapêutica, de forma a evitar um crescimento diminuído ou inexistente da bactéria, o que favorece um diagnóstico erróneo da mesma (Farrar *et al.*, 2014).

Isolamentos através da urina não são recomendados, sendo o principal motivo o facto da leptospiúria só ocorrer na segunda semana após o surgimento dos sintomas. Nesse período é expectável que um antibiótico já esteja a ser administrado ao doente, interferindo, assim, no crescimento das leptospiras em cultura. Na segunda semana, também os anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. já se encontram em circulação, permitindo a realização de um teste serológico (Farrar *et al.*, 2014).

O meio recomendado para o seu isolamento é o semi-sólido *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH) (Levett, 2001; Wuthiekanun *et al.*, 2007), apesar de, em estudos recentes, o LVW *agar* ter demonstrado eficácia no crescimento rápido das leptospiras (Wuthiekanun *et al.*, 2013). Estas são incubadas numa atmosfera isenta de CO<sub>2</sub>, a temperaturas que rondam 28°C-30°C, examinando-se semanalmente o seu crescimento através de microscopia de fundo escuro (Levett, 2001; Farrar *et al.*, 2014).

### 1.1.6.3.3 - Testes serológicos

Atualmente, os métodos serológicos são os mais utilizados no diagnóstico da doença. Os anticorpos anti-*Leptospira interrogans* s.l. surgem entre cinco a sete dias após o início dos sintomas, inviabilizando a realização de qualquer teste serológico na fase inicial da infecção (Levett, 2001).

O método serológico de referência no diagnóstico da leptospirose continua a ser o Teste de Aglutinação Microscópico (TAM), ainda hoje preconizado pela OMS, que é o único que permite determinar o serovar responsável pela infecção (Farrar *et al.*, 2014). Este teste consiste numa reação antigénio-anticorpo entre o soro do doente e uma suspensão de antigénios vivos de cada serovar de, pelo menos, 23 serogrupos de *L. interrogans* s.l. Depois de um período de incubação (duas horas), pesquisa-se ao microscópio a ocorrência de aglutinação, determinando-se qual o título para cada um dos antigénios (serovares/estirpes) utilizados. A leitura faz-se através de microscópio de fundo escuro, verificando-se qual o maior título para o qual se obtém 50% de aglutinação (Levett, 2001). O título a partir do qual se considera um resultado positivo varia de acordo com a região, no entanto, a OMS considera o limiar de positividade em 1:100 (Levett, 2001; Esteves *et al.*, 2014).

Para que um resultado seja confirmado, devem ser testadas duas amostras de soro do doente para acompanhamento da cinética dos anticorpos específicos. Se a primeira amostra for analisada numa fase aguda, é recomendado que se proceda à segunda análise após 10-14 dias, dando tempo para que a seroconversão ocorra (Levett, 2001).

Os títulos de anticorpos logo após seroconversão são significativamente altos, decrescendo ao longo do tempo (meses a anos), caso o indivíduo não volte a ser exposto ao agente (Levett, 2001).

A bateria de antigénios da TAM deve conter serovares representativos de todos os serogrupos existentes, assegurando também a presença da maioria dos serovares prevalentes na região (Fauci *et al.*, 2008; Levett, 2011). Este teste requer que haja um

controle e manutenção rigorosos da bateria de antígenos, o que só é possível em laboratórios especializados e referenciados (Fauci *et al.*, 2008).

Devido à complexidade na realização da TAM, outros testes serológicos são utilizados, como são exemplos os testes rápidos (macro aglutinação sobre lâmina) de que o teste de aglutinação macroscópica (MACROLepto) é um exemplo, entre outros. O MACROLepto é assim, um dos testes de aglutinação em lâmina, concebido e manufaturado pelo Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (IHMT/UNL), inicialmente para permitir uma primeira abordagem diagnóstica de leptospirose, no Arquipélago dos Açores, sendo hoje também utilizado na região continental do país. Contudo, a impossibilidade na distinção do serovar em causa confere a este teste o propósito de *screening*. Desta forma, a presença de aglutinação, requer sempre uma confirmação pela TAM (Farrar *et al.*, 2014).

O fundamento do MACROLepto está relacionado com a ocorrência de aglutinação entre o antígeno e o anticorpo, que se encontra no soro do doente. A reação ocorre em poucos minutos e é facilmente visível, sem necessidade de recorrer a microscópio ou a laboratórios especializados. Pela simplicidade na execução e interpretação, quando comparada à TAM, o MACROLepto torna-se ideal em locais com escassez de recursos, quer de laboratórios quer humanos (Vieira, 2006; Carreira, 2009).

Outros testes, semelhantes ao MACROLepto quanto à sensibilidade e especificidade dos resultados, são a Imunocromatografia, Aglutinação em Microcápsula e Aglutinação em Látex (Levett, 2001).

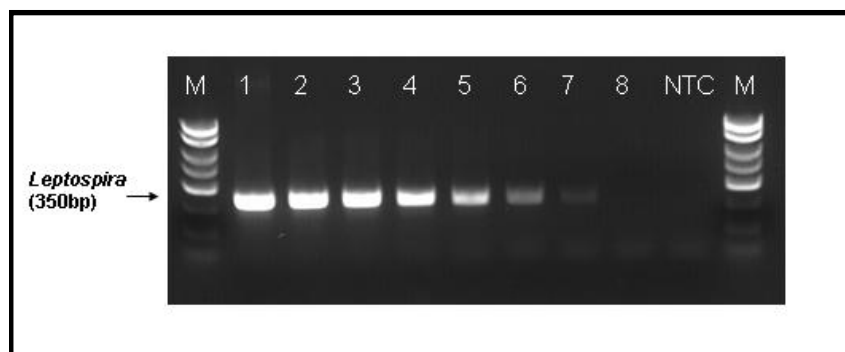
### **1.1.6.3.4 - Métodos moleculares**

Com a evolução dos métodos moleculares, a deteção do DNA leptospírico em material biológico tornou-se possível. A técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) representou um importante avanço no diagnóstico de várias infeções, como a leptospirose, permitindo uma maior rapidez no diagnóstico (Mérien *et al.*, 1992). Ela apresenta, assim, uma vantagem importante em relação ao isolamento em cultura, cujo

método requer um período de tempo prolongado, necessário para que o crescimento bacteriano ocorra (Aldeia, 2016).

O fundamento da técnica PCR, aplicado à bactéria em estudo, baseia-se na amplificação de uma sequência de DNA de *Leptospira interrogans* s.l. numa determinada amostra, obtendo-se no final, um fragmento de DNA amplificado (amplicão) detetável quando visualizado sob luz ultra violeta num gel de agarose, após electroforese (**Figura 1.12.**). A técnica pode ser realizada a partir de amostras biológicas, tais como sangue, urina, ou tecidos, após extração e purificação do DNA (Mérien *et al.*, 1992; Aldeia, 2016).

Atualmente, existem vários protocolos diferentes para a deteção de DNA leptospírico nas amostras dos doentes. Para além das pequenas variações que cada uma apresenta, o fator diferenciador mais importante é o conjunto de *primers* utilizado. Estes definem a especificidade do protocolo, o qual está dependente do *primer* e da sequência de DNA leptospírico à qual ele se vai ligar. Os *primers* com baixa especificidade amplificam DNA do género *Leptospira*, enquanto outros, permitem fazer a distinção entre as diferentes espécies patogénicas (Levett, 2001; Aldeia, 2016).



**Figura 1.12.** - Representação em gel agarose da amplificação de *L. interrogans* s.l., em diluições seriadas.

(Adaptado de <http://www.biosyn.com/sample-preparation-kit/product/leptospira-interrogans-pcr-detection-kit.aspx>)

A PCR apresenta, no entanto, algumas desvantagens relacionadas com a manutenção dos reagentes, bem como de todo o equipamento laboratorial necessário para a realização da técnica. O elevado custo dos materiais, aliado à necessidade de um laboratório especializado, são importantes limitações no que respeita à utilização de

métodos moleculares na rotina, principalmente em regiões onde o volume de amostras é considerável (Aldeia, 2016).

### 1.1.7 - Tratamento, Manutenção e Prevenção

Existem vários antibióticos úteis no tratamento da leptospirose, para os quais a *L. interrogans* s.l. apresenta suscetibilidade. Apesar deste facto, reconhece-se a importância acrescida de uma terapêutica administrada na primeira fase da doença (Watt *et al.*, 1988; Hartskeerl *et al.*, 2011; Farrar *et al.*, 2014).

Vários ensaios clínicos têm sido desenvolvidos ao longo do tempo, muitos deles utilizando Penicilina. No entanto, a eficácia do antibiótico em cada fase da doença continua a levantar questões (Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

Por outro lado, a eficácia da terapêutica, demonstrada numa dada região, parece não ser concordante com resultados obtidos em outras partes do globo. Um exemplo disso mesmo é a disparidade nos resultados obtidos, para o antibiótico Penicilina, entre a Tailândia e o Brasil. Na Tailândia, a terapêutica administrada numa fase tardia da doença demonstrou ser eficaz na diminuição da febre e normalização dos níveis de creatinina no sangue, reduzindo o tempo de internamento dos doentes. No entanto, no Brasil, a mesma terapêutica, administrada quatro dias após o início dos sintomas, não obteve o sucesso esperado no que diz respeito à diminuição da mortalidade (Farrar *et al.*, 2014). Devido à dificuldade em estabelecer uma relação entre a eficácia da terapêutica e o estadio da doença, recomenda-se que esta seja administrada ao doente o mais rápido possível, independentemente da fase em que este se encontre (Farrar *et al.*, 2014).

Na presença de uma leptospirose não complicada, a terapêutica recomendada é Doxiciclina, Amoxicilina ou Azitromicina, as quais são administradas por via oral. Os casos moderados a complicados têm as opções Doxiciclina, Penicilina G, Ceftriaxona ou Cefotaxime, administrados por via endovenosa (Bharti *et al.*, 2003; Fauci *et al.*, 2008; Hartskeerl *et al.*, 2011; Farrar *et al.*, 2014). Todos os antibióticos, exceto a Azitromicina, devem ser tomados durante sete dias. Em caso de melhoria significativa,

os antibióticos administrados por via endovenosa podem ser substituídos por Doxiciclina oral (Farrar *et al.*, 2014).

A Doxiciclina oral continua a ser o antibiótico de eleição no que diz respeito ao tratamento de leptospirose não complicada (Bharti *et al.*, 2003). No entanto, a Amoxiciclina ou Azitromicina são especialmente úteis em casos de hipersensibilidade, gravidez ou amamentação (Farrar *et al.*, 2014).

Doentes com leptospirose severa devem, para além dos antibióticos, receber uma terapêutica de suporte (Bharti *et al.*, 2003). Esta necessidade é especialmente importante em doentes com choque hipovolémico ou lesão renal hipercatabólica. No último caso, a hemodiálise deve ser iniciada o quanto antes, e mantida até que hajam melhorias significativas. Outras medidas, igualmente necessárias na manutenção do doente, estão relacionadas com o controlo de hemorragias e a utilização de um suporte respiratório, o qual é especialmente necessário em casos de hemorragias pulmonares ou insuficiência respiratória (Farrar *et al.*, 2014).

O principal meio de prevenção, especialmente em área endémica, caracteriza-se por uma constante informação da população, em especial dos grupos de risco, acerca das leptospiroses e doença associada. É fundamental que conheçam a sua transmissão, sintomas e métodos preventivos, os quais devem aplicar no seu quotidiano. Este conhecimento é de vital importância para uma deteção precoce da doença, a qual vai proporcionar um diagnóstico e um início de tratamento rápidos (Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014).

Métodos práticos de prevenção, relacionados com os reservatórios animais, caracterizam-se pela diminuição da população de roedores nas imediações das áreas residenciais e laborais, imunização dos animais domésticos e do setor agro-pecuário, bem como a limitação do espaço onde estes últimos habitam (WHO, 2003; Fauci *et al.*, 2008; Hartskeerl *et al.*, 2011; Farrar *et al.*, 2014).

No caso dos grupos laborais de risco, estes devem utilizar equipamentos de proteção, tais como, botas impermeáveis, luvas e uniforme, este último adequado às funções que desempenham (Hartskeerl *et al.*, 2011; Farrar *et al.*, 2014).

A vacinação no ser humano tem sido utilizada em alguns países endêmicos, como Cuba, Rússia e China, onde a maior parte dos estudos têm sido realizados (Bharti *et al.*, 2003; Fauci *et al.*, 2008; Farrar *et al.*, 2014). Num estudo desenvolvido em Cuba, cerca de 100 000 pessoas foram vacinadas e não demonstraram efeitos adversos (Sánchez *et al.*, 2000). Contudo, após proceder-se à TAM, esta não demonstrou a presença de anticorpos contra os antígenos usados na vacina, o que antevê um problema associado à imunização a longo prazo dos vacinados (Sánchez *et al.*, 2000; Bharti *et al.*, 2003). Os resultados alcançados são concordantes com uma necessidade de vacinação periódica, de forma a ser mantido um título de anticorpos capaz de conferir proteção (Bharti *et al.*, 2003; WHO, 2003; Farrar *et al.*, 2014).

### 1.2 - Justificação do tema

Leptospiras, são bactérias (espiroquetas) do género *Leptospira*, muito finas e espiraladas, que apresentam um crescimento ótimo a temperaturas de 28°-30°C. As leptospiras patogénicas podem causar uma infeção subclínica, doença febril semelhante a uma síndrome gripal, ou doença sistémica grave. Esta última caracteriza-se por falência renal e hepática, vasculite disseminada, miocardite e morte. A gravidade da doença está dependente do número de microorganismos que infetam o indivíduo, da sua resposta imunitária e da virulência da estirpe infetante (Murray *et al.*, 2006).

A infeção nos humanos dá-se pela penetração de espiroquetas nas mucosas intactas (nariz, boca ou olhos), ou na pele, através de pequenas feridas ou abrasões. De seguida, elas disseminam-se através do sangue para todos os tecidos, tendo como alvo principal os rins (Murray *et al.*, 2006).

Os humanos são infetados quando contactam principalmente com urina de roedores, em particular ratos, os quais são os principais reservatórios na disseminação das espiroquetas. Como estas mantêm uma relação de simbiose com os referidos roedores, as leptospiras acabam por persistir durante anos nos túbulos renais, sendo excretadas pela urina, durante toda a vida destes animais (Fauci *et al.*, 2008; Pádua, 2009).

Devido à frequência de leptospirose na sua forma atenuada, esta é muitas vezes rotulada de síndrome viral, tornando-se um problema de saúde subestimado à escala global. Torna-se, assim, importante pesquisar esta infeção nos casos de síndrome febril indeterminado, principalmente quando se trata de um doente que se inclui nos grupos de risco, ou que esteve recentemente em contacto com um ambiente favorável à infeção (Fauci *et al.*, 2008; Pádua, 2009).

Certos grupos ocupacionais são considerados como tendo um risco acrescido para contraírem a infeção, tais como: veterinários, agricultores, trabalhadores do saneamento básico e empregados de matadouros (Fauci *et al.*, 2008).

Em 1994 foi elaborado um estudo numa localidade urbana a sul do Brasil, onde se procurava obter evidência da presença de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* s.l.

em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental. Apesar deste estudo ter demonstrado resultados significativos, com 10,4% de casos positivos na amostra estudada, não há documentação de que estudos mais recentes tenham sido efetuados, em população de risco semelhante, noutros países (Almeida *et al.*, 1994). Desta forma, não há registo de que um estudo semelhante tenha alguma vez sido realizado em Portugal Continental (apenas no Arquipélago dos Açores há investigação desenvolvida sobre leptospirose na população) (Vieira *et al.*, 2006).

A frequência de leptospirose com um quadro clínico semelhante a síndrome gripal, aliado à ausência de controlo periódico (na Medicina de Trabalho, por exemplo), fazem com que se coloque a hipótese de subdiagnóstico, nos grupos de risco acima descritos. Evidências serológicas são frequentes em indivíduos que tenham sido infetados por leptospiras, até mesmo em casos assintomáticos da doença. Os anticorpos específicos podem persistir no sangue durante meses ou anos, os quais variam de indivíduo para indivíduo (Fauci *et al.*, 2008; Pádua, 2009).

### 1.3 - Objetivos

Neste estudo, pretende-se determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* s.l. numa amostra constituída por trabalhadores do saneamento básico da região de Lisboa e vale do Tejo. Este é o objetivo geral da investigação, no entanto, pretende-se retirar conclusões adicionais, as quais remetem para os objetivos específicos do estudo, que são os seguintes:

a) Determinar a percentagem de trabalhadores do saneamento básico com ac. anti-*L. interrogans* s.l. no sangue, através dos métodos serológicos MACROLepto (Teste de Aglutinação Macroscópica) e TAM (Teste de Aglutinação Microscópica).

b) Determinar o grau de conhecimento dos trabalhadores em relação à doença em questão (reservatório animal, sintomas, mecanismos de transmissão, medidas de prevenção, entre outras).

c) Caracterizar o espaço onde os trabalhadores exercem funções, quanto à presença de roedores, normas de prevenção coletiva incutidas pela empresa, entre outras, pertinentes para o estudo.

d) Determinar a percentagem de trabalhadores que utilizam EPI's e praticam normas de higiene gerais dentro e fora do espaço laboral.

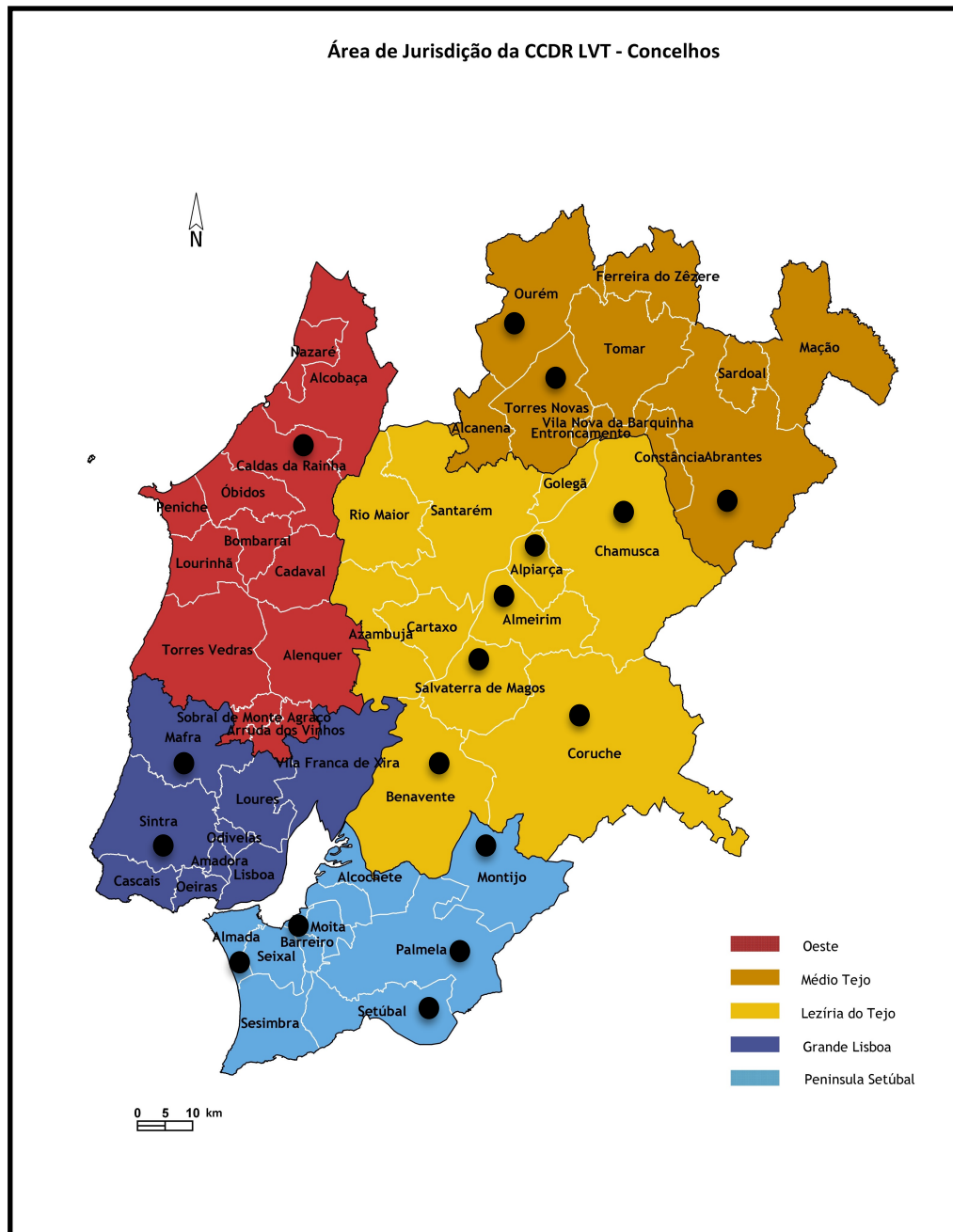
e) Determinar a percentagem de trabalhadores com sintomas associados à forma atenuada da doença (Síndrome Gripal) no ano anterior ao início do estudo.

f) Caracterizar a periodicidade com que os trabalhadores realizam exames pela Medicina do Trabalho e quais os exames/análises incluídos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1 - Área geográfica de estudo

A área geográfica escolhida para a realização do estudo foi a Região de Lisboa e Vale do Tejo (**Figura 2.1.**), a qual compreende 52 concelhos, distribuídos por 12 204 Km<sup>2</sup>.



**Figura 2.1.** - Representação do mapa da Região de Lisboa e Vale do Tejo dividido em zonas e concelhos. Os concelhos que participaram no estudo estão assinalados com círculo preto.

(Adaptado de <http://www.ccdr-lvt.pt/pt/a-regiao/7279.htm>)

A proximidade ao IHMT onde as amostras foram analisadas, bem como o facto da investigadora ter esta região como zona de residência foram fatores decisivos na escolha. As características referidas foram cruciais no desenvolvimento do projeto, permitindo que este ocorresse dentro dos prazos previamente estabelecidos. Também a qualidade do mesmo foi preservada, com as amostras a serem centrifugadas e armazenadas nas horas seguintes à colheita de sangue junto dos trabalhadores.

Apesar da região compreender várias zonas (Grande Lisboa, Península de Setúbal, Lezíria do Tejo, Médio Tejo e Oeste) e de todas elas estarem representadas no estudo, nem todos os concelhos participaram. Assim, na **Figura 2.1.** foi colocada uma marca em cada concelho que participou, de forma a entender-se a real extensão do estudo.

### 2.2 - População alvo e seleção da amostra

#### 2.2.1 - Instituições participantes

Durante o processo de seleção foram contactadas 38 Câmaras Municipais da Região de Lisboa e Vale do Tejo (de entre as 52 existentes), bem como 30 empresas privadas com funções de limpeza de esgotos, desratização ou ETAR. O primeiro contacto deu-se telefonicamente, sendo a chamada reencaminhada a quem de direito. Na maioria dos casos, o segundo contacto foi estabelecido por e-mail (fornecido durante o contacto telefónico), no qual o estudo foi exposto resumidamente, fazendo-se acompanhar pelo documento do Projeto de Investigação.

De seguida, foi agendada uma reunião para cada Entidade que demonstrou interesse em participar, na qual se discutiram os detalhes práticos/logísticos do projeto, bem como o agendamento da fase seguinte (uma ação de sensibilização acompanhada da recolha de dados e colheita de sangue).

Durante este processo, algumas Câmaras Municipais informaram da atual inexistência de trabalhadores do Saneamento Básico a seu cargo (em águas residuais, resíduos sólidos ou ambos), tendo em conta a ocorrência de privatizações neste setor.

Nestas circunstâncias, as Câmaras em questão deixaram de estar incluídas no processo de seleção, tendo este prosseguido com as entidades privatizadas.

As empresas privadas de desratização e limpeza de esgotos não participaram no estudo, como previsto inicialmente, mostrando-se indisponíveis por diversas razões, as quais serão abordadas na “Discussão e Conclusões”.

O estudo foi desenvolvido com a colaboração de 10 Entidades distintas (26% das Entidades contactadas), localizadas em 17 concelhos de todas as zonas da Região (**Figura 2.1.**), num período de tempo compreendido entre os meses de Fevereiro e Julho de 2016. A participação destas Entidades empregadoras, permitiu a inclusão no estudo de 17 concelhos com trabalhadores em contacto com águas residuais e três concelhos cujas atividades estão relacionadas com a recolha de resíduos sólidos. Dividindo as Entidades em Câmaras Municipais e Empresas Privadas (privatizadas), obtiveram-se seis concelhos no primeiro grupo e 11 concelhos no segundo (**Quadro 2.1.**).

**Quadro 2.1.** Distribuição dos concelhos que participaram no estudo (17) por zonas, segundo dois tipos de divisão: Área laboral (Águas Residuais ou Resíduos Sólidos) e Entidade empregadora (Câmara Municipal e Empresa Privada).

		Oeste	Médio Tejo	Lezíria do Tejo	Grande Lisboa	Península de Setúbal
Área laboral	Águas Residuais	1	3	6	2	5
	Resíduos Sólidos	0	0	0	1	2
Entidade empregadora	Câmara Municipal	1	0	0	1	4
	Empresa Privada	0	3	6	1	1

**Nota de rodapé:** Uma Entidade empregadora pode exercer funções em mais do que um concelho e este pode fornecer trabalhadores para áreas laborais distintas.

### 2.2.2 - Critérios de inclusão no estudo

Para esta investigação, procedeu-se ao estudo dos indivíduos com uma ocupação profissional relacionada com o saneamento básico, os quais pertencem a um grupo de risco para aquisição de infeção por *L. interrogans* s.l.. Para este efeito, elaborou-se um conjunto de critérios de inclusão, pretendendo-se que os resultados fossem esclarecedores quanto à atual realidade da região e ambiente laboral destes indivíduos, permitindo retirar conclusões assertivas, as quais poderão trazer algum entendimento acerca deste tema. Com a elaboração dos critérios de inclusão pretendeu-se também que o estudo cumprisse todos os procedimentos éticos previstos na legislação, os quais são fundamentais na condução de um estudo clínico. Assim sendo, os critérios de inclusão foram os seguintes:

- a) Serem trabalhadores de Câmaras Municipais que exerçam funções no saneamento básico, trabalhadores de ETAR e Entidades privatizadas;
- b) Possuir essa ocupação há pelo menos um ano;
- c) Manusearem águas residuais ou resíduos sólidos de uma forma direta ou indireta no local de trabalho;
- d) Serem trabalhadores na região de Lisboa e Vale do Tejo;
- e) Terem sido entendidos os objetivos do estudo, bem como os direitos e deveres como participante do projeto.
- f) Terem assinado o documento do Consentimento Informado.

### 2.2.3 - Seleção dos trabalhadores participantes

Todos os trabalhadores pertencentes às Entidades empregadoras incluídas no estudo foram informados da existência desta investigação. A participação de cada um deles esteve dependente do cumprimento dos critérios de inclusão enunciados no ponto anterior, disponibilidade horária e laboral, bem como do interesse e decisão de cada um em fazer parte do estudo.

### 2.3 - Recolha de dados

A recolha de dados dos participantes no estudo seguiu um procedimento pré-estabelecido pela investigadora e comum a todas as Entidades. No início da sessão foi distribuído um documento de Consentimento Informado, o qual foi seguido pelo preenchimento de um questionário clínico-epidemiológico. Logo após deu-se início a uma sessão de esclarecimento acerca da leptospirose, seguindo-se a recolha de sangue dos participantes.

A sessão de esclarecimentos esteve acessível a todos os trabalhadores interessados, mesmo que não quisessem participar no estudo.

#### 2.3.1 - Consentimento Informado

Foi elaborado um documento de Consentimento Informado para ser assinado por cada participante do estudo (**Anexo 1**). Este visou a obtenção de um consentimento livre e esclarecido, o qual foi fundamental para garantir o cumprimento legal e ético no decorrer da investigação. Este documento conteve informações relevantes, como uma breve introdução do estudo, objetivos, procedimentos, riscos e desconfortos, benefícios, custo e compensação, confidencialidade e publicação dos resultados. No final esteve também incluída a Declaração do Participante, na qual cada um dos participantes referiu ter total conhecimento acerca do estudo e seus procedimentos, aceitando participar no mesmo de forma livre e esclarecida. Este documento incluiu ainda uma cláusula final, na qual o participante autorizou um posterior contacto a fim de tomar conhecimento do resultado laboratorial. O documento foi datado e assinado pelo Participante e pelo Investigador.

#### 2.3.2 - Questionário Clínico-Epidemiológico

Foi elaborado um questionário clínico-epidemiológico (**Anexo 2**), o qual foi aplicado aos participantes após breve introdução da pertinência e fundamento do estudo.

Pretendeu-se que o seu preenchimento fosse o mais fiel possível da realidade e, por esse motivo, não foi transmitida qualquer informação prévia respeitante à leptospirose (transmissão de leptospiros da espécie *L. interrogans* s.l., sintomas da doença e métodos de prevenção). O questionário foi individual e conteve um número (código) que fez correspondência com a amostra biológica, o Consentimento Informado, nome e número de telefone de cada participante.

Com este questionário pretendeu-se obter dados demográficos (género, idade, escolaridade), grau de conhecimento acerca da doença, história de sintomatologia concordante com leptospirose ligeira, informações relativas à saúde ocupacional, elementos caracterizadores do espaço laboral, bem como o uso de equipamento de proteção individual e medidas de higiene adotadas pelo trabalhador. Estas informações foram utilizadas como um complemento à análise laboratorial, com o objetivo de caracterizar o grupo de risco em estudo.

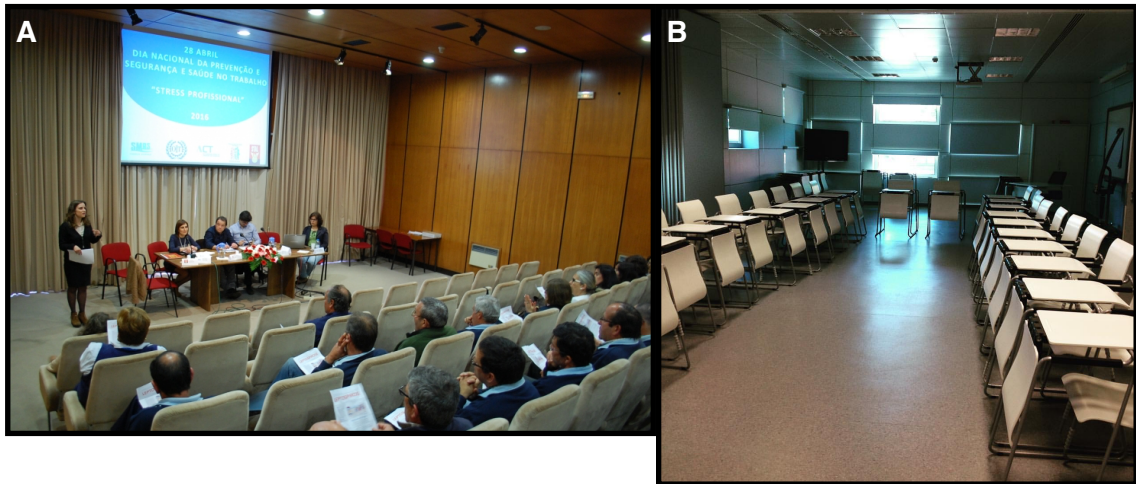
Os EPI's abordados neste estudo foram as botas impermeáveis, luvas, máscara, uniforme descartável, uniforme diário e bata descartável. O uniforme diário foi dividido em Uniforme higienizado pela empresa ("Uniforme diário") e Uniforme higienizado pelos trabalhadores nas suas casas ("Uniforme HT"), tendo sido atribuídos conceitos distintos, de forma a facilitar a análise dos resultados.

### 2.3.3 - Ação de sensibilização

Após o preenchimento do questionário, os trabalhadores presentes assistiram a uma ação de sensibilização sobre o tema "Leptospirose". Esta ação foi concebida para qualquer trabalhador do setor, contemplando participantes e todos aqueles que, por decisão pessoal, não participaram no estudo.

Para esta ação de sensibilização foi elaborado um panfleto informativo (**Anexo 3**) de linguagem simples e concisa, o qual foi distribuído a todos os trabalhadores. Pretendeu-se que o trabalhador pudesse seguir a informação transmitida oralmente, bem como disseminar a mensagem a outros colegas.

As informações transmitidas na ação de sensibilização foram abordadas de uma forma clara e acessível ao público-alvo do estudo, dando oportunidade para que colocassem questões e esclarecessem dúvidas (**Figuras 2.2.**). Desta forma, os trabalhadores adquiriram conhecimentos acerca da bactéria, sua localização, transmissão, grupos de risco, sintomatologia e medidas práticas de prevenção. Foi ainda possível abordar o exemplo dos Açores, dando a conhecer o trabalho desenvolvido em 2003, o qual foi de extrema importância em contexto de saúde pública (Vieira *et al.*, 2006).



**Figura 2.2.** - **A-** Ação de sensibilização sobre o tema “Leptospirose” em trabalhadores do Saneamento Básico. **B-** Preparação para ação de sensibilização em trabalhadores da rede de abastecimento.

(A- Adaptado de <http://www.cm-tvedras.pt/artigos/detalhes/dia-nacional-da-prevencao-e-seguranca-no-trabalho-foi-assinalado-pelo-municipio/>); B- Foto original da autora

### 2.3.4 - Recolha e tratamento das amostras de sangue

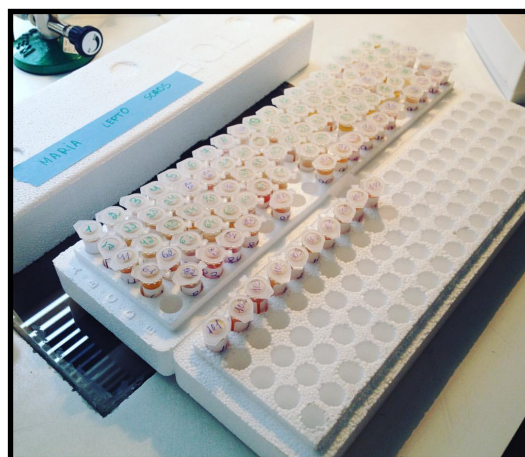
A recolha da amostra de sangue de cada participante no estudo, foi a última etapa do procedimento. Neste procedimento invasivo foram utilizados materiais de colheita, bem como um suporte físico para o correto armazenamento e transporte das amostras até ao laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme do IHMT/UNL

(Lisboa). Desta forma, foram utilizadas agulhas, seringas, algodão, álcool, garrote, luvas, contendor de perfurantes e tubos de soro com gel (**Figura 2.3.**).

Os tubos de soro de cada participante no estudo foram etiquetados no momento da colheita, com o número do participante no estudo (número atribuído anteriormente aquando da distribuição dos Consentimentos Informados). As amostras de sangue foram transportadas até ao laboratório em ambiente refrigerado, tendo sido realizada a centrifugação e separação do soro, num período de tempo não superior a 24h. O soro de cada participante foi identificado de acordo com o seu número no estudo e armazenado no frigorífico a uma temperatura média de 4°C (**Figura 2.4.**), até análise laboratorial (MACROLepto e se necessário, TAM).



**Figura 2.3.** - Material utilizado na colheita de sangue.  
(Fotografia original da autora)



**Figura 2.4.** - Soros dos participantes em processo de armazenamento no laboratório.  
(Fotografia original da autora)

### 2.4 - Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto)

#### 2.4.1 - Preparação do antigénio

A técnica MACROLepto (**Anexo 4**) foi realizada a todos os participantes no estudo de forma a pesquisar-se a presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. no soro dos mesmos. Para a sua execução procedeu-se à preparação prévia dos antigénios (culturas vivas de *L. interrogans* s.l.), os quais foram selecionados a partir da bateria de referência da OMS, existente no laboratório. A seleção dos antigénios baseou-se na sua prevalência em Portugal Continental, bem como na amostra integrante no estudo (Vieira *et al.*, 2006). Desta forma, antigénios *L. interrogans* pertencentes ao serogrupo Ballum foram cultivados num tubo de ensaio contendo meio EMJH, o qual foi colocado na incubadora durante cinco dias, em condições de temperatura (29°C) e agitação constantes.

Após este período, procedeu-se à passagem para três tubos de ensaio, os quais incubaram durante seis dias em condições idênticas, obtendo-se no final uma densidade média de  $\pm 1,76 \times 10^8$  leptospiros/mL. De seguida, os tubos de ensaio foram inoculados num frasco de cultura, o qual foi igualmente colocado na incubadora durante nove dias, respeitando as condições de temperatura e agitação referidas anteriormente. No final deste período, obteve-se uma cultura com densidade ótima de  $\pm 1,6 \times 10^8$  leptospiros/mL.

Os antigénios presentes na cultura foram de seguida inativados com uma solução tamponada de formol a 40% e colocados no frigorífico a 4°C *overnight*. A cultura inativada foi distribuída por seis tubos de ensaio e centrifugada, obtendo-se uma solução concentrada de leptospiros com 10mL de volume final.

Esta preparação foi testada utilizando-se tampão PBS e soros humanos negativos (controlos negativos), bem como soros de positividade conhecida e confirmada pela TAM (controlo positivo), de forma a ser verificada a capacidade de aglutinação para cada uma das situações. Após ser observada a presença de uma ligeira reatividade nos controlos negativos, procedeu-se a uma diluição do antigénio (1:2), obtendo-se um

volume final de 20 mL. Estas preparações foram mantidas no frigorífico a 4°C até serem utilizadas no MACROLepto, tal como descrito por Garcia (2011).

### 2.4.2 - Metodologia da Técnica

A técnica MACROLepto (**Anexo 4**) foi realizada em lâmina de vidro, juntando o soro dos participantes, previamente diluído, em 1:10, ao antigénio de *L. interrogans* s.l., cuja preparação foi abordada no ponto anterior. Foram adicionados 15µL de cada soro “problema” diluído, a 15µL do antigénio, seguido de homogeneização e agitação manual. A reação foi observada ao fim de quatro minutos, sendo relativamente simples fazer a distinção entre a presença e ausência de aglutinação. Para facilitar a leitura da reação, colocou-se a lâmina contra um fundo escuro e utilizou-se uma fonte de luz que incidiu diretamente na mesma (**Figura 2.5.**), tal como descrito por Garcia (2011).



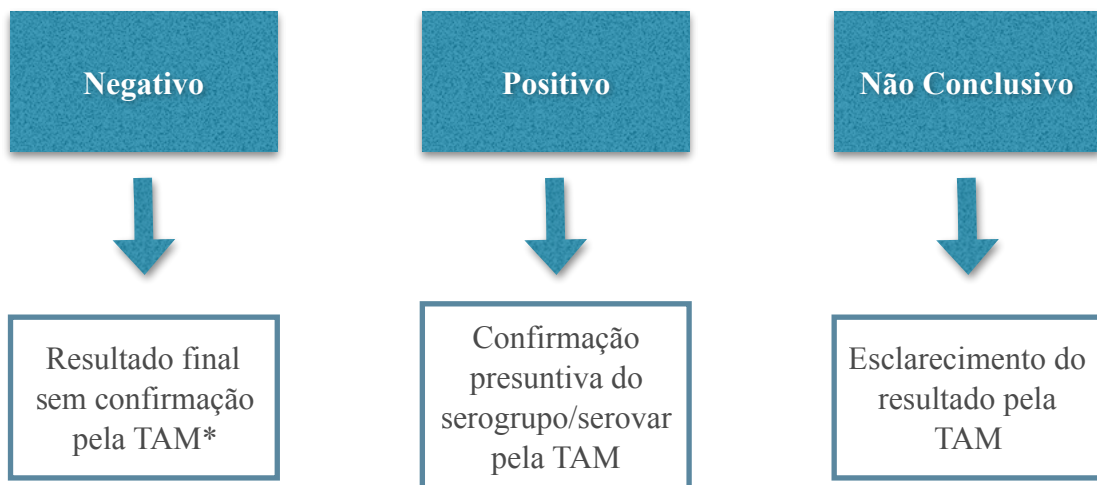
**Figura 2.5.** - Bancada de trabalho para a execução da técnica MACROLepto, no laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme do IHMT/UNL.  
(Fotografia original da autora)

Os soros humanos utilizados para testar a preparação de antigénios, tal como descrito no ponto anterior, foram igualmente importantes como controlo positivo e

negativo na técnica MACROLepto. Estes foram aplicados sempre que se testava um novo grupo de participantes, e também em situações de dúvida, como foi o caso das reações “Não Conclusivas”.

### 2.4.3 - Interpretação e seguimento dos participantes no estudo

No total, foram testados 347 soros “problema”, os quais representaram toda a amostra do estudo. A técnica MACROLepto teve o objetivo de proporcionar, através de um procedimento simples e rápido, um rastreio a todos os trabalhadores. O resultado obtido neste teste foi descrito no seguinte esquema, o qual permite o seguimento do participante ao longo do estudo.



\*Exceto nos participantes com um quadro sintomático completo (febre, calafrios, cefaleias e mialgias) no ano anterior ao início do estudo. Nestes casos, o resultado obtido pelo MACROLepto foi confirmado pela TAM.

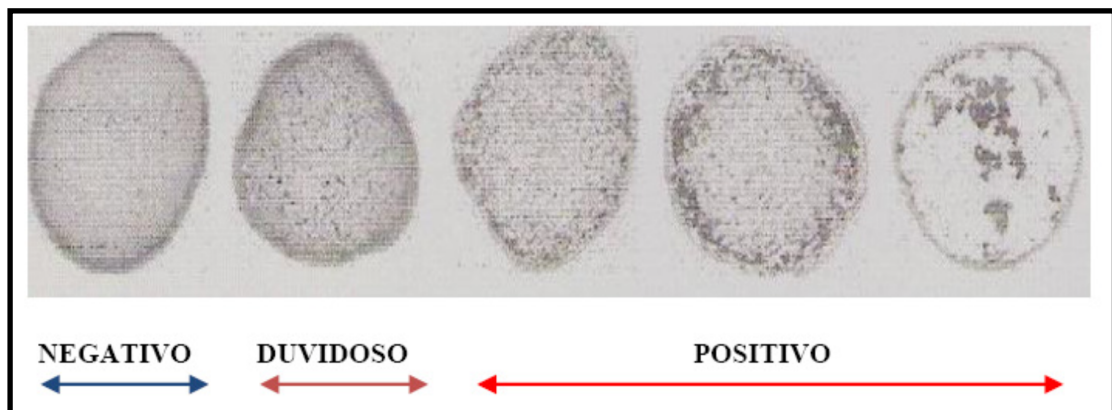
A ausência de aglutinação neste teste é compatível com a inexistência de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., serogrupo Ballum, no soro “problema”. Nestes casos, o participante foi informado por mensagem telefónica do resultado “Negativo” obtido, e o soro não seguiu para a TAM. A exceção a esta regra aconteceu nos participantes com resultado “Negativo”, mas cujo questionário demonstrou a ocorrência recente de

sintomatologia compatível com a forma leve da doença. Nestes casos, o resultado obtido pelo MACROLepto foi posteriormente confirmado pela TAM.

Quando se verificou um resultado “Não Conclusivo”, os participantes não foram informados de imediato do resultado, até que este fosse esclarecido pela TAM. O soro “problema” foi, assim que possível, analisado pelo teste de referência, de modo a dissipar as dúvidas resultantes da técnica MACROLepto.

A ocorrência de aglutinação nesta técnica é concordante com a existência de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l.. Desta forma, um soro com resultado “Positivo” no MACROLepto foi testado de seguida com a TAM, de forma a perceber-se qual o serovar/serogrupo responsável pela reatividade observada. Os participantes com um resultado “Positivo” foram contactados telefonicamente e reencaminhados para a Saúde Ocupacional da Entidade empregadora onde exercem funções.

A representação esquemática da técnica e sua interpretação seguiu o exemplo da **Figura 2.6.**



**Figura 2.6.** - Representação esquemática dos diferentes resultados obtidos no MACROLepto e respectiva interpretação.  
(adaptado de Garcia, 2011)

## 2.5 - Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM)

### 2.5.1 - Preparação da bateria de antigénios

A TAM (**Anexo 5**) foi realizada nos soros considerados “Não Conclusivos” no MACROLepto e aos participantes com uma história recente (ano anterior ao início do estudo) de sintomatologia sugestiva de um quadro completo de leptospirose ligeira. Antes da execução da técnica, foi necessário proceder-se ao crescimento da bateria de antigénios, cujas estirpes foram selecionadas (**Quadro 2.2.**) de modo a apresentarem uma abrangência e relevância para o estudo.

**Quadro 2.2.** Antigénios de *L. interrogans* s.l. e de *L. biflexa* s.l. selecionados para integrarem a bateria utilizada no Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) deste estudo.

Serogrupo	Serovar	Estirpe
Samaranga*	Patoc*	Patoc I*
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
Pomona	Mozdock	5621
Grippotyphosa	Valbuzzi	Valbuzzi
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Ballum	Arboreae	Arborea
Ballum	Ballum	Mus 127
Estirpes isoladas no país		
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA (Açores)
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20 (Açores)
Ballum	Arboreae	Arborea (Pancas)

\*Antigénio representante da espécie saprófita (*L. biflexa* s.l.).

Seleccionou-se uma bateria jovem e densa ( $\pm 2 \times 10^8$  células/mL) e procedeu-se à inoculação de cada estirpe em dois tubos de ensaio com meio líquido EMJH, de forma a obter duas baterias de antigénios. As baterias cultivadas foram colocadas na incubadora a uma temperatura de 29°C e agitação constante, durante uma semana. Após este período, uma das baterias ficou em repouso *overnight*, em condições de ausência de luz, de modo a ser utilizada nos dias seguintes na TAM, enquanto a outra foi colocada no frigorífico a 4°C. Esta bateria foi posteriormente usada na sub-cultura de uma nova bateria de estirpes, iniciando-se novamente o processo.

### 2.5.2 - Metodologia da Técnica

Para a realização da TAM, procedeu-se primeiramente à diluição dos soros a 1:20 com tampão PBS. A diluição final, após a adição do antigénio no poço da microplaca, foi de 1:40, sendo esta a diluição pretendida para a realização da técnica numa primeira fase, onde se pretendia pesquisar qual o antigénio responsável pela aglutinação.

A microplaca foi marcada com os antigénios na horizontal e com os soros na vertical, colocando-se a testemunha no final dos soros. Esta última foi utilizada como controlo negativo em cada microplaca, sendo constituída pelo tampão PBS (35µL) e cada um dos antigénios testados (35µL).

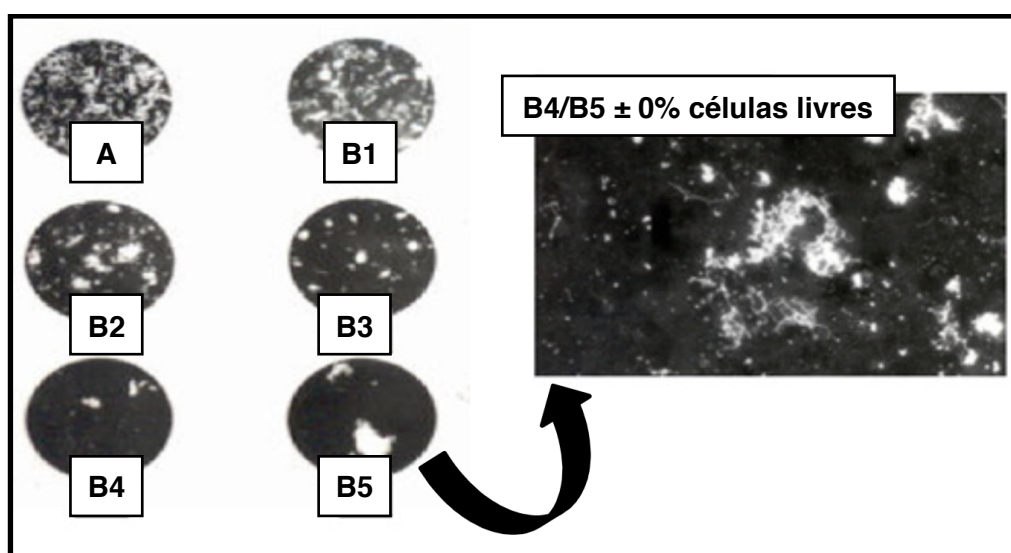
Cada poço da microplaca conteve uma gota (35µL) do soro “problema” e outra do respetivo antigénio, sendo que cada coluna correspondeu a uma estirpe específica, previamente assinalada. Durante o procedimento da técnica foi importante que não houvesse agitação dos antigénios, tendo em conta a sua natural reatividade, a qual poderia originar algum confundimento na leitura ao microscópio.

Após terminado este procedimento, foi colocada uma tampa sobre a microplaca e esta foi colocada na estufa a 37°C, durante 2 horas. Após este tempo, as microplacas foram retiradas e visualizadas ao microscópio de fundo escuro (Vieira., 2006).

### 2.5.3 - Leitura das microplacas

A leitura das microplacas foi realizada logo após o período de incubação na estufa e teve o objetivo primário de observar a existência de aglutinação em cada poço do soro “problema”, comparando-o com a respectiva testemunha (controlo negativo).

Assim, foi registada a intensidade da aglutinação por campo de observação, a qual obedeceu a um critério específico (**Figura 2.7.**). Uma amostra era considerada positiva quando pelo menos 50% do campo estava aglutinado, numa diluição superior a 1:100 (Faine *et al.*, 1999). O registo da observação por campo fez-se da seguinte forma:



**Figura 2.7.** - Representação esquemática das diferentes percentagens de aglutinação que podem ser observadas na TAM. **A**- Testemunha; **B1**- 75% de células livres; **B2**- 50% de células livres; **B3**- 25% de células livres; **B4/B5**- ± 0% de células livres. (adaptado de Garcia, 2011)

4+ = 75% ou mais de bactérias aglutinadas;

3+ = 50 a 75% de bactérias aglutinadas;

2+ = 25 a 50% de bactérias aglutinadas;

1+ = pequenos aglutinados ocasionais;

**Negativo** = ausência de aglutinação, com número de células idêntico ao controlo

### **2.6 - Análise e tratamento de dados**

Foi construída uma base de dados, com as informações obtidas nos Inquéritos aplicados aos participantes do estudo e com os resultados laboratoriais (MACROLepto e TAM). A chave para a identificação dos participantes, bem como a informação necessária para um posterior contacto, ficou num ficheiro separado, com o acesso exclusivo da investigadora principal.

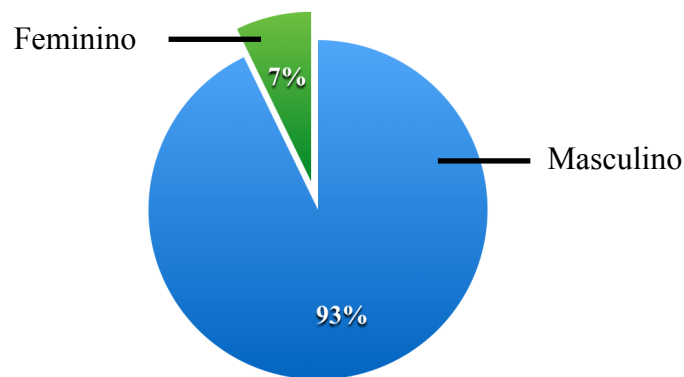


## **3.RESULTADOS**

### 3.1 - Caracterização da Amostra

#### 3.1.1 - Dados sócio-demográficos

No decorrer do estudo foram recolhidos dados de 347 trabalhadores do Saneamento Básico da região de Lisboa e Vale do Tejo, dos quais 322 são do género masculino (93%) e 25 do género feminino (7%) (**Figura 3.1.**).



**Figura 3.1.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo o género.

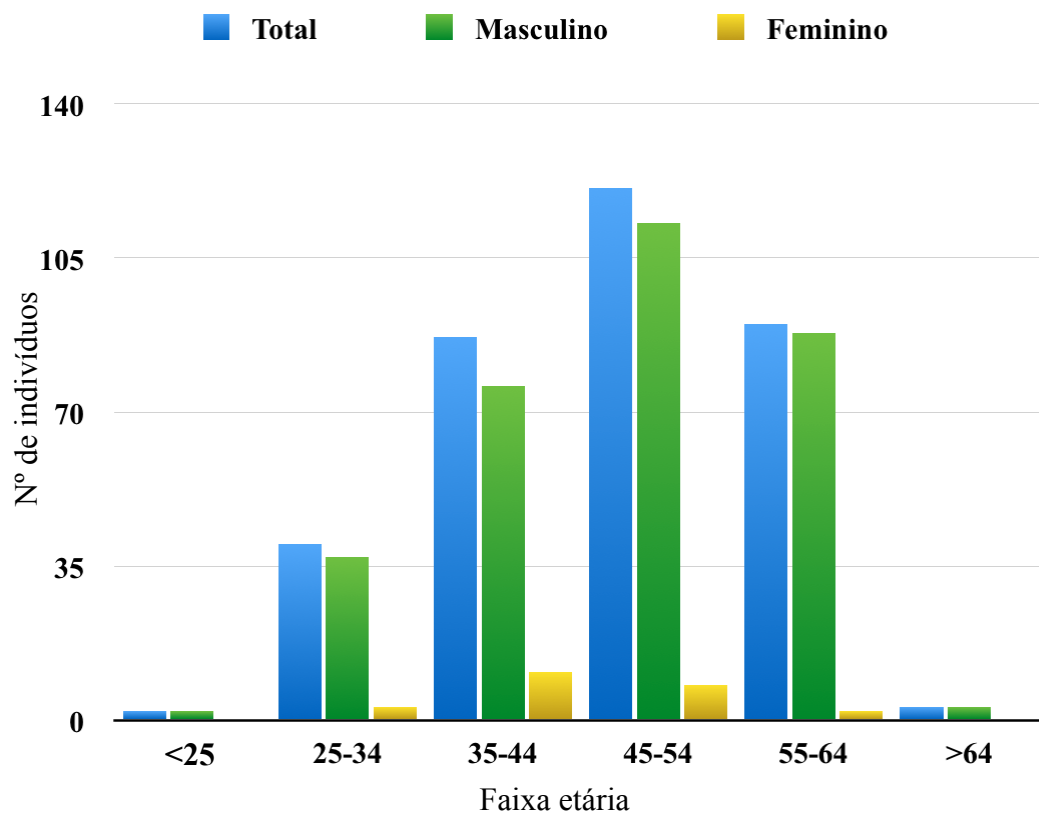
Em relação à faixa etária dos participantes, a sua distribuição, de acordo com o género, pode ser observada no **Quadro 3.1.** e na **Figura 3.2.**

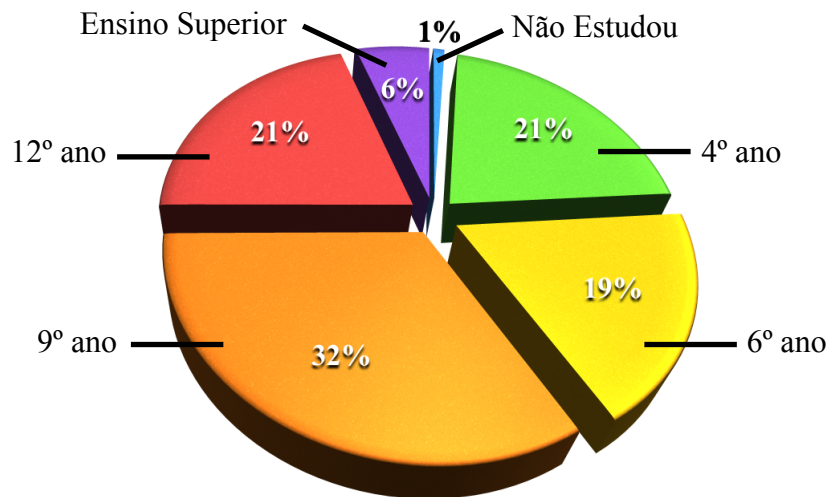
Observando o **Quadro 3.1.** e a **Figura 3.2.** verifica-se que a faixa etária com o maior número de trabalhadores corresponde aos 45-54 anos (n=124), formando 35% dos indivíduos que responderam a esta questão. As faixas etárias “<25 anos” e “>64 anos” foram as que obtiveram menos participantes (1% em cada grupo), o que corresponde a dois (2) e três (3) participantes, respetivamente.

Analisando a **Figura 3.2.** de acordo com o género dos participantes e a faixa etária em que se inserem, verifica-se uma predominância constante do género masculino sobre o género feminino, em qualquer das faixas etárias. A faixa etária dos “35-44 anos” é a que demonstra maior número de mulheres (n=11), com uma percentagem de 44% da totalidade de elementos do género feminino.

**Quadro 3.1.** Distribuição da amostra (N=347) por faixa etária, segundo o género.

Faixa etária	Total n (%)	Masculino n (%)	Feminino n (%)
<25	2 (1)	2 (1)	0
25-34	40 (12)	37 (11)	3 (12)
35-44	88 (25)	77 (24)	11 (44)
45-54	124 (35)	115 (36)	9 (36)
55-64	90 (26)	88 (27)	2 (8)
>64	3 (1)	3 (1)	0
<b>Total</b>	<b>347 (100)</b>	<b>322 (100)</b>	<b>25 (100)</b>

**Figura 3.2.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) por faixa etária, segundo o género.



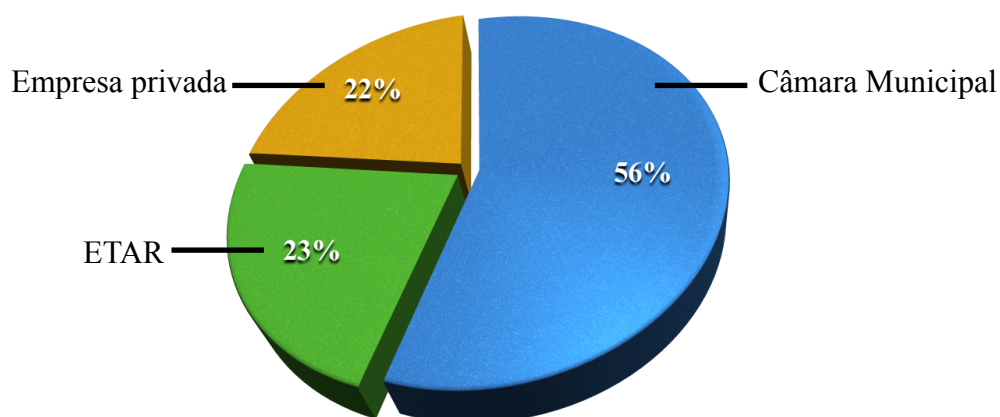
**Figura 3.3.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (n=343 dos participantes) segundo o Grau de escolaridade.

No que diz respeito à escolaridade dos inquiridos, a distribuição segue o padrão descrito na **Figura 3.3.** A maior percentagem diz respeito aos trabalhadores com o 9º ano de escolaridade completo (32%) e a percentagem mais baixa de 1%, é observada no grupo dos que não estudaram.

### 3.1.2 - Grupos Profissionais

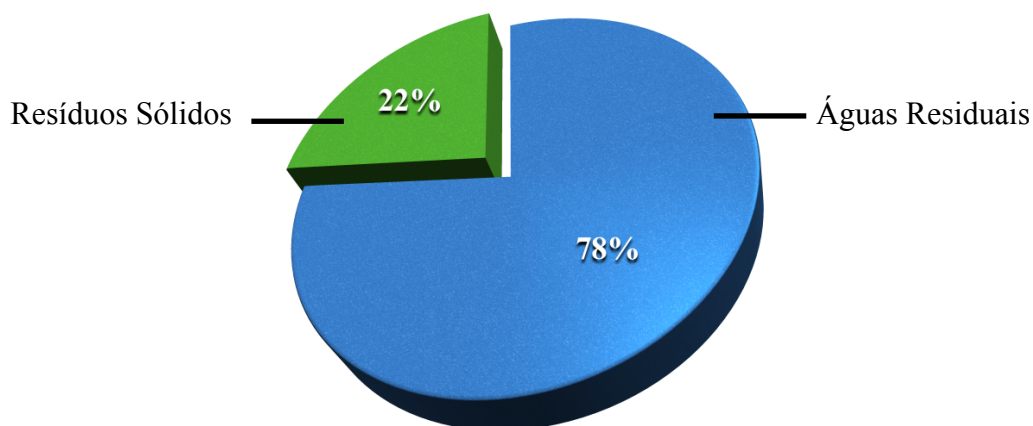
No que respeita às Entidades integrantes na área do Saneamento Básico, estas obtiveram a distribuição observada na **Figura 3.4.**, dividindo-se em Câmara Municipal (SMAS incluídos), ETAR ou Empresa Privada (privatizada). Já na **Figura 3.5.**, a distribuição foi elaborada de acordo com os grupos profissionais em contacto com “Resíduos Sólidos” ou “Águas Residuais”, percebendo-se de que forma os participantes estão distribuídos no estudo segundo a sua atividade laboral.

Como observado na **Figura 3.4.**, as Entidades Empregadoras com maior representatividade na amostra foram as Câmaras Municipais (56%), contribuindo com 193 trabalhadores para o estudo. Os participantes provenientes de ETAR’s ou Empresas privadas (privatizadas) estão em minoria na amostra, com 79 (23%) e 75 (22%) trabalhadores, respetivamente.



**Figura 3.4.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo as Entidades Empregadoras das quais fazem parte.

Na **Figura 3.5.**, é perceptível a predominância dos trabalhadores que entram em contacto com águas residuais no seu quotidiano laboral (78%), com 272 participantes, quando comparado com o setor dos resíduos sólidos (22%), com 75 participantes.



**Figura 3.5.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo a área laboral.

O **Quadro 3.2.** mostra a distribuição dos participantes segundo a Entidade empregadora e área de atividade laboral. Como se pode observar, as Câmaras Municipais foram as Entidades empregadoras com maior percentagem de indivíduos,

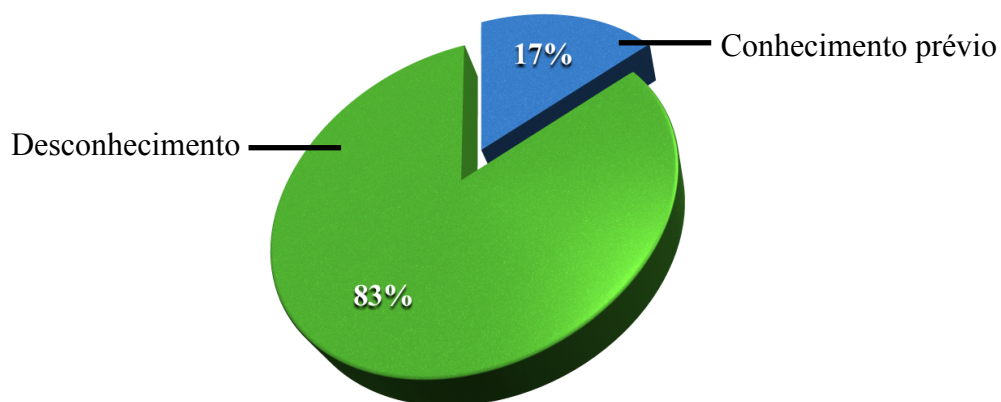
quer nas Águas Residuais como nos Resíduos Sólidos, com 54% (n=146) e 63% (n=47), respetivamente.

**Quadro 3.2.** Distribuição da amostra (N=347) por Entidade empregadora, segundo a área de atividade laboral na qual exercem funções.

Entidade empregadora	Águas Residuais n (%)	Resíduos Sólidos n (%)
Câmara Municipal	146 (54)	47 (63)
ETAR	79 (29)	0
Empresa Privada	47 (17)	28 (37)
Total	272 (100)	75 (100)

### 3.1.3 - Conhecimento prévio da doença

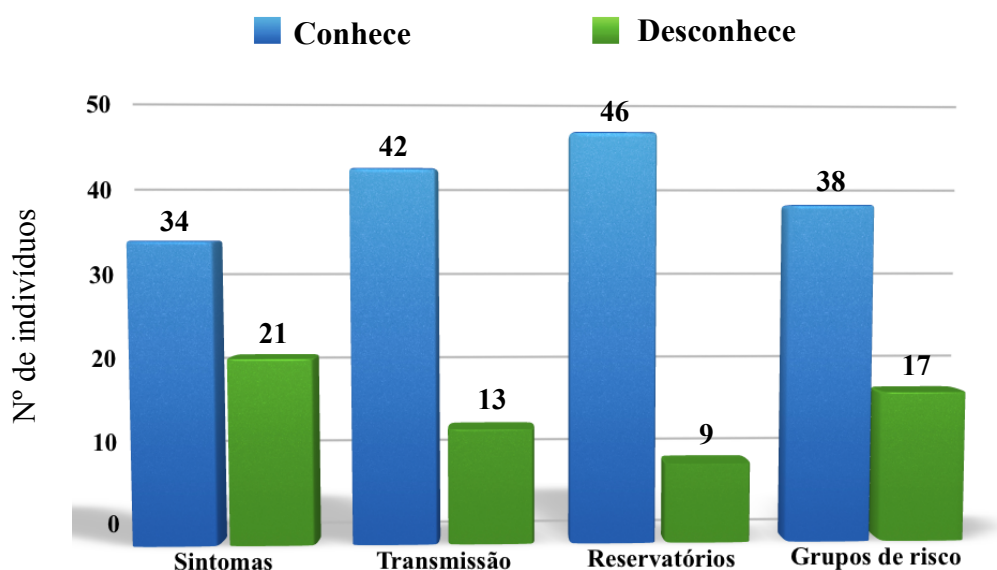
Foi recolhida informação acerca do conhecimento prévio que os participantes poderiam ter da leptospirose (transmissão, principais reservatórios e sintomatologia). Desta forma, a **Figura 3.6.**, mostra a distribuição dos participantes consoante o conhecimento prévio que possuíam, mesmo empírico, acerca da doença, enquanto a **Figura 3.7.** mostra a distribuição, segundo as áreas de conhecimento, para os 17% que afirmaram ter ouvido falar da doença no passado.



**Figura 3.6.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (n=322 dos participantes) segundo o Conhecimento prévio da doença.

Na **Figura 3.6.** verifica-se que uma percentagem de 77% dos participantes (n=267) desconhecia a doença leptospirose, afirmando nunca ter ouvido falar acerca dela. Apenas 17% dos inquiridos (n=55) responderam afirmativamente à pergunta “Alguma vez ouviu falar da doença leptospirose?”, sendo de seguida inquiridos acerca do grau de conhecimentos nos diversos aspetos (sintomas, transmissão, reservatórios e grupos de risco).

Assim, na **Figura 3.7.** observa-se que, o conhecimento acerca dos reservatórios animais responsáveis pela transmissão da bactéria ao ser humano é o aspeto onde os trabalhadores do Saneamento básico estão mais esclarecidos. Verifica-se que, dos 17% de trabalhadores com conhecimento prévio da doença, 83% (n=46/55) já possuíam esta informação. Os sintomas causados pela doença representam o aspeto onde a percentagem de trabalhadores com conhecimento prévio foi menor (62%), com n=34/55.



**Figura 3.7.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (n=55) segundo os diversos aspetos do conhecimento prévio da doença, por parte dos participantes no estudo.

No **Quadro 3.3.** observa-se a distribuição dos trabalhadores por grau de escolaridade, segundo o conhecimento prévio da doença. É visível que as maiores percentagens de inquiridos com conhecimento prévio sobre a doença estão relacionadas com um grau elevado de escolaridade, como são exemplos os trabalhadores com o 12º ano e Ensino Superior, em que 23% (n=15) e 58% (n=11), respetivamente, já tinham algum conhecimento acerca da doença.

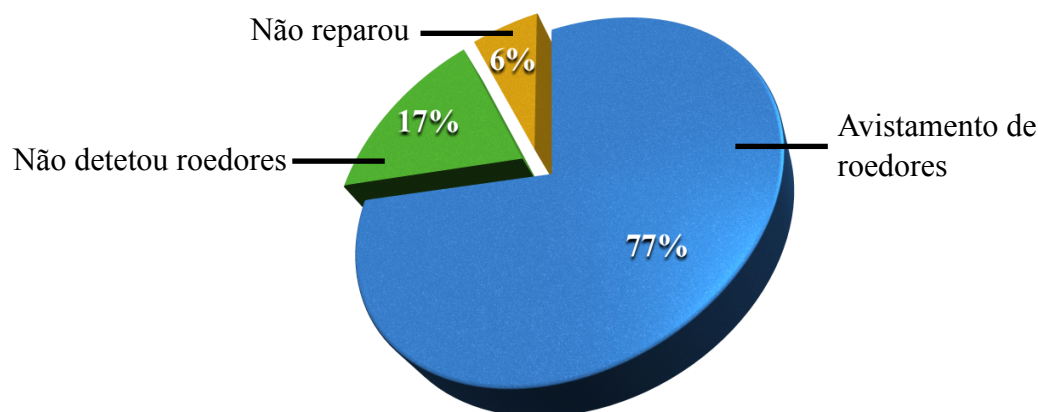
**Quadro 3.3.** Distribuição da amostra (n=319 dos participantes) por grau de escolaridade, segundo o conhecimento prévio da doença.

Grau de escolaridade	Conhecimento n (%)	Desconhecimento n (%)	Total n (%)
Não Estudou	0	2 (100)	2 (100)
4º ano	7 (10)	65 (90)	72 (100)
6º ano	5 (9)	52 (91)	57 (100)
9º ano	17 (16)	88 (84)	105 (100)
12º ano	15 (23)	49 (77)	64 (100)
Ensino Superior	11 (58)	8 (42)	19 (100)

### 3.1.4 - Contacto com reservatórios

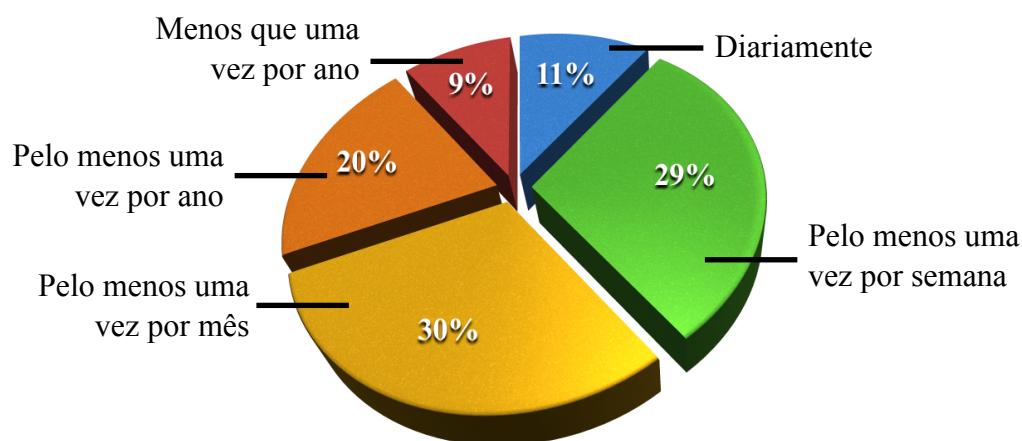
Quanto à exposição a ambientes com roedores (o reservatório mais importante no que diz respeito às leptospiros), a **Figura 3.8.** analisa a distribuição da amostra consoante a presença destes no local de trabalho, enquanto a **Figura 3.9.** diz respeito à frequência com que estes foram avistados, por 77% dos trabalhadores que os detetaram.

Assim, segundo a **Figura 3.8.**, a presença de roedores no local de trabalho foi detetada por 77% dos trabalhadores (n=265), enquanto os restantes 23% não detetaram qualquer roedor ou admitem não ter prestado atenção/não estiveram atentos (n=78).



**Figura 3.8.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (n=343 dos participantes) segundo o avistamento de roedores (ratos) no espaço laboral ou área envolvente, no ano anterior à aplicação do questionário.

A **Figura 3.9.** mostra a frequência com que os 265 trabalhadores (77%) detetaram roedores no seu local de trabalho, tendo 30% (n=80/265) respondido “Pelo menos uma vez por mês”, o que corresponde à maior percentagem. As menores percentagens correspondem aos extremos “Diariamente” e “Menos que uma vez por ano”, com 11% (n=30/265) e 9% (n=25/265), respetivamente.



**Figura 3.9.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (n=265 dos participantes) segundo a frequência com que os trabalhadores avistaram roedores (ratos) no espaço laboral ou área envolvente no ano anterior ao início do estudo.

No **Quadro 3.4.**, observa-se a distribuição dos trabalhadores que já avistaram roedores no seu local de trabalho segundo a área de atividade laboral. Dentro do grupo dos “Resíduos Sólidos” a maior percentagem obtida foi de 34% (n=14/41) para o avistamento de roedores “Pelo menos uma vez por ano”, enquanto que no grupo das “Águas Residuais” 33% (n=73/224) afirmaram ver roedores “Pelo menos uma vez por mês”, sendo esta a percentagem mais elevada do grupo.

**Quadro 3.4.** Distribuição da amostra (n=265) por área de atividade laboral segundo a frequência com que os trabalhadores avistam roedores no local de trabalho.

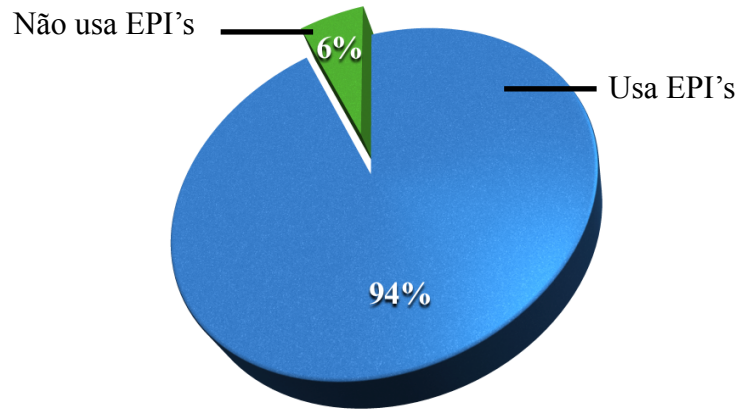
<b>Frequência</b>	<b>Resíduos Sólidos n (%)</b>	<b>Águas Residuais n (%)</b>
<b>Diariamente</b>	4 (10)	26 (12)
<b>Pelo menos uma vez por semana</b>	9 (22)	68 (30)
<b>Pelo menos uma vez por mês</b>	7 (17)	73 (33)
<b>Pelo menos uma vez por ano</b>	14 (34)	39 (17)
<b>Menos que uma vez por ano</b>	7 (17)	18 (8)
<b>Total</b>	41 (100)	224 (100)

## 3.2 - Caracterização do espaço laboral e dos comportamentos

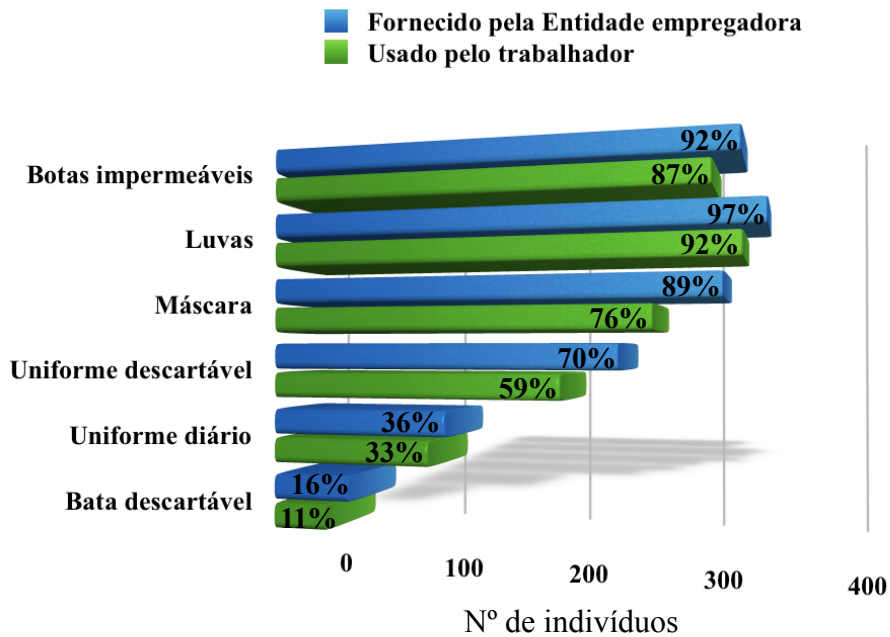
### 3.2.1 - Equipamento de Proteção Individual (EPI)

O fornecimento de EPI's por parte das Entidades empregadoras e sua utilização pelos participantes, encontra-se representado nas **Figuras 3.10.** e **3.11.** A **Figura 3.10.** analisa a utilização de EPI's, de uma forma geral, por parte dos trabalhadores,

observando-se que estes são utilizados por 94% dos inquiridos (n=325). Pelo contrário, 6% (n=22) afirmaram nunca ter usado EPI's no decorrer das suas funções laborais.



**Figura 3.10.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo a utilização de EPI's pelos trabalhadores.



**Figura 3.11.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo os EPI's fornecidos por parte da Entidade empregadora e sua utilização pelos trabalhadores.

Na **Figura 3.11.** e no **Quadro 3.5.** é possível estabelecer uma comparação entre os EPI's fornecidos pela Entidade empregadora e os que são utilizados na prática laboral, pelo trabalhador. Nesta Figura e Quadro apenas o uniforme higienizado no local de trabalho ("Uniforme diário") é incluído, tendo em conta a ausência de dados estatísticos passíveis de estabelecer comparação no que diz respeito ao uniforme transportado pelos trabalhadores e higienizado nas suas casas.

**Quadro 3.5.** Distribuição da amostra (N=347) pelos EPI's fornecidos pela Entidade empregadora e usados pelo trabalhador, bem como a diferença entre ambos.

EPI's	Fornecido pela Entidade empregadora n (%)	Usado pelo trabalhador n (%)	Diferença (Fornecido - Usado) n (%)
Botas impermeáveis	319 (92)	301 (87)	18 (5)
Luvas	335 (97)	320 (92)	15 (5)
Máscara	308 (89)	264 (76)	44 (13)
Uniforme descartável	242 (70)	204 (59)	38 (11)
Uniforme diário	125 (36)	113 (33)	12 (3)
Bata descartável	55 (16)	38 (11)	17 (5)

Analisando a **Figura 3.11.** e o **Quadro 3.5.** percebe-se que a percentagem de trabalhadores que afirmam receber EPI's por parte da sua Entidade empregadora é sempre superior à percentagem que utiliza esses mesmos EPI's. As luvas são o EPI mais fornecido, indicado por 97% dos participantes (n=335), no entanto, só 92% dos trabalhadores (n=320) o utilizam para a execução das suas atividades diárias. Desta forma, 5% dos inquiridos (n=18) que têm acesso a luvas, não as utiliza na rotina laboral.

As percentagens menores de EPI's fornecidos e utilizados dizem respeito ao Uniforme diário (com higienização a cargo da empresa) e à bata descartável, nos quais se verificaram 36% (n=125) e 16% (n=113) de trabalhadores, respetivamente, a afirmar receber estes EPI's no seu local de trabalho, enquanto só 33% (n=55) e 11% (n=38) os utilizam.

Segundo o **Quadro 3.5.**, a diferença maior entre o que é fornecido e utilizado diz respeito à máscara, com 13% (n=44) dos trabalhadores a não usarem, mesmo quando têm à sua disposição.

No **Quadro 3.6.** e na **Figura 3.12.** é possível analisar a frequência com que os trabalhadores utilizam os EPI's em estudo. O "Uniforme HT" representa o uniforme higienizado pelo trabalhador em casa e o "Uniforme diário" é o uniforme higienizado na Entidade empregadora.

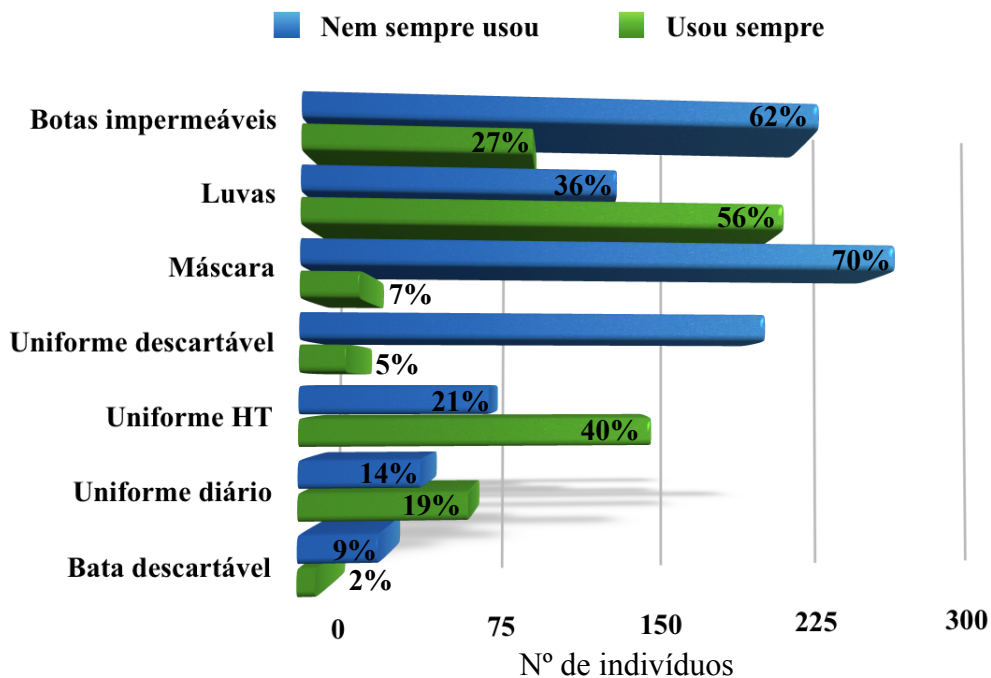
Assim, observando-se o **Quadro 3.6.** percebe-se que a percentagem de trabalhadores que utilizam EPI's varia de acordo com o tipo de EPI em estudo. A percentagem mais elevada diz respeito às luvas, com 56% (n=194) dos trabalhadores a usarem-nas sempre. Contudo, a percentagem mais elevada está na coluna dos que nunca usaram, com 89% (n=308) dos inquiridos a afirmarem nunca ter usado bata descartável. Na coluna com as percentagens dos indivíduos que nem sempre usam EPI's também é possível observar-se que 70% (n=241) não usam sempre a máscara.

O **Quadro 3.7.** mostra a distribuição da amostra por faixa etária (n=346), segundo a utilização de "Luvas" na execução das suas funções laborais. As faixas etárias com maior percentagem de indivíduos a utilizarem sempre luvas são as de "45-54 anos" e de "55-64 anos", com 60% (n=74 e n=54), respetivamente.

Os dados indicados no **Quadro 3.8.** relacionam o grau de escolaridade dos indivíduos com a frequência com que utilizam "Luvas". Neste quadro observa-se que à exceção dos indivíduos sem estudos, a maior percentagem de utilização sistemática de luvas, 64% (n=72), pertence aos participantes com o 9º ano de escolaridade.

**Quadro 3.6.** Distribuição da amostra (n=346 dos participantes) pelos EPI's estudados, segundo a frequência que os usam no seu quotidiano laboral.

EPI's	Nunca usou n (%)	Nem sempre usou n (%)	Usou sempre n (%)	Total n (%)
Botas impermeáveis	36 (11)	209 (62)	91 (27)	346 (100)
Luvas	27 (8)	125 (36)	194 (56)	346 (100)
Máscara	82 (24)	241 (70)	23 (7)	346 (100)
Uniforme descartável	142 (41)	186 (54)	18 (5)	346 (100)
Uniforme HT	133 (38)	74 (21)	139 (40)	346 (100)
Uniforme diário	233 (67)	47 (14)	66 (19)	346 (100)
Bata descartável	308 (89)	31 (9)	7 (2)	346 (100)



**Figura 3.12.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (n=346 dos participantes) segundo os EPI's fornecidos por parte da Entidade empregadora e sua utilização pelos trabalhadores.

**Quadro 3.7.** Distribuição da amostra (n=346 dos participantes) por faixa etária, segundo a frequência que usam “Luvas” (EPI) no seu cotidiano laboral.

Faixa etária	Nunca usou n (%)	Nem sempre usou n (%)	Usou sempre n (%)	Total n (%)
<25	1 (50)	0	1 (50)	2 (100)
25-34	5 (13)	17 (43)	54% 18 (44)	40 (100)
35-44	6 (7)	35 (40)	47 (53)	88 (100)
45-54	6 (5)	43 (35)	74 (60)	123 (100)
55-64	7 (8)	29 (32)	54 (60)	90 (100)
>64	2 (67)	1 (33)	0	3 (100)

**Quadro 3.8.** Distribuição da amostra (n=343 dos participantes) por grau de escolaridade, segundo a frequência que usam “Luvas” (EPI) no seu cotidiano laboral.

Grau de escolaridade	Nunca usou n (%)	Nem sempre usou n (%)	Usou sempre n (%)	Total n (%)
Não Estudou	0	0	3 (100)	3 (100)
4° ano	6 (8)	28 (38)	39 (54)	73 (100)
6° ano	6 (9)	24 (38)	34 (53)	64 (100)
9° ano	5 (5)	34 (31)	72 (64)	111 (100)
12° ano	6 (8)	27 (38)	39 (54)	72 (100)
Ensino Superior	3 (15)	12 (60)	5 (25)	20 (100)

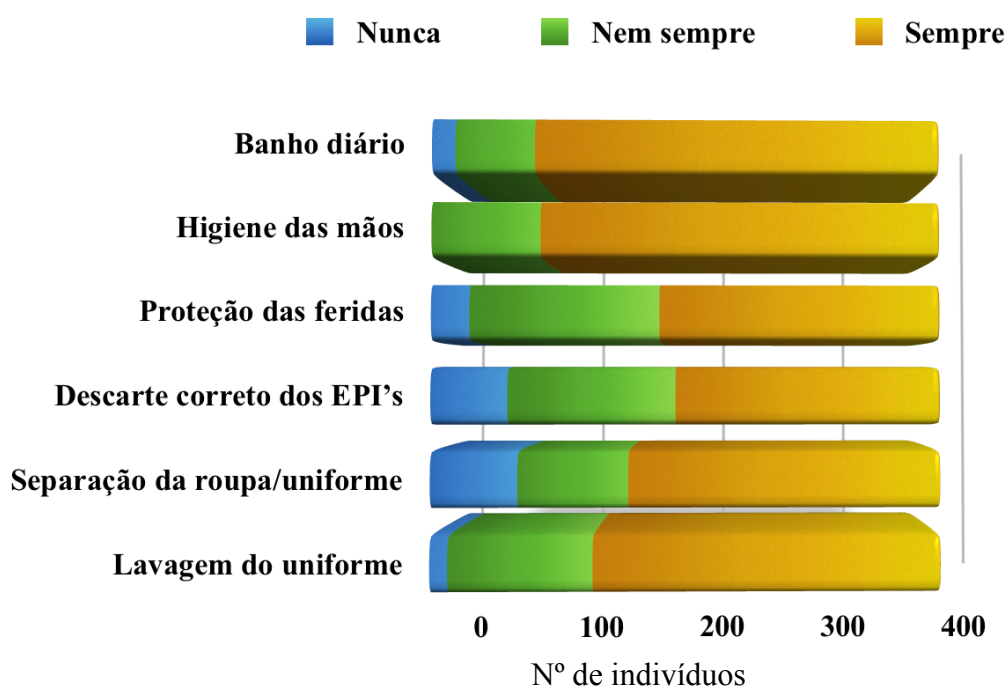
### 3.2.2 - Práticas preventivas (individuais e coletivas)

Em relação às práticas preventivas individuais, foram analisadas medidas de higiene gerais e aplicadas ao ambiente laboral destes trabalhadores. Assim, no **Quadro 3.9.** e na **Figura 3.13.** observa-se a distribuição da amostra para cada uma das medidas em estudo, de acordo com a frequência com que são utilizadas.

Analisando-se o **Quadro 3.9.** e a **Figura 3.13.** percebe-se a predominância de trabalhadores que aplicam sempre as medidas de higiene avaliadas no estudo: banho diário, higiene das mãos, proteção das feridas, descarte correto dos EPI's, separação da roupa/uniforme e lavagem do mesmo. A medida “Banho diário” diz respeito ao banho realizado nas instalações da Entidade empregadora.

**Quadro 3.9.** Distribuição da amostra (N=347) segundo a frequência com que aplicam medidas de higiene na sua rotina laboral.

<b>Medidas de higiene</b>	<b>Nunca n (%)</b>	<b>Nem sempre n (%)</b>	<b>Sempre n (%)</b>	<b>Total n (%)</b>
<b>Banho diário</b>	16 (5)	54 (16)	277 (79)	347 (100)
<b>Higiene das mãos</b>	0	74 (21)	273 (79)	347 (100)
<b>Proteção das feridas</b>	26 (7)	129 (37)	192 (56)	347 (100)
<b>Descarte correto dos EPI's</b>	52 (15)	114 (33)	181 (52)	347 (100)
<b>Separação da roupa/uniforme</b>	59 (17)	75 (22)	213 (61)	347 (100)
<b>Lavagem do uniforme</b>	12 (3)	98 (28)	237 (69)	347 (100)



**Figura 3.13.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo a frequência com que aplicam determinadas medidas de higiene na sua rotina laboral.

Observando-se o **Quadro 3.9.** e o **Gráfico 3.13.**, o “Banho diário” foi a medida preventiva individual que obteve uma maior percentagem de resposta por parte dos trabalhadores, sendo que 79% (n=277) responderam afirmativamente quanto à sua prática corrente.

Analisando as percentagens relacionadas com as medidas preventivas que nunca são realizadas pelos inquiridos, verificou-se que 17% (n=59) dos trabalhadores nunca procedem à separação da roupa pré/pós-laboral do seu uniforme de trabalho, sendo esta a maior percentagem obtida de entre as restantes medidas. Ainda na coluna do “Nunca”, importa referir que não há qualquer trabalhador que tenha afirmado nunca proceder à lavagem das mãos.

Os Quadros seguintes relacionam a frequência com que os trabalhadores procedem à “Proteção das feridas” (utilização de pensos/compressas) com a área de atividade laboral (**Quadro 3.10.**), faixa etária (**Quadro 3.11.**) e grau de escolaridade (**Quadro 3.12.**).

**Quadro 3.10.** Distribuição da amostra (N=347) por área de atividade laboral, segundo a frequência que aplicam a medida preventiva “Proteção das feridas”.

Área de atividade laboral	Nunca n (%)	Nem sempre n (%)	Sempre n (%)	Total n (%)
Águas Residuais	23 (8)	97 (36)	152 (56)	272 (100)
Resíduos Sólidos	3 (4)	32 (43)	40 (53)	75 (100)

Observando-se o **Quadro 3.10.**, o grupo laboral em contacto com águas residuais tem 56% (n=152) dos seus trabalhadores a protegerem feridas expostas, apresentando uma maior percentagem em relação ao grupo dos resíduos sólidos.

Por outro lado, analisando a distribuição em relação à faixa etária dos indivíduos (**Quadro 3.11.**), percebe-se que o grupo dos “55-64 anos” tem a percentagem mais elevada, de 64% (n=58), no que diz respeito à proteção sistemática das feridas, logo a seguir ao grupo dos “<25 anos”, em que os dois participantes efetuam uma proteção contínua das mesmas.

**Quadro 3.11.** Distribuição da amostra (N=347) por faixa etária, segundo a frequência com que aplicam a medida preventiva “Proteção das feridas”.

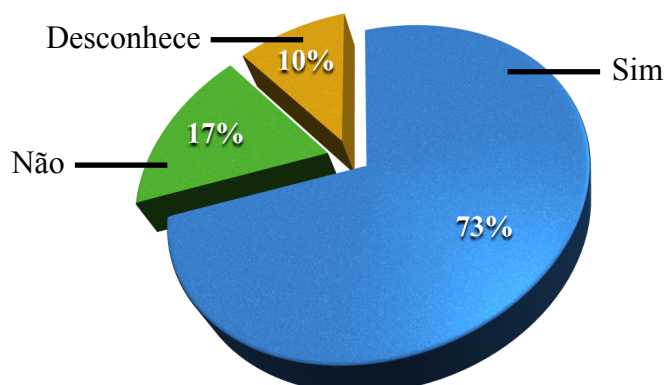
Faixa etária	Nunca n (%)	Nem sempre n (%)	Sempre n (%)	Total n (%)
<25	0	0	2 (100)	2 (100)
25-34	3 (8)	16 (40)	21 (52)	40 (100)
35-44	4 (5)	30 (34)	54 (61)	88 (100)
45-54	10 (8)	58 (47)	56 (45)	124 (100)
55-64	8 (9)	24 (27)	58 (64)	90 (100)
>64	1 (33,(3))	1 (33,(3))	1 (33,(3))	3 (100)

**Quadro 3.12.** Distribuição da amostra (n=343 dos inquiridos) por grau de escolaridade, segundo a frequência com que aplicam a medida preventiva “Proteção das feridas”.

Grau de escolaridade	Nunca n (%)	Nem sempre n (%)	Sempre n (%)	Total n (%)
Não Estudou	1 (33)	0	2 (67)	3 (100)
4º ano	9 (12)	21 (29)	43 (59)	73 (100)
6º ano	3 (5)	27 (42)	34 (53)	64 (100)
9º ano	7 (6)	42 (38)	62 (56)	111 (100)
12º ano	4 (6)	32 (44)	36 (50)	72 (100)
Ensino Superior	2 (10)	5 (25)	13 (65)	20 (100)

Observando o **Quadro 3.12.**, entende-se que 65% (n=13) dos trabalhadores com Ensino Superior completo protegem sempre as suas feridas, sendo esta a percentagem mais alta, logo a seguir ao grupo dos que não estudaram, com 67% (n=2).

No que diz respeito às medidas preventivas coletivas, geralmente aplicadas pela Entidade empregadora, analisaram-se algumas das medidas mais relevantes para o quotidiano laboral destes trabalhadores (existência de área destinada ao descarte/armazenamento de EPI's e desratização do espaço onde exercem funções), as quais estão descritas nas Figuras seguintes (**Figuras 3.14. e 3.15.**).



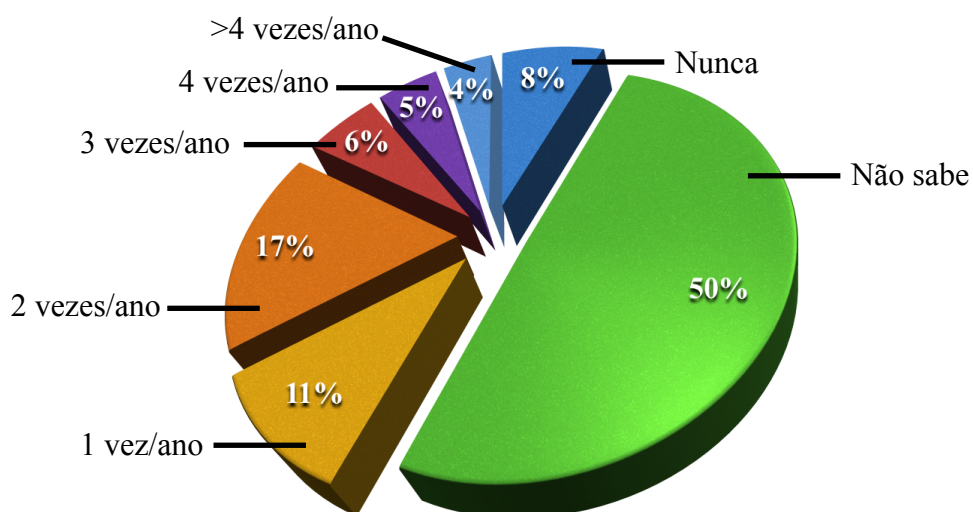
**Figura 3.14.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (n=342 dos participantes) segundo a existência de área destinada à recolha ou armazenamento de EPI's no local de trabalho.

A **Figura 3.14.** mostra que 73% (n=250) dos trabalhadores integrantes no estudo afirmaram possuir no seu local de trabalho uma área destinada à recolha dos EPI's, como é exemplo o cacifo.

Quanto à frequência com que a Entidade empregadora procede à desratização da área laboral, a **Figura 3.15.** permitiu identificar que 50% (n=156) dos inquiridos não tem conhecimento da sua existência, o que representa quase metade da amostra (N=347).

De acordo com as respostas fornecidas pelos trabalhadores percebe-se que 8% (n=25) dos participantes afirmam nunca ter ocorrido desratização no seu local de trabalho (espaço onde exercem as suas funções laborais e onde têm as suas áreas de lazer).

As percentagens mais baixas dizem respeito a frequências de desratização mais regulares no local de trabalho dos indivíduos, sendo que apenas 4% (n=12) dos trabalhadores afirmaram ocorrer desratização mais do que quatro (4) vezes por ano na sua área laboral.

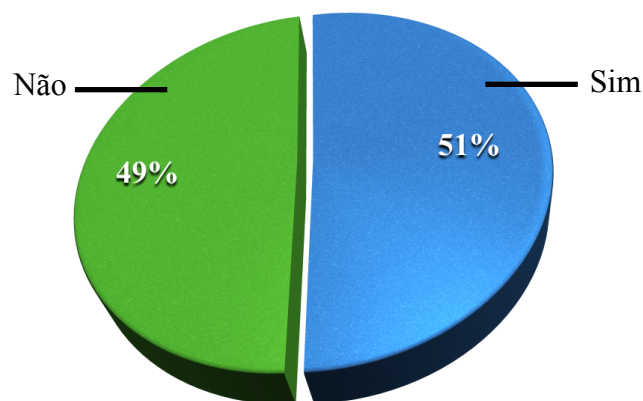


**Figura 3.15.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (n=320 dos participantes) segundo a frequência com que a Entidade empregadora procede à desratização do espaço laboral.

### 3.3 - Saúde Ocupacional

#### 3.3.1 - Sintomatologia compatível com leptospirose

Na área da Saúde Ocupacional, estudou-se a presença de sintomatologia compatível com leptospirose ligeira nos trabalhadores do Saneamento Básico, no decorrer do ano anterior ao início do estudo (**Figuras 3.16 e 3.17**). Os sintomas analisados foram semelhantes a uma síndrome gripal, com ausência de tosse e expectoração (febre, calafrios, cefaleias e mialgias). A **Figura 3.16**. mostra que 51% (n=175) dos inquiridos deu conta da ocorrência de sintomatologia concordante com uma síndrome gripal, enquanto 49% (n=172) afirmou não ter sentido estes sintomas no decorrer do ano anterior ao início do estudo.

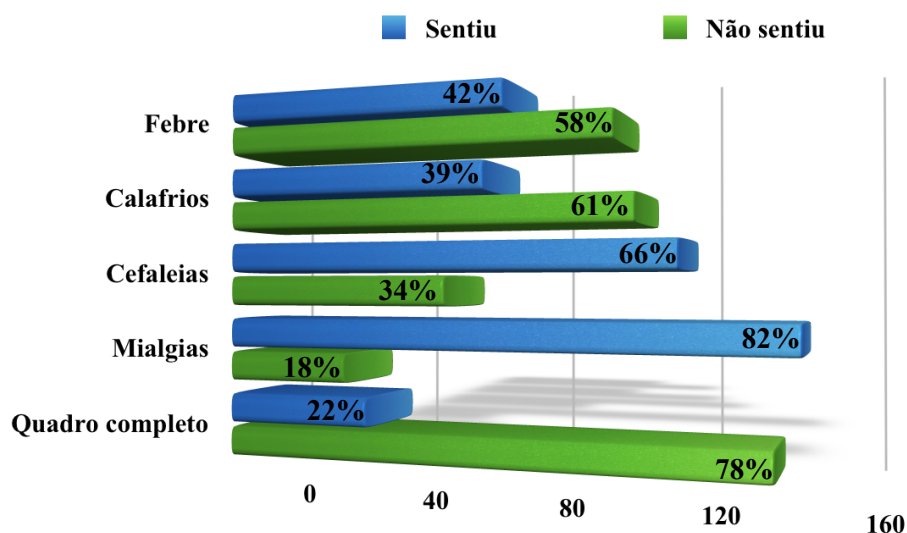


**Figura 3.16.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (N=347) segundo a ocorrência de sintomatologia compatível com leptospirose ligeira, no ano anterior ao início do estudo.

A **Figura 3.17**. diz respeito ao número de inquiridos que afirmou ter sentido sintomatologia compatível com síndrome gripal (49%), verificando-se qual a ocorrência de cada sintoma separadamente.

O sintoma predominante foi a mialgia, a qual ocorreu em 82% (n=143/175) dos trabalhadores. Quanto à percentagem de participantes que afirmaram sentir um quadro

sintomático completo, estes representaram 22% (n=38/175) do total de indivíduos que referiram ter sentido sintomatologia compatível com síndrome gripal no decorrer do ano anterior ao início do estudo.

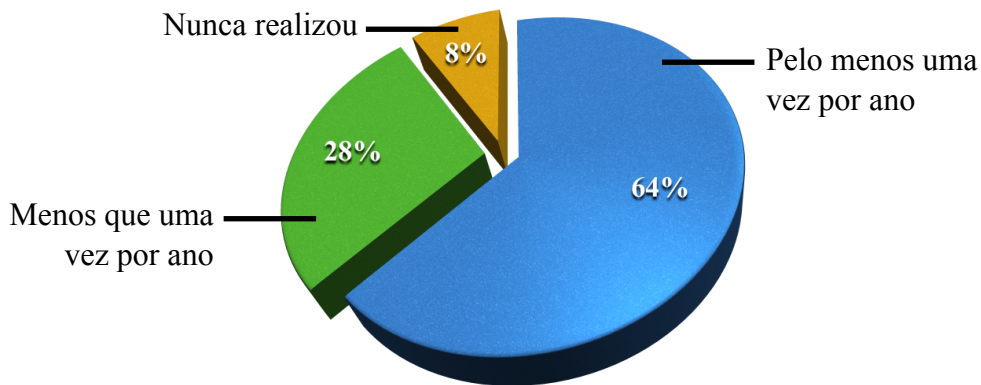


**Figura 3.17.** - Representação gráfica da distribuição dos participantes (n=175) segundo a ocorrência, no último ano, de cada um dos sintomas em particular, bem como de um quadro sintomático completo.

### 3.3.2 - Saúde Ocupacional - exames realizados

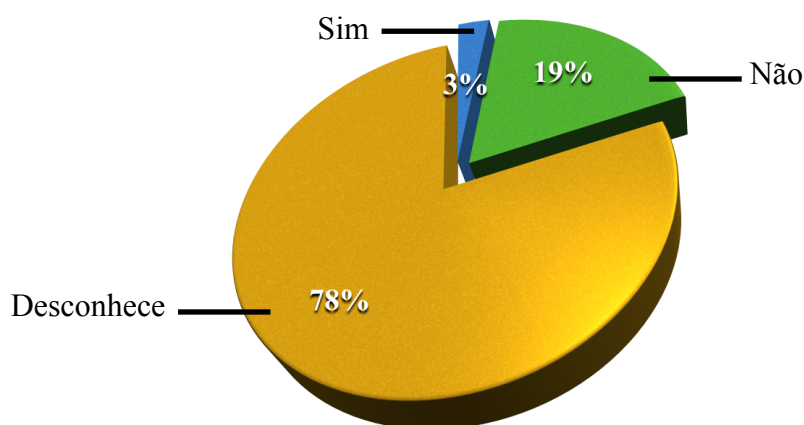
No que diz respeito às análises e exames no âmbito da Saúde Ocupacional, averiguou-se a frequência com que os trabalhadores os realizam, bem como o conhecimento que possuem acerca da existência de um teste de rastreio para pesquisa de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., incluso no conjunto de análises efetuadas (**Figuras 3.18. e 3.19.**).

Analisando-se a **Figura 3.18.**, entende-se que 64% (n=216) dos trabalhadores que participaram no estudo realizam exames/análises pela Medicina do Trabalho pelo menos uma vez por ano, enquanto apenas 8% (n=28) afirmaram nunca os terem feito.



**Figura 3.18.** - Representação gráfica da distribuição das respostas (n=340) dos participantes segundo a frequência com que os mesmos realizam Medicina do Trabalho.

Quanto à presença de um teste de rastreio para a pesquisa de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. no conjunto de análises realizadas (**Figura 3.19.**), 78% (n=263) dos inquiridos não têm conhecimento e 3% (n=9) dos trabalhadores afirmaram da inclusão deste teste de rastreio nas análises pela Medicina do Trabalho, o que não foi confirmado pelo clínico/enfermeiro responsável pela mesma.

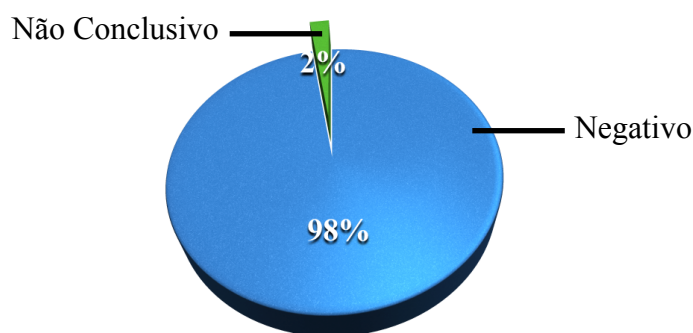


**Figura 3.19.** - Representação gráfica da distribuição da amostra (n=337 dos participantes) segundo a presença de um teste de rastreio para a pesquisa de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. nos exames pela Medicina do Trabalho.

### 3.4 - Testes serológicos

#### 3.4.1 - Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto)

Numa primeira fase foi aplicado o teste MACROLepto aos participantes no estudo, pesquisando-se a presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. nas amostras de soro dos mesmos. Assim, os resultados obtidos neste teste estão descritos na **Figura 3.20.**, não se tendo verificado qualquer resultado “Positivo”. O teste MACROLepto revelou 98% (n=339) de resultados “negativos” e 2% (n=8) de “não conclusivos”.



**Figura 3.20.** - Representação gráfica da distribuição do total de participantes (N=347), de acordo com o resultado laboratorial obtido no teste MACROLepto.

#### 3.4.2 - Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM)

Os resultados “Não Conclusivos” na MACROLepto foram de seguida testados pela TAM, não se verificando qualquer reatividade nas amostras (n=8).

Perante os resultados obtidos na MACROLepto, entendeu-se ser pertinente a realização da TAM às amostras com um quadro sintomático completo, em que os participantes afirmaram ter sentido, no decorrer do último ano, manifestações típicas de uma síndrome gripal.

Desta forma, foram testadas 38 amostras pertencentes aos participantes enquadrados no perfil descrito no parágrafo anterior, não se obtendo qualquer resultado positivo.

## **4.DISSCUSSÃO E CONCLUSÕES**

A leptospirose é uma zoonose com distribuição mundial, afetando principalmente populações que vivem em condições de pobreza. A sua importância clínica é muitas vezes subestimada, tendo-se comprovado em diversos estudos a ocorrência de casos subdiagnosticados, sobretudo em países onde a exposição aos fatores de risco é acentuada. Esta problemática é relativamente importante quando se estabelece a ligação que estes países têm com a incapacidade em elaborar diagnósticos assertivos, ou até mesmo em reconhecer os sinais e sintomas típicos da infecção (Bharti *et al.*, 2003; WHO, 2010; Schneider *et al.*, 2013; Farrar *et al.*, 2014).

Em países tropicais, a semelhança que o quadro clínico típico de leptospirose ligeira apresenta em relação a outras doenças endémicas, tais como a malária e a dengue, são outro fator importante no que diz respeito ao baixo número de casos diagnosticados. Isto é válido sobretudo em regiões onde o grau de exposição aos fatores de risco faria prever uma maior prevalência de leptospirose (Dutta *et al.*, 2005; Fauci *et al.*, 2008).

Ao contrário dos países de baixa renda, onde a transmissão das leptospiras ocorre de uma forma generalizada pela população, nos países desenvolvidos, certas profissões consideradas de risco representam o grupo mais afetado pela doença. Os trabalhadores do saneamento básico são um dos grupos laborais de risco, uma vez que realizam a sua atividade profissional num ambiente propício à presença de roedores, os quais, através da urina, contaminam águas residuais e resíduos sólidos. Este facto potencia o grau de exposição ao qual estão sujeitos no seu quotidiano, tornando o contacto com águas residuais e resíduos sólidos uma possível fonte de infeção para os próprios (Serres *et al.*, 1995; Sarkar *et al.*, 2002; Fauci *et al.*, 2008).

A falta de conhecimento, em Portugal Continental, acerca do risco real a que estes trabalhadores estão sujeitos no seu local de trabalho levantava algumas questões importantes, nomeadamente: a possível existência de doença não diagnosticada neste grupo, por influência da semelhança de sintomas com a síndrome gripal; e a não valorização dos sintomas pelos mesmos motivos. Esta falta de conhecimento originou até à data a ausência de um controlo regular específico para a leptospirose, o qual poderia ser obtido através da inclusão de um teste laboratorial de rastreio para a deteção

de anticorpos específicos (Teste de Aglutinação Macroscópica - MACROLepto), na Medicina do Trabalho.

Este estudo foi pioneiro em Portugal Continental, tentando sobretudo esclarecer acerca da possível prevalência de leptospirose e/ou da presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., na população alvo “trabalhadores do saneamento básico” da região de Lisboa e Vale do Tejo. Num estudo semelhante realizado numa região do Brasil foi revelada a existência de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. nos trabalhadores deste grupo, facto que elevou as expectativas acerca da situação em Portugal Continental, nomeadamente na referida região.

No que diz respeito aos dados demográficos recolhidos através do Questionário clínico-epidemiológico aplicado aos participantes do estudo, comprovou-se a elevada prevalência de elementos do género masculino a exercer funções neste setor (grande maioria), algo que era expectável, visto ser uma profissão geralmente desempenhada por homens.

A faixa etária com maior percentagem de trabalhadores no ativo situa-se entre os 45-54 anos, onde se encontra um terço dos participantes. No entanto, verificou-se que as faixas etárias dos 35-44 anos e 55-64 anos contêm também uma importante percentagem de participantes no estudo (um quarto dos participantes). Estes resultados são concordantes com a diminuição das contratações nas camadas jovens, o que pode ser explicado pelo crescente interesse da população em prosseguir estudos, procurando uma profissão de maior prestígio.

Em relação ao nível de escolaridade dos participantes, observou-se no geral um maior grau do mesmo, sendo que a maioria tem o 9º ano ou um grau superior (12º ano ou Ensino Superior). Estes resultados são surpreendentes, mas podem ser explicados pelo aumento da tecnologia associada às atividades laborais (facto observado durante visitas às instalações aquando do contacto com os trabalhadores), as quais requerem, cada vez mais, um nível superior de conhecimento e especialização por parte do trabalhador. Por essa razão, foram criados vários cursos profissionais com equivalência ao 12º ano, bem como cursos de Ensino Superior, tornando esta área profissional cada vez mais técnica e especializada nas atividades que desenvolve.

A percentagem de trabalhadores vindos de Empresas privatizadas foi a mais baixa (um quinto), destacando-se dos restantes grupos (ETAR e Câmara Municipal), que contribuíram com a maioria dos participantes.

Quanto às empresas privadas de desratização e limpeza de esgotos, desde o primeiro contacto telefónico foi notório o desinteresse em fazer parte do estudo, quer pelo desconhecimento de que a profissão pudesse ser considerada grupo profissional de risco para a leptospirose, quer pela falta de disponibilidade dos trabalhadores em fazer parte do estudo.

Com o desenvolvimento da investigação junto das Entidades empregadoras integrantes do projeto, foi possível entender a importância que estas empresas privadas têm na prestação de serviços a Câmaras Municipais e ETAR's, como entidades subcontratadas. Desta forma, a exposição ao risco por parte dos funcionários das Empresas privadas de limpeza de esgotos e desratização é muito superior ao de um trabalhador pertencente a uma Câmara Municipal e/ou ETAR, cujas funções não os coloca em exposição direta prolongada aos fatores de risco epidemiológico (por exemplo, desentupimento de uma bomba em ETAR).

Importa referir, também, o facto de as Entidades empregadoras participantes no estudo demonstrarem um interesse genuíno no desenvolvimento da investigação aplicada aos trabalhadores, sendo esta uma importante ferramenta na promoção da saúde e da melhoria das condições laborais.

A predominância de trabalhadores em contacto com águas residuais, quando comparada com os que contactam com resíduos sólidos, está relacionada com a falta de adesão que este grupo demonstrou, o qual pertence exclusivamente a Câmaras Municipais. As águas residuais, por sua vez, pertencem aos SMAS (Serviços Municipalizados das Águas e Saneamento), um serviço que não é da total pertença das Câmaras Municipais, tendo adotado ao longo do tempo, de uma forma mais efetiva e com maior rapidez, certas medidas importantes de proteção dos trabalhadores, tais como os EPI's.

Quanto ao grau de conhecimento que os trabalhadores possuíam sobre a leptospirose, antes da sessão de esclarecimento, verificou-se que três quartos dos

inquiridos nunca tinham ouvido falar da doença. Desta forma, neste grupo laboral em particular, seria importante a realização de sessões de esclarecimento/ações de formação onde seriam abordados os riscos associados à sua profissão, bem como medidas práticas de prevenção. Desta forma, a utilização de EPI's em contexto laboral não seria vista como obrigação, mas sim como uma necessidade e uma importante ferramenta de proteção. Observou-se ainda que os trabalhadores com um grau de escolaridade superior, detinham as maiores percentagens no que diz respeito ao conhecimento prévio da doença.

Quanto à exposição que este grupo poderia ter no decorrer das suas atividades laborais, comprovou-se a existência de roedores no local de trabalho, com três quartos dos trabalhadores a confirmarem-no. Sendo estes animais considerados um importante reservatório da bactéria e principais responsáveis pela transmissão das leptospiros aos humanos, entende-se a pertinência que o grau de exposição lhes confere para este estudo. A exposição a roedores demonstra que estes trabalhadores têm um risco acrescido de contacto com leptospiros, o que está na base da sua inclusão nos grupos de risco descritos para esta doença. A presença regular de roedores no local de trabalho é clara quando um terço dos trabalhadores afirma detetar a sua presença pelo menos uma vez por mês e outro terço deteta-os pelo menos uma vez por semana. Analisando a frequência com que estes indivíduos avistam roedores segundo a sua atividade laboral, percebe-se que é o grupo pertencente às águas residuais que avista com maior regularidade. Dois terços dos trabalhadores das águas residuais detetam roedores pelo menos uma vez por mês, enquanto dois terços dos participantes associados às atividades com resíduos sólidos os avistam pelo menos uma vez por ano. Estas informações deixam antever a forte possibilidade dos trabalhadores entrarem em contacto com leptospiros em algum momento da sua prática laboral.

A utilização de EPI's pela grande maioria dos trabalhadores é uma medida de proteção individual essencial para evitar o contacto com a bactéria, protegendo este grupo de uma possível infeção por *L. interrogans* s.l.. A adesão aos EPI's, por parte dos trabalhadores, é extremamente significativa e tem repercussões efetivas na promoção da saúde e na prevenção das doenças associadas a este grupo profissional, entre elas a

leptospirose. Apesar do trabalho desenvolvido até aqui, com a forte implementação dos EPI's em contexto laboral, ainda existem algumas lacunas a ser corrigidas, tais como a não utilização destes equipamentos sempre. Os EPI's devem ser utilizados de acordo com a atividade laboral desenvolvida e com os riscos a ela associados. No entanto, de uma forma geral, a percentagem de trabalhadores que já utilizaram um determinado EPI pelo menos uma vez, não é a mesma daqueles que o utilizam sempre. A utilização de máscara é o exemplo mais notório, com uma diferença importante entre aqueles que já a utilizaram pelo menos uma vez (quatro quintos) e os que a utilizam sempre (um décimo).

As luvas foram os EPI's mais utilizados pelos trabalhadores. Desta forma, analisou-se a sua distribuição por faixa etária e por grau de escolaridade. As faixas etárias "45-54 anos" e "55-64 anos" tiveram mais de metade dos seus participantes a utilizar sempre luvas, enquanto dois terços dos indivíduos detentores do 9º ano de escolaridade recorreram sempre às luvas. Estes resultados poderão dar a entender que a utilização das luvas como equipamento de proteção em ambiente laboral, não será algo cuja importância foi reconhecida recentemente, mas sim generalizada ao longo das últimas gerações, bem como o seu uso será decorrente da informação transmitida desde cedo pelas escolas.

Para além dos EPI's, existem medidas de higiene essenciais para a promoção da saúde e prevenção da doença, tais como: banho diário, higiene das mãos, proteção das feridas, descarte correto dos EPI's, separação da roupa/uniforme e lavagem do mesmo. Estas medidas foram sempre utilizadas por mais de metade dos trabalhadores que participaram no estudo. Estes resultados poderão demonstrar a preocupação que os trabalhadores têm pela prática das medidas de higiene gerais, estando ao corrente da importância que elas constituem para a sua saúde e dos que os rodeiam.

A medida "Proteção das feridas" é de extrema utilidade nesta infeção em particular, prevenindo que o agente infeccioso tenha uma porta de entrada para se disseminar no organismo. Desta forma, analisou-se a sua distribuição por atividade laboral, faixa etária e grau de escolaridade. No que diz respeito à atividade laboral, mais de metade dos indivíduos de cada grupo afirmaram proteger sempre as suas feridas.

Quando observamos os resultados por faixa etária, percebemos que dois terços dos indivíduos do grupo “55-64 anos” protegem sempre as suas feridas, enquanto outros dois terços dos participantes com o Ensino Superior também o fazem. Com estes resultados entendemos que um grau de escolaridade superior pode estar relacionado com uma preocupação acrescida no que diz respeito à proteção individual. No entanto, este parece ser também um assunto valorizado pelas gerações mais antigas, o que nos remete novamente para a explicação apontada dois parágrafos acima, em relação à utilização de luvas.

Por outro lado, no que diz respeito a medidas de proteção coletivas promovidas pelas Entidades empregadoras, verificou-se que a utilização de um local destinado ao descarte/armazenamento de EPI's, bem como a desratização do espaço onde exercem funções, são ambas medidas valorizadas e aplicadas. No primeiro caso, três quartos dos trabalhadores afirmou possuir um local próprio para colocar os EPI's, sendo o cacifo o exemplo mais utilizado. Quanto à desratização, apenas um quinto dos inquiridos afirma que esta não ocorreu, o que demonstra a preocupação em melhorar a qualidade do ambiente onde os trabalhadores desenvolvem as suas funções, bem como a provável consciencialização de que o roedor representa uma fonte de transmissão de agentes causais de doenças.

No âmbito da sintomatologia compatível com leptospirose ligeira, a qual pode ser confundida com uma síndrome gripal, levando ao subdiagnóstico, avaliou-se a ocorrência de febre, calafrios, cefaleias e mialgias no ano anterior ao início do estudo. Metade dos trabalhadores inquiridos afirmaram ter sentido pelo menos um dos sintomas descritos, obtendo-se uma maior frequência nas mialgias (quatro quintos) e cefaleias (três quintos). Tendo em conta este padrão, com apenas um quarto dos trabalhadores a apresentarem o quadro completo, e considerando a inespecificidade dos sintomas, pode supor-se que a ocorrência de mialgias esteja relacionada com o esforço físico das atividades laborais ou com a idade dos participantes, por exemplo. As cefaleias também poderiam ser explicadas pelo eventual *stress* do trabalho ou pelo cansaço/fatiga.

No que diz respeito à Saúde Ocupacional, é perceptível a importância a ela atribuída, motivada também pelo surgimento de nova legislação nesta área. A grande

maioria dos trabalhadores afirmou realizar análises/exames pela Medicina do Trabalho com regularidade, sendo que dois terços o faz todos os anos. No entanto, apesar deste seguimento no que respeita à saúde dos trabalhadores, três quartos dos inquiridos desconhecem se um teste de rastreio para a leptospirose está incluído no painel de análises que realizam, enquanto um quinto afirma que o mesmo está ausente do referido painel. O facto de existir uma pequena percentagem de trabalhadores (menos de um décimo) a afirmar ter conhecimento da presença deste teste de rastreio no painel de análises da Medicina do Trabalho, é indicador da falta de conhecimento que alguns possuem em relação aos exames que realizam. Este facto alia-se ao desconhecimento que os trabalhadores possuíam acerca da bactéria, deixando entender que a leptospirose poderá ser uma doença desvalorizada num contexto de saúde ocupacional. Para essa desvalorização contribui o facto de em Portugal Continental existirem poucos casos de leptospirose severa (Síndrome de Weil) reportados pelas autoridades oficiais (Pinto *et al.*, 2015), mas também a semelhança que a sintomatologia associada à forma ligeira (leptospirose anictérica) apresenta em relação à síndrome gripal.

Assim, a ausência de resultados positivos, quer na MACROLepto, quer na TAM, não constituíram uma total surpresa, após a análise dos questionários clínico-epidemiológicos e após o contacto direto com os trabalhadores, tendo existido a oportunidade de constatar a forma como encaram a saúde e como se preocupam com ela num contexto laboral e familiar.

Para além da grande maioria dos trabalhadores utilizar EPI's durante as suas funções, também adotaram medidas práticas de higiene em contexto laboral, as quais são válidas para qualquer doença infecciosa, não só para a leptospirose. Desta forma, mesmo com um desconhecimento acerca da doença, as noções de segurança e higiene incutidas pela Entidade empregadora poderão ter sido importantes na proteção dos trabalhadores.

Por outro lado, a preocupação que as Entidades empregadoras integrantes do estudo demonstraram, em relação aos seus trabalhadores, foi notória. Este facto distinguiu-as das empresas privadas de desratização e limpeza de esgotos contactadas, que não participaram por entenderem não haver qualquer risco associado aos seus

trabalhadores, não reconhecendo que estes poderiam estar expostos a uma bactéria transmitida por roedores. Nas Entidades empregadoras onde o risco já é reconhecido, poderão existir medidas de proteção mais eficazes para fazer frente a este agente.

Por outro lado, importa referir a questão, abordada acima, de que muitas vezes são as Empresas Privadas de limpeza de esgotos as responsáveis pelas tarefas consideradas de maior risco, colocando o trabalhador em contacto próximo e prolongado com águas residuais, possivelmente contaminadas com a bactéria em estudo. Como essas empresas não aceitaram participar não foi possível avaliar a presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. neste setor, o qual se considerava pertinente para o estudo.

A provável profissionalização dos trabalhadores desta atividade, com um grau de escolaridade mais elevado, poderá ter originado uma maior consciencialização do risco e conseqüentemente a criação e cumprimento de medidas efetivas de proteção do trabalhador.

Assim, verifica-se que:

- As Entidades empregadoras que aceitaram participar demonstraram em todos os momentos um interesse e preocupação pelo trabalhador e pela sua saúde, o que poderá favorecer as boas práticas laborais e a promoção da saúde;

- As Empresas privadas de limpeza de esgotos são muitas vezes subcontratadas pelas Câmaras Municipais para a realização de certas atividades que expõem os trabalhadores a um risco superior quando comparado com os trabalhadores do Saneamento básico integrantes deste estudo;

- A utilização dos EPI's encontra-se generalizada por todo este setor, existindo possivelmente um reconhecimento por parte dos trabalhadores da sua importância em contexto laboral e como ferramentas úteis na prevenção da infeção;

- A utilização das luvas, não será um equipamento de proteção cuja importância terá sido reconhecida recentemente, mas sim algo que tem vindo a ser generalizado ao longo das últimas gerações;

- As medidas gerais de higiene estão assumidas e assimiladas pelos trabalhadores em questão, fazendo parte das suas rotinas diárias, o que poderá contribuir para a diminuição do risco de infecção por leptospiros ou por outra doença infecciosa;

- A falta de conhecimento específico que os trabalhadores possuíam acerca desta doença em particular não parece constituir um fator de risco acrescido, pelo facto de já possuírem noções gerais da doença e da importância em aplicar medidas de proteção efetivas;

- A inespecificidade dos sintomas relacionados com a leptospirose ligeira demonstrou que, mesmo a presença de um quadro sintomático completo num grupo de trabalhadores, não corresponde a infecção por este agente;

- A presença de roedores no local de trabalho constitui um importante fator de risco; no entanto, o cumprimento das normas preventivas enumeradas acima (EPI's, medidas de higiene, desratização) tem sido efetivo na proteção dos trabalhadores;

- A introdução de um teste de rastreio para a pesquisa de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. nas análises pela Medicina do Trabalho não será prioritário, contudo, é importante alertar os trabalhadores para esta infecção e para a importância que as medidas preventivas constituem.

Estas conclusões são válidas para os trabalhadores pertencentes aos grupos profissionais estudados, mas ficou por esclarecer qual a realidade das Empresas privadas de desratização e limpeza de esgotos. Estas empresas demonstraram não valorizar esta temática acerca do risco a que os seus trabalhadores estão sujeitos, para além de estarem encarregues de atividades com maior risco de exposição. Desta forma, julga-se pertinente desenvolver no futuro um estudo com estas características clínico-epidemiológicas, cujo foco seria este grupo profissional em particular.

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

- Abdulkader RCRM.** 1997. Acute renal failure in leptospirosis. *Renal fail.* **19**: 191-198.
- Acha PN, Szyfres B.** 2003. *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals.* 3<sup>a</sup>ed, Pan American Health Organization. Washington, USA
- Adler B, Moctezuma AP.** 2010. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol.* **140**(3-4): 287-96.
- Aldeia AMS.** 2016. Identificação molecular de bactérias do género *Leptospira* em coleções de água doce no distrito de Leiria. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 71pp.
- Alexander AD, Byrne RJ, Evans LB et al.** 1963. Leptospirosis in Puerto Rico. *Zoonoses Res.* **2**: 152-227.
- Almeida LP, Martins LF, et al.** 1994. Levantamento soroepidemiológico de Leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. *Rev Saud Pub.* **28**(1):76-81.
- Angnani R, Pathak AA, Mishra M.** 2003. Prevalence of leptospirosis in various risk groups. *Ind J of Med Microbiol.* **21**(4):271-273.
- Areán VM.** 1962. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Am J Pathol.* **40**: 393-423.
- Ayanegui-Alcerreca MA, Wilson PR, Mackintosh CG, Collins-Emerson JM, Heuer C, Midwinter AC, Castillo-Alcala F.** 2007. Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: a review. *N Z Vet J.* **55**(3): 102-108.

**Ballard SA, Williamson M, Adler B, Vinh T, Faine S.** 1986. Interactions of virulent and avirulent leptospire with primary cultures of renal epithelial cells. *J Med Microbiol.* **21**:59-67.

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

**de Brito T, Machado MM, Montans SD, Hosino S, Freymuller E.** 1967. Liver biopsy in human leptospirosis: a light and electron microscopy study. *Virchows Arch Pathol Anat.* **342**: 61-69.

**Carreira TM.** 2009. Implementação de métodos moleculares para o diagnóstico precoce da Leptospirose humana. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 65pp.

**Collares-Pereira M, Korver H, Terpstra WJ, Santos-Reis M, Ramalinho MG, Mathias ML, Oom MM, Fons R, Libois R, Petrucci-Fonseca F.** 1997. First epidemiological data on pathogenic leptospire isolated on the Azorean islands. *Eur J Epidemiol.* **13**(4):435-441.

**Collares-Pereira M, Mathias ML, Santos-Reis M, Ramalinho MG, Duarte-Rodrigues P.** 2000. Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). *Eur J Epidemiol.* **16**(12):1151-1157

**Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al.** 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**(9): e0003898.

**Dutta TK, Christopher M.** 2005. Leptospirosis - An Overview. *JAPI.* **53**:545-551.

**Esteves LM, Bulhões SM, Branco CC, Mota FM, Paiva C, Cabral R, Vieira ML, Mota-Vieira L.** 2014. Human Leptospirosis: Seroreactivity and Genetic Susceptibility in the Population of São Miguel Island (Azores, Portugal). *PLoS ONE*. **9(9):**e108534.

**Evangelista KV, Coburn J.** 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. **5(9):**1413–1425.

**Everard CO, Sulzer CR, Bhagwandin Lj, Fraser-Chanpong GM, James AC.** 1980. Pathogenic leptospira isolates from the Caribbean Islands of Trinidad, Grenada and St Vincent. *Int J Zoonoses*. **7:** 90-100.

**Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P.** 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2<sup>a</sup>ed, MediSci. Melbourn. 272pp.

**Farrar J, White NJ, Hotez PJ, Junghanss T, Lalloo D, Kang G.** 2014. *Manson's Tropical Diseases*. 23<sup>a</sup>ed, Elsevier Saunders. China. pp433-440.

**Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J.** 2008. *Harrison Medicina Interna*. 17<sup>a</sup> ed, McGraw-Hill. Rio de Janeiro. pp1048-1051.

**Fortes-Gabriel E, Carreira T, Vieira ML.** 2016. First Isolates of *Leptospira* spp., from Rodents Captured in Angola. *Am J Trop Med Hyg*. **94(5):**955-968.

**Garcia J.** 2011. Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na região do Lobito (Angola): aplicação de métodos de diagnóstico serológico e molecular. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 73pp.

**Gonçalves AT, Paiva C, Melo-Mota F, Vieira ML, Carreira T, Nunes MS, Mota-Vieira L, Ahmed A, Harstkeerl RA, Hyde K, Collares-Pereira M.** 2010. First isolation of human *Leptospira* strains, Azores, Portugal. *Int J Infect Dis.* **14**(3):e148-e153.

**Haake DA, Levett PN.** 2015. Leptospirosis in Humans. *Curr Top Microbiol Immunol.* **387**:65-97.

**Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA.** 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect.* **17**(4):494-501.

**Izurieta R, Galwankar S, Clem A.** 2008. Leptospirosis: The “mysterious” mimic. *J Emerg Trauma Shock.* **1**(1):21-33.

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

**Kamath R, Swain S, Pattanshetty S, Nair NS.** 2014. Studying Risk Factors Associated with Human Leptospirosis. *J Glob Infect Dis.* **6**(1):3-9.

**Kelley PW.** Leptospirosis. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. 1998. *Infectious diseases.* 2nd ed, W. B. Saunders. Philadelphia. pp1580-1587.

**Levett PN.** 2001. Leptospirosis. *American Society for Microbiology.* **14**(2):296-326.

**Levett PN, Branch SL, Edwards CN.** 2000. Detection of Dengue Infection in Patients Investigated for Leptospirosis in Barbados. *Am J Trop Med Hyg.* **62**(1):112-114.

**Lilenbaum W, Vargas R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA.** 2009. Identification of *Leptospira* ssp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci.* **87**(1): 16-19.

**López F, Samudio M, de Assis DM, Cabello Á.** 2015. Seroprevalence of leptospirosis and associated factors in workers of the urban cleaning service of the Municipality of Asuncion, Paraguay. *Rev Chilena Infectol.* **32**(6): 628-633.

**Maele I, Claus A, Haesebrouck F, Daminet S.** 2008. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet Rec.* **163**(14): 409-13.

**Marinho M, Cardoso TC.** 2014. Pathogenesis of Leptospirosis: Important Issues. *Med Microb Diagn.* **4**(1):1000e127.

**Martins MG, Matos KT, da Silva MV, de Abreu MT.** 1998. Ocular manifestations in the acute phase of leptospirosis. *Ocul Immunol Inflamm.* **6**: 75-79.

**Matthias MA, Levett PN.** 2002. Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. *West Indian Med J.* **21**: 10-13.

**Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Girons IS.** 1992. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* ssp. in Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* **30**(9): 2219-2224.

**Mohammed H, Nozha C, Hakim K, Abdelaziz F, Rekia B.** 2011. *LEPTOSPIRA*: Morphology, Classification and Pathogenesis. *J Bacteriol Parasitol.* **2**:120.

**Monahan AM, Miller SI, Nally JE.** 2009. Leptospirosis: risks during recreational activities. *J Appl Microbiol.* **107**:707-716.

**Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW.** 2002. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis.* **34**(12): 1593-1599.

**Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** 2006. *Microbiologia Médica.* 5ª ed, Elsevier. Rio de Janeiro. pp430-433.

**Niwattayakul K, Homvijitkul J, Niwattayakul S, Khoo O, Sitprija V.** 2002. Hypotension, renal failure, and pulmonary complications in leptospirosis. *Ren Fail.* **24**(3): 297-305.

**Pádua MM.** 2009. *Patologia clínica para técnicos: Bacteriologia.* 1ª ed, Lusociência. Loures. pp410-415.

**Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N.** 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis.* **12**(4): 351-357.

**Penna D, de Brito T, Pupo AA, Machado MM, Galvão PAA, Soares de Almeida S.** 1963. Kidney biopsy in human leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* **12**: 896-901.

**Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, et al.** 2008. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and pathogenesis of Leptospirosis. *PloS ONE.* **3**(2): e1607.

**Pinto C, Bordalo A, Antunes J, Nascimento M, Vicêncio P.** 2015. Doenças de declaração obrigatória 2010-2013 Volume II - Regiões. Direção Geral de Saúde. Lisboa

**Rajiv C, Manjuran RJ, Sudhayakumar N, Haneef M.** 1996. Cardiovascular involvement in leptospirosis. *Indian Heart J.* **48**: 691-694.

**Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE.** 2010. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *European J Clin Microbiol Infect Dis.* **29**(10): 1305-1309.

**Rupani AB, Shah VB, Deshpande JR.** 2006. Renal Changes in Leptospirosis: An Autopsy Study. *The Lancet.* **368**:1631.

**Samsudin S, Masri SN, Jamaluddin TZMT, Saudi SNS, Ariffin UKA, Amran F, Osman M.** 2015. Seroprevalence of Leptospiral Antibodies among Healthy Municipal Service Workers in Selangor. *Adv Pub Health.* **2015**:6pp.

**Sánchez RM, Sierra AP, Suárez MB, Álvarez AM, Hernández JM, González MD, Paz RC, Reyes G, Batista BM, González GS, Río MA, Cobas AS, Ramos OS.** 2000. Evaluación de la efectividad de una nueva vacuna contra la leptospirosis humana en grupos en riesgo. *Rev Panam Salud Publica.* **8**(6):385-392.

**Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalofonos I, Grunstein I, Flannery B, Dias J, Riley LW, Reis MG, Ko AI.** 2002. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg May.* **66**(5):605-610.

**Schneider MC, Jancloes M, Buss DF, Aldighieri S, Bertherat E, Najera P, Galan DI, Durski K, Espinal MA.** 2013. Leptospirosis: A Silent Epidemic Disease. *Int J Environ Res Public Health.* **10**(12):7229-7234.

**Schneider MC, Tirado MC, Rereddy S, Dugas R, Borda MI, Peralta EA, Aldighieri S, Cosivi O.** 2012. Natural disasters and communicable diseases in the Americas: contribution of veterinary public health. *Vet Ital.* **48**(2):193-218.

**Schreier S, Triampo W, Dounghawee G, Triampo D, Chadsuthi S.** 2009. Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospire. *Bill Res.* **42**: 5-12.

**Serres G, Levesque B, Higgins R, Major M, Laliberté D, Boulianne N, Duval B.** 1995. Need for Vaccination of Sewer Workers against Leptospirosis and Hepatitis A. *Occup Environm Med.* **52**(8):505-507.

**St John MA, King S, Bullen SE, Cherian J, Levett PN.** 2000. Leptospirosis occurring in two children after fresh water immersion. *West Indian Med J.* **49**: 340-343.

**Sulzer C.** 1975. Leptospiral serotype distribution lists according to host and geographic area July 1966 to July 1973. Us Department oh Health, Education, and Welfare. Atlanta

**Sunil S, Jacob J, Varghese B.** 2016. Human Leptospirosis - a review. *World J of Pharmaceut Res.* **5**(4):613-624.

**Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE.** 2010. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Prevention. *J Vet Int Med.* **24**(1): 1-13.

**Tiwari RR.** 2008. Occupational health hazards in sewage and sanitary workers. *Indian J Occup Environ Med.* **12**(3): 112-115.

**Tomich P.** 1979. Studies of leptospirosis in natural host populations I. Small mammals of Waipio Valley, island of Hawaii. *Pacif Sci.* **33**: 257-279.

**Tong MJ, Rosenberg EB, Votteri BA, Tsai C-C.** 1971. Immunological response in leptospirosis: Report of three cases. *Am J Trop Med Hyg.* **20**: 625-630.

**Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D.** 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol.* **7**:35-40.

**Turner LH.** 1970. Leptospirosis III: Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **64**(4):623-646.

**Verma A, Stevenson B, Adler B.** 2013. Leptospirosis in horses. *Vet Microbiol.* **167**(1-2): 61-66.

**Victoriano A, Smythe L, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, Ong BL, Gongal G, Hall J, Coulombe CA, Yanagihara Y, Yoshida S, Adler B.** 2009. Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infect Dis.* **9**:147

**Vieira ML.** 2006. Aspectos da caracterização antagónica e molecular da Leptospireose em áreas endémicas. Tese de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 302pp.

**Vieira ML, Gama-Simões MJ, Collares-Pereira M.** 2006. Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis.* **10**(5):378-386

**Vijayachari P, Sugunan Ap, Shriram AN.** 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosc.* **33**(4): 557-569.

**Vinetz JM.** 2001. Leptospirosis. *Cur Opin Infect Dis.* **14**(5): 527-538.

**Wang C, John L, Chang T, Cheng W, Luo M, Hung A.** 1965. Studies on anicteric leptospirosis. I. Clinical manifestations and antibiotic therapy. Chin Med. J. **84**: 283-291.

**Wasinski B, Dutkiewicz J.** 2013. Leptospirosis - current risk factors connected with human activity and the environment. Ann Agric Environm Med. **20**(2):239-244.

**Watt G, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, Ranoa CP, Laughlin LW.** 1988. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. Lancet. **1**(8583):433-435.

**Witmer GW, Martins H, Flor L.** 2004. Leptospirosis in the Azores: the Rodent Connection. Univ. of Calif.. pp217-220.

**World Health Organization.** 2003. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. WHO. Geneva, Switzerland

**World Health Organization.** 2010. Report of the First Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. WHO. Geneva, Switzerland

**Wuthiekanun V, Amornchai P, Paris DH, Langla S, Thaipadunpanit J, Chierakul W, Smythe LD, White NJ, Day NP, Limmathurotsakul D, Peacock SJ.** 2013. Rapid isolation and susceptibility testing of *Leptospira* spp. using a new solid medium, LVW agar. Antimicrob Agents Chemother. **57**(1):297-302.

**Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Smythe LD, Symonds ML, Dohnt MF, Slack AT, Limpiboon R, Suputtamongkol Y, White NJ, Day NPJ, Peacock SJ.** 2007. Optimization of Culture of *Leptospira* from Humans with Leptospirosis. J Clin Microbiol. **45**(4): 1363-1365.

**Wysocki J, Liu Y, Shores N.** 2014. Leptospirosis with acute liver injury. Proc (Bayl Univ Med Cent). **27**(3): 257-258.

**Yersin C, Bovet P, Mérien F, Wong T, Panowsky J, Perolat P.** 1998. Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population-based study. Am J Trop Med Hyg. **59**(6): 933-940.

**Zaki SR, Shieh W-J.** 1996. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. Lancet. **347**: 535.

# **ANEXOS**

# Anexo 1

## DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Título do Estudo:

”Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* em trabalhadores de Saneamento básico da Região de Lisboa e Vale do Tejo”

Investigadora principal: Maria do Rosário Campos Oliveira Fernandes

Instituição: Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Contactos: 913043538/213652600

Caro Participante,

Gostaríamos de convidá-lo a participar neste projeto. Antes de decidir, leve o tempo que achar oportuno para rever toda a informação e esclarecer quaisquer questões que tenha junto da Investigadora. Deve entender completamente o porquê deste estudo estar a ser desenvolvido, bem como o que ele envolve, antes de tomar a sua decisão.

### INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa, cuja importância a nível global tem vindo a aumentar. As pessoas com esta infeção podem não manifestar sintomas, mas o mais frequente é aparentarem gripe (febre, calafrios, dores de cabeça e dores nos músculos). A transmissão dá-se pelo contacto com urina de roedores infetados (ratos), sangue ou tecidos do animal.

Pessoas com uma profissão que os pode pôr em contacto com roedores, têm um risco aumentado de apanharem a doença, como, por exemplo, agricultores, veterinários, trabalhadores do saneamento básico.

### OBJECTIVO DO ESTUDO

Pretende-se determinar a percentagem de trabalhadores em contacto com águas residuais ou resíduos sólidos que têm ou tiveram esta infeção, no último ano.

### PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Para realizar este estudo será necessário que forneça uma pequena amostra de sangue, de modo a que sejam feitas as análises adequadas. Também lhe vamos pedir que responda a um questionário para se perceber se teve algum sintoma e se contactou com ratos.

### PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E LIBERDADE PARA DESISTIR

É totalmente sua a decisão de participar ou não neste estudo. Poderá, também, desistir a qualquer momento.

**RISCOS E DESCONFORTOS**

Ao participar no estudo o risco e desconforto que existe é mínimo, ligado à colheita de sangue.

**BENEFÍCIOS**

Para si, haverá benefício se estiver infetado. Nesse caso, se autorizar, será informado pela investigadora e será encaminhado ao médico da Medicina do Trabalho para seguimento.

Para o seu empregador e para as autoridades de saúde, permite conhecer a importância da doença e orientar medidas de prevenção.

**CUSTO E COMPENSAÇÃO**

Não terá de pagar nada por fazer parte deste estudo, nem será pago para tal.

**CONFIDENCIALIDADE**

O resultado das análises e as suas respostas ao questionário são confidenciais. Os questionários vão ter um código; apenas o investigador terá acesso aos nomes que correspondem aos códigos, e serão guardados por ele. Os seus dados só lhe serão mostrados a si. O investigador manterá os dados por um período de 5 anos.

**PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os resultados deste estudo serão apresentados em reuniões científicas, às entidades empregadoras e de saúde e serão publicados em revistas científicas, mas nunca terão dados confidenciais.

**DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE**

Sei que neste Estudo está prevista a realização de um questionário, acompanhado de uma colheita de sangue, para posterior análise laboratorial. Declaro que os procedimentos, acima descritos, me foram explicados pela Investigadora, estando informado e esclarecido acerca dos mesmos. Foi-me garantido que todos os dados são confidenciais. Tenho conhecimento de que será atribuído um código a cada Participante, que permitirá correlacionar a informação do questionário com o resultado do exame ao sangue. A correspondência entre o número e o nome do Participante será do conhecimento exclusivo da Investigadora e mantido confidencial para a restante comunidade.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no Estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no Estudo acima mencionado.

Nome do Participante no Estudo \_\_\_\_\_

Assinatura do Participante \_\_\_\_\_

Data                    \_\_/\_\_/\_\_

Cláusulas Opcionais:

Autorizo ser contactado pela Investigadora, caso seja detentor de um resultado reativo/positivo, em pelo menos um dos exames laboratoriais.

Autorizo ser encaminhado para o Médico responsável pela Medicina de Trabalho da minha entidade empregadora, caso seja detentor de um resultado reativo/positivo, em pelo menos um dos exames laboratoriais.

Assinatura do participante \_\_\_\_\_

Assinatura da Investigadora Responsável: \_\_\_\_\_

# Anexo 2

## QUESTIONÁRIO

“Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* em trabalhadores do Saneamento básico da Região de Lisboa e Vale do Tejo”

Estamos a realizar um estudo sobre uma doença infecciosa chamada Leptospirose. Gostaríamos de lhe fazer algumas perguntas acerca do seu conhecimento sobre esta doença.

O Questionário é individual, anónimo e confidencial. Ao Questionário será atribuído um número que corresponderá à amostra de sangue do mesmo Participante. A correspondência será do conhecimento exclusivo da Investigadora e mantido confidencial para a restante comunidade.

Não existem respostas correctas ou incorrectas, pretendendo-se apenas recolher os dados necessários à elaboração do Projecto. Assim sendo, pede-se que o seu preenchimento seja o mais fiel possível da realidade.

Qualquer questão ou dúvida respeitante ao modo de preenchimento ou interpretação do Questionário será esclarecido pela Investigadora.

Agradeço a sua atenção e colaboração.

A Investigadora,

Maria Fernandes

1. Alguma vez ouviu falar da doença leptospirose?

Sim ( ) Não ( )

Se a resposta for **Não**, passe para a **Questão 2.**

1.1. Quais os sintomas associados à forma leve da doença?

Tosse	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Febre	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Calafrios	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Dores de cabeça	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Dores musculares	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Vómitos e diarreia	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Outros	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )

Indique quais \_\_\_\_\_

## 1.2. Qual a forma de apanhar leptospirose?

Contacto com animais	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Contacto com pessoas doentes	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Picada de mosquito	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Outros	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )

Indique quais \_\_\_\_\_

## 1.3. Que animais são os principais responsáveis da transmissão da doença ao Homem?

Cães	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Gatos	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Roedores (ratos)	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Cavalos	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Outros	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )

Indique quais \_\_\_\_\_

## 1.4. Como é que o Homem fica infetado?

Contacto com urina de animais infetados	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Contacto com fezes de animais infetados	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Contacto com saliva de animais infetados	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )
Outros	Sim ( )	Não ( )	Desconheço ( )

Indique quais \_\_\_\_\_

## 1.5. Há alguma profissão em que poderá haver risco de apanhar leptospirose?

Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

Se Sim, indique duas profissões com esse risco:

1 \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_

## 1.6. A sua entidade empregadora fez, alguma vez, ações de formação sobre leptospirose?

Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

1.6.1. Se **Sim**, frequentou essa ação de formação?

Sim ( ) Não ( ) Não me recordo ( )

2. Detectou a presença de roedores (ratos), pelo menos uma vez, no seu espaço laboral ou área envolvente, no último ano?

Sim ( ) Não ( ) Não reparei/não estive com atenção ( )

2.1. Se **Sim**, com que frequência os observa?

Diariamente ( )

Pelo menos uma vez por semana ( )

Pelo menos uma vez por mês ( )

Pelo menos uma vez por ano ( )

Menos que uma vez por ano ( )

3. A Entidade Empregadora, onde exerce funções, disponibiliza o seguinte Equipamento de Proteção Individual (EPI)?

Botas Impermeáveis Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

Luvas Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

Máscara Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

Uniforme descartável Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

Uniforme de uso diário com higienização da empresa Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

Bata descartável Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

4. A Entidade Empregadora possui uma área destinada à recolha do Equipamento de Proteção Individual?

Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

5. Utiliza Equipamento de Proteção Individual (EPI) durante a actividade laboral?

Sim ( ) Não ( )

Se a resposta for **Não**, passe para a questão 6..

5.1. Se Sim, selecione qual/quais, dentro da seguinte lista:

- Botas Impermeáveis ( )
- Luvras ( )
- Máscara ( )
- Uniforme descartável ( )
- Uniforme higienizado pelo trabalhador diariamente ( )
- Uniforme de uso diário com higienização da empresa ( )
- Bata descartável ( )

5.2. Diga com que frequência, na sua rotina laboral, utiliza o(s) equipamento(s) que selecionou acima?

Botas Impermeáveis:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Luvras:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Máscara:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Uniforme descartável:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Uniforme higienizado pelo trabalhador diariamente:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Uniforme de uso diário com higienização da empresa:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Bata descartável:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

6. Diga com que frequência, na sua rotina laboral, utiliza as seguintes medidas de higiene.

Banho no final do período laboral:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Higiene das mãos:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Protecção das feridas expostas com penso/compressa/gaze:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Descarte do Equipamento de Protecção Individual nos lugares próprios para o efeito:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Manter a roupa/uniforme laboral separado da roupa pré/pós-laboral:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

Lavagem frequente da roupa/uniforme laboral:

Nunca ( ) Poucas vezes ( ) Algumas vezes ( ) Muitas Vezes ( ) Sempre ( )

7. Quantas vezes **por ano** a Entidade Empregadora procede à desratização do espaço em que exerce a sua atividade laboral?

\_\_\_\_\_

8. A Entidade Empregadora procede à desinfeção diária do espaço/equipamento com que exerce funções?

Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

9. Durante o último ano, sentiu ou não sintomatologia típica de um Síndrome Gripal (Febre, Calafrios, Dores de Cabeça, Dores Musculares), mas sem ter tido tosse, nem expectoração?

Sim ( ) Não ( )

Se a resposta for **Não**, passe para a questão 10..

9.1. Se **Sim**, qual/quais o(s) sintoma(s) que sentiu durante o último ano?

Febre: sim ( ) Calafrios: sim ( ) Dores de cabeça: sim ( ) Dores Musculares: sim ( )  
não ( ) não ( ) não ( ) não ( )

9.2. Quantas vezes teve esses sintomas, ao longo do **último ano**?

Febre - \_\_\_\_\_

Calafrios - \_\_\_\_\_

Dores de cabeça - \_\_\_\_\_

Dores musculares - \_\_\_\_\_

9.3. Em algum momento foi assistido por um médico, devido a essa condição de saúde?

Sim ( ) Não ( )

10. Alguma vez lhe foi diagnosticado Leptospirose?

Sim ( ) Não ( )

10.1. Se Sim, quando?

Há mais de um ano ( ) Há menos de um ano ( )

11. Alguma vez, algum dos seus colegas de trabalho teve leptospirose?

Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

12. Realiza análises/exames pela Medicina do Trabalho, pelo menos uma vez por ano?

Sim ( ) Não ( )

12.1. Se Não, alguma vez realizou análises pela Medicina do Trabalho, desde que iniciou a sua actual actividade laboral?

Sim ( ) Não ( )

13. A pesquisa desta doença (Leptospirose) está incluída nas análises que faz ao sangue, aquando da Medicina do Trabalho?

Sim ( ) Não ( ) Desconheço ( )

14. Em qual das seguintes Entidades Empregadoras se encontra a exercer a sua actividade profissional?

Câmara Municipal ( )

ETAR ( )

Empresa Privada (Limpeza de esgotos, desratização, etc...) ( )

15. No seu dia de trabalho entra em contacto com **águas residuais**?

Sim ( ) Não ( )

16. Exerce a sua actividade profissional há quanto tempo?

Menos de um ano ( ) Um ano ou mais ( )

17. Antes de trabalhar aqui, esteve em alguma das Entidades da **Questão 14.**?

Sim ( ) Não ( )

18. Sexo:

Masculino ( ) Feminino ( )

19. Idade: \_\_\_\_\_anos.

20. Escolaridade:

Não estudou ( )

4º ano ou 4ª classe ( )

6º ano ou ciclo preparatório ( )

9º ano ou secundária ( )

12º ano ou liceu ( )

Ensino Superior ( )

## Anexo 3

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

20 de Abril de 2016

# LEPTOSPIROSE

Doença | Transmissão | Prevenção

## O que é?

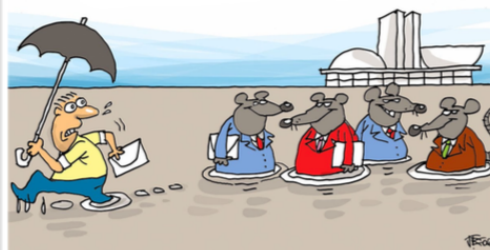
Leptospiras são bactérias com características especiais, que se designam também por espiroquetas. As leptospiras podem causar doença (as da espécie *L. interrogans sensu lato*) ou serem de vida livre e por isso chamadas saprófitas (não causam doença).

## Onde está?

As leptospiras podem estar presentes em várias espécies de mamíferos (ratos, cães, gatos, porcos, vacas, ovelhas, cavalos, etc...), no entanto, é mais comum em ratos ou ratazanas. Os ratos não adoecem, logo, não sabemos se têm a bactéria. Assim, quando nos infetamos, a grande maioria das vezes é por causa dos ratos.

## Como se transmite?

Os ratos libertam a bactéria pela urina durante toda a vida. Somos infetados quando tocamos em superfícies, solo ou águas, que contenham urina de rato, ou então, diretamente no rato. O risco de infeção aumenta se tivermos uma ferida ou corte na pele.



As cheias são importantes na transmissão das leptospiras!

## Leptospirose nos Açores!

Em 2003, depois do número de casos por ano de Leptospirose ter aumentado bastante, comparado com Portugal Continental, uma equipa de investigadores, em conjunto com as autarquias locais e hospitais, fizeram um programa de pesquisa e controlo da doença.

As autarquias distribuía raticida, de maneira a diminuir o número de ratos, no entanto, não estava a funcionar. Iniciou-se então um programa de Educação da população, com distribuição de cartazes e panfletos. Ao mesmo tempo, os hospitais começaram a fazer o rastreio, conseguindo-se perceber quem tinha a doença, com maior rapidez.



Estudante de Mestrado Maria Fernandes

1



### Profissões de risco?

Os trabalhadores que lidam com águas de esgoto ou resíduos sólidos, fazem limpeza de esgotos, ou desratização, têm uma profissão de risco. Quando o rato urina na água, a bactéria consegue sobreviver durante muito mais tempo do que em lugares secos. Além disso, a água transporta a bactéria para muitos lugares. Por isso, quando a água toca a pele dos trabalhadores, pode levar as leptospiros até eles.

Outras profissões de risco são: agricultores, veterinários, trabalhadores de matadouros, ou praticantes de desportos aquáticos.

### Quais os sintomas?

O mais habitual é as pessoas não ficarem doentes ou então apenas terem os sintomas iguais aos de uma gripe (febre, arrepios de frio, dores de cabeça, dores no corpo e vômitos). Por causa disto, nunca chegam a perceber que tiveram a doença. A única forma é através de análises ao sangue (rastreio). A forma grave da doença é menos frequente, mas também pode acontecer. Neste caso, a doença ataca principalmente os rins, levando à falência deles, podendo também afetar os pulmões, e ainda causar hemorragias. Se não tratada a tempo, pode levar à morte.

Ao mesmo tempo, a equipa de investigação tentou entender qual a sua frequência da infeção/doença, como é que as pessoas eram infetadas, por onde andavam os ratos que transmitiam as leptospiros, o que é que os doentes tinham em comum e quais as profissões onde havia maior número de casos.

Em 2008, com a continuação da prevenção, o número de casos severos por ano, diminuiu de 35 para 17, sendo a incidência de 11,1 casos por 100 mil habitantes. De 2009 a 2013 desceu ainda mais, mantendo-se esta tendência até hoje. Apesar disso, os Açores continuam a ter 10 vezes mais casos do que Portugal Continental.

### Como podemos prevenir a doença?

- Informar os trabalhadores acerca da bactéria, sua transmissão e o risco que correm;
- Controlo dos ratos/ratazanas na área onde trabalham (desratização);
- Utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), tais como: botas impermeáveis, luvas, máscara, uniforme descartável ou uniforme com higienização diária, bata descartável;
- Não misturar a roupa do trabalho com a restante do dia-a-dia e colocar os uniformes descartáveis nos locais próprios para o efeito;
- Manter hábitos diários de higiene, tais como: banho no final do trabalho, higiene das mãos, proteção das feridas com pensos/compressas, lavar a roupa de trabalho diariamente.



## Anexo 4

### TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MACROSCÓPICA EM LÂMINA (MACROLepto)

(*adaptado de Garcia, 2011*)

#### **Materiais e Reagentes:**

- Cultura jovem de *Leptospira interrogans* sensu lato ( $\pm 2 \times 10^8$  leptospiaras/mL)
- Tubos de ensaio com meio EMJH
- Câmara de fluxo laminar
- Pipetas Pasteur de vidro
- Incubadora orbital
- Espectrofotómetro
- Frasco com meio EMJH
- Microscópio óptico
- Formol a 40%
- Centrífuga 14 000 rpm
- Azida Sódica a 1%
- Tubo *ependorf* de 10mL
- Controlo positivo e negativo
- Tampão PBS (0.01M, pH=7.2)
- Micropipetas de 5mL, 5 a 50  $\mu$ L e 200 a 1000  $\mu$ L + pontas
- Vórtex
- Lâminas de vidro

## 1ª Parte: Preparação do Antígeno

### a) Sementeira (sub-cultura)

1. Semear (inocular) 20 gotas de uma cultura jovem e densa ( $\pm 2 \times 10^8$  leptospiras/mL) num tubo de ensaio com meio EMJH líquido (5mL). O tubo de ensaio é colocado na incubadora a 29°C, em agitação permanente, durante  $\pm 5$  dias.

2. Semear 20 gotas da cultura anterior em 3 tubos de ensaio com meio EMJH líquido (5mL/cada). Estes ficam a incubar a 29°C, em agitação permanente, durante  $\pm 5$  dias.

3. Proceder à leitura das culturas por espectrofotometria, as quais devem apresentar uma densidade ótima de  $\pm 2 \times 10^8$  leptospiras/mL.

4. Inocular o volume dos 3 tubos de ensaio (15mL), num frasco de cultura com 150mL de meio EMJH. O frasco é colocado na incubadora a 29°C, sob agitação constante, durante  $\pm 1$  semana.

### b) Recolha do Antígeno

1. Proceder à leitura da cultura por espectrofotometria, a qual deve apresentar uma densidade ótima de  $\pm 2 \times 10^8$  leptospiras/mL.

2. Adicionar ao frasco de cultura 4mL de formal a 40% e colocar no frigorífico *overnight* a uma temperatura de 4°C.

3. Distribuir a cultura inativa em seis tubos de ensaio (25mL/cada) para posterior centrifugação.

4. Centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos.

5. Descartar o sobrenadante e ressuspender o depósito com 25mL de azida sódica a 1%.

6. Repetir o procedimento 4.

7. Repetir o procedimento 5.

8. Repetir o procedimento 4.

9. Ressuspender o depósito com 1mL de azia sódica a 1%.

10. Armazenar a preparação num tubo de 10mL e colocar no frigorífico a 4°C.

11. Antes de ser utilizado na técnica MACROLepto, o antigénio é testado com tampão PBS e soros positivos e negativos (controlos negativo e positivo), previamente confirmados com a TAM, de forma a se observar a ocorrência de aglutinação. Caso o antigénio esteja demasiado reativo, deve-se proceder a uma diluição com tampão PBS e testar novamente.

## **2ª Parte: Metodologia da Técnica**

1. Diluir o soro “problema 1:10 com tampão PBS.

2. Agitar no vórtex o tubo com o antigénio e o tubo com o soro “problema”.

3. Juntar 15µL do soro diluído com 15µL do antigénio numa lâmina de vidro

4. Homogeneizar com a ponta da pipeta, através de movimentos circulares ( $\pm 15$ mm) durante alguns segundos.

5. Agitar manualmente a lâmina, em movimentos circulares, durante 4 minutos.

6. Observar a lâmina contra um fundo escuro, utilizando-se uma fonte de luz que incida diretamente na mesma.

## Anexo 5

### TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA EM MICROPLACA (TAM)

(adaptado de Vieira, 2006)

#### Materiais e Reagentes:

- Culturas de 4 a 13 dias de *Leptospira interrogans* sensu lato com uma densidade ótima de  $\pm 2 \times 10^8$  leptospiras/mL em meio EMJH
- Tampão PBS (pH 7,2 - 7,4)
- Microplaca de fundo plano
- Pipetas Pasteur de vidro calibradas (1 gota  $\pm 35\mu\text{L}$ )
- Micropipeta de 100 $\mu\text{L}$  a 1000 $\mu\text{L}$ , 5 $\mu\text{L}$  a 50 $\mu\text{L}$  e micropipeta multicanal
- Estufa de incubação a 37°C
- Vórtex
- Microscópio de fundo escuro com objetiva de longa distância focal (x20)

#### Procedimento:

1. Diluição dos soros a 1:20 em tampão PBS.

2. Marcar a microplaca com os antígenos, o número atribuído a cada soro e a testemunha, como se encontra representado no esquema seguinte:

	Antigénio A	Antigénio B	Antigénio C	Antigénio D	...
Soro 1					
Soro 2					
...					
Testemunha					

3. Adicionar 35 $\mu$ L de tampão PBS aos poços marcados com Testemunha, utilizando-se uma micropipeta multicanal.

4. Adicionar 35 $\mu$ L de cada soro “problema” nos poços correspondentes, segundo a linha da microplaca.

5. Com o auxílio da Pipeta Pasteur de vidro, adicionar uma gota de cada antígeno aos poços correspondentes da microplaca. Cada antígeno é adicionado seguindo a coluna da microplaca, incluindo os soros a testar e a Testemunha. Durante este processo é importante que os tubos de ensaio não sejam agitados.

6. Agitar levemente e cobrir a microplaca com uma tampa.

7. Colocar a microplaca na estufa a 37°C, durante 2 horas.

8. Findo este tempo, procede-se à leitura da microplaca em microscópio de fundo escuro adaptado com objetiva de longa distância focal (x20).

### Leitura das microplacas:

A observação da aglutinação por campo tem início nos poços da Testemunha (controlo negativo), a qual vai servir de elemento comparativo em relação às amostras testadas. Considera-se que uma amostra é positiva quando, numa aglutinação superior a 1:100, se observa mais de 50% de aglutinação. Assim, o critério utilizado para a leitura e interpretação das microplacas está no esquema seguinte:

Aglutinação (%)	Critério	Resultado
> 75%	++++	Positivo
50%-75%	+++	Positivo
25%-50%	++	Negativo
<25%	+	Negativo
0%	-	Negativo