

RAFAELA LOPES DINIZ

ESTUDO COMPARATIVO DE PROTOCOLOS E MEIOS DE CULTIVO PARA
ISOLAMENTO DE *Leptospira sp.*

Dissertação apresentada ao Mestrado de
Microbiologia e Parasitologia Aplicada da
Universidade Federal Fluminense.

Orientador: Prof.Dr. Walter Lilenbaum.

NITÉROI/RJ
2011

RAFAELA LOPES DINIZ

ESTUDO COMPARATIVO DE PROTOCOLOS E MEIOS DE CULTIVO PARA
ISOLAMENTO DE *Leptospira sp.*

Dissertação apresentada ao Mestrado de
Microbiologia e Parasitologia Aplicada da
Universidade Federal Fluminense.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Walter Lilenbaum
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Marcio M. Folly
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

NITÉROI/ RJ
2011

Dedico este trabalho a minha família, por todo apoio, amor e carinho. Nada disso seria possível sem vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sua grande criação, fonte de estudo da minha profissão, além de me permitir realizar este trabalho.

Aos meus pais por todo apoio que me deram desde a infância, vocês são os maiores exemplos da minha vida, amo vocês, obrigada por tudo!

Minha amiga irmã Alessandra Diniz e meu irmão Raul Diniz, obrigada pelo apoio e compreensão.

Ao José Leonardo Nicolau, meu anjo da guarda amado, obrigada pelo apoio incondicional.

Ao meu filho do coração Cauê Nicolau, pela felicidade que você traz para minha vida e compreensão pela minha ausência.

A memória da minha querida avó Quitéria Diniz, por todo amor que me deu.

Ao meu grande amigo Daniel Gomes pelas risadas e discussões do meu projeto.

Agradeço também aos meus amigos da FIOCRUZ, Edmilson Baptista, Felipe Vicente, Rafael Resende e Renata Chagas por todo apoio.

Em especial agradeço aos meus grandes amigos Adriana Moraes, Jade Lyra, Fernando Moraes e Solange Pereira pela compressão e ajuda nos momentos mais difíceis.

De uma forma especial quero agradecer ao Gerson Lima, pelo pai que ele foi, acreditando em mim quando nem eu mesma acreditava. A você o meu imenso obrigada. Literalmente não teria conseguido sem você.

Quero agradecer a FIOCRUZ – instituição na qual tenho imenso orgulho de trabalhar e onde construí minha vida profissional - e em especial a Bio-Manguinhos, pela colaboração neste projeto.

Ao grupo do Laboratório de Microbiologia Veterinária, que me recebeu com muito carinho, principalmente a Luciana Fonseca minha grande amiga, Camila Hamond, Denis Otaka e em especial ao Gabriel Martins que me ajudou enormemente.

Ao Dr. Walter Lilenbaum, pela orientação e compreensão as minhas limitações de tempo. Muito obrigada por tudo, cresci muito durante este período.

Aos professores Aloysio de Mello, Jefferson de Oliveira, Otílio Machado, Rosana Rocha e Mauricio Cagy, pela dedicação ao curso e aos alunos.

A UFF, por proporcionar a realização deste trabalho.

Por fim, a todas as pessoas que me auxiliaram neste trabalho direta ou indiretamente.

"Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos".

Albert Einstein

RESUMO

A leptospirose é uma doença bacteriana de caráter zoonótico, que possui uma ampla distribuição geográfica onde pode acometer animais domésticos, silvestres e o homem. A soroaglutinação microscópica (SAM) é o método recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico da enfermidade. Apesar disso, para um maior avanço nos estudos epidemiológico e em vacinologia deve-se recorrer ao isolamento do agente. O presente estudo busca fazer uma avaliação comparativa entre os diferentes protocolos e meios de cultivos descritos, na busca de um aprimoramento da metodologia. Nove amostras de urina humana, recém-emittidas, foram contaminadas experimentalmente com *Leptospira interrogans* serovares Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Hardjo nas concentrações de 10^2 , 10^5 e 10^8 leptospiras por mL. Tais amostras foram submetidas a três protocolos de seleção com: diluição seriada, coquetel de antibióticos e filtração (0,22 μ m). Em seguida foram inoculados em quatro meios de cultivo: EMJH, EMJH acrescido de 5-Fluoruracil, Fletcher e EMJH Tween 40/80/LH. Os cultivos foram analisados semanalmente por até quatro meses. O protocolo de diluição seriada teve 22/36 (61,1%) de amostras isoladas; já o protocolo de seleção por meio de coquetel com antibiótico obteve 10/36 (27,7%) isolados, e o protocolo de filtração obteve 1/36 (2,7%) isolado. O protocolo de diluição seriada obteve diferenças significativas quando correlacionado ao protocolo de seleção por meio de coquetel de antibiótico ($p=0.0086$) e ao protocolo de seleção por filtração ($p<0.0001$). Os protocolos de seleção por coquetel de antibiótico e protocolo de seleção por filtração obtiveram diferenças significativas ($p=0.0065$). Não houve diferenças significativas entre os meios nos três protocolos testados. Independentemente do meio de cultivo a ser utilizado no isolamento de leptospiras, deve-se priorizar o tipo de protocolo a ser empregado. No presente estudo o protocolo de diluição seriada obteve resultados significativos, sendo recomendado para ampliar as chances de sucesso no isolamento do agente.

Palavras-chave: *Leptospira*, isolamento, meios de cultivo.

ABSTRACT

Leptospirosis is a bacterial disease with zoonotic character, which has a wide geographical distribution which can affect pets, wildlife and human. The microscopic agglutination test (MAT) is the method recommended by the World Health Organization (WHO) and World Organization for Animal Health (OIE) for diagnosis of the disease. Still, for a major advance in the epidemiological study and vaccinology, we must resort to isolation of the agent. This study seeks to make a comparison among the various protocols and culture media described in the search for an improvement of the methodology. Nine samples of human urine, newly issued, were experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovars Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Hardjo concentrations 10^2 , 10^5 and 10^8 leptospire per mL. These samples were subjected to selection with three protocols: serial dilution, cocktail of antibiotics and filtration (0.22 μm). They were then inoculated in four culture media: EMJH, EMJH plus 5-fluorouracil, and Fletcher EMJH 40/80/LH Tween. The cultures were examined weekly for up to four months. The serial dilution protocol yielded 22/36 (61.1%) of isolates, since the protocol selection by antibiotic cocktail got 10/36 (27.7%) isolates, and protocol filtering got 1/36 (2.7%) alone. The serial dilution protocol achieved significant differences when correlated to the selection protocol using a cocktail of antibiotics ($p = 0.0086$) and the selection protocol by filtration ($p < 0.0001$). Protocols for selection of antibiotic cocktail and protocol selection by filtration obtain significant differences ($p = 0.0065$). There were no significant differences between means in the three protocols tested. Regardless of the medium to be used for the isolation of leptospire, priority should be given the type of selection protocol being employed. In this study, the serial dilution protocol has achieved significant results and is recommended to increase the chances of success in isolating the agent.

Key-words: *Leptospira*, isolation, culture media.

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Quadro 1: Casos de leptospirose humana. Brasil, Regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2010*23

Quadro 2 - Serovares e serogrupos de *Leptospira sp.* descritos nas diferentes espécies de animais portadores.....26

Tabela 1 - Número de culturas recuperadas nas diferentes concentrações (10^2 , 10^5 e 10^8 de leptospirose/mL) comparados com os serovares Hardjo, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae nos diferentes protocolos de cultivo.....40

Tabela 02 - Número de tubos recuperados e contaminados em cada meio de cultivo.....41

Tabela 03 - Número de tubos recuperados e contaminados em cada meio de cultivo processadas pelos protocolos de seleção por diluição seriada, por coquetel de antibiótico e filtração.....42

Tabela 04 - Número de tubos recuperados e contaminadas nos protocolos de seleção por diluição seriada (A), seleção por coquetel de antibióticos (B) e seleção por filtração (C).....45

ÍNDICE DE FIGURAS, FLUXOGRAMAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Foto de microscopia eletrônica de <i>Leptospira</i> sp.....	19
Figura 2 - Ciclo epidemiológico da leptospirose.....	24
Fluxograma 1 - Inoculação das Amostras.....	35
Fluxograma 2 - Protocolo Seleção por Diluição Seriada.....	36
Fluxograma 3 - Protocolo Seleção por Coquetel de Antibióticos.....	37
Fluxograma 4 - Protocolo Seleção por Filtração.....	38
Gráfico 1 - Comparação do número de tubos com recuperação e tubos contaminados nos meios de cultivos EMJH, EMJH acrescido de 5-FU, Fletcher e EMJH Tween 80/40/LH.....	41
Gráfico 2 - Número de tubos recuperados comparadas a culturas contaminadas nos meios de cultivo EMJH, EMJH acrescido de 5-FU, Fletcher e EMJH Tween 80/40/LH no protocolo de seleção por diluição Seriada.....	43
Gráfico 3 - Número de tubos recuperados comparados a tubos contaminados nos meios de cultivo EMJH, EMJH acrescido de 5-FU, Fletcher e EMJH Tween 80/40/LH no protocolo de seleção por coquetel de antibiótico.....	44
Gráfico 4 - Número de tubos recuperados comparados a tubos contaminados nos protocolos de seleção.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluoruracil
EMJH	Ellinghausen Mc Cullough Johnson Harris
IgG	Imunoglobulina G
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Molaridade
mg	Miligrama
mL	Mililitro
°C	Grau Celsius
PBS	Tampão Fosfato
pH	Potencial Heterogênico
SAM	Soroaglutinação microscópica
sp.	Espécie
UFC	Unidade Formadora de Colônia
β	Beta
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Histórico	17
2.2. Agente	18
2.2.1. Morfologia e Estrutura.....	18
2.2.2. Taxonomia.....	19
2.2.3. Fisiologia, Crescimento e Sobrevivência.....	20
2.3. Epidemiologia	21
2.4. Ciclo Epidemiológico	23
2.5. Leptospirose Humana	24
2.6. Leptospirose Animal	25
2.7. Diagnóstico Laboratorial	26
2.8. Isolamento de Leptospiras	27
3. OBJETIVO	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos Específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Locais de Desenvolvimento dos Estudos	30
4.2. Desenho do Estudo	30
4.3. Amostras	30
4.4. Protocolos de Semeadura	31
4.4.1. Protocolo I - Seleção por Diluição Seriada.....	31
4.4.2. Protocolo II - Seleção por Coquetel de Antibiótico.....	31
4.4.3 Protocolo III - Seleção por Filtração.....	32

4.5. Meios de Cultura	32
4.5.1 Meio Líquido de EMJH	32
4.5.2 Meio Semi-Sólido Fletcher.....	33
4.6. Análises das Amostras	33
4.7. Análise Estatística	38
5. REULTADOS	39
5.1. Amostras de Urina.....	39
5.2. Protocolos de Seleção.....	39
5.3. Meios de Cultivo.....	41
5.4. Associação entre os Protocolos e Meios.....	42
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	49
8 BIBLIOGRAFIA	50

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença bacteriana de caráter zoonótico, que possui ampla distribuição geográfica podendo acometer animais domésticos, silvestres e o homem. Causada por uma espiroqueta do gênero *Leptospira sp.*, é uma doença infecciosa que apresenta grande variabilidade de quadros clínicos, desde uma forma branda, com sintomas semelhantes à gripe até quadros graves que podem determinar síndrome icterícia também conhecida como doença de Weil.

Os animais são reservatórios da bactéria. Nas áreas urbanas os roedores são os principais reservatórios da doença, destacando-se neste grupo a ratazana (*Rattus norvegicus*), que adquire o papel de maior importância como propagador da doença em humanos.

A leptospira penetra no organismo através da pele lesada e mucosas íntegras. A transmissão ocorre de animal para animal e de animal para o homem. Embora já tenha sido descrita a transmissão homem a homem, esta não representa papel importante para a epidemiologia da enfermidade. O contágio ocorre através do contato direto ou indireto com tecidos e urinas contaminadas. É uma doença sazonal em áreas temperadas, e endêmica em países tropicais, com maior incidência nos períodos quentes e chuvosos.

Humanos apresentam quadro clínico variável, desde sintomas brandos, até formas meningítica, encefalítica, pulmonar e icterohemorrágica, sendo as duas últimas consideradas mais graves, com insuficiência renal aguda, hepática e hemorragias que podem determinar o óbito. A leptospirose em animais de produção é uma importante enfermidade associada a falhas do sistema reprodutivo tais como abortamentos, nascimento de crias fracas, repetição de cio, causando uma baixa de produtividade e determinando severas perdas econômicas.

O diagnóstico da leptospirose pode ser feito por meio de métodos diretos, como testes moleculares e cultura (padrão-ouro) ou indiretos, como métodos sorológicos. A escolha da técnica depende da fase da doença e do objetivo do diagnóstico, se ele se destina a detecção da fase aguda ou

detecção de estado de portadores. A soroaglutinação microscópica (SAM) é o método recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico da enfermidade.

Apesar de ser o diagnóstico recomendado, esta técnica apresenta varias limitações tais como: a ocorrência do reconhecimento inespecífico dos anticorpos do hospedeiro por mais de um serovar, a necessidade de manutenção de uma extensa bateria de bactérias, além do risco de um diagnóstico falso negativo se tratando de um serovar ainda não descrito ou incomum a região. Para se ter certeza do real serovar infectante, deve-se utilizar a técnica de isolamento, que nos permite também a descobertas de novos serovares, avaliações genéticas que são de extrema importância no desenvolvimento de novas vacinas e para estudos epidemiológicos.

Mesmo sendo uma importante ferramenta, o isolamento é pouco empregado como método diagnóstico. A fragilidade do agente, a contaminação das amostras primárias por outros microrganismos, os longos períodos de incubação, o grande custo, a complexidade dos protocolos e a falta de padronização das técnicas dispostas limitam a utilização deste método.

O presente estudo buscou fazer uma avaliação comparativa entre os diferentes protocolos e meios de cultivo descritos, na busca de um aprimoramento da metodologia de isolamento de *Leptospira* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A leptospirose foi descrita no passado por vários autores como enfermidades distintas (LEVETT, 2001).

Em 1881, Weiss descreveu uma doença que ele denominou de *icterus catarrhalis*. Logo após, em 1882 Lancereaux relatou detalhadamente o quadro clínico de oito pacientes como "icterícia grave essencial ou febre ictérica". Neste momento, achava-se então que se tratava de uma doença infecciosa sistêmica, e nitidamente definida pelos aspectos clínicos e anatomopatológicos. No ano seguinte, Landouzy observou pacientes com quadros clínicos descritos como "febre biliosa ou hepática", associando-os ao contato com esgotos (FAINE et al., 2000).

Em 1886, Adolf Weil publicou quatro casos clínicos de icterícia denominada como "Doença desconhecida infecciosa aguda, acompanhada de tumefação do baço, icterícia e nefrite". Em 1907, Stimson observou pela primeira vez leptospiros em cortes histológicos renais impregnados pela prata, de um paciente com diagnóstico de febre amarela. As leptospiros formavam agregados nos rins e individualmente apresentavam formato de ponto de interrogação, sendo por isso denominada como *Spirochaeta interrogans*. Posteriormente, no Japão, onde a doença era comumente encontrada em minas de carvão e plantações de arroz, Inada e colaboradores conseguiram reproduzir a infecção em cobaias e isolar o agente, denominando o microrganismo de "*Sphirochaeta icterohaemorrhagiae*" (INADA et al., 1916).

Miyajima em 1915 demonstrou que ratos eram fortes candidatos a carreadores da bactéria, e em 1939 Walch-Sorgdrager descreveu uma ampla relação de serovares e seus relativos hospedeiros (FAINE et al., 2000).

Historicamente a leptospirose humana foi classificada como uma doença ocupacional, tendo diferentes denominações a depender do local. Na China sendo denominada como "icterícia dos plantadores de arroz", na Austrália e na Europa como "doença dos cortadores de cana", "doença dos criadores de suínos" e "doença dos limpadores de esgoto", no Japão a doença

era conhecida como “febre outonal”. Nas décadas de 30 e 40 do século XX, diversas formas clínicas da leptospirose em humanos foram relatadas. Nesta mesma época evidenciou-se também a importância da infecção nos animais domésticos para a transmissão zoonótica (LEVETT, 2001; FAINE et al., 2000).

As primeiras leptospirosas patogênicas foram cultivadas por Inada et al. (1916), em um meio de cultura que continha substrato de rim de cobaia. Outros meios de cultura foram pesquisados, onde os mais eficientes eram compostos de água com ou sem a adição de sais, peptonas, soro de coelho ou de cobaias. As principais informações que temos na atualidade sobre o cultivo de leptospirosas, tais como temperatura ideal, lenta adaptação após o isolamento, requisitos para a ligeira alcalinidade, condições aeróbicas e soro ou proteínas séricas, provêm dos primeiros experimentos na área (FAINE et al., 2000).

No Brasil, a leptospirose foi reconhecida pela primeira vez em 1917 no Pará, por McDowel. No mesmo ano, Aragão verificou a presença de *Leptospira icterohaemorrhagiae* ao estudar seis exemplares de *Rattus norvegicus* da cidade do Rio de Janeiro (ARAGÃO, 1917).

2. 2. Agente

2.2.1 Morfologia e Estrutura

Leptospirosas são bactérias da família Leptospiraceae, na ordem Spirochaetales pertencentes ao gênero *Leptospira*. São espiroquetas de cerca de 0,1 µm de diâmetro por 6-20 µm de comprimento. São bactérias móveis que possuem dois flagelos periplasmáticos responsáveis por esta atividade. Possuem uma estrutura de dupla membrana típica, recobertas por uma membrana externa (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001).

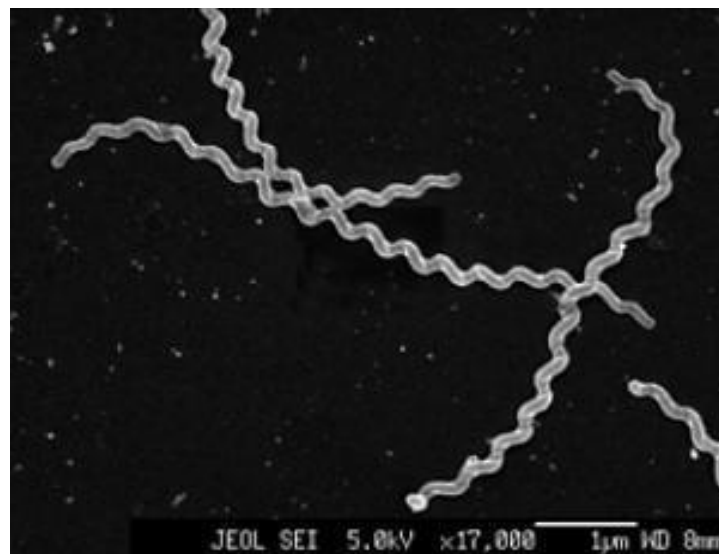
As leptospirosas apresentam uma parede celular que se assemelha às bactérias Gram-negativas, devido à constituição da sua dupla membrana e presença de lipopolissacarídeos (LPS), além de possuir peptidoglicanos ligados à sua membrana interna (VIJAYCHARI, et al.; 2008).

A superfície celular das leptospirosas é composta principalmente de lipopolissacarídeos (LPS). Estes são os principais antígenos-alvo durante a

resposta imune contra este microrganismo, que em sua maioria são anticorpos opsonizantes, principalmente as IgG. No entanto, a imunidade mediada por LPS é restrito aos serovares que são antigenicamente relacionados (LEVETT, 2001). Além dos LPS, outras moléculas vêm sendo descritas com potencial antigênico, como as proteínas integrais da membrana externas, como a porina OmpL1, numerosas lipoproteínas ancoradas na membrana (LipL32, LipL21, LipL41), moléculas do sistema de secreção do tipo II (T2SS) e secretinas DSGP (CULLEN, et al.; 2005).

As leptospiros são indiferenciáveis por microscopia óptica, mas seus membros do grupo são distintos por suas composições químicas, ácidos nucleicos, nutrição, metabolismo e hospedeiros preferenciais (FAINE et al., 2000).

Figura 1. Foto de microscopia eletrônica de *Leptospira sp.*



Universidade de Cornell-USA (01/11/07)

2.2.2 Taxonomia

Existem dois tipos de classificação para as leptospiros, uma baseada na classificação sorológica e a outra na classificação genotípica. Na classificação sorológica o gênero é dividido em duas espécies: *L. interrogans* (engloba todas as leptospiros patogênicas), e *L. biflexa* (engloba cepas não

patogênicas). Adicionalmente, as suas espécies se subdividem em vários serovares (JOHNSON e FAINE, 1984; LEVETT, 2001).

A diferenciação fisiológica entre leptospiros saprófitas e patogênicas se dá pela capacidade das saprófitas crescerem a 13°C e na presença de 8-azaguanina a 225mg/L, além de formarem células esféricas na presença de NaCl a 1M (JOHNSON e ROGERS, 1964; JOHNSON e HARRIS, 1967; WHO, 2003).

Embora os serogrupos da classificação sorológica não expressem proximidade genética, eles são importantes para estudos epidemiológicos. Existem mais de 250 serovares agrupados em 24 sorogrupos. (LEVETT, 2001).

A classificação sorológica vem sendo gradualmente substituída pela genotípica, baseada em hibridização DNA-DNA. Nesta classificação agruparam-se as cepas conforme a sua similaridade genética. Já foram identificadas 14 espécies denominadas e quatro genomospécies. As cepas do mesmo grupo têm acima de 70% de similaridade de relação DNA-DNA. (YASUDA et al., 1987; PEROLAT et al., 1998; BRENNER et al., 1999; LEVETT et al., 2005; MATTHIAS et al., 2008). As genomospécies não correspondem às duas espécies conhecidas de leptospira (*L. interrogans* e *L. biflexa*) posto que sorovariedades patogênicas e não patogênicas podem ocorrer dentro da mesma espécie, isto se demonstra pela existência de múltiplas estirpes da mesma sorovariedade dentre elas (BRENNER et al., 1999).

2.2.3 Fisiologia, Crescimento e Sobrevivência.

Leptospiros são aeróbicas obrigatórias, sua temperatura de crescimento ótima é entre 28 e 30°C e pH entre 7,2 a 7,4 (FAINE et al., 2000). São bactérias catalase e oxidase-positivas (SMIBERT, 2008). Para seu desenvolvimento *in vitro*, é necessário meio de cultivos especiais contendo albumina bovina ou soro de coelho, vitaminas B12 e B1, fosfato, cálcio, magnésio, amônia e ferro. (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001). São bactérias muito sensíveis, sendo degradadas quando ocorrem mudanças em seu ambiente. Não toleram grandes alterações de temperaturas (abaixo de 10°C ou acima de 50°C) e variações de pH (inferior a 6,8 ou superior a 8,0) (TRUEBA et al., 2004).

Podem sobreviver no ambiente, em locais úmidos, e tendem a formar agregados em coleções de água. Sua sobrevivência nestes locais depende da temperatura, pH, salinidade e grau de poluição (GANOZA et al., 2006). Quando o ambiente é ideal podem sobreviver por longos períodos, podendo chegar a seis meses (TRUEBA et al., 2004).

Tem como sua principal fonte energética os ácidos graxos de cadeia longa, que degradam por β -oxidação, sendo que este, ao mesmo tempo em que são necessários ao metabolismo energético da bactéria, também são tóxicos à mesma, por isso, os meios de cultivo devem conter desintoxicante, como albumina bovina. Estas são capazes de absorver grande quantidade de ácidos graxos e de liberá-los gradativamente de forma não tóxica. Acredita-se que na natureza a bactéria integra a sua membrana externa em superfícies em que os ácidos graxos são absorvidos (FAINE et al., 2000).

As espécies patogênicas possuem longo tempo de geração, variando de oito a 18 horas. Seu crescimento em meio de cultura varia de dois a 30 dias (FAINE et al., 2000), podendo levar até 26 semanas para isolamentos primários (ELLIS et al., 1983).

Reproduzem-se por fissão binária transversal (HOLT, 1978). Durante sua divisão, a célula se alonga até o momento onde ocorre a constrição do cilindro protoplasmático, fechando assim as extremidades das duas novas células que permaneceram conectadas. Não se conhece a forma de regulação de divisão das leptospiros. (FAINE et al., 2000).

2.3 Epidemiologia

Leptospirose é a zoonose mais difundida em todo o mundo (WHO, 1999). Está presente em todos os continentes, exceto na Antártida. Já foi relatado em praticamente todas as espécies de mamíferos. Os seres humanos são comumente infectados por meio de atividades ocupacionais, lazer, doméstica, diretamente ou através de água ou do solo contaminados (ADLER et al., 2010).

A doença tem maior incidência em países de clima tropical, fato explicado pela maior permanência da bactéria em ambientes quentes e úmidos. Além disso, grande parte dos países tropicais são também países em

desenvolvimento, onde há uma maior exposição da população ao agente. Já em áreas temperadas, a doença tem caráter sazonal, com pico de incidência ocorrendo durante os períodos mais quentes e chuvosos (ADLER et al., 2009).

Diversas espécies de roedores são consideradas reservatórios do agente, podendo eliminar leptospiros por toda vida sem desenvolver a doença (EDELWEISS, 1962; MINISTÉRIO DA SAÚDE 1989). Roedores podem eliminar a cada micção, cerca de 6.000 espiroquetas por mL de urina. Considerando que a cada micção são eliminados por volta de três mL de urina, pode-se supor que se expelidos cerca de 18.000 leptospiros por cada micção de um rato (FÜHNER, 1950). Animais albergam a leptospira nos rins e eliminando-a de forma contínua ou intermitente no meio ambiente e desta forma, contaminando água, solo e alimentos (VASCONCELLOS, 1993).

Muitas espécies animais foram descritas com reservatório renal de leptospiros, e a distribuição dos diversos serovares varia de acordo com a espécie acometida, região e/ou ecossistema estudados (BARCELLOS et al., 2003; BHARTI et al., 2003). As infecções humanas são resultados da eliminação de leptospiros por animais portadores no ambiente. Devido a este fator, a identificação dos serovares circulantes em cada região, assim como os hospedeiros mantenedores do agente no meio, possibilita um maior esclarecimento da epidemiologia da doença (BHARTI et al., 2003).

A leptospirose tem período de incubação variável, com uma média de dez dias, e pode ser dividida em duas fases. A primeira denominada de septicêmica ou aguda, caracterizada pela presença das espiroquetas na circulação sanguínea, e a segunda fase é chamada de imune, onde é estabelecida uma resposta imunológica mediada principalmente por anticorpos, quando as leptospiros se encontram principalmente nos órgãos alvo (LEVETT, 2001).

As taxas de morbidade e mortalidade aumentam pela falta de medidas preventivas como vacinação de animais e humanos, políticas de informação e orientação à população, tratamento adequado e dificuldade no diagnóstico aliada a subnotificação da enfermidade (LEVETT, 2001; VINETZ, 2001).

Mundialmente a leptospirose atinge de forma mais intensa áreas que possuem precárias condições sanitárias, sendo países em desenvolvimento os

mais afetados, onde representa uma zoonose com grande importância social e econômica (LEVETT, 1999; WHO, 1999, MEITES, et al 2004).

No Brasil, populações de baixa renda estão continuamente expostas ao agente, apresentado assim maior risco para adquirir a infecção (KO et al., 1999). Mesmo sendo considerada uma doença subdiagnosticada, (BHARTI, et al., 2003; KO et al., 2009), o quadro 1 mostra o elevado número de casos de leptospirose no país, sendo as regiões sul e sudeste as mais acometidas. O Brasil entre outros países é considerado como uma região onde a doença é reemergente pelo aumento do número de casos e pela ocorrência de formas graves da doença em humanos (www.saude.gov.br; SPICHLER et al.,2008; KO et al.,2009).

Quadro 1: Casos de leptospirose humana. Brasil, Regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2010*

Região e UF	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Região Norte	484	584	340	391	142	227	248	224	272	752	246	338	350	197
Região Nordeste	847	514	194	1006	651	638	514	807	746	679	558	646	911	622
Região Sudeste	944	1242	1102	948	1222	957	999	1319	1363	1693	1230	1097	1477	1191
Região Sul	863	1084	782	1094	1649	907	1192	673	1088	1175	1264	1572	1063	1036
Região Centro-Oeste	160	25	15	48	44	40	52	74	65	70	36	53	46	37
Brasil	3298	3449	2433	3487	3708	2769	3005	3097	3534	4369	3334	3706	3847	3083

Fonte: SINAN/SVS/MS

* Dados obtidos em 13.01.2011, sujeitos a revisão.

2.4 Ciclo Epidemiológico

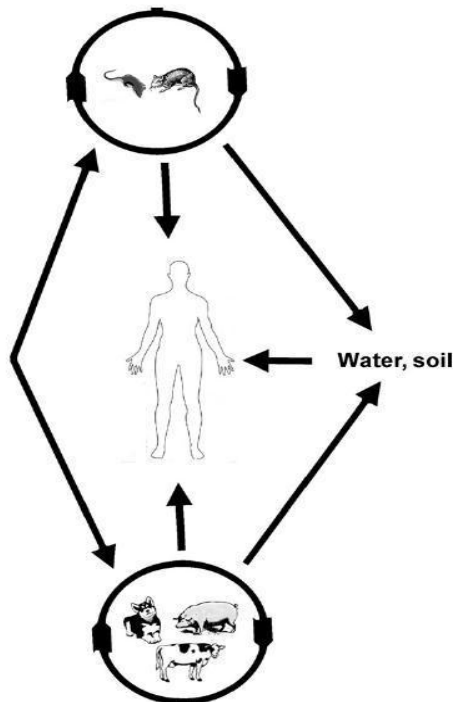
Há uma grande diversidade de hospedeiros de manutenção das leptospirosas, sendo estes compreendidos por animais silvestres e domésticos. Cada serovar é mantido por um hospedeiro animal específico, sendo classificado como adaptado (ELLIS, 1984; FAINE et al., 2000). No entanto, a associação dos serovares patogênicos com as espécies animais não é exclusiva, podendo variar entre regiões devido às diferentes condições ecológicas. Deste modo, o mesmo serovar pode estar adaptado a mais de um hospedeiro, por exemplo, serovar Copenhageni sendo adaptado à *Rattus norvegicus* e *R. rattus* (BHARTI, et al., 2003; TURNER, 1967; WHO, 2003). Além disso, a mesma espécie animal pode ser hospedeira de manutenção para um serovar, e ser hospedeira acidental de outros (LEVETT, 2001).

Reservatórios animais são cronicamente infectados nos rins pelos serovares de leptospira (ATHANAZIO et al., 2008). Assim, a transmissão pode ocorrer pela eliminação de leptospiras na urina que contamina a água e o solo, sendo esse o principal veículo de transmissão da doença (McBRIDE et al., 2005). Além disso, leptospiras podem ser eliminadas por sêmen e secreções vaginais, possibilitando assim a transmissão venérea ou por meio de inseminação artificial (FAINE et al., 2000).

Acredita-se que as leptospiras sejam eliminadas em altas concentrações na urina de ratos, estudos demonstraram que ratos experimentalmente infectados eliminam até 10^7 bactérias/mL de urina (NALLY et al., 2005). As leptospiras naturalmente tendem a formar agregados na água, o que pode estar relacionado com sua manutenção no ambiente (TRUEBA et al., 2004).

Existem vários fatores associados à transmissão da leptospirose que envolvem diferentes reservatórios e hospedeiros (Figura 1). Além disso, condições ambientais são determinantes para o transporte e manutenção do microrganismo (ANDRÉ-FONTAINE et al., 1990).

Figura 2: Ciclo epidemiológico da leptospirose



(ADLER et al., 2009)

2.5 Leptospirose Humana

O homem é o hospedeiro terminal e acidental da infecção. A entrada da bactéria no organismo ocorre principalmente através de lesão na pele ou mucosas íntegras. Apesar de ocorrer apenas na forma incidental, a leptospirose em humanos varia clinicamente de acordo com o serovar infectante, idade, estado de saúde e competência imunológica do paciente. O estado clínico pode variar de estado febril a insuficiência renal, hepática e pulmonar, além de icterícia, podendo chegar ao óbito (ADLER et al, 2009).

A enfermidade apresenta um difícil diagnóstico clínico, principalmente na fase inicial da doença, podendo ser confundida com uma série de enfermidades tais como febre amarela, dengue e hepatite. Cerca de 15% dos infectados evoluem para a forma clássica da doença denominada síndrome de Weil, caracterizada pelo quadro clínico icterico, insuficiência renal e hemorragia aguda. Atualmente, a síndrome hemorrágica pulmonar é descrita como uma das formas mais graves da doença, A letalidade das formas graves atinge aproximadamente de 10% a 50% quando ocorre a síndrome da hemorragia pulmonar (FAINE et al., 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Qualquer serovar pode determinar as diversas formas clínicas, no entanto, alguns estão mais comumente relacionados a formas mais graves, como por exemplo, Icterohaemorrhagiae (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

2.6 Leptospirose Animal

Nos animais, a leptospirose apresenta sinais clínicos variados e na sua maioria inaparentes, podendo causar febre, insuficiência hepática/renal ou problemas reprodutivos, sendo estes últimos, responsáveis por importantes perdas econômicas, determinando abortamentos, natimortalidade, nascimento de animais fracos, e infertilidade. (ADELER et al, 2010; ELLIS, 1984). No quadro 2 podemos observar a relação entre alguns serovares e seus respectivos hospedeiros renais.

Quadro 2 – Serovares e serogrupos de *Leptospira sp.* descritos nas diferentes espécies de animais portadores.

Serovar	Serogrupo	Espécie	Hospedeiro
Hardjo (Hardjobovis)	Sejroe	<i>L. borgpetersenii</i>	Bovinos
Hardjo (Hardjoprajitno)	Sejroe	<i>L. interrogans</i>	Bovinos
Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Roedores
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Ratazana
Pomona	Pomona	<i>L. interrogans</i>	Suínos
Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Caninos

Adaptado de FAINE ET AL. 2000.

2.7 Diagnóstico Laboratorial

Existem varias técnicas de diagnóstico para a leptospirose, porém o melhor método a ser escolhido, está intimamente relacionado ao objetivo do diagnóstico (FAINE et al., 2000).

O diagnóstico precoce da doença é essencial, já que a terapia com antibióticos é mais eficiente no inicio da infecção, aumentando assim a chance de cura em seres humanos. Em países tropicais o diagnóstico em humanos se dificulta ainda mais, devido a outras infecções endêmicas que se sobrepõe com sintomatologia similar (MCBRIDE et al., 2005), como Dengue e Hepatite.

O teste da soroaglutinação microscópica (SAM), baseado na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* no soro do paciente, é o teste preconizado pela OMS e OIE. Este método tem alta sensibilidade e especificidade, mas em contrapartida não consegue detectar a doença em suas fases iniciais, ate o sétimo dia após a infecção (HICKEY, 2007); além disso, as variações nas respostas imunológicas individuais e a reatividade cruzada entre os diferentes serovares de leptospira tornam difícil a definição do verdadeiro serovar infectante (SAKATA et al., 1992; RODRIGUES et al., 2007).

Em animais a detecção da doença por este método diagnóstico pode ser influenciada pela vacinação, podendo assim produzir resultados falso-positivos. Outras formas de diagnóstico têm sido descritas, como os ensaios de imunofluorescência, imunoenzimáticos e western-blot (RAGHAVAN et al., 2007).

O isolamento da bactéria em urina ou tecidos é considerado o padrão ouro para o diagnóstico. Vários autores ressaltam a importância do isolamento para estudos epidemiológicos, vacinologia e desenvolvimento de reativos (VASCONCELLOS et al., 2001), mas a cultura de isolamento constitui-se de um trabalho intensivo e demorado, além de ter uma baixa sensibilidade (RAGHAVAN, et al. 2007).

2.8. Isolamento de Leptospiras

A leptospirose é uma doença sistêmica, possibilitando a detecção do agente em vários tecidos e fluidos do organismo, principalmente em urina, via preferencial de transmissão da bactéria. Sendo assim, todas estas amostras representam potencial para a tentativa de isolamento. O cultivo da leptospiras é considerado como diagnóstico definitivo da infecção (SCHÖNBERG, 1981; THIERMANN, 1984; OIE, 2010).

Mesmo sendo o diagnóstico definitivo da doença, sua utilização é limitada pela lenta taxa de crescimento, longos períodos de incubação, elevado custo e equipamentos específicos para manutenção dos cultivos e a contaminação das culturas por outros microrganismos. Para um isolamento bem sucedido, é primordial que as amostras testadas sejam recentes (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001; FREITAS et al., 2004). A incubação pode durar até 13 semanas em estufa com temperaturas de 28 a 30°C com análise semanal pela microscopia de campo escuro. Após este período sem crescimento a cultura pode ser descartada. Outros autores, no entanto, recomendam a incubação por até 30 semanas (ELLIS et al., 1983). Por este motivo, a cultura não é empregada como um teste rotineiro para o diagnóstico, mas permanece importante para finalidades epidemiológicas (ADLER et al., 2009).

O meio de cultura mais utilizado para o seu cultivo é o meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), que contém ácido oléico, soro albumina bovina como detoxificante e tween 80 como fonte de carbono (ELLINGHAUSEN e MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON e HARRIS, 1967). Outros meios menos utilizados são o meio modificado de Korthof, meio modificado de Stuart e meio semissólido Fletcher entre outros (FAINE et al., 2000).

Estudos ressaltam a importância do isolamento de leptospiros para ampliação dos conhecimentos em epidemiologia e vacinologia da enfermidade (VASCONCELLOS et al., 2001). No entanto, poucos são os relatos de isolamento de amostras no Brasil, em função das várias limitações já descritas. Para o isolamento se fazem necessárias técnicas apropriadas, devido às exigências para o crescimento a susceptibilidade do agente a mudanças do meio (BLAZOTTI, 2006). Para a solução deste problema muitos autores propõem diferentes tipos de protocolos e meios de cultivo, com a utilização de antibióticos e melhorias na manipulação das amostras e técnicas (SCHONBERG et al., 1981; THIERMANN, 1984; ADLER et al., 1986).

Ao longo dos anos foram desenvolvidos diversos protocolos com diferentes meios de cultura e métodos para uma metodologia eficiente onde se consiga isolar leptospiros.

O isolamento de leptospiros de urina requer mais cuidados, exigindo um protocolo de seleção para eliminar os contaminantes provenientes do material (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001).

Apesar de ser o método recomendado para o diagnóstico da leptospirose, a soroaglutinação microscópica apresenta limitações, tais como as variações nas respostas imunes e a reação cruzada entre os diferentes serovares de leptospiros, o que torna difícil a definição do verdadeiro serovar infectante (SAKATA et al., 1992; ROGRIGUES et al., 2007).

Em níveis epidemiológicos, o isolamento de leptospiros é de extrema importância, já que a SAM nos revela apenas o sorogrupo provável de circulação em uma população estudada (TURNER, 1970). Sendo assim, se faz necessário o isolamento de leptospiros para análises com técnicas que permitam identificar as cepas circulantes em determinadas regiões, a ocorrência de novas cepas, ou mutações das já existentes, dando suporte assim aos novos estudos em vacinologia, ajudando na profilaxia e no entendimento desta enfermidade das diferentes regiões (VASCONCELLOS et al., 2001).

Um dos grandes problemas do isolamento de leptospiros é justamente a fragilidade do patógeno em relação ao material utilizado no isolamento. Por exemplo, amostras de urina, por ser um material normalmente

contaminado com outros microrganismos, dificulta extremamente o isolamento da bactéria é difícil, além disso, o transporte das amostras até o local de processamento muitas vezes é demorado, aumentando as chances de perda de leptospiras nas amostras (HUSSAINI e RUBY, 1976; ADLER et al., 1986).

No intuito de incrementar as chances de isolamento, vários autores reportaram diversas metodologias. Apesar disso, nenhuma ainda demonstrou grande eficácia, tendo resultados limitados (SCHONBERG, 1981; THIERMANN, 1984; ADLER et al, 1986).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Este estudo teve por objetivo comparar diferentes protocolos para isolamento de leptospiros, associando-os com diversos meios de cultivo dispostos na literatura, visando aumentar a sensibilidade da técnica.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliação de diferentes protocolos de seleção de leptospiros.
- 2- Avaliação de diferentes meios de cultivo para isolamento de leptospiros a partir de amostras clínicas.
- 3- Avaliação do uso combinado dos protocolos de seleção e meios de cultivo, em busca de uma otimização da técnica de isolamento de leptospiros.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Locais de Desenvolvimento dos Estudos

Os meios de cultivo e meios seletivos foram preparados no Laboratório de Bactérias e Recombinantes do Departamento de Reativos para Diagnóstico no Instituto de Imunobiológicos – BIOMANGUINHOS – FIOCRUZ/RJ. O cultivo das leptospiros, infecção experimental das amostras e análise ocorreram no Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico na Universidade Federal Fluminense - UFF.

4.2 Desenho do Estudo

Inicialmente, foram escolhidos na literatura e preparados os meios de cultura e soluções a serem utilizados. Posteriormente, foram feitos os inóculos experimentais em 30 mL de urina humana recém-emitida com leptospiros de três serovares: Hardjo, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae em três concentrações de 10^2 , 10^5 e 10^8 leptospiros por mL, procurando reproduzir as condições naturais de eliminação deste microrganismo. Tais amostras foram processadas pelos protocolos selecionados e cultivadas.

4.3. Amostras

Foram utilizadas culturas de leptospiros dos serovares Icterohaemorrhagiae (RGA), foi selecionado como representante principal de ambientes urbanos, Grippotyphosa (Moskva 5), representando ambientes silvestre, e Hardjo (Hardjoprajitno), representante de leptospiros de interesse veterinário e reconhecida por ser um serovar de difícil crescimento. As culturas foram mantidas em meio de cultivo EMJH, com análise e passagens periódicas semanais, livres de auto-aglutinação ou contaminantes. As amostras pertencem à coleção de leptospiros do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

A fim de simular eliminação de baixa, média e alta quantidade de leptospiras, amostras de urinas humanas recém-emitidas foram inoculadas com as culturas de leptospiras de cada serovar selecionados em concentrações variáveis para a obtenção de amostras com 10^2 , 10^5 e 10^8 leptospiras por mililitro, contadas em câmara de contagem Petroff-Hausser.

Para controle da contaminação das amostras de urina utilizadas no experimento, as amostras foram semeadas em meio Agar tripticase soja (Merck) e incubadas a 37°C para crescimento por 24 h, e posterior contagem de colônias em aparelho conta-colônias (CB 600Plus, Phoenix).

4.4 Protocolos de Semeadura

Foram avaliados os protocolos de seleção por diluição seriada (ZUERNER, 2005), por coquetel de antibiótico (SCHÖNBERG, 1981; HEER et al., 1982) e por filtração (membrana $0,22\mu\text{m}$) (RITTENBERG et al., 1958 com modificações)

4.4.1 Protocolo I - Seleção por Diluição Seriada

As amostras de urina experimentalmente contaminadas nas concentrações de 10^2 , 10^5 e 10^8 leptospiras por mL foram processadas conforme o protocolo de seleção por diluição seriada sendo posteriormente inoculadas nos meios de cultivo. O protocolo baseia-se em diluições de cada amostra em tampão PBS com albumina bovina a 10% do volume do meio nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , sendo logo semeadas com inóculo de 10% do volume do meio de cada diluição nos meios de cultivo, em fluxo laminar e incubados em estufa a 30°C .

4.4.2 Protocolo II - Seleção por Coquetel de Antibiótico

Um inóculo na proporção de 10% do volume do meio foi feita de cada amostra (urina experimentalmente contaminadas) em meio seletivo EMHJ com coquetel de antibióticos (5-Fluoruracil 400mg/L, Sigma-USA; Cloranfenicol 5mg/L, Sigma-USA; Ácido nalidixico 50mg/L, Inlab-Brasil; Neomicina 10mg/L,

Sigma-USA; Vancomicina 10mg/L, Acros-USA) e incubada por 24 h em estufa a 30°C. Após este período, retirou-se o material do meio seletivo fazendo um inóculo de 10% do volume do meio em meios de cultura sem adição de antibióticos (com exceção do meio que contém 5-FU), seguido de incubação em estufa a 30°C.

4.4.3 Protocolo III - Seleção por Filtração

As amostras de urina experimentalmente contaminadas conforme previamente descrito foram filtradas com o auxílio de filtros estéreis com membrana de 0,22µm (Millipore, USA) com auxílio de seringa, realizando diretamente um inóculo equivalente a 10% do volume de meio nos meios de cultivo, incubando em estufa a 30°C.

4.5 Meios de Cultura

Foram utilizados no experimento os seguintes meios de cultura: Meio Ellinghausen–Mc Cullough–Johnson–Harris (EMJH) (DIFCO-USA); Meio Ellinghausen–Mc Cullough–Johnson–Harris (EMJH) acrescido de 5-Fluouracil (DIFCO-USA/ Sigma-USA); Meio Ellinghausen–Mc Cullough–Johnson–Harris acrescido de Tween 40/80/LH (ELLIS et al., 1985) e Meio semissólido Fletcher (DIFCO-USA) acrescido de 10% de soro de coelho (FAINE et al., 2000).

4.5.1 Meio Líquido de EMJH

A base para o meio EMJH é disponível comercialmente (DIFCO-USA) e foi reidratada conforme instruções do fabricante, sendo posteriormente autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Este meio base foi utilizado de três formas diferentes:

- Acrescido de suplemento comercial (DIFCO-USA) – EMJH puro.
- Acrescido de suplemento comercial (DIFCO-USA) e de 5-Fluouracil (DIFCO-USA/ Sigma-USA) 100 mg/mL – EMHJ acrescido de 5-FU.

- Acrescido de suplemento modificado - Tween 40/80/LH (conforme sugerido por ELLIS et al. (1985).

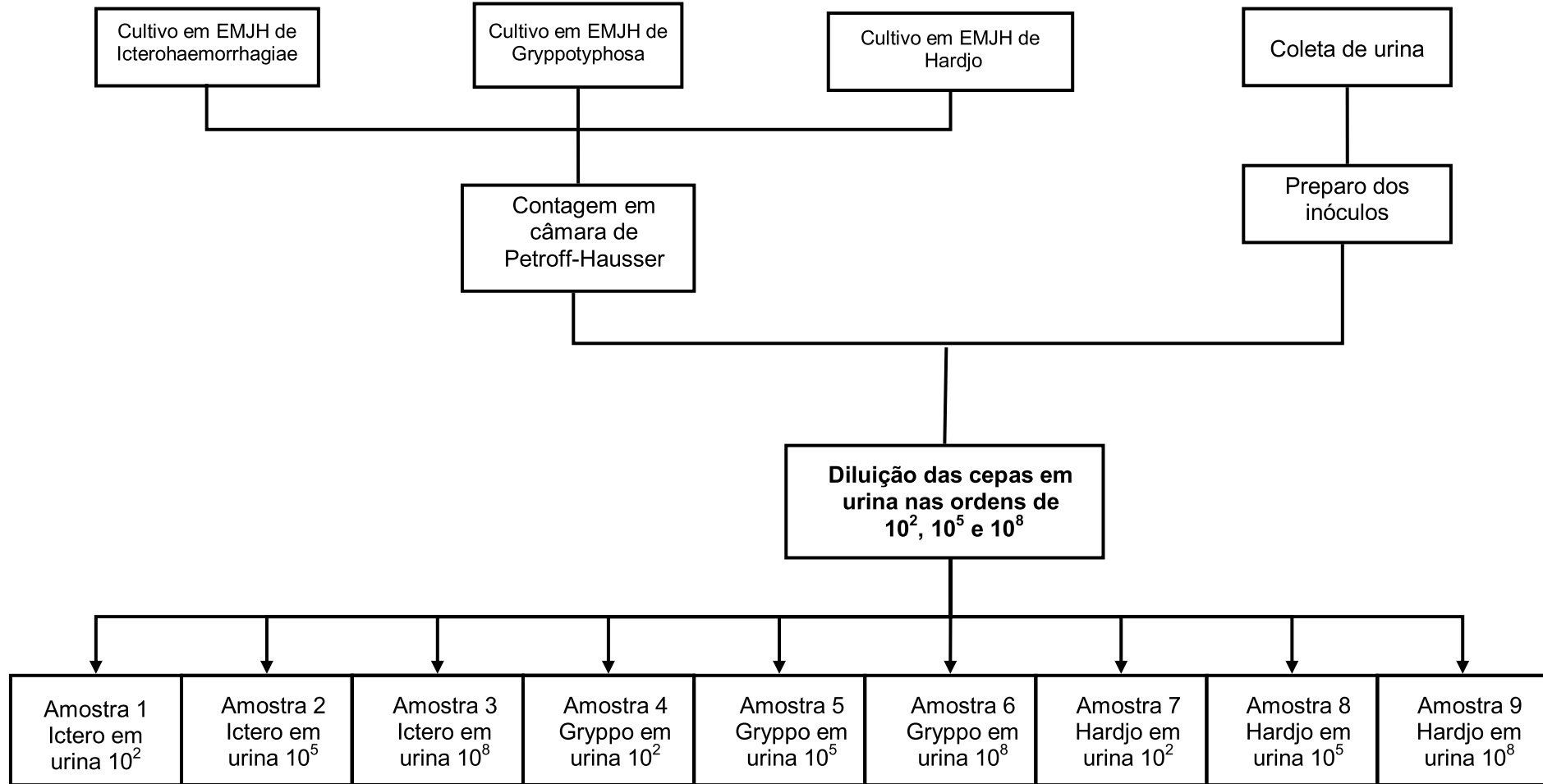
4.5.2 Meio Semi-Sólido Fletcher

A base para meio semi-sólido Fletcher é disponível comercialmente (DIFCO-USA) e foi reidratado conforme instruções de fabricante, sendo posteriormente autoclavado por 15 minutos a 121°C. Após atingir a temperatura de 45-50°C adicionou-se 10% de soro de coelho estéril, adquirido no Centro de Criação e Experimentação Animal (CECAL) na FIOCRUZ e o meio foi imediatamente envasado em tubos de ensaios estéreis.

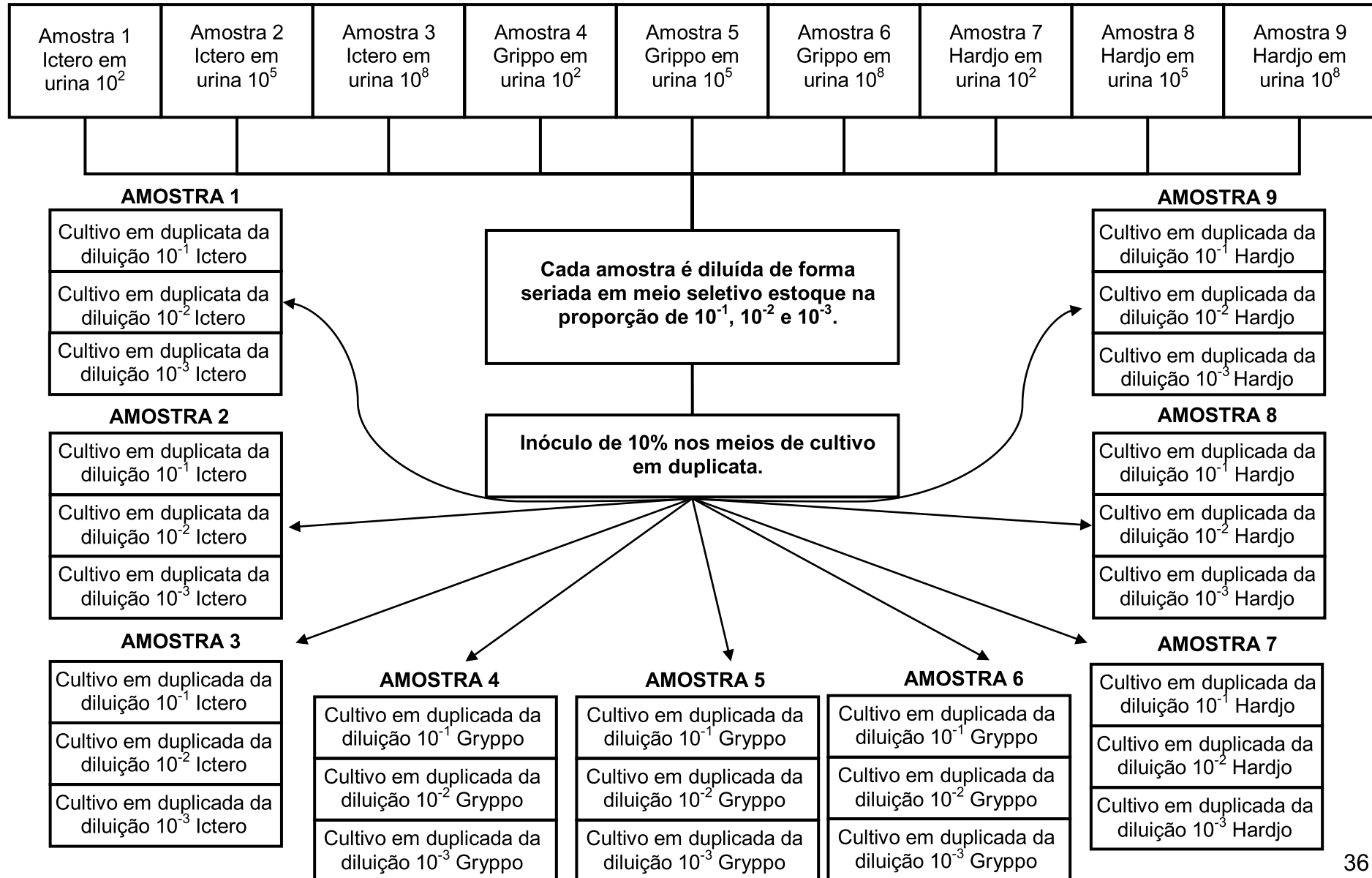
4.6 Análises das Amostras

Todos os cultivos foram realizados em duplicata, e todos os protocolos foram repetidos três vezes para garantir a reprodutividade do estudo. Os cultivos foram analisados por quatro meses e semanalmente eram avaliados macroscopicamente e no caso de apresentarem turvação eram analisados microscopicamente (microscopia de campo escuro).

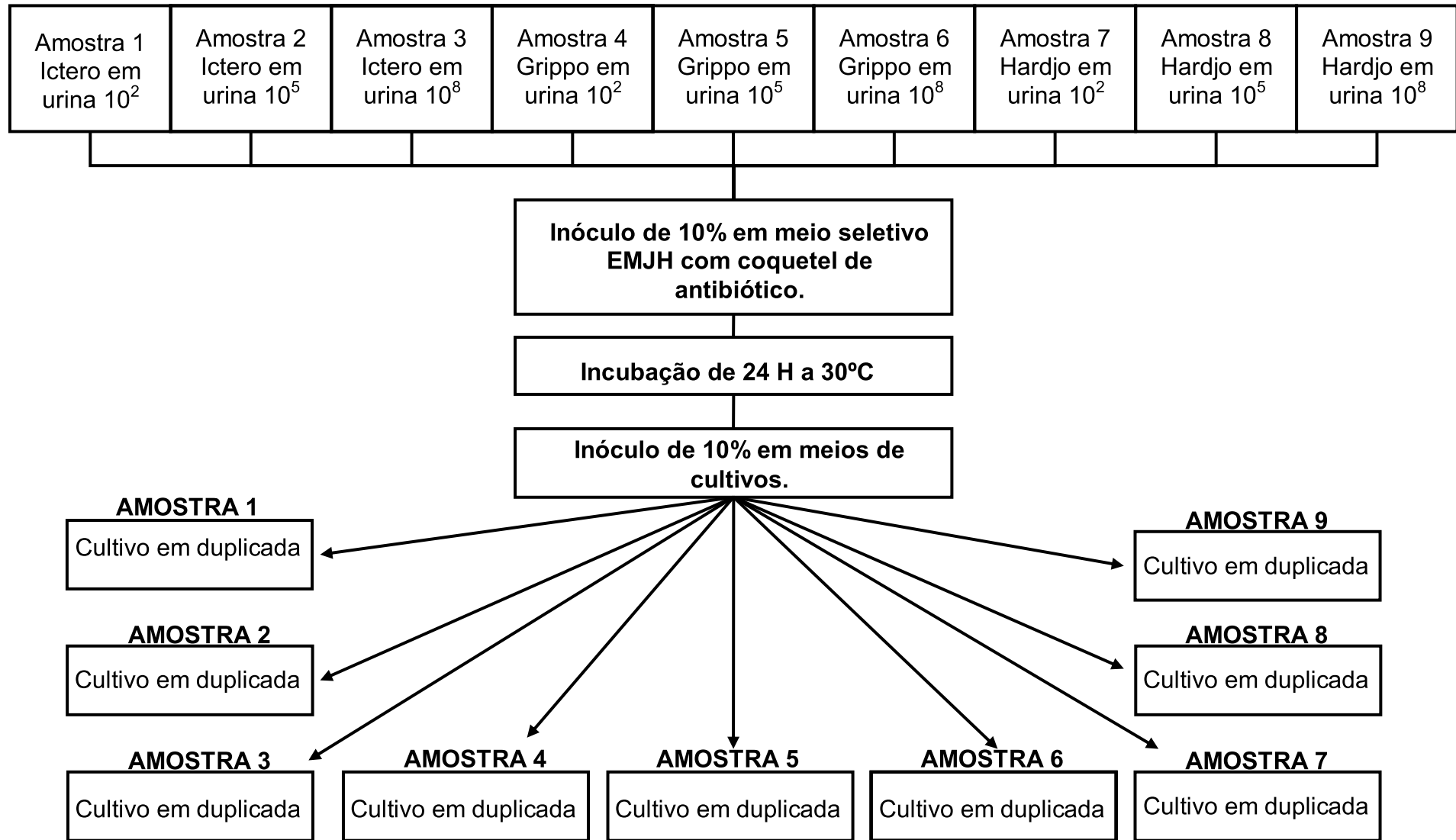
Fluxograma 1 - Inoculação das Amostras



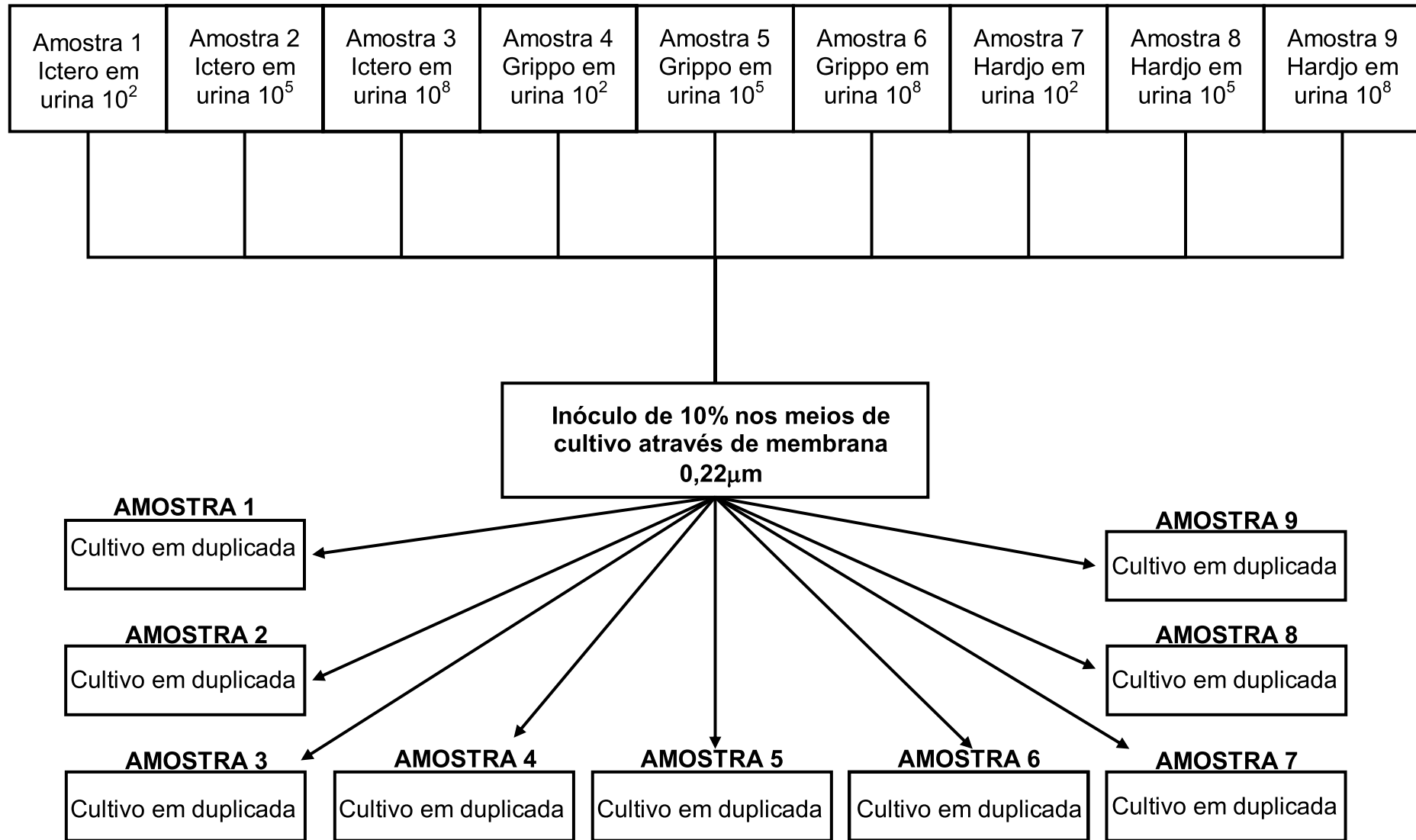
Fluxograma 2 - Protocolo Seleção por Diluição Seriada



Fluxograma 3 - Protocolo Seleção por Coquetel de Antibióticos



Fluxograma 4 - Protocolo Seleção por Filtração



4.7 Análise Estatística.

Os resultados foram analisados pelo teste exato de Fischer utilizando GraphPad InStat version 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Análises foram consideradas significativas quando apresentaram diferença em um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5.RESULTADOS

5.1 Amostras de Urina

A contagem de colônias em meio Agar-tripticase soja mostrou que todas as amostras apresentaram contagem menor que 10.000 UFC por mL. Mostrando uma contaminação normal para um indivíduo saudável.

5.2 Protocolos de Seleção

Dos 36 tubos cultivados pelo método de diluição seriada, independentemente do serovar ou do meio de cultura utilizado, recuperou-se leptospiros em 24 (66,6%), embora em 32 (88,8%) destes tenha sido observada a presença de contaminantes. No que se refere á recuperação por serovares, verificou-se que Grippytyphosa apresentou o maior número de recuperações (100%), enquanto Hardjo e Icterohaemorrhagiae foram recuperados em seis tubos (50%) cada. Esta diferença se mostrou estatisticamente significativa ($p=0.0046$) quando se comparam o serovar Grippytyphosa com os demais testados (Tabela 1).

Em relação à concentração do inóculo, observou-se que as amostras com alta concentração de leptospiros (10^8 leptospiros/mL) obtiveram 12/12 (100%) dos cultivos recuperados, independente do serovar testado ou do meio onde foi inoculado, valor significativo quando comparados com as demais diluições testadas ($p= 0,0137$). Entre as diluições 10^5 e 10^2 leptospiros/mL não houve diferença significativa em relação ao número de culturas recuperadas, as quais apresentaram seis (50%) tubos recuperados cada. Desta forma, verificou-se que a recuperação de leptospiros está diretamente relacionada à quantidade de leptospiros na amostra original (Tabela 1).

No que diz respeito aos tubos cultivados pelo método de seleção por coquetel de antibióticos, dos 36 tubos cultivados, independentemente do serovar ou do meio de cultura utilizado, recuperou-se leptospiros em 10 (27,7%) tubos e obteve-se 15 (41,6%) tubos contaminados. No que se refere á recuperação por serovares, não se verificou diferenças significativas onde dos 12 tubos de cada

serovar, três (25%) tubos com Hardjo, quatro (33,3%) de Grippytyphosa e três (25%) de Icterohaemorrhagiae (Tabela 1).

A respeito da concentração do inóculo, observou-se mais uma vez que as amostras com alta concentração (10^8 leptospiras/mL) obtiveram maior número de recuperações com 9/12 (75%) dos tubos recuperados, independente do serovar testado ou do meio onde foi inoculada, já diluição 10^5 leptospiras/mL obteve 1/12 (8,3%) diferença significativa em relação a diluição 10^8 leptospiras/mL ($p=0.0028$) e concentração 10^2 leptospiras/mL não obteve isolados 0/12 (0%) diferença também significativa quando comparada a diluição 10^8 leptospiras/mL ($p=0.0003$) (Tabela 1).

Já o protocolo de seleção por filtração apresentou o mais baixo nível de recuperação com apenas uma cultura positiva (2,7%). A mesma foi a única cultura a apresentar contaminação. A concentração de leptospiras não se mostrou significativa para a eficiência do protocolo.

Tabela 01. Culturas recuperadas nas diferentes concentrações dos serovares Hardjo, Grippytyphosa e Icterohaemorrhagiae nos protocolos de cultivos estudados.

Serovar		10^2	10^5	10^8
		% recuperação (positivos/n)	% recuperação (positivos/n)	% recuperação (positivos/n)
Diluição seriada	Hardjo ^(x)	25 (1/4)	25 (1/4)	100 (4/4)
	Grippytyphosa ^(x)	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)
	Icterohaemorrhagiae ^(x)	25 (1/4)	25 (1/4)	100 (4/4)
	Total	50 (6/12) ^(y)	50 (6/12) ^(y)	100 (12/12) ^(y)
Coquetel de antibióticos	Hardjo	0 (0/4)	0 (0/4)	75 (3/4)
	Grippytyphosa	0 (0/4)	25 (1/4)	75 (3/4)
	Icterohaemorrhagiae	0 (0/4)	0 (0/4)	75 (3/4)
	Total	0 (0/12) ^(k)	8,3 (1/12) ^(z)	75 (9/12) ^{(z)(k)}
Filtração	Hardjo	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)
	Grippytyphosa	0 (0/4)	0 (0/4)	25 (1/4)
	Icterohaemorrhagiae	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)
	Total	0 (0/12)	0 (0/12)	8,3 (1/12)

(positivos/n): culturas positivas para recuperação/número total de culturas; (x): valor de p encontrado entre o serovar Grippytyphosa e os serovares Hardjo e Icterohaemorrhagiae ($p = 0.0046$); (y): valor de p encontrado entre a concentração 10^8 e as concentrações 10^5 e 10^2 ($p=0,0137$); (z): valor de p encontrado entre a concentração 10^8 e as concentrações 10^5 ($p=0,0028$); (k): valor de p encontrado entre a concentração 10^8 e as concentrações e 10^2 ($p=0,0003$).

5.3 Meios de Cultivo

Dos 27 tubos semeados em cada meio de cultura, verificou-se que o meio EMJH sem aditivos obteve o melhor desempenho, tendo sido possível recuperar leptospiros em 11/27 (40,7%) tubos, seguido pelo meio EMJH acrescido de 5-FU com 10/27 (37%), pelo meio EMJH Tween 40/80/LH com 8/27 (29,6%) e por fim o meio Fletcher com 6/27(22,2%) tubos com recuperação. Não foram observadas diferenças significativas entre os meios (Tabela 2).

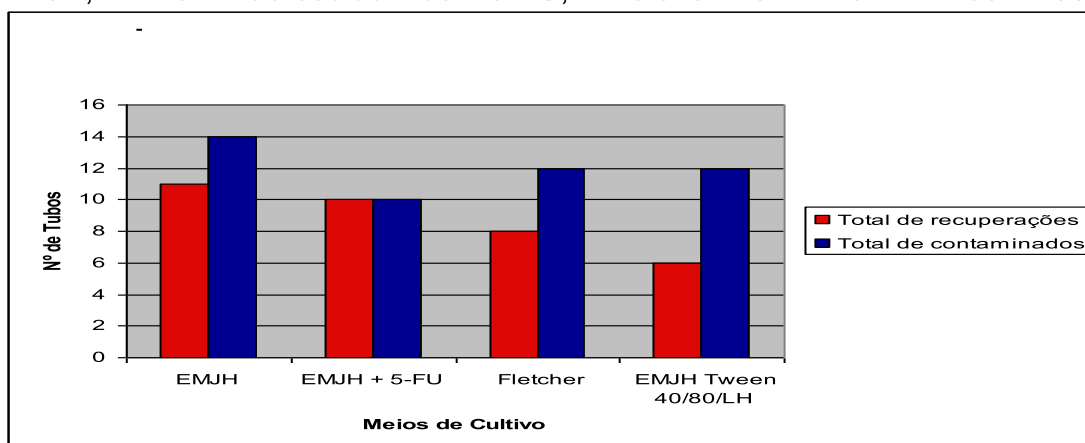
Tabela 02. Número de tubos recuperados e contaminados em cada meio de cultivo.

Total	Meio EMJH	Meio EMJH + 5-FU	Meio Fletcher	Meio EMJH Tween 40/80/LH
	% (positivos/n)	% (positivos/n)	% (positivos/n)	% (positivos/n)
Total de recuperações	40,7 (11/27)	37 (10/27)	29,6 (8/27)	22,2 (6/27)
Total de contaminados	51,8 (14/27)	37 (10/27)	44,4 (12/27)	44,4 (12/27)

(positivos/n): tubos positivos /número total de tubos.

Em relação à contaminação dos cultivos o meio EMJH acrescido de 5-FU teve o menor número de tubos contaminados 10/27 (37%), enquanto os meios Fletcher e EMJH Tween 40/80/LH, obtiveram 12/27 (44,4%) tubos contaminados e o meio EMJH teve o maior índice com 14/27 (51,8%) tubos contaminados (Tabela 2). A cassociação entre contaminação e recuperação das culturas pode ser observada no gráfico 1.

Gráfico 01. Tubos com recuperação e tubos contaminados nos meios de cultivos EMJH, EMJH acrescido de 5-FU, Fletcher e EMJH Tween 80/40/LH



5.4 Associação entre os Protocolos e Meios

No protocolo de seleção por diluição seriada, dos 9 tubos de cada meio semeado, o meio EMJH apresentou nove (100%) tubos recuperados, seguido dos meios EMJH acrescido de 5-FU, Fletcher e EMJH Tween 40/80/LH com cinco (55,5%) recuperações cada. Embora o meio EMHJ tenha tido o maior número de tubos recuperados, não houve diferença significativa entre os meios neste protocolo (Tabela 3).

Tabela 03. Tubos recuperados e contaminados em cada meio de cultivo processadas pelos protocolos de seleção por diluição seriada, por coquetel de antibiótico e filtração.

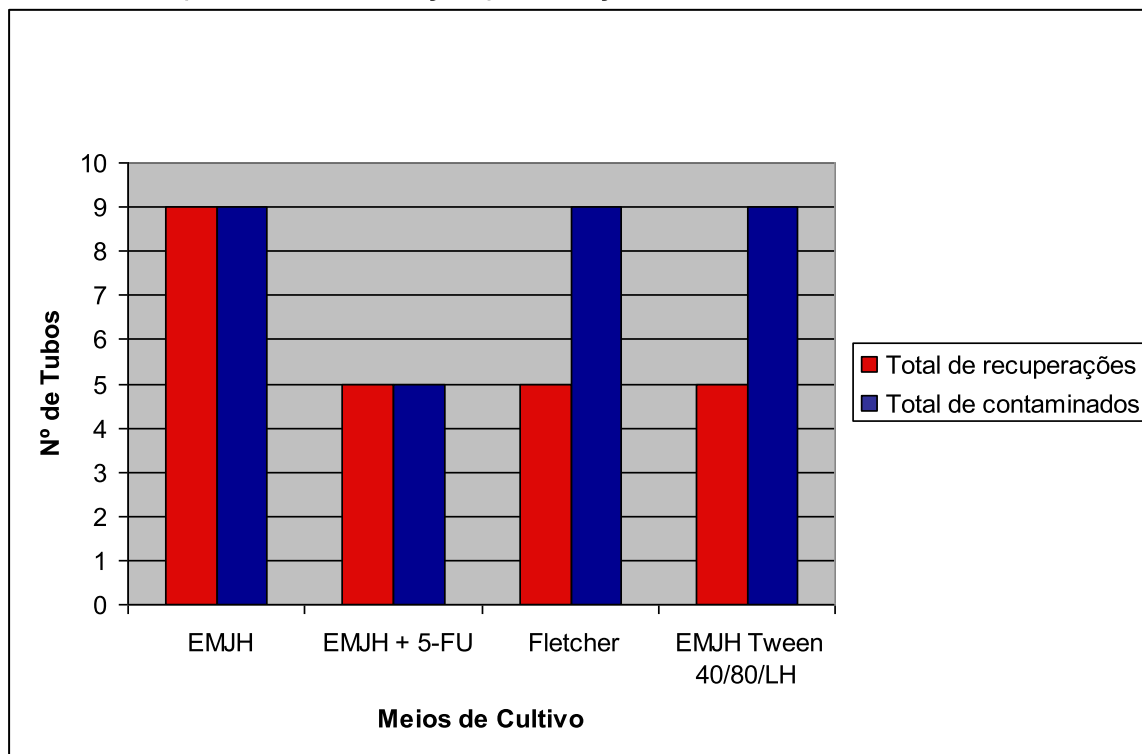
Protocolo		Meio EMJH	Meio EMJH + 5-FU	Meio Fletcher	Meio EMJH Tween 40/80/LH
		% (positivos/n)	% (positivos/n)	% (positivos/n)	% (positivos/n)
Diluição Seriada	Total de recuperações	100 (9/9)	55,5 (5/9)	55,5 (5/9)	55,5 (5/9)
	Total de contaminados	100 (9/9)	55,5 (5/9)	100 (9/9)	100 (9/9)
Coquetel de antibióticos	Total de recuperações	22,2 (2/9)	44,4 (4/9)	11,1 (1/9)	33,3 (3/9)
	Total de contaminados	55,5 (5/9)	44,4 (4/9)	33,3 (3/9)	33,3 (3/9)
Filtração	Total de recuperações	0 (0/9)	11,1 (1/9)	0 (0/9)	0 (0/9)
	Total de contaminados	0 (0/9)	11,1 (1/9)	0 (0/9)	0 (0/9)

(positivos/n): tubos positivos/número total de tubos.

No que diz respeito à contaminação por outros microrganismos o meio EMJH acrescido com 5-FU demonstrou o melhor desempenho. Dos nove tubos de cada meio de cultivo cinco (55,5%) tubos apresentaram contaminação no meio EMJH acrescido de 5-FU, enquanto os meios EMJH, Fletcher e EMJH Tween 40/80/LH apresentaram todos os cultivos contaminados (9/9 – 100%). Não houve

diferença significativa dos valores de contaminação entre os meios de cultivo neste protocolo (Tabela 3). O gráfico 2 mostra a comparação entre o número de tubos recuperados e contaminados.

Gráfico 2. Número de tubos recuperados comparados a culturas contaminadas nos meios de cultivo EMJH, EMJH acrescido de 5-FU, Fletcher e EMJH Tween 80/40/LH no protocolo de seleção por diluição seriada.

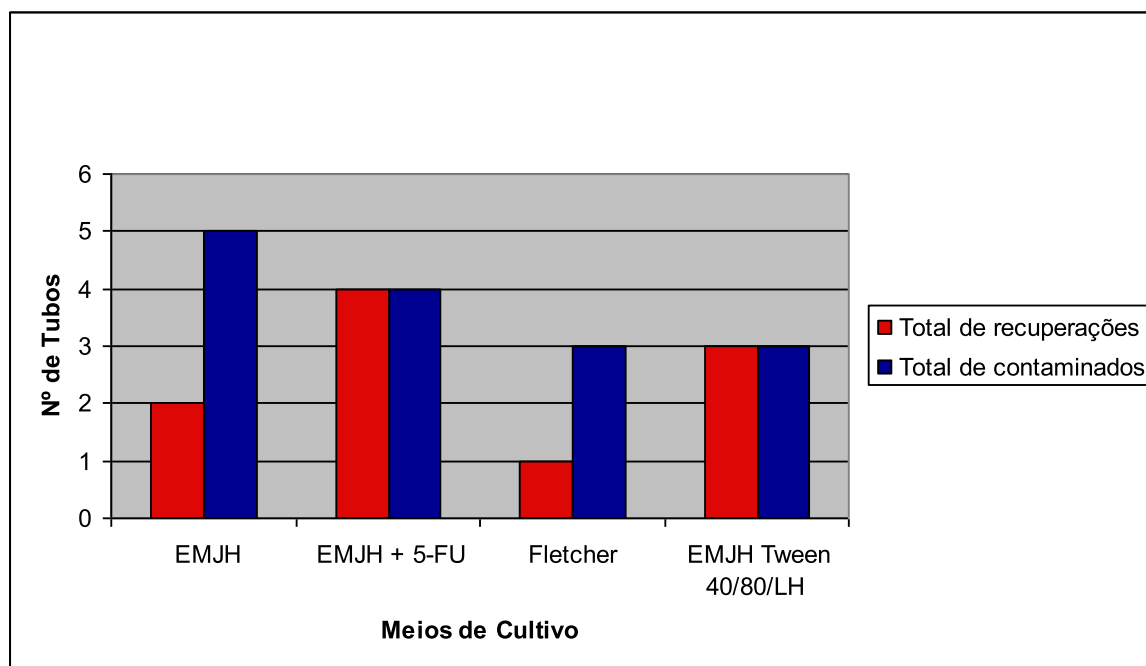


Em relação ao protocolo de seleção por coquetel de antibióticos, dos nove tubos de cada meio o EMJH acrescido de 5-FU apresentou o maior número de recuperações com quatro (44,4%) tubos recuperados, seguido dos meios EMJH Tween 40/80/LH com três (33,3%) tubos recuperados, seguido do meio EMJH com duas (22,2%) recuperações e do meio Fletcher com uma (11,1%) recuperação. Não houve diferenças significativas entre os meios neste protocolo de seleção (Tabela 3).

A respeito da contaminação por outros microrganismos o meio EMJH apresentou o maior número de tubos contaminados com cinco (55,5%) tubos dentre os nove tubos contaminados. Já o meio EMJH acrescido por 5-FU apresentou quatro (44,4%) tubos contaminados seguidos dos meios Fletcher e EMJH Tween 40/80/LH apresentaram três (33,3%) dos tubos contaminados. Não houve diferença significativa dos valores de contaminação entre os meios de

cultivo neste protocolo. O gráfico 3 mostra a comparação entre o número de cultivos recuperados e contaminados (Tabela 3).

Gráfico 3. Número de tubos recuperados comparados a tubos contaminados nos meios de cultivo EMJH, EMJH acrescido de 5-FU, Fletcher e EMJH Tween 80/40/LH no protocolo de seleção por coquetel de antibiótico.



No protocolo de seleção por filtração, dos nove tubos de cada meio o EMJH acrescido de 5-FU apresentou a única recuperação do protocolo (11,1%) sendo o mesmo a apresentar a única contaminação do protocolo. Não houve diferenças significativas entre os meios de cultivos.

O protocolo de seleção por diluição seriada apresentou 24 (66,6%) recuperações dos 36 cultivos testados, sendo o protocolo com maior número de recuperações, seguido pelo protocolo de seleção por coquetel de antibióticos com 10/36 (27,7%) recuperações e por ultimo, o protocolo de seleção por filtração com apenas 1/36 (2,7%) recuperação. A análise desses dados mostrou diferença significativa entre o protocolo de diluição seriada comparada ao protocolo de seleção por coquetel de antibiótico com $p=0,0019$, e quando comparada ao protocolo de seleção por filtração com $p<0,0001$. A comparação entre o protocolo de seleção por coquetel de antibióticos e o protocolo de seleção por filtração também foi significativo com $p=0.0065$ (Tabela 4).

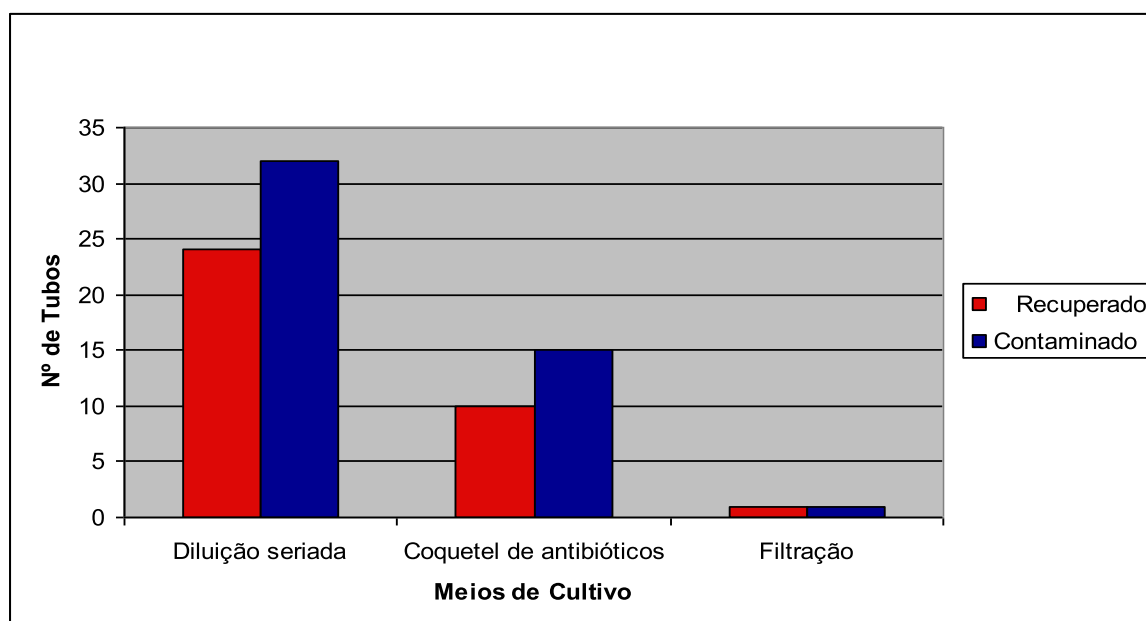
Tabela 04. Tubos recuperados e contaminados nos protocolos de seleção por diluição seriada (A), seleção por coquetel de antibióticos (B) e seleção por filtração (C).

Protocolo	Recuperado % (nº de positivos/n)	Contaminado % (nº de positivos/n)
Diluição seriada	66,6 (24/36) ^{(x)(y)}	88,8 (32/36)
Coquetel de antibióticos	27,7 (10/36) ^{(x)(k)}	41,6 (15/36)
Filtração	2,7 (1/36) ^{(y)(k)}	2,7 (1/36)

(positivos/n): tubos positivos/número total de tubos; (x): valores significativos protocolo A x B (p =0,0019); (y): valores significativos entre os protocolos A x C (p < 0,0001); (k): valores significativos entre os protocolos B x C (p=0,0065).

O protocolo de seleção por filtração teve o melhor desempenho com relação à eliminação de contaminantes, com apenas um (2,7%) tubo contaminado, seguida pelo protocolo de seleção por coquetel de antibióticos, que obteve 15 (41,6%) tubos contaminados e por último o protocolo de seleção por diluição seriada com 32 (88,8%) tubos contaminados dos 36 testados (tabela 4). O gráfico 4 mostra a comparação entre o número de tubos recuperados e contaminados.

Gráfico 4. Número de tubos recuperados comparados a tubos contaminados nos protocolos de seleção.



6. DISCUSSÃO

Adler et al. (1986) sugeriram que o fato mais crítico em relação ao isolamento e cultivo de leptospiros seria a contaminação do meio por outros microrganismos, principalmente quando o isolamento é feito a partir de amostras de urina ou tecidos. Adicionalmente, no campo veterinário, tal afirmação se faz ainda mais válida, visto que a coleta de urina e sêmen por meio de métodos assépticos de coleta nem sempre são possíveis em condições de campo (HUSSAINI e RUBY, 1976). Como nosso estudo foi realizado em condições controladas, com urinas recém emitidas, isto minimizou os níveis de contaminação. Importante observar, entretanto, que amostras contaminadas podem ser inoculadas em meios de cultura seletivos contendo antibióticos, ou ainda filtradas para se reduzir os contaminantes (CARTER, 1988). Importante observar que, com base nos resultados de urocultura, podemos afirmar que as amostras utilizadas no presente estudo apresentavam níveis de contaminação normal para indivíduos saudáveis, buscando reproduzir as condições usualmente verificadas em condições reais.

Em relação aos protocolos testados neste trabalho, o protocolo de seleção por diluição seriada apresentou baixa eficiência do protocolo para a redução da contaminação dos cultivos, embora tenha apresentado um desempenho significativamente melhor em amostras com maior concentração do inoculo em relação aos demais inóculos.

Já o protocolo de seleção por meio do uso de coquetel de antibiótico apresentou melhor resultado no que se refere à contaminação dos tubos. No entanto, a recuperação de leptospiros não foi boa, demonstrando que a redução da contaminação não se refletiu num aumento evidente no número de recuperações. Embora a contaminação da amostra seja usualmente referida como o principal fator de limitação para a recuperação de leptospiros a partir de material clínico (BIAZOTTI, 2006), outros autores já reportaram que esta associação nem sempre é observada. Schonberg (1981) mostrou que o uso de vancomicina (10 mg / L) e de ácido nalidíxico (50 mg /L) apresentaram pouco efeito em relação ao crescimento e multiplicação das leptospiros. Já nos casos de estreptomicina e cloranfenicol, houve uma redução elevada da contagem de leptospiros, ocorrendo a ausência da multiplicação da bactéria. Assim, observa-se que, mesmo sendo um

importante fator limitante para o crescimento de leptospiras, a contaminação não é o único fator a complicar a recuperação de amostras. Neste protocolo, verificou-se que a concentração original do inóculo de leptospiras mostrou-se como fator importante para a recuperação destes microrganismos, uma vez que houve uma significativa associação linear entre o inóculo original e a taxa de recuperação, mesmo sem diferenças significativas entre os serovares testados.

Embora o protocolo de seleção por filtração tenha obtido o melhor desempenho em relação à descontaminação das amostras, apresentou baixa recuperação de leptospiras, com apenas um tubo com crescimento. Importante observar que, embora a referência original deste método (RITTENBERG et al., 1958) tenha recomendado o uso de membrana filtrante com poros de 0,45µm, no presente estudo utilizou-se a membrana com poros de 0,22 µm. O uso deste filtro com poros menores foi recomendado por Faine et al. (2000) para a descontaminação de meios com pouco crescimento de leptospiras e abundante contaminação, uma vez que um filtro maior ainda permite a passagem de contaminantes. No entanto, embora tenha sido realmente eficiente para a prevenção de contaminação no meio semeado, talvez o uso de filtros com poros menores (0,22 µm) possa ter prejudicado a recuperação de leptospiras a partir de amostras clínicas, quando o número de leptospiras é bastante inferior ao observado em culturas já crescidas.

Os resultados do presente estudo não mostraram diferenças significativas entre os meios de cultivos testados considerando os três protocolos utilizados, mostrando que nas condições utilizadas os meios se equivalem em relação à recuperação de leptospiras das amostras. Embora o meio de cultivo EMJH acrescido de 5-FU tenha obtido o melhor desempenho em relação à redução de contaminantes, este fato não se refletiu num incremento nas recuperações de leptospiras. Em contraste, apesar de ter havido grande contaminação nos tubos com meio EMJH sem 5-FU, este foi o meio de cultura que possibilitou o maior número de recuperações. Os demais meios de cultura utilizados apresentaram resultados intermediários, variando em relação à contaminação e recuperações de acordo com o protocolo de seleção empregado, sem que se demonstrasse diferenças significativas entre os meios de cultivo.

Desde o desenvolvimento dos primeiros meios de cultivo para leptospiras, por Inada e colaboradores (1916), vários meios foram desenvolvidos,

muitos com a mesma base, modificando apenas a suplementação. O sequenciamento do genoma de leptospiros evidenciou a necessidade de modificações relacionadas ao cultivo para o isolamento primário a partir de amostras clínicas (NASCIMENTO et al., 2004). Bactérias fastidiosas requerem suplementos diferenciados para o seu crescimento, diferentemente de outras, como as pertencentes aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Canicola, as quais são isoladas com maior facilidade (FAINE et al., 2000).

No que se refere às diferenças observadas entre os serovares estudados, observa-se que o serovar Grippotyphosa apresentou maior sucesso em relação aos outros serovares testados na recuperação para este protocolo, independente da concentração utilizada. Grippotyphosa é reconhecido como um serovar ambiental menos exigente ao cultivo e associado a infecções incidentais. Recentemente este serovar foi isolado de urina de cabras, representando o primeiro isolamento no Brasil de leptospiros para esta espécie animal (LILENBAUM et al., 2007). Desta forma, a hipótese de que diferentes estirpes de leptospiros podem apresentar diferenças entre suas exigências de cultivos se fortalece com os resultados observados neste estudo.

7. CONCLUSÕES

Concluimos que o protocolo de seleção por diluição seriada mostrou o melhor desempenho para a recuperação de leptospiros em amostras frescas, independentemente do meio de cultivo utilizado. Adicionalmente, a concentração de leptospiros no inóculo mostrou-se como importante fator para o sucesso na recuperação, assim como o serovar envolvido, o que reforça a tese de que as leptospiros tem exigências e comportamentos diferentes.

8. BIBLIOGRAFIA

ADLER, B. et al. Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical material. **Veterinary Microbiology**, v.12, p.377-381, 1986.

ADLER, B.; MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis, **Veterinary Microbiology**, v. 27, p. 287-296, 2010.

ANDRÉ-FONTAINE G.; GANIERE J.P. New topics on leptospirosis, **Compendium of Immunological and Microbiological Infection Disease**, v.13, p.163-168, 1990.

ARAGÃO H. B. Sobre a presença da Espiroqueta icterohaemorrhagiae nos ratos do Rio de Janeiro. **Brasil-Médico**, v. 31, p. 329-330, 1917.

ATHANAZIO, D. A.; SILVA E. F.; SANTOS, C. S.; ROCHA, G. M.; VANNIERSANTOS, M. A.; MCBRIDE, A. J. A.; KO A. I.; REIS, M. G. *Rattus norvegicus* as a Model for Persistent Renal Colonization by Pathogenic *Leptospira interrogans*, **Acta Tropica**, v. 105, p. 176-180, 2008.

BARCELLOS C., LAMMERHIRT C. B., DE ALMEIDA M. A. & DOS S. E. Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies, **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19,p. 1283-1292, 2003.

BHARTI A. R., NALLY J. E., RICALDI J. N., MATTHIAS M. A., DIAZ M. M., LOVETT M. A., LEVETT P. N., GILMAN R. H., WILLIG M. R., GOTUZZO E. & VINETZ J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infection Disease**, v. 3, p. 757-771, 2003.

BIAZOTTI, R. **Leptospirose Canina**. Rio de Janeiro: UCB, 2006. 27 p. Monografia – Curso de Especialização “Lato Sensu” em Clínica Médica em Pequenos Animais, Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso, **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – 8. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010.

BRENNER DJ, KAUFMANN AF, SULZER KR, STEIGERWALT AG, ROGERS FC, WEYANT RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 49, p. 839-858, 1999.

CARTER, G. R. **Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária**. São Paulo, Ed. Roca, p. 249, 1988.

CULLEN, P. A., XU, X., MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., KO, A. I., HAAKE, D. A., ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp, **Infection and Immunity**, v. 73(8), p. 4853-4863, 2005.

EDELWEISS, E. L. Leptospirosis humanas (contribuição ao seu estudo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina de Porto Alegre RS. **(Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Porto Alegre RS)**, 1962.

ELLINGHAUSEN, H. C. JR., MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80, **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 45-51, 1965.

ELLIS, W.A. et al. Possible involvement of leptospire in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. **Veterinary Record**, v.26, p.291-293, 1983.

ELLIS, W.A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive Veterinary Medicine**, v.2, p.411-421, 1984.

ELLIS, W.A.; O'BRIEN, J.J.; CASSELLS, J.A. ; NEILL, S.D.; HANNA, J. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo following calving or abortion. **Research Veterinary Science**, v. 39, p. 296-298, 1985.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., PEROLAT, P. ***Leptospira and Leptospirosis***. MedSci, Melbourne, Austrália, 2nd Ed., 2000.

FREITAS JC, SILVA FG, OLIVEIRA RC, DELBEM ACB, MULLER EE, ALVES LA, TELES PS. Isolation of leptospira spp from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciência Rural**, v. 34, p. 853-856, 2004.

FÜHNER F. Über die Bedutung der Mitreaktionen artverschiedener Leptospire nantigene bei der Auswertung serologischer Leptospiroseergebnisse für Klinik un Praxis. **Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie**, v.108,p. 278, 1950.

GANOZA CA, MATTHIAS MA, COLLINS-RICHARDS D, BROUWER KC, CUNNINGHAM CB, SEGURA ER, GILMAN RH, GOTUZZO E, VINETZ JM. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. **PLoS Med** , v. 3. p. 308, 2006.

HEER, S. et al. *Leptospira interrogans* serovar pomona associated with abortion in cattle: isolation methods and laboratory animal histopathology. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.49, p.57-62, 1982.

HOLT, S. C. Anatomy and chemistry of spirochetes. **Microbiological Reviews**. v. 42, p. 114-160, 1978

HUSSAINI, S. N.; RUBY, K. R. Comparative studies on the use of 5-fluorouracil in two different media as a selective agent for isolation of leptospira. **Research in Veterinary Science**., v. 20, p 148-50, 1976.

INADA, R.; IDO, Y; HOKI, R; KANERO, R; ITO,H. The etiology, mode of infection and specific therapy of weil's disease (spirochetosis icterohaemorrhagica). **The Journal of Experimental Medicine** , v. 23, p.377-402, 1916.

JOHNSON, R. C. & FAINE, S. GENUS I. *Leptospira* Noguchi 1917, 755AL, In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, **Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt**. Baltimore: **Williams & Wilkins**, vol. 1, p. 62-67, 1984.

JOHNSON, R. C., HARRIS, V. G. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospirae I. Growth at Low Temperatures, **Journal of Bacteriology**, v. 94(1), p. 27-31, 1967.

JOHNSON, R. C., AND P. ROGERS. b. Metabolism of leptospirae. I. Utilization of amino acids and purine and pyrimidine bases, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 107, p. 459-470, 1964.

KO A. I, GOARANT C., PICARDEAU M. *Leptospira*: The Dawn of The Molecular Genetics era for an Emerging Zoonotic Pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 736-747, 2009

KO A.I., GALVÃO M., RIBEIRO D. C. M., JOHNSON W. D., RILEY L.W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet. Infectious Disease**, v. 354, p. 820-825, 1999.

LEVETT P.N., Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 417-418, 1999.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p. 296–326, 2001.

LEVETT, P. N., MOREY R. E., et al. Reclassification of *Leptospira parva* Hovind-Hougen et al., 1982 as *Turneriella parva* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55: p. 1497-1499, 2005.

LILENBAUM, W., MORAIS, Z.M., GONÇALES, A.P., SOUZA, G.O., RICHTZENHAIN, L. & VASCONCELLOS, S.A.. First isolation of leptospirae from dairy goats in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v.38, p. 507-510, 2007.

MATHIAS, M. A., RICHARDS, D. C., BROWER, K. C., CUNNINGHAM. C. B.; SEGURA, E. R., GILMAN, R. H., GOTUZZO, E., VINETZ, J. M., Determining risk for severe leptospirosis molecular analysis of environmental surface water for pathogenic leptospira. **Plos medicine**, v. 3, p.1329-1340, 2006.

MATTHIAS, M.A., RICALDI, J.N., CESPEDES, M., DIAZ, M.M., GALLOWAY, R.L., SAITO, M., STEIGERWALT, A.G., PATRA, K.P., ORE, C.V., GOTUZZO, E., GILMAN, R.H., LEVETT, P.N. & VINETZ, J.M.. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* Species reservoir in the Peruvian Amazon. **PLoS Neglect. Trop. Dis.** v. 2 (4), p. 213, 2008.

McBRIDE, A.J., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., KO, A.I. Leptospirosis, **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18(5), p. 376-86, 2005.

MEITES E., JAY M. T., DERESINSKI S., SHIEH W. J., ZAKI S. R., TOMPKINS L., SMITH D.S. Reemerging leptospirosis, California. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10(3), p.406-12, 2004.

MINISTERIO DA SAÚDE ; Manual de controle da Leptospirose, **Brasil, Ministério da Saúde. Centro de Documentação**, p. 7-10, 1989.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; Portal da Saúde, Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm/>, acessado em janeiro /2011.

NALLY, J.E.; FISHBEIN, M.C.; BLANCO, D.; LOVETT, M. Lethal Infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 7014-17, 2005.

NASCIMENTO, A.L.T.O. et. al. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186 (7), p. 2164-2172, 2004.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS; Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals. **Disponível em** <http://www.oie.int/>, acessado em dezembro /2010.

PEROLAT, P.; CHAPPEL, R. J.; ADLER, B.; BARANTON, G.; BULACH, D. M.; BILLINGHURST, M. J.; LETOCART, M.; MERIEN, F.; SERRANO, M. S. *Leptospira fanei* sp nov. isolated from pigs in Austrália. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 48, p.851- 858, 1998.

RAGHAVAN P. U. M.; SUBBUPOONGOTHAI R.;YUNG-FU, C. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis, **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, p. 284-292, 2007.

RITTENBERG M. B., LINSKOTT W. D.,BALLI M. G. Simple Method For Separating Leptospirae From Contaminating Microorganisms, v. 76, p. 669-670, 1958.

RODRIGUES A. M. A., VASCONCELLOS S. A., MORAES Z. M., Hagiwara M. K., Isolamento de *Leptospira* spp. de cães com diagnóstico clínico de leptospirose em São Paulo (Brasil). **Acta Scientiae Veterinariae**. .v. 35, p. 705-706, 2007.

SAKATA, E. E., YASUDA, P. H., ROMERO, E. C., SILVA, M. V., LOMAR, A. V. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 34, p. 217-221, 1992.

SCHÖNBERG, A. Studies on the effect of antibiotic substances on Leptospiras and their cultivation from material with a high bacterial count. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Abt. 1. Originale A. Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie**, v.249, p.400-406, 1981.

SMIBERT, R. M. The Spirochaetales. **CRC handbook of microbiology**, 2nd ed, vol. 1. CRC Press, Cleveland, Ohio. *Tropica*, v. 105, p. 176-180, 2008.

SPICHLER, A.S., VILAC, P.J., ATHANAZIO, D.A., ALBURQUERQUE, J.O.M., BUZZAR, M., CASTRO, B., SEGURO, A., VINETZ, J. Predictors of lethality in severe leptospirosis in Urban Brazil, **The American Journal Tropical Medicine Hygiene**. v. 79, p. 911–914, 2008.

THIERMANN, A.B. Isolation of leptospire in diagnosis of leptospirosis. **Modern Veterinary Practice**, v.5, n.10, p.758- 759, 1984.

TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K.; CULLEN, P.; HAAKE, D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water, **International Microbiology**, v. 7(1), p. 35-40, 2004.

TURNER, L.H. Leptospirosis I, **Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, p. 842-855, 1967.

TURNER, L.H. Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.64, p.623-46,1970.

VASCONCELLOS, S. A. et al. Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology** , v.32, p.298-300, 2001.

VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose animal. **Encontro Nacional Em Leptospirose, Rio de Janeiro, Anais. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Nacional de Saúde**, p. 62-65, 1993.

VIJAYACHARI, P., SUGUNAN, AP, SHRIRAM, A. N. J. Leptospirosis: an emerging global public health problem, **Bioscience.**, v. 33(4), p. 557-69, 2008 .

VINETZ J. M., Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 527-538, 2001.

WALCH-SORGDRAGER, B. - Leptospiroses. **Bull. Hlth. Org. L. o. N.**,v. 8, p. 143-386, 1939.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – ILS. **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control.**, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leptospirosis worldwide. **Weekly epidemiological record**, v. 74, p. 237–242, 1999.

YASUDA, P. H., STEIGRWALT, A. G., SULZER, K. R., KAUFMANN, A. F., ROGERS, F., BRENNER, D. J., Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New Leptospira Species, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 37, p. 407-415, 1987.

ZUERNER, R. Laboratory maintenance of pathogenic Leptospira, **Current Protocols in Microbiology**, cap. 12E.1.1–12E.1.13., 2005.

