

## Revisão sobre as principais técnicas de diagnóstico de leptospirose

### Review o the main techniques of diagnostic of leptospirosis

DOI:10.34119/bjhrv4n4-068

Recebimento dos originais: 14/06/2021

Aceitação para publicação: 14/07/2021

#### **Luan Daniel Silva Ferreira**

Mestrando em Genética e Biologia Molecular, pela Universidade Federal do Pará -  
UFPA

End.: Est. Macaracuera, Cond. Quinta dos Paricás, BL 151, apto 303 – CEP 66815-140  
Belém - Pará - Brasil

E-mail: luan.ferreirabio@gmail.com

#### **Bruno Pantoja Gadelha**

Pós-graduando em Microbiologia e Imunologia, pela Escola Superior da Amazônia –  
ESAMAZ

End: Rua Alameda Curuçá, Estrela, N° 1035 – CEP 68743-210  
Castanhal – Pará

E-mail: brunopgadelha@gmail.com

#### **Analice Ramos Fernandes**

Pós-graduanda em Microbiologia e Imunologia, pela Escola Superior da Amazônia –  
ESAMAZ

End: Rua Elísio de Abreu, Castanhal, N° 10 – CEP 65278-000  
Turiaçu – Maranhão

E-mail: analiceramosfernandes@outlook.com

#### **Priscila Cerdeira Coelho de Sousa**

Pós-graduanda em Microbiologia e Imunologia, pela Escola Superior da Amazônia –  
ESAMAZ

End: Av. XV de novembro, Marituba, N° 500 – CEP 68470-000

E-mail: priscilacerdeira36@gmail.com

#### **Erlane Paiva Russo**

Pós-graduanda em Microbiologia e Imunologia, pela Escola Superior da Amazônia –  
ESAMAZ

End: Rua Marechal Deodoro da Fonseca, São Judas Tadeu, N° 604 – CEP 68690-000  
Acará – Pará

E-mail: erlane\_russo@outlook.com

#### **Laura Cristina Correa Costa**

Pós-graduanda em Microbiologia e Imunologia, pela Escola Superior da Amazônia –  
ESAMAZ

End: Conjunto Cidade Nova 5, WE 24, N° 722 – CEP 67133-070  
Ananindeua – Pará

E-mail: laurabiouepa@gmail.com

## RESUMO

A leptospirose é uma doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem, de curso agudo a crônico que afeta diversas espécies de animais domésticos e silvestres, assumindo considerável importância econômica e de saúde pública. O estudo foi realizado através de uma revisão da literatura, onde foram selecionados trabalhos que possuíam alguma relação com as técnicas de diagnóstico da leptospirose. A técnica SAM, considera que as reações cruzadas e dados epidemiológicos são fundamentais para um diagnóstico efetivo, e sua especificidade é inversamente proporcional ao tempo decorrido de infecção. A técnica ELISA para detecção de anticorpos anti-leptospira é muito sensível, mas pouco específico para o diagnóstico do sorovar, permite a detecção da doença a partir da 1ª semana até um a dois meses após infecção. A técnica de microscopia de campo escuro é baseada na morfologia e motilidade das leptospirosas, possui a capacidade de isolar os sorovares e identificá-los, sua desvantagem é baseada na observação que necessita ser feita logo após a coleta. A técnica de imunoperoxidase indireta, tem sido usada para o diagnóstico em órgãos de animais infectados. A técnica de *PCR* permite analisar fluidos corporais, além dos órgãos e tecidos, apresenta uma alta sensibilidade, especificidade, agilidade na execução e baixo custo, sua desvantagem é a incapacidade de detecção do sorovar. Por fim, são necessários mais estudos com o intuito de desenvolver técnicas de consigam integrar a sensibilidade, a especificidade, a rapidez, o custo e a eficiência na identificação da leptospirose.

**Palavras-Chave:** Infecção, Importância, Detecção.

## ABSTRACT

Leptospirosis is a disease or infection naturally transmissible between vertebrate animals and man, from acute to chronic course that affects several species of domestic and wild animals, assuming considerable economic and public health importance. The study was carried out through a literature review, in which studies were selected that had some relationship with the techniques of diagnosis of leptospirosis. The SAM technique considers that cross reactions and epidemiological data are essential for an effective diagnosis, and their specificity is inversely proportional to the elapsed time of infection. The ELISA technique for detecting anti-leptospira antibodies is very sensitive, but not very specific for the diagnosis of serovar, it allows the detection of the disease from the 1st week to one to two months after infection. The dark field microscopy technique is based on the morphology and motility of the leptospires, it has the ability to isolate the serovars and identify them, its disadvantage is based on the observation that needs to be made right after the collection. The indirect immunoperoxidase technique has been used for the diagnosis of infected animal organs. The PCR technique allows the analysis of body fluids, in addition to organs and tissues, has a high sensitivity, specificity, agility in execution and low cost, its disadvantage is the inability to detect the serovar. Finally, further studies are needed in order to develop techniques to be able to integrate sensitivity, specificity, speed, cost and efficiency in the identification of leptospirosis.

**Keywords:** Infection, Importance, Detection.

## 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem (COLEMEN, 2000), de curso agudo a crônico que afeta diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem, assumindo considerável importância como problema econômico e de saúde pública (FAINE *et al.*, 1999).

A leptospirose foi descrita pela primeira vez em 1880, no Cairo, por Larrey, no entanto foi em 1886 que Weil descreveu minuciosamente, quatro casos clínicos em humanos (CALDAS, 1987; BRASIL, 1995). Essas espiroquetas são da ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira sp.* (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Sua estrutura possui cilindro protoplasmático helicoidal, com diâmetro delgado (0,1µm) e comprimento de 6 a 20 µm, móvel, aeróbios estritos e apresentam uma ou ambas as extremidades encurvadas ou em forma de gancho (QUINN *et al.*, 2005; LEVETT *et al.*, 2010). Movimentam-se através de rotações e flexões ao longo de seu próprio eixo.

Para crescimento e multiplicação é necessário temperaturas que variam de 28 a 30°C e pH 7,2 a 7,6 (FAINE *et al.*, 1999). Sensíveis a dessecação, desinfetantes, incidência de luz solar direta, pH ácido menor que 6,8 ou básico maior que 8,0 e temperaturas inferiores a 10° C ou superiores a 50° C. Conseguem sobreviver bem na água e em cultura por longos períodos (TRUEBA *et al.*, 2004).

As leptospirosas estão classificadas em 19 genótipos, sendo 14 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans* (senso estrito), *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffi* e *L. mayottensis*, com mais de 260 sorovares. As espécies saprófitas incluem *L. biflexa* (senso estrito), *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii*, com mais de 60 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

As leptospirosas penetram de forma ativa no organismo através das mucosas e pele lesada ou íntegra, devido sua motilidade e morfologia, invadindo a circulação (ADLER, 2015; ELLIS, 2015). Nos rins elas encontram ambiente que confere proteção contra sistema imune do hospedeiro (MCBRIDE *et al.*, 2005), são excretadas pela urina, contaminando todo o ambiente (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020), podem ser eliminadas pelo fluido vaginal (LILENBAUM *et al.*, 2008). Dessa forma a transmissão pode se dar por contato direto com a urina de animal portador, ou água, solo e fômites contaminados (PICARDEAU, 2013).

A leptospirose distribui-se pelo globo terrestre, mas sua ocorrência é maior em países de clima tropical e subtropical devido à maior sobrevivência das leptospiros em ambientes quentes e úmidos. A doença é sazonal, com picos epidêmicos no verão ou outono em regiões de clima temperado, ou durante as estações de chuva nas regiões quentes. Em alguns países como o Brasil a infecção ocorre sob a forma de surtos em seres humanos e animais associados a períodos de alta pluviosidade, presença de roedores e mamíferos silvestres e domésticos bem como águas represadas com altas concentrações de animais (PLANK; DEAN, 2000; BRASIL, 2007).

A atenção para a leptospirose foi ampliada a partir da primeira guerra mundial, devido à forte incidência entre os beligerantes. Hoje, pode-se dizer que a leptospirose está espalhada por toda parte, acometendo bovinos, ovinos, caprinos, suínos, cães, gatos, coelhos e animais silvestres. Nos EUA, já foi considerada como a quarta doença dos bovinos, na escala de importância, causando, prejuízos superiores a 200 milhões de dólares em mortalidade, perdas de carne, de leite e de crias (FERREIRA, 1976).

A leptospirose apresenta-se usualmente sob a forma endêmica e sua morbidade é bastante alta em todos os países em que tem sido estudada, porém, os sorovares variam de região para região. A manutenção do agente na natureza está assegurada pelos portadores domésticos e silvestres (CORREA; CORREA, 1991). Os fatores climáticos, incluindo índice pluviométrico, temperatura e umidade relativa do ar, influenciam de maneira decisiva na ocorrência da doença (BRASIL, 1995).

Investigações epidemiológicas têm indicado que as leptospiros persistem em nichos naturais, circulando em hospedeiros primários, roedores selvagens, a partir dos quais alcançam outras populações de animais sinantrópicos e ou domésticos, sendo estes os hospedeiros secundários. Neste sentido, altas concentrações de animais domésticos, associadas a modificações introduzidas no ecossistema, pode resultar na criação de amplas cadeias infecciosas que contribuem para a dispersão da leptospiros no ambiente (CÔRTEZ, 1993).

A leptospirose em humanos pode variar desde uma infecção subclínica, apresentando febre normalmente bifásica, cefaleia, mialgia, vômitos, dores abdominais e diarreia até desenvolver uma forma icterícia, sendo esta mais severa (FAINE *et al.*, 1999; GEBRIEL *et al.*, 2006).

Em bovinos, a doença afeta o trato reprodutivo, causando sequelas crônicas, como aborto, nascimento de filhotes debilitados, partos prematuros, retenção de placenta e metrites, infertilidade, inclusive de touros, e esterilidade (ELLIS, 1994; LEMOS;

ALMEIDA, 2005). Outro sintoma importante em bovinos é a agalaxia, caracterizada pela redução na produção de leite conhecida pela síndrome da queda da produção de leite (ELLIS, 1983).

Nos suínos, a leptospirose se caracteriza por aborto no terço final de gestação, repetição de cio, mumificação fetal, natimortalidade, nascimento de leitões fracos, baixo número de leitões, descarga vulvar e morte embrionária (ELLIS, 1989). Sinais clínicos como anorexia, perturbação de equilíbrio, hemoglobinúria, convulsões, transtornos gastrointestinais, paralisia progressiva, queda de produção de leite e perda de peso também são observadas em suínos domésticos (FAINE *et al.*, 1999).

Em equinos, normalmente apresenta febre, acompanhada de anorexia, icterícia nefrite e complicações oculares. Em sua forma subclínica ela pode determinar casos de aborto, nascimento de animais prematuros e debilitados (FAINE *et al.*, 1999; HONG *et al.*, 1993). Em artiodactilos e perissodactilos silvestres portadores da *Leptospira sp.* foram relatados quadros clínicos caracterizados por aborto, nascimento de filhotes debilitados e baixos índices de fertilidade, sendo que em perissodactilos também foram observados transtornos oculares (MIRANDA, 2008).

Sob essa óptica, o estudo tem por finalidade fornecer dados sobre os diagnósticos existentes na atualidade para o diagnóstico da doença leptospirose, consultando e explorando trabalhos publicados, com intuito de reunir informação sobre as mais variadas técnicas, suas metodologias, vantagens e desvantagens.

## 2 METODOLOGIA

O estudo foi realizado através de uma revisão da literatura, onde foram selecionados, trabalhos (artigos, monografias, dissertações, teses, estudos de casos e etc.) que tiveram alguma relação com as técnicas de diagnóstico da doença leptospirose. Foram utilizados diferentes bancos de dados para a buscar e download dos trabalhos, entre eles: Scielo, Google Acadêmico, NCBI e PubMed.

Primeiramente, os trabalhos foram escolhidos conforme a leitura do seu título e resumo, todos relativos ao tema proposto. O critério inclusivo foi a abordagem de técnicas usadas para detecção e diagnóstico da doença leptospirose em humanos e animais. Trabalhos na língua portuguesa e inglesa compuseram o acervo, o qual foi montado no período de maio de 2021 a agosto de 2021.

### 3 DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico da leptospirose é confirmado por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção de anticorpos, na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético da bactéria na urina ou nos tecidos (SANTA ROSA, 1970; FAINE *et al.*, 1999).

#### 3.1 SAM – SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA

A soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos é a mais utilizada em todo o mundo (FAINE *et al.*, 1999). A técnica consiste principalmente na reação entre anticorpos presentes no soro contra os antígenos encontrados na superfície da leptospira (LEVETT, 2001). Reações cruzadas entre sorovares, títulos vacinais e o início da fase aguda da enfermidade são fatores importantes na interpretação dos resultados laboratoriais, sendo assim os testes sorológicos devem ser realizados levando em consideração dados epidemiológicos, bem como as informações obtidas na anamnese e no exame físico (BOLIN, 1996).

Entre as técnicas de diagnóstico baseadas na detecção de anticorpos, a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) é o método de referência preconizado pela Organização Mundial de Saúde (SANTA ROSA, 1970; FAINE *et al.*, 1999). Para a sua realização é necessária uma infraestrutura mínima e pessoal qualificado (SMITH *et al.*, 1994). Esse teste é baseado na reação entre antígenos de natureza lipopolissacarídica.

A SAM é um teste sorogrupo específico e a sua interpretação é complexa devido às reações cruzadas que acontecem entre sorogrupos distintos, principalmente na fase aguda da doença (FAINE, 1994; RENTKO; CLARK; ROSS, 1992). A especificidade da SAM é alta, entretanto este teste pode apresentar algumas limitações: a sensibilidade declina à medida que aumenta o tempo decorrido da infecção, não diferencia títulos de animais vacinados e não vacinados, há variabilidade interlaboratorial, podem ocorrer reações cruzadas entre sorovares e algumas infecções latentes podem não ser identificadas (WILLIAM; BERNARD, 1995).

A soroaglutinação macroscópica em placa pode ser utilizada como triagem inicial por ser de rápida e fácil execução, pois utiliza suspensões de leptospiras formolizadas. Entretanto, a técnica baseia-se na detecção de Imunoglobulina M(IgM) e não da Imunoglobulina G(IgG), predominantes em bovinos com infecção crônica, apresentando assim resultados insatisfatórios (SANTA ROSA, 1970; FAINE, 1982).

### 3.2 ELISA

O diagnóstico sorológico pelo teste de ELISA (Ensaio de Imuno Absorção Enzimática) também tem sido utilizado, apresentando como vantagens a utilização apenas de frações bacterianas, não necessitando do antígeno vivo e a possibilidade de detectar especificamente anticorpos da classe IgM ou IgG, podendo assim, correlacionar os resultados com o tempo de infecção (YAN *et al.*, 1999). As leptospirosas são detectadas na urina e órgãos por provas de interação entre antígenos e anticorpos marcados por imunofluorescência e imunoperoxidase (BASKERVILE, 1986).

O ELISA para detecção de anticorpos antileptospira é muito sensível, mas pouco específico para o diagnóstico do sorovar. Permite a detecção da doença a partir da 1ª semana até um a dois meses após infecção (BRASIL, 2005). Os anticorpos IgM são detectados após a primeira semana de infecção, e os IgG após o início da segunda semana pós-infecção e persistem por longos períodos de tempo. Portanto, animais com leptospirose aguda têm altos títulos de IgM e IgG relativamente baixos. E animais vacinados ou que tiveram infecções anteriores tem altos títulos de IgG. Em bovinos, o principal papel do ELISA seria a identificação de IgM para identificação de infecções recentes e para o rastreamento de rebanhos em regiões onde a vacinação para leptospirose não é praticada (OIE, 2006).

### 3.3 IMUNOPEROXIDASE INDIRETA

A técnica de imunoperoxidase indireta, utilizando soro hiperimune com anticorpos contra sorovares de leptospirosas, tem sido usada para o diagnóstico em órgãos de animais infectados (SCANZIANI *et al.*, 1991). A técnica possibilita a localização de leptospirosas em cortes histológicos e a visualização simultânea do agente e das lesões microscópicas (SCANZIANI *et al.*, 1991; FAINE *et al.*, 1999). Entretanto, tem como inconvenientes a necessidade da integridade da estrutura e antigenicidade da leptospira que pode ser facilmente alterada durante a estocagem e o processamento da amostra (SCANZIANI *et al.*, 1991).

### 3.4 MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO

A visualização direta de leptospirosas em microscópio de campo escuro tem sido utilizada principalmente em amostras de urina durante a fase de leptospiurúria, pode ser utilizado também em tecidos ou conteúdo gástrico de fetos abortados. Este exame, quando realizado imediatamente após a colheita da urina aumenta as chances de um resultado



positivo, uma vez que o diagnóstico é baseado na morfologia e motilidade das leptospiras. Este teste apresenta como principais limitações, baixa sensibilidade, necessidade de observador experiente para diferenciar leptospiras de artefatos presentes nas amostras e a eliminação intermitente de leptospiras pela urina (SANTA ROSA, 1970; THIERMAN, 1984).

O isolamento de leptospiras permite o diagnóstico definitivo da leptospirose e a identificação do sorovar infectante, dado este importante para orientar ações destinadas ao controle e profilaxia da doença (VASCONCELLOS, 1987; FAINE *et al.*, 1999). As leptospiras têm sido isoladas principalmente em amostras de urina, rim, útero e produtos de abortamento de bovinos (ELLIS *et al.* 1982).

As técnicas de isolamento são demoradas e laboriosas, sendo restritas a poucos laboratórios que tenham infectórios adequados para manutenção de animais que poderão passar a eliminar leptospiras patogênicas na urina. O rápido processamento das amostras, a utilização de meios de transporte e de meios de cultura que atendam às exigências nutricionais das leptospiras, o uso de antibióticos seletivos para controle de bactérias e a técnica de diluições seriadas aumentam as chances de isolamento em cultivos (THIERMANN, 1984), encontrados na superfície das leptospiras e os respectivos anticorpos (BALDWIN; ATKINS, 1987).

### 3.5 PCR

Entre as técnicas de diagnóstico baseadas na detecção do DNA das leptospiras, a reação em cadeia de polimerase (*PCR*) vem sendo utilizada de forma crescente para o diagnóstico da leptospirose em fluidos orgânicos e órgãos de várias espécies animais (HEINEMANN *et al.*, 1999). A reação em cadeia pela polimerase (*PCR*) vem sendo utilizada de forma crescente para o diagnóstico precoce da leptospirose no homem e em várias espécies animais.

A técnica da *PCR* apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo amplificar quantidades mínimas do DNA do microrganismo em diversos tipos de amostras biológicas tais como humor aquoso (MÉRIEN *et al.*, 1993), urina (BAL *et al.*, 1994), soro sanguíneo (BROWN *et al.*, 1995), líquido (ROMERO *et al.*, 1998) e tecidos (BROWN *et al.*, 2003). O método consiste na amplificação exponencial '*in vitro*' de regiões específicas de DNA em um curto espaço de tempo. Cada ciclo consiste de três fases: 1) desnaturação das fitas de DNA; 2) anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores específicos ao DNA molde; 3) síntese do DNA específico utilizando a enzima Taq DNA



polimerase. As moléculas amplificadas pela técnica da PCR são facilmente detectadas e identificadas pela eletroforese (BÉLAK; BALLAGIPORDÁNY, 1993).

Atualmente, estão disponíveis grande número de técnicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial de rotina para leptospirose, porém nenhuma associa as exigências de sensibilidade, especificidade e praticidade (LEVETT, 2001). Excetuando os custos iniciais para a aquisição de equipamentos, a técnica de PCR é específica, sensível, rápida e de baixo custo para o diagnóstico da leptospirose (HEINEMANN, 1999). No entanto, apresenta como limitações, a incapacidade de identificar o sorovar infectante. Enquanto isto não é significativo para o paciente individualmente, a identificação do sorovar tem valor epidemiológico e de saúde pública (LEVETT, 2004).

A sensibilidade da *PCR* pode variar de acordo com a escolha dos pares de oligonucleotídeos iniciadores (primer), padronização dos reagentes empregados na técnica, seleção do material biológico, forma de conservação e tempo de estocagem da amostra, uma vez que o DNA pode facilmente sofrer degradação (VELOSO *et al.*, 2000).

#### 4 CONCLUSÃO

Com base no que foi analisado no presente estudo, apesar de ter vários meios de diagnóstico da leptospirose, tanto em humanos, como em animais, existem algumas vantagens e limitações para cada técnica analisada.

No caso da SAM, apesar de ser um dos métodos, em suma mais simples que os demais, as reações cruzadas e dados epidemiológicos são fundamentais para um diagnóstico efetivo, e sua especificidade é inversamente proporcional ao tempo decorrido de infecção.

Quando analisado o teste ELISA, sua vantagem é a utilização de frações bacterianas e fazer uma correlacionar com o tempo de infecção. A desvantagem é a não especificidade dos tipos sorovares. Já a técnica de imunoperoxidase indireta consegue identificar sorovares de leptospiras, no entanto, como a amostra é de base histológica, a integridade da estrutura pode ser alterada durante a estocagem, prejudicando o diagnóstico.

A técnica de microscopia de campo escuro é baseada na morfologia e motilidade das leptospiras, possui a capacidade de isolar os sorovares e identificá-los. A desvantagem se dá pelo fato que, a observação necessita ser feita logo após a coleta, e sua diferenciação no meio dos artefatos se torna trabalhosa.

A técnica de PCR é a que mais se destaca, pois permite analisar fluidos corporais, além dos órgãos e tecidos, apresenta uma alta sensibilidade, especificidade, agilidade na execução e baixo custo. A sua desvantagem é a incapacidade de detecção do sorovar.

Essas principais técnicas utilizadas para o diagnóstico da leptospirose possuem vantagens e desvantagens que as tornam eficazes em determinadas situações de aplicabilidade. Portanto, são necessários mais estudos com o intuito de desenvolver técnicas de consigam integrar a sensibilidade, a especificidade, a rapidez, o custo e a eficiência na identificação da leptospirose, facilitando o diagnóstico e contribuindo para medidas de tratamento mais efetivas.

### **AGRADECIMENTOS**

A Escola Superior da Amazônia – ESAMAZ –, pelo suporte técnico.

## REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. **Leptospira and leptospirosis**. Amsterdam: Veterinary Microbiology, v. 140, n. 3- 4, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B. **History of leptospirosis and leptospira**. Current Topics in Microbiology and Immunology, Amsterdã, v. 387, p. 79-84, 2015.
- BAL, A. E. *et al.* **Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis**. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 32, n. 8, p. 1894–1898, 1994.
- BALDWIN, C. J.; ATKINS, C. E. **Leptospirosis in the dog**. Compêndio Continuado de Educação e Prática Veterinária, v. 9, n. 5, p.499-508, 1987.
- BASKERVILE, A. **Histopathological aspects of diagnosis of leptospirosis**. In: Ellis, W. A.; LITTLE, T. W. A. The present state of leptospirosis diagnosis and control. Neorthern Ireland, p. 33-53, 1986.
- BELAK, S.; BALLAGI-PORDANY, A. **Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic**. Veterinary Research Communications, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 55-72, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. Ministério da Saúde, ed. 6, Brasília, p. 816, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: Ministério da saúde. Serie A normas e manuais técnicos, ed. 6, p. 816, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de leptospirose**. Brasília: p. 98, 1995.
- BOLIN, C. A. **Diagnosis of leptospirosis: A reemerging diseases of companion animals**. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.
- BROWN, P. D. *et al.* **Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples**. Research in Microbiology, Amsterdam, v. 154, n. 4, p. 581-586, 2003.
- BROWN, P. D. *et al.* **Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis**. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 43, n. 2, p. 110-114, 1995.
- CALDAS, E. M. **Sessão sobre leptospirose**. Hiléia Médica, v. 8, n. 1, p.42-43, 1987.
- COLEMAN, T. J. **The public health laboratory service (PHLS) and its role in the control of zoonotic disease**. Acta Tropica, n. 76, p. 71-75, 2000.

CORREA, R. P.; CORREA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: Varela, p. 823, 1991.

CÔRTEZ, J. A. **Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Varela, p. 227, 1993.

ELLIS, W. A. **Animal leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology, Tokyo, v. 387, n. 1, p. 99-137, 2015.

ELLIS, W. A. **Leptospirosis as a cause of reproductive failure**. Vet. Clin. North Am. Food Anim Prac. ed. 10, p. 463-478, 1994.

ELLIS, W. A. **Recent developments in bovine Leptospirosis**. Veterinary annual. Bristol. ed. 23, p. 91-95, 1983.

ELLIS, W. A. *et al.* **Bovine leptospirosis: Microbiological and serological findings in aborted fetuses**. Veterinary Record, v. 110, p. 147-150, 1982.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. ed. 2, Melbourne, Austrália: Medicine Science, p. 272, 1999.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World health, Organization, p. 171, 1982.

FERREIRA. A. J. **Leptospire**: In: Doenças infecto-contagiosas dos animias domésticos. Fundação Calauste gulbenkian, Lisboa, p. 829, 1976.

GEBRIEL, A. M.; SUBRAMANIAM, G.; SEKARAN, S. D. **The detection and characterization of pathogenic Leptospira and the use of OMPs as potential antigens and immunogens**. Trop. Biomed. ed. 23, p. 194-207, 2006.

HEINEMANN, M. B.; *et al.* **Detection of leptospire in bovine semen by polimerase chain reaction**. Australian Veterinary Journal, v. 77, n. 1, 1999.

HONG, C. B. *et al.* **Equine abortion and stillbirth in central Kentuckey during 1985 and 1989 following seasons**. Vet. Diagn. Invest. ed. 5, p. 560-566, 1993.

LEMOS, R. A. A.; ALMEIDA, A. P. M. G. **Leptospire bovina**. In: LEMOS, R. A. A. Leptospire bovina, campilobacteriose genital bovina, tricomonose bovina, neosporose em bovines. Campo Grande, MS: ed. UFMS. 2005.

LEVETT, P. N.; HAAKE, D. A. **Leptospira species (leptospirosis)**. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010.

LEVETT. P.N. **Leptospirosis: A forgotten zoonosis?**. Clinical and Applied Immunology Reviews, Chicago, v. 4, n. 6, p. 435-448, 2004.

LEVETT, P. N. **Leptospirosis**. *Clinical Microbiology Veterinary*, v. 14, p. 296-326, 2001.

LILENBAUM, W. *et al.* **Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil**. *Res. Vet. Sci.* v. 84, n. 1, p. 14–21, 2008.

LOUREIRO, A. P., LILENBAUM, W. **Genital bovine leptospirosis: a new look for an old disease**. *Theriogenology*. v. 141, p. 41–47, 2020.

MCBRIDE, A. *et al.* **Leptospirosis**. *Current Opinion Infectious Diseases*, v. 18, n. 1, p. 376 386, 2005.

MÉRIEN, F. *et al.* **Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples**. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MIRANDA, F. R. **Pesquisa de anticorpo para bactéria do gênero *Brucella* spp, *Leptospira* spp, *Clamydophila* spp em tamanduás-bandeira (*Mymecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758), da RPPN SESC Pantanal, Parque Nacional da Serra da Canastra, Parque Nacional das Emas**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, p. 116, 2008.

OIE. World organisation for animal health. **Leptospirosis**. 2006

PICARDEAU, M. **Diagnosis and epidemiology of leptospirosis**. *Médecine et Maladies Infectieuses*, Paris, n. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

QUINN, P. J. *et al.* **Espiroquetas**. In: QUINN, P. J. *et al.* *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, Cap. 31. p. 179-188, 2005.

RENTKO, V. T.; CLARK, N.; ROSS, L. A. **Canine leptospirosis**. A retrospective study of 17 cases. *Journal Veterinary International Medical*, ed. 6, p. 235-244, 1992.

ROMERO, E.C.; *et al.* **Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR**. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 36, n. 5, p. 1453-1455, 1998.

SANTA ROSA, C. A. **Diagnóstico laboratorial das leptospiroses**. *Revista Microbiologia*, v.1, n. 2, p. 97-109, 1970.

SCANZIANI, E. *et al.* **Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs**. *Rev. Vet. Sci.*, v. 50, p. 229-232, 1991.

SMYTH, C. R. *et al.* **A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle**. *Australian Veterinary Journal*, v. 71, n. 9, 1994.

THIERMANN, A. B. **Isolation of leptospires in diagnosis of leptospirosis.** Modern Veterinary Practice, ed. 5, p. 758-759, 1984.

TRUEBA, G. *et al.* **Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water.** Rockville Pike: International Microbiology. n. 7, p. 35- 40, 2004.

VASCONCELLOS, S. A. **O papel dos reservatórios na manutenção da Leptospirose na natureza.** Comum. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo, v. 11, n. 1, p. 17-24, 1987.

VELOSO, I. F. *et al.* **A comparison of three DNA extractive procedure with *Leptospira* for Polymerase Chain Reaction Analysis.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 339-343, 2000.

WILLIAM, V.; BERNARD, D. V. M. **Leptospirosis.** Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, ed. 9, p. 435-443, 1995.

YAN, K. T. *et al.* **Development of Elisa to detect antibody to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle.** Veterinary Microbiology. v. 69, p. 173-187, 1999.