

**Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz**

**Curso de especialização
Vigilância Laboratorial em Saúde Pública**

Gabriela Manzi Moraes

MEIOS DE CULTURA PARA *Leptospira*: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**São Paulo
2020**

Gabriela Manzi Moraes

MEIOS DE CULTURA PARA *Leptospira*: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de Conclusão de Curso de especialização apresentado ao Instituto Adolfo Lutz – Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP-Doutor Antônio Guilherme de Souza como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Orientadora: Roberta Morozetti Blanco

**São Paulo
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-
SP

Moraes, Gabriela

Meios de cultura para *Leptospira*: uma revisão bibliográfica/
Gabriela Moraes – São Paulo, 2020.

39 f. il

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância
Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São
Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Bacteriologia em Saúde Pública

Orientação: Prof. Mestre. Roberta Blanco

1 Leptospirose; 2 *Leptospira*; 3 Meios de cultura

SES/CEFOR/IAL-68/2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ednéia e Pedro, ao meu irmão e outros familiares por todo suporte, carinho e alegria ao longo desta jornada. Pelos momentos que demonstraram preocupação e interesse na área em que escolhi.

Agradeço a minha orientadora, Roberta, por toda a orientação, paciência, ensinamentos e oportunidades que me ofereceu durante a especialização.

À minha companheira de laboratório, Cecilia, por todas as risadas, histórias e desabafos. Muito obrigada por toda sua ajuda.

Aos colegas da especialização, por sempre alegrarem meus dias. Não consigo imaginar como seriam meus dias sem vocês.

Agradeço a Juliana Pinhata pela correção deste trabalho. Suas sugestões enriqueceram o conteúdo apresentado nesta revisão.

Aos pesquisadores e funcionários do Centro de Bacteriologia, muito obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos e risadas.

Aos meus amigos, obrigada pelo suporte e por estarem sempre presentes na minha vida.

Ao Instituto Adolfo Lutz, por fornecer estrutura e oportunidades para uma formação de qualidade.

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose reemergente de relevância mundial. É considerada uma doença tropical negligenciada causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* spp., englobando 250 sorovares agrupados em 25 sorogrupos. A doença apresenta duas fases distintas que podem ser diagnosticadas a partir de testes microbiológicos, moleculares e sorológicos. A técnica de isolamento da bactéria por meio de cultura é capaz de identificar *Leptospira* spp. em ambas as fases da doença, constituindo um dos melhores métodos para diagnóstico. O isolamento bacteriano é de extrema importância epidemiológica, permitindo investigar e rastrear surtos, epidemias e cepas circulantes em determinadas áreas geográficas, além de colaborar com a possível elaboração de vacinas efetivas. Entretanto, é uma técnica com baixa sensibilidade, principalmente devido às altas taxas de crescimento de microrganismos contaminantes. O presente estudo tem como objetivo revisar os meios de cultura utilizados para *Leptospira* spp. Neste contexto, foi realizada uma revisão bibliográfica a partir das bases de dados LILACS, PubMed, MEDLINE e SciELO. Ao todo foram encontrados 2005 estudos a partir dos descritores utilizados nos bancos de dados, entretanto apenas 32 artigos foram inclusos nesta revisão. Grande parte dos estudos indicam que vitamina B1, vitamina B12 e ácidos graxos de cadeia longa são os nutrientes necessários para o crescimento de leptospiros. O 5-fluorouracil é o antimicrobiano mais utilizado para isolamento, podendo ser combinado com diferentes antibióticos. Além disso, existe uma vasta quantidade de metodologias diferentes para a preservação das cepas, porém nenhuma garante viabilidade total das bactérias por longos períodos. Embora ainda não padronizados, os testes de sensibilidade e os novos meios de cultura para leptospiros se demonstram promissores. Por fim, devido à grande importância da execução da cultura e as dificuldades encontradas para sua produção, mais estudos devem ser realizados sobre o tema.

Palavras-chave: leptospirose; leptospira; meios de cultura.

ABSTRACT

Leptospirosis is a reemerging zoonosis of worldwide relevance. It is considered a neglected tropical disease caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira* spp., containing 250 serovars grouped in 25 serogroups. The disease has two distinct phases that can be diagnosed by microbiological, molecular and serological tests. The technique of bacterial isolation by culture is able to identify *Leptospira* spp. in both stages of the disease, constituting one of the best methods for diagnosis. Bacterial isolation is of extreme epidemiological importance, allowing the investigation and tracking of outbreaks, epidemics and circulating strains in certain geographical areas, in addition to collaborating with the possible elaboration of effective vaccines. However, it is a technique with low sensitivity, mostly due to the high growth rates of contaminating microorganisms. The present study aimed to review the culture media used for *Leptospira* spp. In this context, a literature review was performed from the LILACS, PubMed, MEDLINE and SciELO databases. In all, 2005 studies were found from the descriptors used in the databases, however only 32 articles were included in this review. Most studies indicate that vitamin B1, vitamin B12 and long chain fatty acids are the necessary nutrients for leptospires growth. 5-fluorouracil is the most widely used antimicrobial agent for isolation and can be combined with different antibiotics. In addition, there are a wide range of different methodologies for the preservation of strains, but none of them guarantee full viability of the bacteria for long periods. Although not yet standardized, susceptibility testing and new culture media for leptospires are promising. Finally, due to the great importance of culture execution and the difficulties encountered in its production, more studies should be conducted.

Keywords: leptospirosis; leptospira; media leptospira.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluxograma representando o processo de seleção dos estudos incluídos na discussão.....	22
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AST – Aminotransferase

BSA – Albumina de soro bovino

CAAT – Teste de Aglutinação com Absorção Cruzada

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute

CO₂ – Dióxido de Carbono

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMJH – Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

LILACS – Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências de Saúde

LVW – Ágar Vanaporn Wuthiekaun

MAT – Teste de Aglutinação Microscópica

MLST – Tipagem Multilocus de Sequência

MH – Mueller-Hinton

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial de Hidrogênio

PES – Plano Estadual de Saúde

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis

SciELO – Scientific Electronic Library Online

SPHS – Síndrome de Hemorragia Pulmonar Associada à Leptospirose

STAFF – Sulfametoxazol, Trimetoprim, Anfotericina B, Fosfomicina e 5-fluorouracil

VNTR – Tipagem número variável de repetições em tandem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Justificativa no Plano Estadual de Saúde (PES).....	9
2. OBJETIVOS.....	10
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3.1. Leptospirose.....	11
3.2. Morfologia e biologia de leptospiras.....	12
3.3. Classificação e taxonomia	13
3.4. Sinais e sintomas clínicos.....	13
3.5. Epidemiologia	15
3.6. Tratamento e prevenção.....	16
3.7. Diagnóstico laboratorial.....	17
4. METODOLOGIA	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. Substâncias ou nutrientes necessários para crescimento de leptospiras.....	23
5.2. Meios seletivos com adição de antimicrobianos.....	26
5.3. Meios para preservação de leptospiras.....	28
5.4. Meios utilizados em testes de sensibilidade.....	30
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose reemergente de relevância mundial devido a sua ampla distribuição global. A doença é considerada como uma zoonose tropical negligenciada (ROQUEPLO et al., 2019; WHO, 2019).

As bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* spp. são as causadoras da leptospirose, sendo capazes de infectar mais de um milhão de indivíduos mundialmente e causar em torno de 60 mil mortes por ano (COSTA et al., 2015).

A técnica de isolamento da bactéria por meio de cultura é capaz de identificá-la em ambas as fases da doença, constituindo um dos melhores métodos para diagnóstico. O isolamento de *Leptospira* spp. é de extrema importância epidemiológica, permitindo investigar e rastrear surtos, epidemias e microrganismos circulantes em determinadas áreas geográficas, além de colaborar com a possível implementação de vacinas efetivas (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; BRASIL, 2005; PINHATA; BLANCO; ROMERO, 2018).

Entretanto, o isolamento de *Leptospira* spp. é um processo demorado e difícil, pois requer meios de cultura específicos, além de possuir baixa sensibilidade devido à lenta taxa de crescimento da bactéria, o que favorece a ocorrência de contaminação por outros microrganismos (LOUREIRO et al., 2015; MARINOVA-PETKOVA et al., 2019; OLIVEIRA, 2016; WHO, 2003).

Os meios de cultura disponíveis atualmente apresentam a grande desvantagem de permitir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes de crescimento rápido que podem interferir com o correto isolamento de leptospirosas. Diante disso, houve um aumento no número de estudos sobre possíveis alterações que podem ser realizadas nos meios de cultura para *Leptospira* spp. (MIRAGLIA et al., 2009; PINHATA; BLANCO; ROMERO, 2018; SAITO et al., 2015).

1.1. Justificativa no Plano Estadual de Saúde (PES)

O isolamento de leptospirosas é essencial para confirmação dos casos e para o monitoramento da leptospirose, porém a cultura apresenta baixa sensibilidade. Como não há na literatura científica, até o momento, uma revisão sobre esse tema, o objetivo do trabalho de TCC será realizar uma revisão bibliográfica dos meios de cultura para isolamento e manutenção de leptospirosas.

2. OBJETIVOS

O estudo tem como objetivo geral revisar os meios de cultura utilizados para bactérias do gênero *Leptospira* spp. Além disso, o trabalho apresenta dois objetivos específicos: descrever os principais métodos utilizados para isolamento, preservação e teste de sensibilidade para leptospiros a partir de meios de cultura e identificar os nutrientes e substâncias adicionados nos meios de cultura que possibilitam o isolamento ideal destes microrganismos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Leptospirose

A leptospirose foi descrita pela primeira vez por Adolf Weil no ano de 1886 e apresenta como sinonímia os termos Síndrome de Weil, febre dos pântanos, febre dos arrozais e tifo canino. Entretanto, atualmente apenas o termo leptospirose é utilizado. Esta doença acomete regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BRASIL, 2005; BUNNELL et al., 2000; HUTTNER et al., 2002; VIEIRA, 2012).

As populações mais vulneráveis são as que vivem em regiões rurais e algumas regiões urbanas de países em desenvolvimento de clima tropical, devido à falta ou precário saneamento básico e elevada frequência de alagamentos por causa de constantes chuvas. Nas regiões rurais, os casos estão, em sua maioria, relacionados a atividades ocupacionais (SANTOS, 2015).

Entretanto, outras atividades ocupacionais como jardineiros, médicos veterinários, plantadores de cana de açúcar e pecuaristas também podem expor os trabalhadores a ambientes contaminados. Atualmente, devido a práticas esportivas aquáticas, ecoturismo e viagens, a leptospirose está apresentando um novo padrão epidemiológico (MARINOVA-PETKOVA et al., 2019; PEREIRA et al., 2019).

O principal meio para adquirir a infecção é através do contato direto com animais infectados através de feridas ou mucosas ou pelo contato indireto por meio de água, solo ou lama contaminados com urina de seres com a doença. A bactéria também pode infectar através da pele íntegra, quando em contato por longos períodos em água contaminada. Os principais reservatórios da bactéria são animais silvestres, domésticos e sinantrópicos, como os roedores, bovinos, suínos e cães (BRASIL, 2014; BUNNELL et al., 2000). Apesar da baixa frequência, existem relatos de infecção a partir de tecidos, sangue e órgãos contaminados, transmissão acidental em laboratório e por ingestão de água e alimentos contaminados (BRASIL, 2005).

Após a penetração, as bactérias entram na corrente sanguínea e podem se difundir por todos os tecidos do animal através de quimiotaxia. As principais regiões acometidas são fígado, rim, coração, músculo esquelético, meninges e olhos. O período de incubação varia de algumas horas até cerca de 30 dias, sendo que a média é entre 7 a 14 dias (BRASIL, 2014; OLIVEIRA, 2016; VIEIRA, 2012).

Os animais reservatórios são capazes de transmitir a bactéria pela urina por longos períodos. O ser humano é hospedeiro acidental e pode desenvolver a leptospirose (SANTOS, 2015; WHO, 2003). Os principais reservatórios urbanos são os roedores sinantrópicos, como o rato preto (*Rattus rattus*), camundongo (*Mus Musculus*) e o rato de esgoto (*R. norvegicus*). Alguns animais reservatórios podem ser os principais portadores de sorovares específicos, como é o caso do rato de esgoto, que é o principal portador do sorovar Icterohaemorrhagiae, o mais prevalente no Brasil. São raros os casos de transmissão entre humanos (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014; BUNNELL et al., 2000; VIEIRA, 2012).

3.2. Morfologia e biologia de leptospiras

L. interrogans é uma espiroqueta extracelular de crescimento lento, possui extremidades em forma de gancho e características morfológicas de bactérias gram-negativas. Além de ser aeróbica obrigatória, possui grande motilidade devido aos seus dois endoflagelos envelopados localizados na região posterior, apresentando uma rápida movimentação por rotação. Sua morfologia e movimentação facilitam a penetração nos tecidos animais (BRASIL, 2005; OLIVEIRA, 2016; SLAMTI et al., 2011; VIEIRA, 2012).

O ciclo de vida natural da bactéria depende da colonização de túbulos renais proximais de um animal vertebrado, ocorrendo a eliminação das espiroquetas vivas pela urina deste hospedeiro no ambiente (BUNNELL et al., 2000; HAAKE, 2000).

A partir de adaptações evolutivas a condições ambientais e do hospedeiro, a bactéria adquiriu elevado grau de variação antigênica e se mantém viva em ambientes úmidos e quentes por até 180 dias devido a formação de biofilmes. O microrganismo possui a capacidade de infectar uma grande variedade de mamíferos (BRASIL, 2005; HAAKE, 2000; VALENCIA, 2014; WIDIYANTI et al., 2019).

As leptospiras não patogênicas são facilmente eliminadas do corpo através de fagocitose e ativação do sistema complemento. Já as leptospiras patogênicas possuem diversos mecanismos de invasão, disseminação e permanência no corpo do hospedeiro, como hemolisinas e adesão a diversos tipos de células (BRASIL, 2005; VALENCIA, 2014).

A bactéria apresenta diversos fatores de virulência, como as proteínas Loa22, heme oxigenase, FliY (proteína chave do motor flagelar) e os lipossacarídeos. Os

lipopolissacarídeos presentes na camada externa de *Leptospira* spp. apresentam características similares de bactérias gram-negativas e possuem toxicidade relativamente baixa para células e animais (VIEIRA, 2012; VALENCIA, 2014).

O paciente apresenta imunidade sorovar específica após a infecção, sendo possível o humano adquirir a doença novamente através de outros sorovares (BRASIL, 2005).

3.3. Classificação e taxonomia

De acordo com a classificação molecular, realizada a partir do sequenciamento do 16S rRNA, o gênero *Leptospira* é dividido em espécies patogênicas (*L. alexanderi*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kmetyi*, *L. alstonii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri* e *L. noguchii*) e espécies não patogênicas (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. vanthielii*, *L. wolbachii* e *L. terpstrae*). Além disso, há cinco espécies classificadas como intermediárias (*L. licerasiae*, *L. wolffii*, *L. fainei*, *L. inadai* e *L. broomii*) (LEVETT, 2015; ROQUEPLO et al., 2019).

Entretanto, a classificação mais utilizada na prática clínica é a sorológica. Seguindo a classificação sorológica, o gênero *Leptospira* spp. é dividido em duas espécies. A primeira espécie é *L. interrogans*, que compreende as leptospirosas patogênicas englobando 250 sorovares agrupados em 25 sorogrupos. Já a segunda espécie é a *L. biflexa*, representando as leptospirosas saprófitas, contendo cerca de 60 sorovares (VALENCIA, 2014; POLACHINI; FUJIMORI, 2015).

Os principais sorovares causadores de doenças em humanos são Canicola, Pomona, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, sendo as duas últimas frequentemente relacionadas aos casos mais graves (BRASIL, 2005; HUTTNER et al., 2002; WIDIYANTI et al., 2019).

3.4. Sinais e sintomas clínicos

Os hospedeiros infectados podem desenvolver quadros clínicos leves, moderados e graves. Em bovinos, a leptospirose pode desencadear abortos, infertilidade e perdas perinatais, representando uma alta taxa de perda econômica, sendo os sorovares Icterohaemorrhagiae, Pomona e Hardjo os mais frequentemente encontrados. Em relação aos cães, estes também apresentam quadros clínicos

diversos, como perda de peso e insuficiência renal aguda, e estão entre os hospedeiros preferenciais para o sorovar Canicola (POLACHINI; FUJIMORI, 2015; REPISO et al., 2005; ZARANTONELLI et al., 2018).

A doença em humanos apresenta sinais e sintomas clínicos distintos entre os indivíduos infectados, possuindo diversos graus de severidade. A infecção pode ser assintomática ou desencadear quadros clínicos leves, moderados ou graves (BRASIL, 2005).

Quando infectados, os humanos apresentam uma síndrome febril não específica que é clinicamente difícil de ser distinguida de outras doenças, como dengue, malária, toxoplasmose e hepatite viral. Conseqüentemente, a doença pode ser uma importante causa de doença febril não diagnosticada devido ao difícil diagnóstico laboratorial da doença (BUNNELL et al., 2000; TORGERSON, et al., 2015; WHO, 2019).

Clinicamente, a leptospirose é diferenciada nas formas anictérica e ictérica. A forma anictérica apresenta quadros clínicos leves, moderados ou graves, sendo responsável por cerca de 90 a 95% dos casos. Entretanto, devido à precária notificação e confirmação dos casos, apenas 45% destes casos são oficiais. Esta forma pode ser iniciada de forma branda, na qual o paciente apresenta febre, cefaléia, náuseas, dores musculares e vômito. A leptospirose pode ser curada em poucos dias sem ocasionar sequelas (BRASIL, 2005).

Em casos mais graves, a forma anictérica é caracterizada por duas fases distintas. A primeira fase é chamada de septicêmica, leptospirêmica ou leptospiremia, onde pode também ocorrer febre súbita elevada, calafrios, cefaléia, dor ocular, fotofobia, diarreia, alucinações e hepatomegalia, sendo raro ocorrer hemorragia digestiva, esplenomegalia e pancreatite. Esta fase pode durar de 4 a 7 dias, e, após este período, o paciente pode evoluir para cura ou desenvolver sintomas ainda mais severos (BRASIL, 2005; HUTTNER et al., 2002; VIEIRA, 2012).

A fase seguinte é denominada de fase imune. Inicia-se normalmente na segunda semana da doença e possui como característica o surgimento de anticorpos IgM que formam imunocomplexos circulantes que podem causar graves alterações neurológicas, como meningite e cefaléia. Em raros casos, o paciente pode desenvolver encefalite, paralisias focais, síndrome de Guillain-Barré, paralisia de nervos cranianos, distúrbios neurológicos, alterações cardíacas, oculares, renais

e cutâneas. A duração desta fase e suas manifestações clínicas são bastante variáveis (BRASIL, 2005; HUTTNER et al., 2002).

Pacientes que apresentam uma fase septicêmica extremamente grave podem desenvolver a forma ictérica, causando alterações hepáticas, renais, cardíacas, pulmonares, neurológicas e fenômenos hemorrágicos. Estes sintomas podem desencadear a síndrome ou doença de Weil, caracterizada como a forma clássica da leptospirose grave. O paciente também pode apresentar hemorragia, insuficiência renal e falência de múltiplos órgãos de 4 a 9 dias após o aparecimento da icterícia. A doença pode ser fatal em cerca de 10 a 50% dos casos graves, mesmo com a utilização de recursos terapêuticos intensivos (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014; NABITY et al., 2018; PEREIRA et al., 2019). A forma ictérica, que é bastante intensa e característica nesta fase, inicia-se entre o terceiro e sétimo dia da doença e está associada à maior incidência de complicações, embora não seja a principal causa de óbito (BRASIL, 2005).

Além disso, a leptospirose está relacionada à síndrome de hemorragia pulmonar associada à leptospirose (SPHS). A síndrome pode causar altas taxas de letalidade, compreendendo de 50 a 74% dos casos, podendo substituir a doença de Weil como a principal causa de morte (SANTOS, 2015).

O período de convalescença da doença tem duração de 1 a 2 meses e a leptospiúria pode persistir por até diversos meses após o desaparecimento dos sintomas. Os níveis de anticorpos podem continuar elevados por muitos meses ou apresentar uma redução gradativamente ao longo do tempo (BRASIL, 2005).

São considerados como casos suspeitos de leptospirose os pacientes que apresentam febre, cefaléia e mialgia e possuem um ou mais dos critérios de suspeita, como exposição a enchentes, esgoto, lixo, residir em áreas de risco, realizar atividade ocupacional relacionada à coleta de lixo e de materiais recicláveis, manejo ou contato com animais, dentre outros (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014).

3.5. Epidemiologia

No Brasil, a leptospirose é uma doença de notificação compulsória (MAGALHÃES; ACOSTA, 2019; VIEIRA, 2012). No país, ocorrem cerca de 3 a 4 mil casos confirmados de leptospirose anualmente, resultando em torno de 400 óbitos. Durante o ano de 2018, ocorreram 3.069 casos confirmados de leptospirose no

Brasil, sendo as regiões sul e sudeste as mais afetadas, devido ao melhor diagnóstico e vigilância epidemiológica. Dentre estes casos, 279 (9%) pacientes evoluíram à óbito. No estado de São Paulo, foram confirmados 521 casos da doença no mesmo ano, com um total de 85 casos de óbitos, representando uma taxa de letalidade de 16,31% (CVE, 2019).

De acordo com Costa et al. (2015), estima-se que há 1,03 milhões de casos mundialmente e cerca de 60 mil mortes todos os anos. O aumento do número de surtos de leptospirose pode ser associado a desastres ambientais e eventos climáticos extremos em regiões endêmicas (MAGALHÃES; ACOSTA, 2019). Países da América Central, América do Sul, Ásia, Oceania e Caribe são os que apresentam maior quantidade de casos de leptospirose (SANTOS, 2015).

Na América Latina e em alguns países asiáticos, a leptospirose é uma grave doença de saúde pública, uma vez que, em casos severamente graves, o paciente necessita de intensos cuidados médicos, tratamento com antibióticos intravenosos e hospitalização por longo período (VIEIRA, 2012). No Brasil, entre o período de 1999 e 2003, cerca de 77% dos pacientes confirmados com leptospirose precisaram ser hospitalizados, sendo que a média da permanência de internação foi de sete dias. Portanto, a doença representa um problema econômico para a saúde devido ao alto custo hospitalar e a alta taxa de letalidade (BRASIL, 2005).

3.6. Tratamento e prevenção

Em relação à antibioticoterapia, os principais fármacos utilizados para tratamento na fase precoce são a amoxicilina e a doxiciclina administrados de 5 a 7 dias. Já para a fase tardia, são comumente utilizados medicamentos intravenosos, como a penicilina G cristalina, ampicilina, ceftriaxona ou cefotaxima, por um período de 7 a 10 dias. Dentre as principais drogas alternativas estão a azitromicina, claritromicina, tetraciclina e o cloranfenicol (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014). *L. interrogans* apresenta resistência à trimetoprim, sulfametoxazol, neomicina, rifampicina, polimixina B e sulfadimetoxina (ADLER et al., 1986; CHAKRABORTY et al., 2011; MIRAGLIA et al., 2013).

Para o tratamento de pacientes em estado grave, podem ser realizadas condutas terapêuticas de suporte, como reposição hidroeletrólítica, assistência cardiorrespiratória, transfusão de sangue e plasma fresco congelado, com a

intenção de evitar ou reduzir as complicações da doença (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014).

Segundo a OMS (2003), o tratamento deve ser iniciado antes do 7º dia da infecção, não devendo ser aguardada a confirmação laboratorial, pois esta intervenção medicamentosa pode promover maiores chances de sobrevivência ao paciente. Entretanto, devido à similaridade dos sintomas da leptospirose com os de outras doenças, além da demora no diagnóstico laboratorial, a antibioticoterapia é comumente iniciada após o período recomendado.

Atualmente, ainda não há disponível uma vacina para uso humano contra a leptospirose. A vacina para uso animal é denominada de bacterina e pode ser aplicada em cães, bovinos, suínos, dentre outros. Entretanto, pelo fato de a vacina ser sorovar específica, mesmo com a vacinação, os animais ainda podem transmitir sorovares que não estão presentes na vacina para outros mamíferos. A vacina é preparada de acordo com os sorovares circulantes da região para os diferentes animais (BRASIL, 2005; VALENCIA, 2014). Em estudo realizado por Yupiana et al. (2019), foi demonstrado que fazendeiros possuem maior risco de infecção por *Leptospira* spp. quando expostos à animais de gado não vacinados.

3.7. Diagnóstico laboratorial

A confirmação por exames laboratoriais é necessária para a obtenção do diagnóstico definitivo. O método laboratorial de escolha depende do quadro clínico em que se encontra o paciente e pode ser realizado a partir do sangue total, soro, urina, fragmentos teciduais do paciente ou líquido cefalorraquidiano (MARINOVA-PETKOVA et al., 2019; WHO, 2003).

Entre os exames laboratoriais estão hemograma, coagulograma, transaminase, bilirrubina, uréia, creatinina, raio X de tórax, eletrocardiograma, visualização de sedimentação e elementos anormais em urina (BRASIL, 2005).

Pacientes acometidos por leptospirose podem apresentar alterações hematológicas e bioquímicas, como anemia normocítica, anemia normocrômica, leucocitose com neutrofilia, elevação de bilirrubina total, níveis elevados de creatinina e ureia, baixos níveis de potássio, transaminase pouco elevada, elevado nível de aspartato aminotransferase (AST), acidose metabólica, hematúria e leucocitúria (BRASIL, 2005; PEREIRA et al., 2019).

Na fase leptospirêmica, os melhores métodos para diagnóstico são através da visualização de espiroquetas no sangue por exame direto e isolamento da bactéria em meio de cultura. Na fase imune, também pode-se observar leptospiras na urina por exame direto (BRASIL, 2005).

O método mais adequado para a visualização de *Leptospira* spp. é utilizando microscopia de campo escuro ou contraste de fase, uma vez que esta bactéria é dificilmente corada pela técnica de Gram. A técnica de impregnação por sais de prata auxilia na visualização de espiroquetas. A observação morfológica não diferencia entre espécies patogênicas e saprofíticas de *Leptospira* spp. e não determina os sorovares (SLAMTI et al., 2011; VIEIRA, 2012; WHO, 2003).

Os testes sorológicos são os mais utilizados para diagnóstico da leptospirose devido às dificuldades que os demais métodos apresentam. O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o método de referência recomendado pela OMS, sendo o mais utilizado para diagnóstico sorológico em casos suspeitos de leptospirose. Este método deve ser realizado a partir do soro sem hemólise do paciente. No entanto, o teste apresenta difícil interpretação e podem ocorrer reações cruzadas entre diferentes sorovares. Além disso, sua realização está restrita à laboratórios de referência (GAMAGE; FERNANDO, 2018; MARINOVA-PETKOVA et al., 2019; OLIVEIRA, 2016; WHO, 2003).

A confirmação do diagnóstico utilizando a técnica de MAT ocorre quando há um aumento de quatro ou mais vezes na titulação da segunda amostra de sangue coletada após intervalo de no mínimo 14 dias da primeira amostra. Entretanto, quando não é possível coletar mais de uma amostra do paciente, o diagnóstico pode ser confirmado caso amostra apresente título maior ou igual a 800 (BRASIL, 2014).

A técnica de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) é outro método de diagnóstico, sendo considerado como um teste de triagem, apresentando maior sensibilidade quando comparada ao MAT, porém possui menor especificidade na fase aguda (BRASIL, 2014; GAMAGE; FERNANDO, 2018).

Hoje em dia, também podem ser realizadas técnicas moleculares que auxiliam em uma rápida identificação de espécies patogênicas e sorovares de *Leptospira* spp. O genoma de *Leptospira* spp. é formado por dois cromossomos circulares de tamanhos diferentes. As espécies patogênicas possuem 656 genes que não estão presentes nas espécies saprofíticas (SANTOS, 2015).

Dentre os métodos moleculares, o mais utilizado é o teste de reação em cadeia da polimerase (PCR), podendo ser realizada desde o 1º até o 10º dia de infecção. Atualmente, já foram padronizadas metodologias utilizando tanto a PCR convencional como a PCR em tempo real (BRASIL, 2014; MARINOVA-PETKOVA et al., 2019; WHO, 2003).

Um dos métodos para a obtenção de leptospiras é o isolamento indireto pela inoculação de 0,5 a 1 mL de sangue do paciente em animais de laboratório. A taxa de sucesso depende da susceptibilidade dos animais utilizados e do sorovar e da patogenicidade da bactéria presente na amostra. Os animais mais utilizados são porcos jovens e hamsters sírios. Após o terceiro dia, fluído peritonial do animal é retirado e observado através de microscopia de campo escuro. Caso a presença da bactéria seja confirmada, é possível utilizar o sangue do animal para isolamento em cultura (WHO, 2003).

O isolamento de *Leptospira* spp. é realizado a partir de meios de cultura especializados, como os meios Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) e Fletcher, sendo o sangue o material clínico humano mais adequado. A bactéria necessita de temperatura em torno de 28 a 30°C e de pH de cerca de 7,2 a 7,6 (MARINOVA-PETKOVA et al., 2019; VIEIRA, 2012; WHO, 2003).

Segundo WHO (2003), o isolamento a partir de sangue deve ser realizado até os primeiros 10 dias da infecção e antes da administração de antibióticos. São inoculadas apenas algumas gotas do sangue do paciente em tubos contendo 5 mL em qualquer meio de cultura apropriado para crescimento de leptospiras. Os tubos devem ser incubados em estufa à 30°C e analisados por um período de até 4 meses.

Após o isolamento das leptospiras, pode ser realizado o teste sorológico de aglutinação microscópica com absorção cruzada (CAAT) para a identificação de novos sorovares. Entretanto, o método é demorado e restrito apenas a laboratórios de referência internacional, requerendo uma vasta coleção de cepas de referência de *Leptospira* spp. (MACHRY et al., 2010).

Atualmente, com o advento das técnicas moleculares, as espécies de *Leptospira* spp. e seus sorovares podem ser agrupados a partir das técnicas de tipagem de número variável de repetições em tandem (VNTR) e tipagem de sequências multilocus (MLST) que auxiliam na obtenção de informações

epidemiológicas e na investigação de surtos. Entretanto, tais técnicas ainda não possibilitam diferenciar os diversos sorovares existentes (SANTOS, 2015).

A técnica molecular de pulsed field gel electrophoresis (PFGE) é um método de extrema importância epidemiológica que permite comparar e analisar cepas bacterianas isoladas pertencentes a um mesmo surto ou isoladas de diferentes surtos em diversas regiões geográficas. O PFGE é caracterizado como um método relativamente rápido de ser realizado, em torno de uma semana, e apresenta fácil interpretação. Entretanto, devido à alta similaridade genética, esta técnica não tem capacidade de distinguir corretamente os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni (MACHRY et al., 2010; MIRAGLIA et al., 2013).

Apesar do método de isolamento de *Leptospira* spp. não ser muito utilizado para o diagnóstico, a realização do isolamento a partir de amostras clínicas humanas é fundamental na investigação e rastreamento de casos desde sua origem. A identificação da bactéria é de extrema importância para um melhor entendimento da epidemiologia da doença, analisando abordagens apropriadas para investigar a fonte de transmissão durante surtos, epidemias e até mesmo cepas circulantes em determinadas regiões. Também é essencial para a possível elaboração de uma vacina efetiva contendo antígenos específicos para determinados sorovares de *Leptospira* spp., além de ser importante para o estudo de sorovares utilizados na técnica de MAT, melhorando o diagnóstico através deste teste laboratorial (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; OLIVEIRA, 2016; PINHATA, BLANCO; ROMERO, 2018).

A preservação e manutenção de cepas bacterianas devem ser realizadas de maneira que garantam sua sobrevivência, estabilidade e pureza por longos períodos, conservando suas características morfológicas e genéticas. A preservação é de grande importância, permitindo a recuperação de microrganismos para propósitos diagnósticos e estudos científicos, epidemiológicos, comparativos, dentre outros. Para a preservação de leptospiros, diversas técnicas podem ser utilizadas, como nitrogênio líquido e meios de cultura semi-sólidos. Porém, estes métodos podem acarretar na diminuição da viabilidade da bactéria (COSTA et al., 2009; ZUERNER, 2005).

4. METODOLOGIA

A metodologia utilizada para o presente estudo foi a pesquisa de estudos previamente publicados em revistas da área da saúde, representando fontes confiáveis para consulta e relacionados à saúde pública. Os materiais consultados foram disponibilizados nos bancos de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO), PubMed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências de Saúde (LILACS) e MedLine em língua portuguesa, inglesa e espanhola. Os descritores da pesquisa utilizados foram: media leptospira, medium leptospira, growth leptospira, development media leptospira.

Foram utilizados como critérios de inclusão: ser artigo original, possuir trabalho em sua forma integral disponibilizado no banco de dados, ser artigo de revisão bibliográfica e apresentar título e resumo relacionados ao objetivo deste trabalho. Portanto, foram excluídos os estudos que apresentaram temática fora do contexto do presente trabalho e os artigos que se apresentaram repetidos nos diferentes bancos de dados. Não foi utilizado como critério de exclusão o ano das publicações, sendo aceito qualquer ano publicado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando-se os descritores mencionados, foram encontrados 2005 artigos nos bancos de dados do PubMed, SciELO, LILACS e MEDLINE. Ao todo, 1302 foram excluídos, pois o título apresentava tema fora do objetivo deste trabalho. Por não estarem disponibilizados por completo, 230 artigos foram excluídos.

Foram recuperados para avaliação do resumo 473 estudos, sendo que 324 apresentaram temática fora do contexto deste estudo. Dos 149 estudos restantes, 117 se encontraram em duplicata nos diferentes bancos de dados. Portanto, 32 artigos foram incluídos nesta revisão (Figura 1).

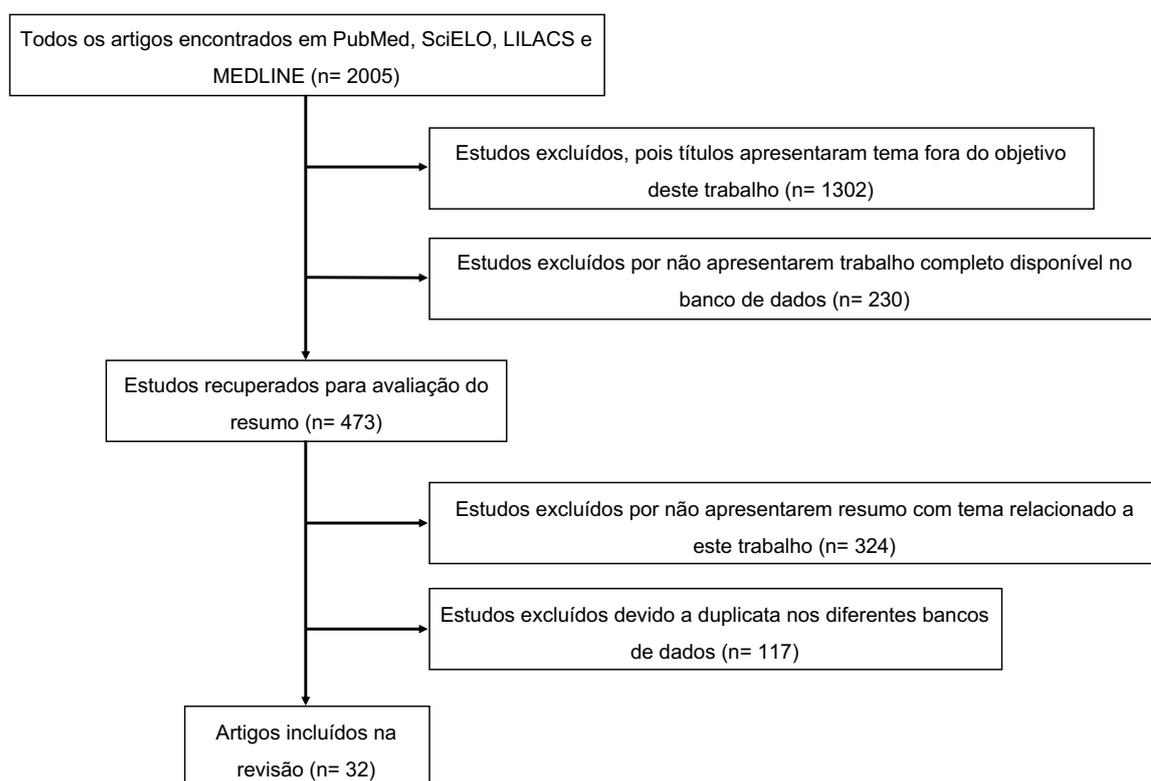


Figura 1 - Fluxograma demonstrando o processo de seleção dos artigos analisados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos. Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

Para melhor entendimento dos assuntos obtidos nos artigos estudados, os temas foram separados em: nutrientes ou substâncias que podem ser adicionados aos meios de cultura para crescimento de leptospiras, antimicrobianos que podem ser utilizados para evitar contaminantes, métodos e meios de cultura utilizados para preservação de leptospiras, meios de cultura para testes de sensibilidade e novos meios propostos para o cultivo de leptospiras.

5.1. Substâncias ou nutrientes necessários para crescimento de leptospiiras

Os meios tradicionais que podem ser utilizados para isolamento de leptospiiras são Noguchi, Korthof, Vervoort, Fletcher e Stuart. Esses meios contêm de 8 a 10% de soro de coelho como fonte de vitamina B12. No entanto, tais meios não são amplamente utilizados devido ao seu baixo conteúdo de moléculas orgânicas de nitrogênio, essenciais para o crescimento das leptospiiras (PHILIP; GARBA; NEELA, 2018; ZUERNER, 2005).

Outro meio também muito utilizado é o EMJH, composto por fosfato dissódico, fosfato monopotássico, cloreto de amônio, tiamina, albumina e Tween 80. O EMJH pode ser preparado com ou sem a adição de soro de coelho e antibióticos (PHILIP; GARBA; NEELA, 2018; ZUERNER, 2005).

Estes meios podem se apresentar como sólidos, semi-sólidos ou líquidos. Os meios semi-sólidos tendem a favorecer o crescimento estável de cepas patogênicas de *Leptospira* melhor do que culturas líquidas. Nos meios semi-sólidos, as bactérias formam uma densa zona de crescimento, comumente chamada de disco de Dinger, sendo que esta zona de crescimento pode se estender em direção ao fundo do tubo. Já em meios de cultura sólidos, as colônias se apresentam de cor branca e diâmetro de 1 a 2 mm, comumente se demonstrando incorporadas logo abaixo da superfície do ágar (ZUERNER, 2005).

Os nutrientes mais importantes e necessários para o crescimento de leptospiiras são vitamina B1, vitamina B12 e ácidos graxos de cadeia longa. Os ácidos graxos de cadeia longa são a principal fonte de carbono e energia. Por causa dos ácidos graxos livres no meio de cultura serem tóxicos para leptospiiras, são comumente adicionados soros, albumina sérica ou Tween 80 (GONZÁLEZ et al., 2006; PHILIP; GARBA; NEELA, 2018; BEY; JOHNSON, 1978; YANAGAWA; HIRAMUNE; AKAIKE, 1963). De acordo com Staneck, Henneberry e Cox (1973), adicionar Tween 80, acetato e glicerol pode auxiliar na diminuição do tempo de geração e facilitar a utilização de ácidos graxos pelas leptospiiras.

Segundo González et al. (2006), é importante adicionar superóxido dismutase ao meio, pois sua ausência faz com que a bactéria sofra um estresse oxidativo por acumulação de radicais superóxido formados durante a respiração aeróbia.

Rodríguez et al. (2002) avaliaram a influência de concentrações crescentes de Tween 80 no meio EMJH em relação ao crescimento e antigenicidade do sorovar

Mozdok. A concentração de Tween 80 a 3,25 mg/mL causou uma aceleração no metabolismo das leptospiros, aumentando a quantidade de biomassa bacteriana obtida, sem afetar a antigenicidade durante a realização de subcultivos sucessivos.

O sorogrupo Ballum agrupa cepas de crescimento fastidioso com requerimentos nutricionais mais exigentes que as outras cepas patogênicas de *Leptospira* spp. A incorporação de soro de coelho e de carneiro estimulou ligeiramente o crescimento de Ballum (GONZÁLEZ et al., 2006).

O sorovar Hardjo também apresenta necessidades nutricionais mais complexas. Foram realizadas três combinações utilizando o meio EMJH suplementado com piruvato de sódio, piruvato de sódio com enzima superóxido dismutase e piruvato de sódio com superóxido dismutase e soro fetal bovino. Estas suplementações possibilitaram o isolamento de leptospiros e a realização de uma rápida caracterização molecular do sorovar Hardjo (CHIDEROLI et al., 2017).

De acordo com Azuma et al. (1968), ácido micólico e seus derivados podem ser adicionados ao meio Korthof, pois podem substituir o soro de coelho em culturas para leptospiros patogênicos. Já Finn e Jones (1976) concluíram que substituir soro fetal de bezerro a 10% pelo complexo sérico de albumina-ácido oleico proporciona melhor crescimento e custo benefício no isolamento de leptospiros.

Dois autores sugerem a utilização de indicador para melhor visualização do crescimento da bactéria. Segundo Kirschner e Graham (1959), as leptospiros são organismos micro-aerofílicos, não apresentando crescimento em contato direto com o oxigênio e em ambiente com ausência de oxigênio. Por isso, as leptospiros apresentam crescimento um pouco abaixo da superfície do meio de cultura. Os autores utilizaram o indicador de oxidação-redução 2,6-diclorofenol indofenol para verificar a presença de anel de crescimento nos tubos. Uma grande vantagem da utilização do indicador obtida no estudo é a observação precoce de microrganismos contaminantes. Já Murray e Hospenthal (2004) utilizaram o indicador AlamarBlue para a visualização do crescimento de leptospiros ao realizar teste de sensibilidade por microdiluição.

Além dos meios de cultura já descritos, também podem ser utilizados meios com baixa ou nenhuma quantidade de proteínas. Estes demonstraram exibir excelentes propriedades para o crescimento de leptospiros e comumente apresentam polissorbatos, vitamina B1 e B12 e sais inorgânicos (PHILIP; GARBA; NEELA, 2018).

Segundo Bey e Johnson (1978), a produção de vacinas necessita de grandes volumes de meios de cultura e o componente mais utilizado nos meios para leptospiras é o soro ou albumina sérica que apresentam alto custo. Os autores propõem a realização de um meio de cultura com baixa quantidade de proteína, pois este apresenta método de esterilização mais fácil e menor custo. Além disso, a produção de leptospiras em um meio com baixa quantidade de proteínas auxilia na elaboração de vacinas e estudos fisiológicos das espiroquetas, uma vez que proteínas contidas no meio podem causar interferências. Outras vantagens do meio com baixo teor de proteína é a possibilidade da realização do meio com a adição de apenas 0,1% de BSA e o tempo de crescimento das *Leptospira* spp. ser o mesmo de quando crescidas em meio contendo proteína (BEY; JOHNSON, 1978).

A quantidade de biomassa obtida pelo meio EMJH é inapropriada para a produção em escala de vacina contendo células inteiras do sorogrupo Ballum (GONZÁLEZ et al., 2006).

Alguns autores propuseram a utilização de meios já utilizados para outras bactérias ou a elaboração de um novo meio de cultura específico para *Leptospira*.

Griffith et al. (2006) propuseram a utilização de meio de cultura BacT/ALERT MB, comumente utilizado para isolamento de micobactérias a partir do sangue de pacientes, pois é um meio disponibilizado em grande parte dos laboratórios clínicos.

As garrafas para hemocultura BacT/ALERT MB mantiveram leptospiras viáveis por até 2 semanas. Apesar do meio não conter ácidos graxos de cadeia longa, o glicerol utilizado demonstrou uma melhora no crescimento da bactéria. A utilização deste meio pode ser útil para casos suspeitos de leptospirose em laboratórios clínicos, pois o crescimento da bactéria no frasco de hemocultura pode ser mantido por tempo suficiente para ser enviado para um laboratório de referência (GRIFFITH et al., 2006).

Wuthiekanun e colaboradores (2013) desenvolveram um meio de cultura denominado de *Leptospira* Vanaporn Wuthiekanun Agar (ágar LVW) que permitiu o crescimento rápido, isolamento de colônias únicas e a realização com sucesso de teste simples de suscetibilidade antimicrobiana. Entre seus principais ingredientes, estão ágar-base Noble 1%, 10% de soro de coelho, base EMJH e piruvato de sódio. O meio requer uma incubação inicial a 30°C em CO₂ a 5% por dois dias, em seguida de incubação contínua a 30°C em estufa comum. O desenvolvimento do meio LVW

oferece oportunidades para rápido diagnóstico clínico e pesquisas na área (PHILIP; GARBA; NEELA, 2018; WUTHIEKANUN et al., 2013; WUTHIEKANUN et al., 2015).

5.2. Meios seletivos com adição de antimicrobianos

É de extrema importância a obtenção de culturas puras de leptospiras para o correto diagnóstico da leptospirose. Além disso, bactérias de crescimento rápido presentes na amostra como contaminantes podem inibir o crescimento de *L. interrogans*. Por isso, podem ser incluídos antibióticos nos meios de cultura para realização de isolamento e para testes de sensibilidade (MIRAGLIA et al., 2009).

A substância 5-fluorouracil é letal a diversos microrganismos, exceto à *Leptospira* spp. Entretanto, algumas cepas podem ter seu crescimento inibido pela substância, sendo aconselhável realizar o isolamento das cepas também em meios sem o 5-fluorouracil, paralelamente (MIRAGLIA et al., 2009).

Segundo os resultados obtidos através da pesquisa bibliográfica realizada neste trabalho, dois autores afirmam que apenas a utilização do antibiótico 5-fluorouracil é suficiente para a inibição de contaminantes, enquanto 9 autores recomendam a utilização do antimicrobiano em conjunto com algum outro.

Dhayabaran, Chidambaram e Krishnaswamy (2019) realizaram a inoculação de urina de pacientes infectados em meio Stuart modificado com 5-flourouracil. O meio desenvolvido apresentou anel de crescimento visível após 40 horas de incubação a 30°C e sem a presença de contaminantes.

Segundo Ris (1974), algum componente do meio Fletcher, possivelmente o extrato de carne bovina, pode ser capaz de anular a ação inibitória do 5-fluorouracil (400 ug/ml) em bactérias não pertencentes ao gênero *Leptospira*. Por causa disso, o autor sugere a utilização do meio Tween 80–albumina com adição de 5-fluorouracil (400 ug/mL), pois este se demonstrou mais eficaz, não causando efeitos negativos em leptospiras. Entretanto, em estudo realizado por Pinhata, Blanco e Romero (2018), foi observado que a utilização de 5-fluorouracil com concentração de 300 ug/mL em meio EMJH inibiu 20 sorovares diferentes de *Leptospira* spp.

Miraglia et al. (2009) utilizaram o meio EMJH modificado com 5-fluorouracil (300 mg/L) e ácido nalidíxico (20 mg/L) que se demonstrou eficiente para o isolamento de leptospiras em sêmen bovino.

Adler et al. (1986) utilizaram seis diferentes antibióticos (actidiona, bacitracina, 5-fluorouracil, neomicina, polimixina B e rifampicina) em meio EMJH líquido e semi-sólido para produzir um meio mais seletivo para isolamento primário de *Leptospira* sorovares Hadjo e Pomona a partir de material clínico. Os autores concluíram que os sorovares apresentam melhor crescimento em meio semi-sólido EMJH 0,1% ágar contendo antibióticos.

Segundo Myers e Varela-Díaz (1973), a incorporação de neomicina no meio de cultura mostrou-se eficaz ao inibir *Escherichia coli* sem interferir no crescimento de *Leptospira* sorotipo Autumnalis. Outros 12 sorotipos foram testados, sendo que nenhum foi afetado negativamente pela adição de 300 ug/mL de neomicina em meio EMJH ou 5 ug/mL em meio Fletcher. Além disso, foi possível descontaminar culturas presentes em meio contendo 5-fluorouracil ao realizar subculturas em outro meio contendo neomicina.

Myers (1975) realizou a adição de furazolidona e neomicina combinadas, nas concentrações de 5 ug/mL em meio Fletcher ou utilizando discos de sensibilidade de 50 ug para furazolidona e 10 ug para neomicina. A utilização de ambos os antibióticos foram eficazes na inibição de contaminantes e não interferiram no crescimento de leptospiros pertencentes a 66 sorotipos diferentes.

Oie et al. (1986) utilizaram 54 microrganismos contaminantes, sendo que a combinação de fosfomicina (400 ug/mL) e 5-fluorouracil (100 ug/mL) em meio Korthof inibiu 52 destes e não afetou negativamente sorovares de *Leptospira*. Além disso, esta combinação permitiu o crescimento do sorovar Copenhageni. Foi concluído que a combinação de fosfomicina com 5-fluorouracil é considerada útil para o isolamento seletivo da bactéria e o meio apresentou melhores resultados do que a utilização apenas de 5-fluorouracil no meio Korthof.

Pinhata, Blanco e Romero (2018) realizaram experimentos envolvendo os antimicrobianos anfotericina B, neomicina, furazolidona e 5-fluorouracil para verificar a eficácia destes isoladamente e em combinação para impedir o crescimento de contaminantes em culturas de leptospiros em meio EMJH. Os autores concluíram que a utilização de anfotericina B (500 ug/mL) isoladamente inibiu com sucesso o crescimento de fungos e outras bactérias contaminantes, porém inibiu também algumas leptospiros. Além disso, o 5-fluorouracil (100 ug/mL), a neomicina (4 ug/mL) e a furazolidona (4 ug/mL) utilizados isoladamente não foram capazes de inibir fungos, bacilos gram-negativos e bacilos gram-positivos com eficiência nas culturas

realizadas. Portanto, os autores recomendaram a utilização de neomicina (4ug/mL) com 5-fluorouracil (100 ug/mL) sendo esta combinação mais eficaz na prevenção de contaminantes, apesar da combinação não ter inibido o crescimento de alguns bacilos gram-negativos (PINHATA; BLANCO; ROMERO, 2018).

Também podem ser utilizados um conjunto de cinco antimicrobianos denominados de STAFF (sulfametoxazol, trimetoprim, anfotericina B, fosfomicina e 5-fluorouracil) para a obtenção de culturas puras de leptospiras. Três autores realizaram experimentos com este conjunto de antibióticos.

Chakraborty et al. (2011) utilizaram STAFF em meio Korthof para isolamento de leptospiras em amostras contaminadas. Os autores conseguiram inibir o crescimento de 16 contaminantes ambientais, porém ressaltam que mais estudos devem ser realizados para explorar a eficiência dos antimicrobianos.

Saito et al. (2015) realizaram um estudo com o meio Korthof semi-sólido com 0,1% ágar e meio líquido contendo STAFF para analisar o crescimento dos sorovares Pomona e Icterohaemorrhagiae. Foi concluído que os antimicrobianos impediram o crescimento de contaminantes, permitindo um aumento de 72% na taxa de isolamento do sorovar Icterohaemorrhagiae e bom crescimento do sorovar Pomona em meio semi-sólido de Korthof.

Loureiro et al. (2015) avaliou uso do meio EMJH com STAFF. Este método apresentou menor taxa de contaminação do que o meio sem antibióticos e foi uma ferramenta importante na recuperação de leptospiras de amostras de bovinos.

5.3. Meios para preservação de leptospiras

É essencial encontrar maneiras eficientes para manter e preservar por longos períodos as características e propriedades das leptospiras. Entretanto, tais métodos apresentam dificuldades e resultados diversos devido à natureza biológica da leptospira (PHILIP; GARBA; NEELA, 2018; ZUERNER, 2005).

Os métodos comuns de preservação são preservação em nitrogênio líquido, congelamento a -78°C ou -79°C e realização de subculturas. Porém, estes métodos apresentam alto custo, demandam bastante tempo e podem resultar em perda de virulência e viabilidade (ELLINGHAUSEN, 1973; PHILIP; GARBA; NEELA, 2018).

A conservação em nitrogênio líquido tem sido a metodologia mais utilizada atualmente. As bactérias podem ser preservadas por diversos meses utilizando

como agente crioprotetor o glicerol a 10% ou o dimetilsulfóxido a 2,5%. Entretanto, o nitrogênio líquido apresenta alto custo, sendo recomendado apenas para laboratórios de referência (PHILIP; GARBA; NEELA, 2018; SAMIR; WASFY, 2012; WUTHIEKANUN et al., 2014; ZUERNER, 2005).

Zuerner (2005) recomenda a utilização de nitrogênio líquido para a correta preservação de cepas de leptospiros. As amostras devem ser armazenadas em tubos criogênicos, sendo que os isolados devem ser mantidos em -70°C por 4 horas antes de serem transferidos para nitrogênio líquido, visando uma melhor viabilidade.

Também podem ser utilizadas como preservação de leptospiros as técnicas de congelamento a -78°C em recipiente contendo álcool a 95% por até 10 meses ou em meio Stuart contendo 7,5% de glicerol a -79°C em gelo seco por 27 meses. Foi observado que culturas de leptospiros acondicionadas em meio EMJH líquido por até 14 dias em estufa apresentou melhor preservação quando foram refrigeradas a -70°C por 20 meses (PHILIP; GARBA; NEELA, 2018).

Chakraborty et al. (2011) utilizou o glicerol a -80°C como método de preservação. Porém, segundo Philip, Garba e Neela (2018), esta metodologia não apresenta resultados satisfatórios a longo prazo devido a produção de cristais de gelo que podem causar a morte das bactérias. Além disso, o glicerol pode causar toxicidade às culturas de *Leptospira* (SAMIR; WASFY, 2012).

Em geral, os isolados de *Leptospira* são mantidos à temperatura ambiente em meio líquido ou semi-sólido, com transferência frequente a cada três a 12 semanas. A viabilidade dos isolados é então confirmada por microscopia de campo escuro. Este método de preservação é trabalhoso e apresenta alto risco de contaminação (WUTHIEKANUN et al., 2014; ZUERNER, 2005).

Em estudo realizado por Ellighausen (1973), todas as cepas preservadas em meio semi-sólido polissorbato se apresentaram viáveis por até 12 meses, sendo que leptospiros do sorovar Pomona se encontraram viáveis por até 52 meses.

Kirschner e Graham (1959) acondicionaram em geladeira cepas isoladas em meio sólido em tubos e estas não apresentaram alteração de viabilidade por até 6 meses.

Myers, Varela-Díaz e Siniuk (1973) realizaram uma comparação da sobrevivência de 28 sorotipos de leptospiros em meio Fletcher semi-sólido com 10% de soro de coelho e em meio Fletcher contendo 0,7% de ágar e 0,5% carvão animal quando acondicionados em temperatura ambiente e baixa luminosidade por até dois

anos. Um ano após a cultura, todos os sorotipos cultivados em meio de cultura com carvão apresentaram motilidade. Após 2 anos, 3 sorotipos não apresentaram crescimento e os isolados não apresentaram motilidade. Os autores concluíram que o carvão pode substituir a albumina bovina e auxilia na remoção de produtos tóxicos gerados pelo metabolismo bacteriano das leptospiros.

Em estudo realizado por Samir e Wasfy (2012), foram testados o meio líquido EMJH e sangue de ovelha como criopreservadores para longo armazenamento em temperatura a -70°C . As bactérias foram visualizadas em microscopia de campo escuro e se apresentaram móveis por até 20 meses. Os tubos contendo apenas EMJH apresentaram viabilidade satisfatória após 20 meses, enquanto os tubos contendo sangue de ovelha tiveram queda da viabilidade após 12 meses.

Philip, Garba e Neela (2018) e Wuthiekanun et al. (2014) recomendam a utilização do meio LVW ágar por ser um método simples de preservação de leptospiros, de baixo custo e com baixa necessidade de transferências periódicas quando comparado com os outros meios. Este meio garante um período de preservação de 12 meses e taxa de contaminação menor do que os outros métodos.

Segundo Wuthiekanun et al. (2014), a utilização do meio LVW em tubo entreaberto em temperatura ambiente foi eficaz para a preservação de 11 diferentes sorovares por até 12 meses. Os tubos semi-abertos foram verificados mensalmente a olho nu. Após 12 meses, todos os isolados foram analisados através de observação das colônias e microscopia de campo escuro, apresentando 100% de motilidade. Não houve alteração no volume total de ágar nos tubos, apenas foi observado que o meio de cultura se demonstrou seco.

5.4. Meios utilizados em testes de sensibilidade

Devido às leptospiros serem bactérias de crescimento lento e não serem capazes de crescer em meios de cultura comuns, há uma grande dificuldade em se realizar testes de sensibilidade aos antimicrobianos, não havendo um método padronizado e estabelecido nas normas do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (BOSS et al., 2019).

Os testes de sensibilidade podem ser realizados a partir de meio líquido ou semi-sólido modificado, porém são muito trabalhosos, necessitam de conhecimentos específicos e demandam muito tempo para sua realização (BOSS et al., 2019)

Evidências clínicas demonstram que as leptospiros apresentam sensibilidade a betalactâmicos, macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas, porém ainda há poucos estudos na área (BOSS et al., 2019).

Wuthiekanun et al. (2015) utilizaram o meio sólido LVW para desenvolver um teste com disco difusão para *Leptospira* spp. Foram testados isolados da espécie *L. interrogans* (sorovares Autumnalis, Bataviae, Canicola, ME danensis e Pyrogenes) e três isolados das espécies *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. weilli*. O teste foi realizado a partir da inoculação de 300 µL de cada isolado (10⁸ UFC/mL) na superfície do meio sólido LVW, sendo que as placas foram incubadas a 30°C em ambiente com 5% de CO₂ por 2 dias. Após este período, os discos foram aplicados no centro de uma única placa e as placas foram acondicionadas a 30°C por 7 dias.

Os resultados encontrados foram comparados com os protocolos padronizados pelo CLSI para Enterobactérias, devido à falta de padronização para leptospiros. Todas as cepas se apresentaram sem contaminação e com resistência total à fosfomicina, ácido nalidíxico, rifampicina e trimetoprim/sulfametoazol, indicando que estes antimicrobianos podem ser incorporados em meios de cultura para inibição de contaminantes em amostras ambientais e clínicas. O método de difusão em disco é fácil de executar e pode se tornar um teste de triagem útil inicial para a vigilância epidemiológica da resistência antimicrobiana (WUTHIEKANUN et al., 2015).

Boss et al. (2019) realizaram teste de sensibilidade por disco-difusão no meio LVW utilizando azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina e penicilina. As placas foram incubadas inicialmente a 30°C com 5% de CO₂ por 2 dias, seguida de incubação final por 5 dias a 30°C em estufa com CO₂. Os halos foram lidos após 8 dias de incubação. Todas as leptospiros apresentaram sensibilidade aos antibióticos apresentando halos maiores que 25 mm. Entretanto, os autores ressaltam que tiveram dificuldade de ler alguns diâmetros e, devido ao longo período de incubação, as zonas de inibição podem ter alterações em seu tamanho. Além disso, algumas amostras apresentaram contaminação por outros microrganismos.

Para a verificação da efetividade do meio LVW para teste de sensibilidade utilizando disco difusão, Wuthiekanun et al. (2016) realizaram estudo para controle de qualidade e avaliaram se este meio apresenta resultados similares aos testes de sensibilidade de disco difusão em ágar Mueller-Hinton (MH). Para isso, a partir das

normas e diretrizes do CLSI, avaliaram a zona de inibição de cepas padrão bacterianas das espécies *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. As zonas de inibição dos 22 antimicrobianos testados em ágar LVW se apresentaram significativamente parecidas com as zonas de inibição em ágar MH, exceto o antibiótico fosfomicina que apresentou divergências entre os dois meios de cultura.

Ainda assim, os autores ressaltam que tiveram que realizar uma alteração nas normas do CLSI em relação à temperatura que exige incubação a 35-37°C e o experimento foi realizado a 30°C. Além disso, os pesquisadores também alteraram o tempo de crescimento, sendo utilizado apenas 24 horas para as cepas padrão e de 2 a 5 dias para as leptospiros (WUTHIEKANUN et al., 2016).

Ainda utilizando o meio LVW, Wuthiekanun et al. (2013) conseguiram desenvolver o teste de sensibilidade Etest para 109 isolados das espécies *L. interrogans*, *L. kirschnerii* e *L. borgpetersenii*, a partir de incubação inicial a 30°C em CO₂ a 5% por 2 dias e incubação contínua a 30°C em estufa comum. Os resultados foram interpretados após 7 dias.

Murray e Hospenthal (2004) desenvolveram uma técnica de microdiluição usando o indicador de crescimento AlamarBlue, que demonstrou ser eficaz para outros microrganismos. Os autores testaram 12 diferentes sorovares de *Leptospira* spp. e seis antimicrobianos (penicilina G, doxiciclina, cloranfenicol, eritromicina, cefotaxima e ciprofloxacina) para realizar uma comparação entre os testes de microdiluição e macrodiluição realizados em meio EMJH. As placas foram incubadas a 30°C e, após o 3º dia, foi adicionado o indicador AlamarBlue, cuja coloração inicial é azul escura e se torna rosa na presença de microrganismos em crescimento. Após 2 dias da adição do indicador, o teste foi interpretado. Ambos os métodos produziram resultados semelhantes, sendo que a microdiluição permitiu realização da técnica mais rápida e simplificada.

Tanto Boss et al. (2019) quanto Murray e Hospenthal (2004) ressaltam a importância da criação de guias e manuais para interpretação de teste de sensibilidade para leptospiros.

6. CONCLUSÃO

Com este levantamento bibliográfico, foi possível compreender os diferentes estudos realizados sobre meios de cultura para leptospiros, incluindo os nutrientes necessários para o crescimento de leptospiros em geral e sorovares específicos. Os meios mais comuns e utilizados são Noguchi, Korthof, Vervoort, Fletcher e Stuart.

A grande dificuldade de encontrar meios de cultura com baixa quantidade de proteínas acaba dificultando a elaboração de vacinas humanas.

Diversos autores recomendam a utilização do antibiótico 5-fluorouracil combinado com outro antibiótico para inibir o crescimento de microrganismos oportunistas. Entretanto, ainda não há um consenso sobre quais antibióticos são os mais adequados e qual a concentração ideal que não inibe o crescimento de leptospiros.

Variadas metodologias para preservação das cepas de leptospiros foram testadas, porém nenhuma destas garante a total preservação da viabilidade das cepas por períodos maiores de 2 anos.

Os testes de sensibilidade realizados nos estudos analisados e o novo meio de cultura proposto denominado LVW se demonstra promissor, podendo auxiliar futuramente no isolamento e diagnóstico da leptospirose humana.

Esta revisão bibliográfica se demonstrou essencial para compreensão dos melhores meios utilizados para *Leptospira* e para proposição de novos meios que auxiliem no pronto diagnóstico da leptospirose humana.

Devido à extrema importância epidemiológica da realização de cultura para leptospiros e às grandes dificuldades que esta apresenta, mais estudos devem ser realizados para a definição de metodologias adequadas para isolamento, preservação e testes de sensibilidade, além de possibilitar a execução de meios de cultura adequados para a elaboração de vacinas humanas contra a leptospirose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.

AZUMA, I. et al. Effect of Mycolic Acid and Its Derivatives on the Growth of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 4, p. 1489-1490, 1968.

BEY, R. F.; JOHNSON, R. C. Protein-Free and Low-Protein Media for the Cultivation of *Leptospira*. **Infection and Immunity**, v. 19, n. 2, p. 582-569, 1978.

BOSS, J. et al. Antimicrobial Susceptibility Testing of *Leptospira* spp. in the Lao People's Democratic Republic Using Disk Diffusion. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 5, p. 1073-1078, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BUNNELL, J. E. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon Basin Region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 63, n. 5, p.255-258, 2000.

CHAKRABORTY, A. et al. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. **Microbiol Immunol**, v. 55, p. 494-501, 2011.

CHIDEROLI, R. T. et al. Culture Strategies for Isolation of Fastidious *Leptospira* Serovar Hardjo and Molecular Differentiation of Genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2155, p. 1-8, 2017.

COSTA, E. C. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v. 19, n. 2, p. 111-122, 2009.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p.1-19, 2015.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2019**. 2019. Disponível

em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/19/Casos-Lepto-18-07-2019.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2020.

DHAYABARAN, V.; CHIDAMBARAM, D.; KRISHNASWAMY, P. R. Identification of compounds for improved growth of *Leptospira* in culture and isolation. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, 2019.

ELLINGHAUSEN, H. C. Growth Temperatures, Virulence, Survival, and Nutrition of Leptospire. **J. MED. MICROBIOL**, v. 6, p. 487-497, 1973.

FINN, M. A.; JONES, R. H. Growth of Saprophytic and Pathogenic *Leptospira*: Evaluation of Medium, Temperature, Inoculum, and Cost. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 134-137, 1976.

GAMAGE, K. K. K.; FERNANDO, H. Leptospirosis complicated with Guillain Barre syndrome, papillitis and thrombotic thrombocytopenic Purpura; a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 691, p. 1-4, 2018.

GONZÁLEZ, A. et al. Medio EMJH modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. **Revista Argentina de Microbiología**, v.38, p. 61-68, 2006.

GRIFFITH, M. E. et al. Viability of *Leptospira* in BacT/ALERT MB Media. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.54, p. 263–266, 2006.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146, n. 7, p. 1491-1504, 2000.

KIRSCHNER, L.; GRAHAM, J. Growth. Purification and maintenance of *Leptospira* on solid media. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 40, n. 1, p. 57-60, 1959.

HUTTNER, M. D.; PEREIRA, H. C. P.; TANAKA, R. M. Pneumonia por leptospirose. **J. Pneumol**, v.28, n. 4, p. 229-232, 2002.

LEVETT, P. Systematics of Leptospiraceae. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 387, p.11-20, 2015.

LOUREIRO, A. P. et al. Usage of a selective media (EMJH-STAFF) in primary culturing of pathogenic leptospire from bovine clinical samples. **Letters in Applied Microbiology**, v.61, p. 603-606, 2015.

MACHRY, L. et al. Caracterização de cepas de referência de *Leptospira* sp. utilizando a técnica de pulsed field gel electrophoresis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 166-169, 2010.

MAGALHÃES, V. S.; ACOSTA, L. M. W. Leptospirose humana em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, de 2007 a 2013: caracterização dos casos confirmados e distribuição espacial. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 28, n. 2, 2019.

MARINOVA-PETKOVA, A. et al. First reported human cases of leptospirosis in the United States Virgin Islands in the aftermath of hurricanes Irma and Maria, September-November 2017. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n.7, p. 1-6, 2019.

MIRAGLIA, F. et al. EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp. from experimentally contaminated bovine semen. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 189-193, 2009.

MIRAGLIA, F. et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Conhageni isolates from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, p.195-199, 2013.

MURRAY, C. K.; HOSPENTHAL, D. R. Broth Microdilution Susceptibility Testing for *Leptospira* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1548-1552, 2004.

MYERS, D. M.; VARELA-DÍAZ, V. M. Selective Isolation of *Leptospiras* from Contaminated Material by Incorporation of Neomycin to Culture Media. **Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 781-786, 1973.

MYERS, D. M.; VARELA-DÍAZ, V. M.; SINIUK, A. A. Long-Term Survival of *Leptospira* in a Biphasic Culture Medium Containing Charcoal. **Applied Microbiology**, v. 25, n.4, p. 514-516, 1973.

MYERS, D. M. Efficacy of Combined Furazolidone and Neomycin in the Control of Contamination in *Leptospira* Cultures. **Antimicrobiol Agents and Chemotherapy**, v. 7, n.5, p. 666-671, 1975.

NABITY, S. A. et al. Prospective evaluation of accuracy and clinical utility of the Dual Path Platform (DPP) assay for the point-of-care diagnosis of leptospirosis in hospitalized patients. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 2, p. 1-13, 2018.

OIE, S; KOSHIRO, A.; KONISHI, H.; YOSHII, Z. In Vitro Evaluation of Combined Usage of Fosfomycin and 5-Fluorouracil for Selective Isolation of *Leptospira* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1084-1087, 1986.

OLIVEIRA, M. A. A. **Avaliação da combinação de diferentes métodos laboratoriais utilizados para diagnosticar e caracterizar *Leptospira* spp. a partir de amostras de sangue de pacientes com suspeita de leptospirose em Minas Gerais, Brasil, 2008 a 2014.** 2016. 141f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

PEREIRA, I. A., et al. Leptospirose em fase aguda evoluindo com síndrome de Weil e seu frágil diagnóstico sorológico: Relato de Caso. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 29. p. 1-4., 2019.

PHILIP, N.; GARBA, B.; NEELA, V. K. Long-term preservation of *Leptospira* spp.: challenges and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 13, p. 5427-5435, 2018.

PINHATA, J. W.; BLANCO, R. M.; ROMERO, E. C. Evaluation of inhibitors for development of a selective medium for isolation of *Leptospira* spp. from clinical samples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 558-564, 2018.

POLACHINI, C. O.; FUJIMORI, K. Leptospirose canina e humana, uma possível transmissão conjuntival no Município de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Pan-Amaz. Saúde**, v. 6, n. 1, p. 59-65, 2015.

REPISO, M. V. et al. **Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganaderia de carne y caracterización de los establecimientos de cria del Uruguay.** Uruguai: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 2005.

RIS, D. R. Limitations of the Use of 5-Fluorouracil as a Selective Agent for the Isolation of Leptospirae. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 270-271, 1974.

RODRÍGUEZ, A. G.; SANTIESTEBAN, N. B.; ABREU, Y. V.; GONZÁLEZ, M. G. Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok em medio EMJH modificado. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v. 54, n. 1, p. 32-36, 2002.

ROQUEPLO, C. et al. Leptospirosis, one neglected disease in rural Senegal. **Vet. Med. Sci.**, v. 5, p.1-9, 2019.

SAITO, M. et al. The usefulness of semi-solid medium in the isolation of highly virulent *Leptospira* strains from wild rats in an urban area of Fukuoka, Japan. **Microbiol. Immunol.**, v. 59, p. 322–330, 2015.

SAMIR, A.; WASFY, M. O. A simple technique for long-term preservation of leptospire. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 1-3, 2012.

SANTOS, L. A. ***Leptospira interrogans* sorovar copenhageni e Icterohaemorrhagiae: relação evolutiva, diferenças genéticas e associação com desfecho clínico.** 2015. 98f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

SLAMTI, L. et al. Deciphering Morphological Determinants of the Helix-Shaped *Leptospira*. **Journal of Bacteriology**, v.193, n.22, p. 6266-6275, 2011.

STANECK, J. L.; HENNEBERRY, R. C.; COX, C. D. Growth Requirements of Pathogenic *Leptospira*. **Infection and Immunity**, v. 7, n. 6, p. 886-897, 1973.

TORGERSON, P. R. et al. Global Burden of Leptospirosis: estimated in terms of disability adjusted life years. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 10, p. 1-14, 2015.

VALENCIA, M. M. C. **Interação de proteínas de membrana de *Leptospira* com os reguladores Fator H e C4BP do Sistema Complemento Humano.** 2014. 45f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VIEIRA, M. L. **Interação de *Leptospira interrogans* com o sistema proteolítico plasminogênio/plasmina: análise, caracterização e possíveis implicações na infecção.** 2012. 255 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

WIDIYANTI, D. et al. *Leptospira* detection in flood-prone environment of Jakarta, Indonesia. **Zoonoses Public Health**, v. 66, p. 1-6, 2019.

WHO. World Health Organization. **Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.** 2003.

WHO, World Health Organization. **Neglected tropical diseases:** Other neglected zoonotic diseases. 2019. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/other_NZDs/en/. Acesso em: 29 nov. 2019.

WUTHIEKANUN, V. et al. Rapid Isolation and Susceptibility Testing of *Leptospira* spp. Using a New Solid Medium, LVW Agar. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 297–302, 2013.

WUTHIEKANUN, V. et al. Maintenance of *Leptospira* Species in *Leptospira* Vanaporn Wuthiekanun Agar. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n.12, p. 4350–4352, 2014.

WUTHIEKANUN, V. et al. Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of *Leptospira* spp. Using *Leptospira* Vanaporn Wuthiekanun (LVW) Agar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 2, p. 241–243, 2015.

WUTHIEKANUN, V. et al. Quality controls for antimicrobial disk diffusion testing on *Leptospira* Vanaporn Wuthiekanun agar. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 110, p. 673–675, 2016.

YANAGAWA, R.; HIRAMUNE, T.; AKAIKE, Y. Growth of saprophytic and pathogenic leptospirae on solid medium in carbon dioxide-free air. **J. Bacteriol.**, v. 85, p. 953–954, 1963.

YUPIANA, Y. et al. Epidemiological investigation of *Leptospira* spp. in a dairy farming enterprise after the occurrence of three human leptospirosis cases. **Zoonoses Public Health**, v. 66, p.1-10, 2019.

ZARANTONELLI, L. et al. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. 1-22, 2018.

ZUERNER, R. L. Laboratory Maintenance of Pathogenic *Leptospira*. **Current Protocols in Microbiology**, v. 12, p..1-13, 2005.