

M. TERESA ROCHA

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEPTOSPIROSE ANIMAL**

LISBOA

---

1 9 8 6

## **DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEPTOSPIROSE ANIMAL**

M. TERESA ROCHA

### **SUMÁRIO**

Neste trabalho é feita uma descrição das principais técnicas utilizadas no diagnóstico laboratorial da leptospirose animal, sublinhando alguns aspectos que se julga serem úteis no esclarecimento das suas possibilidades e limitações, interpretação dos resultados e recolha de material a enviar ao laboratório.

## **DIAGNOSTIC LABORATORIEL DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE**

### **RÉSUMÉ**

L'auteur réfert les principales techniques utilisées pour le diagnostic de laboratoire de la leptospirose animale. Quelques aspects qu'on croit être utiles pour l'éclaircissement de leur capacités et limitations ont été soulignés, ainsi que l'interprétation des résultats et le prélèvement du matériel à envoyer au laboratoire.

## **LABORATORY DIAGNOSIS OF ANIMAL LEPTOSPIROSIS**

### **SUMMARY**

This paper describes the main techniques for the laboratory diagnosis of animal leptospirosis, with a special analysis of some aspects which are thought to be useful for a better understanding of their possibilities and limitations, interpretation of the results and selection of samples to send to the laboratory.

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEPTOSPIROSE ANIMAL

TERESA ROCHA \*

### INTRODUÇÃO

O diagnóstico da Leptospirose, baseado unicamente nos sinais clínicos, é difícil, pois estes variam extensivamente em todos os animais domésticos. O diagnóstico depende da avaliação da história pregressa individual ou do efectivo, sinais clínicos, lesões, dados epidemiológicos e resultados laboratoriais. É importante ter em conta a patogénese da doença para uma selecção do material apropriado a enviar ao laboratório (1).

Em linhas gerais, a evolução da infecção decorre da seguinte forma: após penetração através da pele ou mucosas, as leptospiras multiplicam-se no sangue e tecidos durante alguns dias, seguindo-se o aparecimento de anticorpos por reacção imunitária e eliminação dos microrganismos pela urina. A persistência de leptospiras nos rins pode dar origem a uma leptospirúria prolongada (2). Esta, usualmente evidente duas ou três semanas após a infecção, pode durar de apenas algumas semanas a cerca de dois anos (3), podendo ser intermitente. O contacto directo ou indirecto com a urina de animais portadores de leptospiras é a via mais usual de propagação da infecção (1). Quando a leptospirose ocorre durante a gravidez pode dar origem às seguintes complicações: infecção intra-uterina com morte fetal e aborto, nado-mortos, partos prematuros e sinais de leptospirose congénita dentro de 1-2 semanas após o parto. As leptospiras podem ser secretadas no leite durante a fase septicé-

mica, sendo as mães lactantes nesta fase possíveis transmissoras aos animais jovens (1).

Considerando portanto a evolução do processo infeccioso, conclui-se que, no diagnóstico laboratorial da leptospirose, pode fazer-se a pesquisa do microrganismo em si (durante a fase de leptospirémia, leptospirúria, ou mediante análise de tecidos ou certos fluidos corporais colhidos na necrópsia) e/ou a pesquisa de anticorpos quando se supõe ter já havido reacção imunitária. Estas pesquisas podem incidir sobre animais jovens ou adultos, mas também podem fazer-se nos fetos.

As leptospiras são classificadas de acordo com os seus caracteres antigénicos. A base taxonómica para o Genus «Leptospira» é o serovar. Os serovars que têm uma relação serológica mais estreita, embora possuam diferenças antigénicas individuais, são agrupados, para fins práticos, em serogrupos (1). Existem actualmente 183 serovars de *Leptospira interrogans* (leptospiras patogénicas) agrupadas em 25 serogrupos distintos (16).

Este trabalho pretende fazer uma revisão das principais técnicas actualmente utilizadas no diagnóstico laboratorial da leptospirose animal, sem intenção de descrever em pormenor a sua execução, mas antes de fazer referência à sua aplicação, importância relativa, interpretação de resultados e recolha de material apropriado para análise laboratorial. Em cada capítulo são especialmente desenvolvidos alguns aspectos que julgamos úteis no sentido de um maior esclarecimento acerca das possibilidades e limitações das várias técnicas de diagnóstico laboratorial.

\* Médica Veterinária do L.N.I.V.

## TESTE DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA

O teste de aglutinação microscópica (para a pesquisa de anticorpos) é a base do diagnóstico serológico da leptospirose e classificação das leptospirosas (1).

Os soros em estudo são diluídos individualmente ou em «pool» (4) e distribuídos numa microplaca, após o que se adiciona igual volume de antígeno; as placas são incubadas e o grau de aglutinação observado em microscópio de fundo escuro. O título final é dado pela diluição sérica em que se verifique 50 % de aglutinação (1).

Os antígenos usados são culturas vivas ou mortas por formalina (1). As culturas vivas, que devem ter uma densidade e tempo de crescimento adequados, são mais sensíveis e permitem a obtenção de reacções a título mais alto, embora tenham a desvantagem de poderem contaminar-se com mais facilidade e exigirem uma manutenção e manipulação mais cuidadas; as culturas mortas por formalina estão relativamente livres de problemas de contaminação e manipulação, mas tendem a proporcionar mais reacções cruzadas e títulos mais baixos (1); além disto, são susceptíveis de se deteriorar por aparecimento de aglutinações espontâneas com deposição de leptospirosas, tornando a suspensão insuficientemente densa para ser utilizada (5). No L.N.I.V. utilizam-se culturas vivas como antígeno.

Os soros imunes humanos apresentam reacções cruzadas em muito maior grau que os soros animais, demonstrando uma quase universal reacção cruzada com os serovars *patoc* e *andamana* de *Leptospira biflexa* (leptospirosas saprófitas); este facto permitiu utilizar estas estirpes como antígenos para testes «screening» específicos de «Genus» (1). Contudo, a sua aplicação no estudo de soros animais, relativamente serovar-específicos, não é viável, tendo estes de ser testados inicialmente com o serovar homólogo para se detectar a presença de anticorpos anti-leptospira (1, 5).

A escolha dos antígenos a utilizar na reacção de aglutinação microscópica deve ser criteriosa. Sempre que não se disponham de dados suficientes sobre as prevalências de antígenos individuais locais, devem usar-se os recomendados pela O.M.S. (1), tendo ainda em conta a mais recente subdivisão do serogrupo Hebdomadis em 3 serogrupos distintos (Mini, Hebdomadis e Sejroe) proposta por Kmety (6). Segundo a O.M.S. (7), em alguns países

pode ser conveniente cancelar, substituir ou adicionar estirpes, dependendo das condições locais e da finalidade dos testes. As estirpes recomendadas são estirpes de referência, mas por vezes pode ser útil a sua substituição por outras homólogas (5).

Confrontando assim cada soro em estudo com uma adequada bateria de antígenos, tendo em conta o que acima se referiu, pode esperar-se uma boa sensibilidade do teste de aglutinação microscópica.

O soro de fetos abortados pode conter aglutininas que, quando presentes, são de valor diagnóstico. Embora não se faça em testes de rotina, também se pode pesquisar anticorpos na urina e líquido céfalo-raquidiano, sendo estes então examinados por diluir (1).

### Interpretação

Os títulos iguais ou superiores a 1:100 são considerados significativos, indicando portanto a presença de infecção por *Leptospira* (8). No entanto, é necessário ter em mente diversos factores que a seguir se enumeram.

Os anticorpos detectáveis pelo teste de aglutinação microscópica estão presentes dentro de 10 dias após a infecção podendo atingir títulos máximos dentro de 3-4 semanas; seguidamente, o seu nível sérico declina gradualmente, mas podem estar presentes títulos detectáveis de 1 a 2 anos após a infecção (8). Segundo Harvey L. Rubin (9), a persistência de níveis de anticorpos é extremamente variável; alguns animais permaneceriam sero-positivos vários anos enquanto outros se tornariam sero-positivos alguns meses após a infecção. Serologicamente, o diagnóstico da leptospirose poderia ser confirmado pela observação de uma subida significativa de título mediante a colheita de 2 amostras de soro do mesmo animal efectuadas respectivamente no início da doença e na fase de convalescença, 10 a 14 dias mais tarde; contudo, na prática, nem sempre este tipo de colheita é viável e, por outro lado, a leptospirose é por vezes assintomática ou de suspeita tardia, o que dificulta a obtenção de sangue no início da infecção. Assim, o meio mais prático seria a simples verificação de níveis de anticorpo significativos, embora serologicamente seja difícil distinguir um título residual de um título de uma infecção actual pelo exame de uma única colheita de soro.

Como foi atrás referido, os animais com títulos maiores ou iguais a 1:100 são conside-

rados positivos à leptospirose. Este nível de discriminação é provavelmente adequado para reconhecer a maioria dos animais infectados (8). Contudo, Hoges (10) demonstrou que alguns animais infectados activamente não produzem anticorpos a níveis correntemente considerados de valor diagnóstico. Isto parece não ser incomum nas infecções provocadas pelo serovar *hardjo*, endémicas no gado bovino (11), que apresentam muitas vezes títulos baixos (12, 13). Mackintosh, Marshall e Broughton (12) isolaram *L. hardjo* de gado bovino com títulos de anticorpo  $< 1:24$  e referem também que, num estudo efectuado num matadouro, Ellis verificou que aproximadamente metade dos isolamentos provinham de bovinos com títulos  $\leq 1:100$  e que 16 % destes davam títulos  $< 1:10$  quando titulados contra o isolado homólogo. Há também a hipótese de deixar escapar animais no período de incubação se, após o despiste de alguns positivos, se considerarem os restantes como negativos; se os animais positivos eliminavam leptospiros na urina, alguns animais negativos em contacto com eles podem estar no período de incubação, podendo portanto em breve vir a tornar-se positivos (8). Já foram isoladas leptospiros a partir da urina de animais selvagens sero-negativos (5).

Na maioria dos casos, a leptospirose é um problema de grupo e deve ser diagnosticada nesta base. Assim, para se obter informação significativa, devem colher-se amostras de uma certa percentagem dos animais dum mesmo grupo (segundo L. Rubin pelo menos 10 %), relacionando os resultados serológicos com dados clínicos ou epidemiológicos (9).

### Conclusão

Em suma, a reacção de aglutinação microscópica continua a ser o teste standard de referência no diagnóstico serológico da leptospirose. Os animais que tenham títulos  $\geq 1:100$  são considerados positivos. No entanto, os resultados devem ser interpretados com as devidas reservas, na medida em que podem haver animais portadores e disseminadores de leptospiros sem que haja um nível de anticorpos detectável e, por outro lado, um animal que apresente um título positivo não será necessariamente possuidor de uma infecção actual.

Os resultados da serologia, sempre que possível e especialmente nos casos duvidosos, devem ser completados com o isolamento e tipificação da *Leptospira* e, sempre que se julgue necessário, os animais suspeitos devem ser isolados (8) e tratados.

### ISOLAMENTO

O isolamento de leptospiros é o modo mais positivo pelo qual um diagnóstico definitivo da leptospirose pode ser feito (14). Segundo Turner (5), os resultados da serologia devem ser considerados apenas como potencialmente indicativos do Serogrupo e o organismo causador da infecção (serovar) deve ser isolado e classificado por absorção cruzada de aglutininas.

A escolha de material apropriado para o isolamento depende do provável estágio da infecção do(s) animal(ais) em estudo. Durante a fase de leptospirose os materiais de escolha são o sangue, órgãos vasculares (especialmente o fígado, baço, rim), e o líquido céfalo-raquidiano. Na fase de leptospirose e produção de anticorpos, o cortex renal e a urina são os inóculos mais apropriados. Estes podem sempre examinar-se quando se pretende verificar se um animal é portador de leptospiros (14). O material deve ser colhido antes da antibioterapia (15).

É necessário também ter em conta que a viabilidade das leptospiros no material colhido ou a colher é limitada. As variações de pH da urina geralmente matam as leptospiros, devendo proceder-se à sementeira logo após a colheita; os tecidos colhidos a partir de animais mortos há mais de 24 horas sem terem sido refrigerados não são adequados para o isolamento. Em condições ideais, os tecidos devem ser colhidos e semeados imediatamente após a morte ou eutanásia dos animais, uma vez que a autólise pode criar condições adversas de anaerobiose (as leptospiros são aeróbias). No entanto, sob refrigeração adequada (4° C), as leptospiros poderão apresentar viabilidade durante alguns dias. A congelação reduz grandemente o número de leptospiros viáveis, portanto não é aconselhável. Quando se colherem tecidos para cultura, podem também colher-se para exame histopatológico. Todo o trabalho para isolamento deve processar-se em condições de asséptica (14).

O isolamento é efectuado mediante a sementeira de material em meio específico, usualmente semi-sólido, segundo técnicas já referidas (1, 14, 15). Qualquer que seja o meio utilizado ou a técnica escolhida, o crescimento é sempre lento e o processo de obtenção de culturas densas e puras fastidioso. Por vezes são precisos vários meses de trabalho de re-isolamento e purificação de contaminantes, antes que se obtenha uma cultura pronta para tipificação. Para além do crescimento ser lento, existem vários factores que afectam a viabilidade das leptospiros «in vitro»: presença de resíduos de detergentes e antisépticos nos tubos de meio de cultura, eventuais alterações de pH do meio, presença de substâncias inibidoras no inóculo (anticorpos, lípidos libertados por emulsificação dos tecidos), contaminação com outros microrganismos, etc. (15).

O estado portador nos animais domésticos é caracterizado pela eliminação de leptospiros na urina por um período variável de tempo, após a fase aguda ou uma infecção inaparente, não se acompanhando de sinais clínicos. O isolamento de leptospiros na urina é particularmente útil na detecção destes casos. No entanto, sendo a eliminação intermitente, os resultados negativos não excluem a possibilidade de haver de facto leptospiúria (1).

O isolamento de leptospiros a partir de fetos (além da serologia fetal) é o melhor método de diagnóstico do aborto por leptospirose, tendo em conta que muitas vezes os animais abortam fetos infectados por leptospira sem que apresentem títulos de anticorpos serologicamente detectáveis (18).

Devido aos já referidos factores que afectam a viabilidade das leptospiros (nos tecidos ou fluidos e in «vitro»), os resultados negativos ao isolamento não significam necessariamente a ausência de infecção por leptospira.

#### CLASSIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

As características morfológicas e de motilidade das leptospiros permitem identificá-las por observação microscópica (fundo escuro) até ao género. Este compreende 2 espécies: *L. interrogans* (leptospiros patogénicas) e *L. biflexa* (leptospiros saprófitas) (1).

As leptospiros saprófitas estão raramente associadas com a infecção no homem ou ou-

tros mamíferos. Diferenciam-se culturalmente da *L. interrogans* pela capacidade de crescimento a 13° C e em meio contendo 225 µg/ml de 8-azaguanina, além da diferenciação serológica e por taxonomia de DNA (1).

Como já foi referido, a base taxonómica para a classificação das leptospiros é o serovar. Os serovars que têm uma relação serológica mais estreita agrupam-se, para fins práticos, em serogrupos. Existem actualmente 183 serovars de *L. interrogans* agrupados em 25 serogrupos distintos.

As propriedades culturais de todos os serovars de *L. interrogans* são essencialmente as mesmas e a sua diferenciação é feita pelas suas características serológicas (1).

Quando se obtém uma cultura pura de *L. interrogans* procede-se primeiramente à identificação do serogrupo a que pertence. Esta é feita mediante a realização de um teste de aglutinação microscópica com uma bateria adequada de «soros de grupo». Um soro de grupo é um antisoro de coelho seleccionado que aglutina optimamente todos os serovars dentro de um dado serogrupo e que dá um mínimo de aglutinações cruzadas com estirpes de outros serogrupos. O «soro de grupo» que dá o título mais alto indica o serogrupo a que pertence a estirpe isolada (1).

A determinação do serovar é muito mais complicada. O método clássico, aprovado pela O.M.S. (7), é baseado em testes de aglutinação cruzada e absorção cruzada de aglutininas. É um método fastidioso, sendo necessário confrontar a estirpe isolada com cada serovar do serogrupo a que pertence. Segundo a O.M.S. (7), «duas estirpes são consideradas como pertencentes a serovars diferentes se após absorção cruzada com quantidades adequadas de antigénio heterólogo, 10 % ou mais do título homólogo permanece em pelo menos um dos dois antisoros».

Apesar de ter uma técnica morosa e que requer a utilização de grande quantidade de meio e antisoros, a classificação de estirpes isoladas é de toda a utilidade para o alargamento dos dados epidemiológicos da região ou efectivo em estudo. O conhecimento de quais os serovars presentes permite a aplicação mais eficaz de medidas de tratamento e/ou profilaxia.

## IMUNOFLUORESCÊNCIA

Utiliza-se para a visualização de leptospiras (pesquisa de antigénio) quando não é aconselhável recorrer ao isolamento, por este ser difícil e moroso, ou quando os tecidos a analisar se encontram deteriorados, não sendo provável a presença de leptospiras viáveis. Pode usar-se também como complemento do diagnóstico (A.E. Stevens - C.V.L. - Weybridge, U.K - comunicação pessoal).

As leptospiras são evidenciadas pelo método dos anticorpos marcados com fluorocromos (17).

O material usado para a preparação das lâminas pode ser: macerado de órgão, esfregaço por impressão, ou por criofactura (N<sub>2</sub> líquido).

A) *I.F. directa* — A aplicação directa de imunoglobulinas conjugadas com isotiocianato de fluoresceína sobre as lâminas preparadas e fixadas tem a vantagem de ser um método rápido e com menos efeitos de fluorescência inespecífica. No entanto, é necessária a preparação e conjugação de antisoros hiperimunes específicos (A.E. Stevens, com. pes.).

B) *I. F. indirecta* — É uma técnica mais morosa, tendo a vantagem de se poder usar um conjugado anti-espécie comercializado. É necessário, no entanto, ter uma bateria adequada de antisoros hiperimunes anti-leptospira (A.E. Stevens, com. pes.).

Segundo Turner (15) a técnica dos anticorpos fluorescentes teria em teoria duas principais vantagens: as leptospiras são coradas; esta coloração é baseada numa reacção antigénio-anticorpo, sendo portanto específica.

Convém no entanto lembrar que se a concentração dos microrganismos no material a examinar for baixa, pode ser difícil observá-las, mesmo que a técnica tenha sido bem executada.

Segundo W.A. Ellis (Belfast-Stormont, comunicação pessoal), há vários aspectos essenciais para uma boa sensibilidade e especificidade da técnica:

a) O microscópio usado — É necessário o uso de um microscópio equipado com objectivas de alta ampliação e iluminação por luz incidente.

b) Uso da técnica de coloração directa — Na *I.F. indirecta* surgem demasiados artefactos que complicam uma visualização satisfatória das leptospiras.

c) Qualidade do antisoro — O uso da *I.F. directa* requer o uso de antisoro de alta qualidade. A qualidade de um soro hiperimune de coelho não se relaciona com a sua actividade de aglutinação, mas com os níveis de IgG electroforeticamente lenta. Para a estimulação de níveis adequados desta classe de Ig, aplica-se um calendário de inoculação lenta, descrito por Ellis (17).

d) Redução da coloração não específica ao mínimo (17).

A técnica dos anticorpos fluorescentes tem a vantagem de não ser necessário que as leptospiras estejam vivas e intactas para a sua evidenciação nos tecidos. No entanto, tem a desvantagem de requerer a elaboração de antisoros específicos de alta qualidade, muitas vezes não disponíveis comercialmente (18). Além disto, quando se desconhecem quais os serovars mais prevalentes nas regiões ou país em estudo, é necessário trabalhar com uma larga quantidade de antisoros ou conjugados, se não se quiser obter resultados falsos negativos.

Portanto, será mais viável aplicar esta técnica quando já se dispõem de dados suficientes sobre as referidas prevalências, reduzindo assim o número de serovars a pesquisar, à semelhança do que acontece em Inglaterra e outros países europeus, onde se aplica a *I.F. directa* na pesquisa de rotina de infecções pelo serovar *hardjo* (A.E. Stevens - CVL, Weybridge, comunicação pessoal).

## EXAME A FRESCO EM MICROSCÓPIO DE FUNDO ESCURO

O uso deste método microscópico para detectar leptospiras em fluidos ou tecidos poderia constituir um meio rápido de diagnóstico. No entanto, acontece que a concentração destes microrganismos é muitas vezes demasiado baixa para permitir uma pronta detecção no material examinado. É frequente encontrarem-se artefactos, resíduos celulares e outras «pseudo-leptospiras» cuja visualização pode facilmente induzir em erro o observador menos experiente (1).

A presença de leptospiras no sangue ou líquido céfalo-raquidiano na fase inicial da infecção é efémera, sendo raramente detectada a tempo, em especial nas formas assintomáti-

cas ou exames tardios. A eliminação de leptospiros na urina tem duração mais longa, mas por outro lado é intermitente, e a sua visualização dificultada por frequentes resíduos celulares e outros artefactos (1).

Segundo W.A. Ellis (18), esta técnica, descrita em vários livros como sendo um método útil de demonstração de leptospiros em fluidos, não tem qualquer valor, dando resultados falsos negativos e/ou positivos, mesmo quando efectuada por pessoal especializado.

A observação a fresco de leptospiros poderá apenas constituir um diagnóstico presuntivo, exigindo sempre uma confirmação por outros métodos (1).

## COLORAÇÕES POR IMUNOPEROXIDASE E IMPREGNAÇÃO PELA PRATA

Ambas as técnicas são susceptíveis de dar resultados falsos positivos e falsos negativos (1, 18).

### E.L.I.S.A.

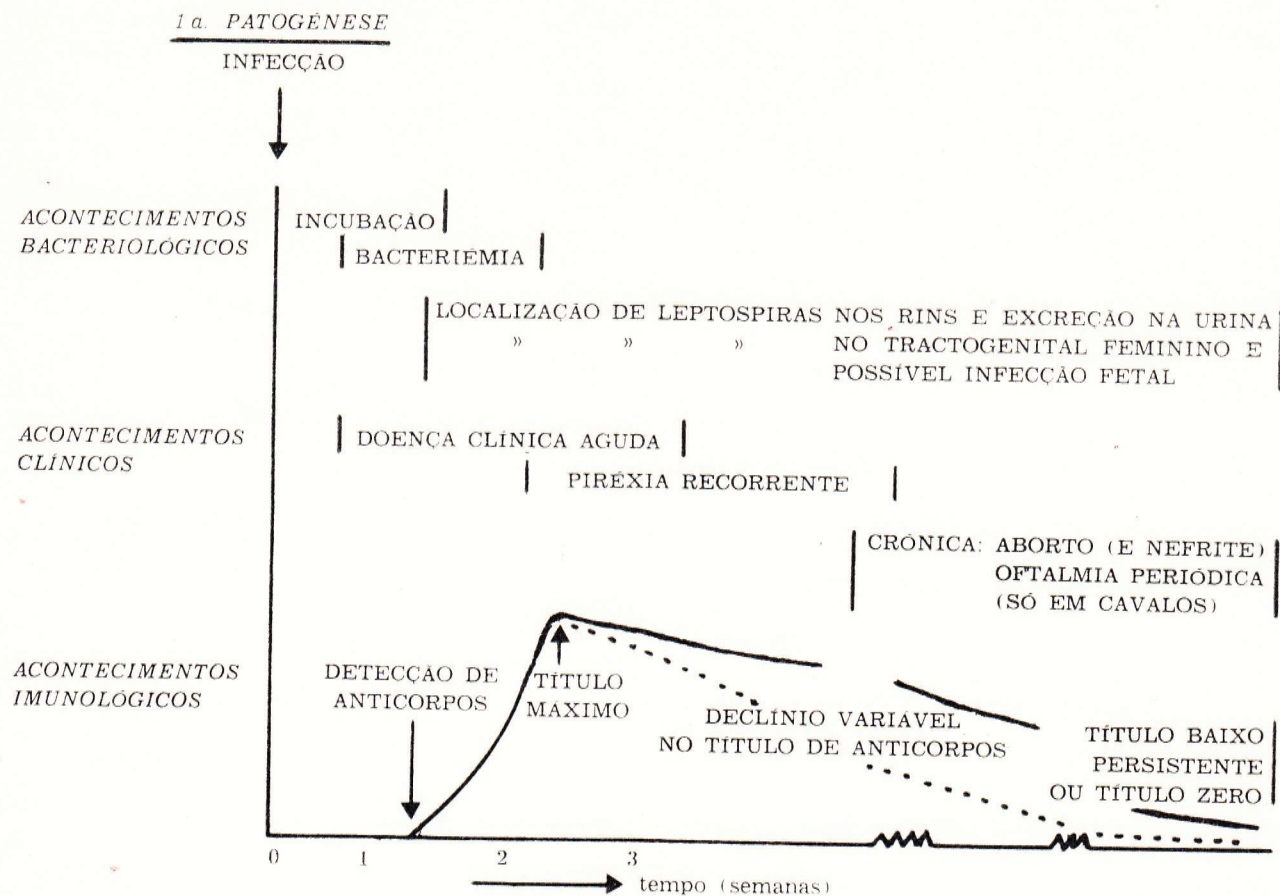
Potencialmente um teste de grande utilidade, pois tem uma grande sensibilidade e permite medir a resposta imunitária por diferentes classes de Ig. No entanto, a sua especificidade é reduzida, sendo por enquanto usada (Inglaterra) apenas a nível experimental.

## BIBLIOGRAFIA

1. FAINE, S. (1982) — Guidelines for the control of leptospirosis. W.H.O. of. Publ. N.º 67, Geneva, 171 pp.
2. BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A. & RADOSTITS, O. M. (1979) — *Veterinary Medicine*. Baillière Tindall, 5.ª edição, London.
3. MITCHELL, D.; ROBERTSON, A.; CORNER, A. H., & BOULANGER, P. (1966) — *Can. J. comp. Med. & Vet. Sci.* 30, 211.
4. GRAMATIKOVSKI, G. & STOJANOVSKI, B. (1974) — Diagnosis of leptospirosis by an agglutination test suitable for a large number of serum samples. *Vet. Glas.*, 28, 787-789. Em: *Vet. Bull.*, 45, 417. 1975.
5. TURNER, L. H. (1968) — Leptospirosis II: serology. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 62, 880-899.
6. KMETY, E. (1977) — Study of the antigenic structure of the *leptospirae*. Classification of the serological group Hebdomadis (in slovak). *Fol. Fac. Med. Univ. Com. Brat.*, 15, 245-309.
7. W. H. O. Expert group. (1967) — Current problems in leptospirosis research. Geneva: World Health Organization Technical Report Series, N.º 380, 33 pp.
8. WORTHINGTON, R. W. (1982) — Serology as an aid to diagnosis: uses and abuses. *New Zealand Veterinary Journal*, 30, 93-97.
9. RUBIN, H. L. (1979) — Bovine leptospirosis. *California Veterinarian*, November, 1979, 27-32.
10. HODGES, R. T. (1975) — Diagnosis of leptospirosis of farm livestock in New Zealand. Proceedings of a seminar on leptospirosis. New Zealand Veterinary Association, Waikato Branch, Hamilton.
11. LITTLE, T. W. A. & HATHAWAY, S. C. (1983). — *Leptospira hardjo* infection in cattle: an emerging problem in the United Kingdom. Em: Proceedings 10<sup>th</sup> Conference of the OIE Regional Commission for Europe. London 1982, 73-74. Paris: Office International des Épizooties.
12. MACKINTOSH, C. G.; MARSHALL, R. B. & BROUGHTON, E. S. (1980) — The use of a *hardjo-pomona* vaccine to prevent leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *N. Z. Vet. J.*, 28, 174-177.
13. ELLIS, W. A.; BRYSON, D. G.; O'BRIEN, J. J. & NEILL, S. D. (1983) — Leptospirosis infection in aborted equine fetuses. *Eq. Vet. J.*, 15, (4), 321-324.
14. RUBIN, H. L.; COLE, J. R.; ELLINGHAUSEN, H. C. (1981) — Diagnosis of leptospirosis of domestic animals — II — Isolation Procedures. Leptospirosis Committee of the U.S. Animal Health Association, 1981.
15. TURNER, L. H. (1970) — Leptospirosis III — Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 64, 623-646.
16. MAZZONELLI, J. (1984) — Advances in bovine leptospirosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 3 (4), 775-808.
17. ELLIS, W. A. (1982) — Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. *Vet. Rec.* 110, 147-150.
18. ELLIS, W. A. (1986) — The diagnosis of leptospirosis in farm animals. Em: The present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Eds., Dordrecht, 13-24.



FIGURA I  
 MODELO DA PATOGÊNESE DA LEPTOSPIROSE (ELLIS, 1986)  
 E SUA IMPORTANCIA NO DIAGNOSTICO \*



1 b. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

SEROLÓGICOS	SUBIDA DE TÍTULO EM 2 AMOSTRAS (AGUDA E CONVALESCENTE). DETECÇÃO DE ANTICORPOS A TÍTULO POSITIVO	VALOR LIMITADO
CULTURAIS: ANIMAL VIVO	SANGUE, L.C.R.   LEITE	URINA
ANIMAL MORTO	RIM, FIGADO, PULMAO, OLHO, FLUIDOS CORPORAIS	RIM
MICROSCÓPICOS	I.F. do PULMAO, RIM, FIGADO, CÉREBRO	I.F. do RIM FETOS - COMO PARA O ANIMAL ADULTO
	EXAME A FRESCO (FUNDO ESCURO) DE SANGUE E L.C.R.	EXAME A FRESCO (FUNDO ESCURO) da URINA

\* Figura adaptada (18)