

MOACIR MARCHIORI FILHO

Indução do estado de portador renal e genital pela *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamster (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe, da via de inoculação e da vacinação

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MOACIR MARCHIORI FILHO

Indução do estado de portador renal e genital pela *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamster (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe, da via de inoculação e da vacinação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Dra. Margareth Élide Genovez

São Paulo

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1894
FMVZ

Marchiori Filho, Moacir

Indução do estado de portador renal e genital pela *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamster (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe, da via de inoculação e da vacinação / Moacir Marchiori Filho. -- São Paulo: M. Marchiori Filho, 2007.
131 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Dra. Margareth Élide Genovez.

1. Leptospirose animal. 2. Vacinas. 3. Via de inoculação. 4. Portador. 5. Adjuvante. I. Título.




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Relação entre a via de infecção e a ocorrência do estado de portador renal e/ou genital na leptospirose experimental em hamster e uso da vacinação com bacterina composta pelos sorovares Hardjo, Wolffi, Pomona e Bratislava como medida preventiva", protocolo nº590/2004, utilizando 520 hamsters, sob a responsabilidade da Profª Drª Margareth Élide Genovez (ICB), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Relationship between infection and the occurrence of renal and/or genital carrier of experimental leptospirosis in hamster and the use of vaccine composed by sorovars Hardjo, Wolffi, Pomona and Bratislava as a preventive measure", protocol number 590/2004, utilizing 520 hamsters, under the responsibility of Profª Drª Margareth Élide Genovez (ICB) agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting).

São Paulo, 10 de fevereiro de 2005


Profª Drª Júlia Maria Malera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARCHIORI FILHO, Moacir

Título: Indução do estado de portador renal e genital pela *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamster (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe, da via de inoculação e da vacinação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico,

À minha amável esposa, Juliana

*"Ninguém pode contar o que te devo, é lúcido
O que te devo, amor, e é como uma raiz
natal de Araucânia, o que te devo, amada.*

*É sem dúvida estrelado tudo o que te devo,
O que te devo é como o poço de uma zona silvestre
Onde guardou o tempo relâmpagos errantes."*

(Pablo Neruda)

Aos meus pais, Moacir e Vera

*"Amor é dado de graça,
é semeado no vento,
na cachoeira, no eclipse.
Amor foge a dicionários
e a regulamentos vários."*

(Carlos Drummond de Andrade)

Agradeço,

À Dra. Margareth Élide Genovez, pela orientação, ensinamentos e agradável convivência.

À Vallée S.A., especialmente ao Dr. Ronan de Freitas e ao Dr. Américo Martins Craveiro, pela oportunidade e inestimável apoio.

À minha esposa, Juliana pelo carinho, companherismo e dedicação na execução deste trabalho.

Aos Professores Dr. Silvio Arruda Vasconcellos (FMVZ/USP), Dr. Júlio César de Freitas (UEL) por terem cedido a estirpe LO4 e pelas valiosas contribuições.

Ao Prof. Dr. Leonardo Richtzenhain (FMVZ/USP) pelas considerações para aprimoramento do trabalho.

Às pesquisadoras do Instituto Biológico: Dra. Rosa Maria Piatti e Dra. Eliana Scarcelli Pinheiro pelas informações esclarecedoras.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Alessi (FCAV/Unesp-Jaboticabal) pelos ensinamentos histopatológicos e fotografias.

À Dra. Rita de Cássia Paro Alli (IPT/SP) pela ajuda nas fotografias.

Aos meus pais, Moacir e Vera, irmãos, Daniela e Rodrigo, e sobrinhos, Luísa e Guilherme, pelo carinho e exemplos.

Às amigas do Instituto Biológico: Vanessa, Jéssica, Simone, Tatiana, Carolina, Dona Maria, Dona Antera, pelo apoio durante a execução deste trabalho. Agradeço de coração.

Aos amigos da Vallée: Ethel, Igor, Eliane, Alex, Maria do Carmo, Samir, Diogo, Cássia, Márcio, Cristina, Sandra, Karina, Alessandra, Ana Célia e Alexandre, pela ajuda durante a minha ausência e contribuições nas diversas fases do estudo.

Ao meu tio Raul, pelo incentivo e exemplo de perseverança.

À Família Gréggio, Dona Marilza, Sr. Vergílio e Virgílinho, pelo carinho.

Ao Cláudio Arroyo (VPT/USP), pela ajuda no preparo das lâminas.

Às amigas Gleicilane e Ivy, bibliotecárias da Vallée, pela inestimável ajuda nas buscas bibliográficas.

Ao colega Celso Akio Maruta, pela enorme contribuição na análise estatística.

Aos amigos eternos: Gréggio, Marcelo, Guilherme, Rodrigo, Danilo, Adriano, Tamaki, Tchelão, Daniel e Yvan, pelos momentos alegres de descontração.

RESUMO

MARCHIORI FILHO, M. **Indução do estado de portador renal e genital pela *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamster (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe, da via de inoculação e da vacinação.** [Induction of renal and genital carrier for *Leptospira interrogans* serovar Canicola, strain LO4, in hamster (*Mesocricetus auratus*). Influence of concentration, strain virulence, inoculation via and vaccination]. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Em decorrência da importância da leptospirose nas criações zootécnicas pelos prejuízos econômicos, principalmente pelas infecções crônicas, forma mais importante na propagação e permanência da bactéria no ambiente, este trabalho pretendeu estudar o curso da leptospirose e a formação do portador pela infecção experimental de hamsters com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, autóctone, pelas vias conjuntiva-nasal (CN) e cérvico-vaginal (CV) comparadas a via controle, intraperitoneal (IP) com duas concentrações de inóculo (20-30 e 100-200 leptospiras/campo microscópico) e ainda estabelecer a eficácia conferida por cinco vacinas experimentais formuladas com dois tipos de adjuvantes (saponina e hidróxido de alumínio), pelo desafio de hamster. No preparo das vacinas foi considerada a virulência da estirpe LO4 submetida a duas e cinco passagens *in vitro*, que foi comparada com duas vacinas controle produzidas com a estirpe de referência, *Hond Utrecht IV*, com indeterminado número de passagens *in vitro*. Foram também avaliadas a indução de anticorpos aglutinantes e neutralizantes e as lesões histopatológicas por HE e Warthin-Starry. A detecção das leptospiras nos órgãos de hamsters mortos pela leptospirose ou eutanasiados foi realizada pela visualização direta, cultivo e PCR, considerando qualquer um dos resultados positivo. A visualização direta foi o melhor método de detecção na suspensão de órgãos. A via CN mostrou-se tão letal quanto IP na maior concentração de inóculo ($p < 0,01$) e também mais letal que CV nas duas concentrações ($p < 0,01$). A via CV induziu o portador renal e genital, não havendo diferença entre as duas concentrações. Pela via CN, não houve diferença entre sexos na indução da letalidade e da formação do portador, para ambos os inóculos. Todos os hamsters

que morreram pós-inoculação apresentaram grande quantidade de leptospiras nos rins e genitais com necrose e hemorragias. Os animais eutanasiados após 21 dias de infecção, apresentaram leptospiras em rins e genitais sem lesões aparentes, caracterizando o portador. Pela SAM, tanto os animais que vieram a óbito, quanto os sobreviventes à inoculação com ambas as concentrações de leptospiras pelas vias CN, CV e IP, mostraram-se não reagentes na SAM (<25) para as estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*. As vacinas com ambas as estirpes e adjuvantes induziram baixos títulos de anticorpos aglutinantes e neutralizantes. Os maiores títulos de anticorpos neutralizantes e aglutinantes foram observados nos animais vacinados com a estirpe referência, *Hond Utrecht IV*. Os anticorpos neutralizantes não tiveram correspondência com o teste desafio em hamsters. As vacinas produzidas com ambas as estirpes protegeram os animais contra a letalidade da leptospirose causada pela infecção com a estirpe LO4, e, portanto a virulência da estirpe não interferiu na eficácia, porém as bacterinas não foram capazes de proteger os hamsters contra a formação do portador renal e genital.

Palavras-chave: Leptospirose animal. Vacinas. Via de inoculação. Portador. Adjuvante.

ABSTRACT

MARCHIORI FILHO, M. **Induction of renal and genital carrier for *Leptospira interrogans* serovar Canicola, strain LO4, in hamster (*Mesocricetus auratus*). Influence of concentration, strain virulence, inoculation via and vaccination.** [Indução do estado de portador renal e genital pela *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamster (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe, da via de inoculação e da vacinação]. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Leptospirosis is important in production systems due to its negative economic impact, and chronic infections are the most relevant type of propagation and permanence of the bacteria in the environment. The objectives of this study were to study the occurrence of leptospirosis, and the formation of carriers animals, by the experimental infection of hamsters with *Leptospira interrogans* serovar Canicola, LO4 autochthon strain through conjunctive-nasal (CN) and cervix-vaginal (CV) via versus control and intra-peritoneum (IP) via with two inoculum concentrations (20-30 and 100-200 leptospiras/microscopic area). In addition, the efficacy of five experimental vaccines formulated with two types of adjuvants (saponine and aluminum hydroxide) was evaluated. In the vaccine preparation, the virulence of LO4 autochthon strain manipulated in two and five *in vitro* passages was compared with two control vaccines produced with the reference strain, *Hond Utrecht IV* with undetermined number of *in vitro* passages. It was also evaluated the induction of agglutinating and neutralizing antibody production and the histopathological lesions by HE and Warthin-Starry. The leptospira detection in the hamsters organs killed by the leptospira or euthanized was done by direct visualization or culture or PCR. The direct visualization was the best method of detection in the organs suspensions. The CN via has shown to be as lethal as IP in the highest inoculum concentration ($p < 0.01$) and also more lethal than the CV in the two concentrations ($p < 0.01$). The CV via has induced the occurrence of renal and genital carrier with no difference between the two concentrations. By the CN via, with the two inoculum, there has no difference detected between sex in the lethality induction as well as in the formation of carrier. All hamsters that died following inoculation presented a great amount of leptospiras in the kidneys and genitals with necrosis and hemorrhage. After 21 days

of infection, the euthanized animals presented leptospiras in the kidneys and genitals without any apparent lesion, characterizing a carrier. By the SAM, the animals that died, as well as the ones that survived the inoculations by CN, CV and IP via with the two inoculum concentrations were not reactive to the SAM (<25) to the strain LO4 and *Hond Utrecht IV*. The two vaccines for the two strains and adjuvant have induced low agglutinating and neutralizing antibody titers. The highest agglutinating and neutralizing antibody titers were observed in animals vaccinated with the reference strain, *Hond Utrecht IV*. The neutralizing antibodies did not correspond to the hamster challenge test. The two vaccines produced with the two strains protected the animals against the leptospira lethality caused by the LO4 strain; therefore, the strain virulence did not affect the efficacy. However, the bacterines were not capable to protect the hamsters against the formation of renal and genital carrier.

Keywords: Animal leptospirosis. Vaccines. Inoculation via. Carrier. Adjuvant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Macerado de órgãos de hamster infectado com a estirpe LO4, utilizando o homogeneizador <i>Stomacher</i> [®] 80 <i>Biomaster</i> para preparo do inóculo.....	44
Figura 2 – Inoculação via intraperitoneal (IP).....	47
Figura 3 – Inoculação via cérvico-vaginal (CV).....	47
Figura 4 – Inoculação via nasal (CN).....	47
Figura 5 – Inoculação via conjuntival (CN).....	47
Figura 6 – Reação de PCR. 1- Padrão molecular 100 bp; 6- rim positivo para <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola, estirpe LO4; 7- genital positivo para <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola, estirpe LO4; 2, 3, 4, 5 e 8 a 18 – amostras negativas; 19- controle negativo; 20- controle positivo: cultivo de <i>Leptospira</i> spp. sorovar Hardjo.....	60
Figura 7 – Hemorragias pulmonares e congestão hepática em hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via conjuntiva-nasal (CN).....	61
Figura 8 – Hemorragias pulmonares e congestão hepática em hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal (IP).....	61
Figura 9 – Útero hiperêmico e aumentado de volume em hamster inoculado com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via cérvico-vaginal (CV) e eutanasiado.....	61
Figura 10 – Enterite hemorrágica em hamsters mortos por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculados pela via conjuntiva-nasal (CN).....	61
Figura 11 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com hemorragia difusa, necrose tubular de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via Conjuntiva-nasal (CN).....	83
Figura 12 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com hemorragia glomerular e tubular com degeneração tubular de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal (IP).....	83

- Figura 13 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com congestão e hemorragia glomerular e tubular com degeneração tubular, necrose focal de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal (IP)..... 83
- Figura 14 – Corte histológico de útero, corado pela técnica de H.E., com congestão e hemorragia intersticial difusa de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via conjuntiva-nasal (CN)..... 83
- Figura 15 – Corte histológico de útero, corado pela técnica de H.E., com congestão e hemorragia intersticial e infiltrado inflamatório na luz do órgão (seta) e na mucosa de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal (IP)..... 84
- Figura 16 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via conjuntiva-nasal (CN) e eutanasiado..... 84
- Figura 17 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via conjuntiva-nasal (CN) e eutanasiado (maior aumento)..... 84
- Figura 18 – Corte histológico de útero, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via conjuntiva-nasal (CN) e eutanasiado..... 84
- Figura 19 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com infiltrado inflamatório intersticial de hamster imunizado com a vacina C e inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via intraperitoneal (IP) e eutanasiado..... 85
- Figura 20 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com infiltrado inflamatório intersticial de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via conjuntiva-nasal (CN) e eutanasiado..... 85
- Figura 21 – Corte histológico de testículo, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal (CN)..... 85

Figura 22 – Corte histológico de testículo, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal, CN (maior aumento).....	85
Figura 23 – Corte histológico de rim contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal, CN. Técnica de Warthin-Starry.....	87
Figura 24 – Corte histológico de rim contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal, CN. Técnica de Warthin-Starry.....	87
Figura 25 – Corte histológico rim contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 pela via intraperitoneal, IP. Técnica de Warthin-Starry.....	87
Figura 26 – Corte histológico de rim contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 pela via intraperitoneal, IP. Técnica de Warthin-Starry.....	87
Figura 27 – Corte histológico de útero contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal , CN. Técnica de Warthin-Starry.....	88
Figura 28 – Corte histológico de útero contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal , CN (maior aumento). Técnica de Warthin-Starry.....	88
Figura 29 – Corte histológico de testículo contendo a presença de leptospira (seta) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, IP. Técnica de Warthin-Starry.....	88
Figura 30 – Corte histológico de testículo contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 pela via intraperitoneal, IP. Técnica de Warthin-Starry.....	88
Figura 31 – Corte histológico de rim com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com <i>L. interrogans</i> sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via IP e eutanasiado. Técnica de Warthin-Starry.....	89

- Figura 32 – Corte histológico de rim com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina C, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via CN e eutanasiado. Técnica de Warthin-Starry..... 89
- Figura 33 – Corte histológico de testículo com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina E, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via IP e eutanasiado. Técnica de Warthin-Starry..... 89
- Figura 34 – Corte histológico de útero com aspecto normal de hamster de hamster imunizado com a vacina A, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via CV e eutanasiado. Técnica de Warthin-Starry..... 89

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Médias aritméticas dos títulos de anticorpos aglutinantes, na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes A, B e C e grupo controle (não vacinado) e desafiados com a estirpe LO4 pela via IP (Experimento 2) - São Paulo – 2007..... 72
- Gráfico 2 - Médias aritméticas dos títulos de anticorpos aglutinantes, na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes B, C, D, E e grupo controle (não vacinado) e desafiados com a estirpe LO4 pela via IP (Experimento 3) - São Paulo – 2007..... 78
- Gráfico 3 – Títulos e médias aritméticas de anticorpos neutralizantes de *pools* de soros sanguíneos de hamsters imunizados com vacinas monovalentes A, B, C, D e E contra a *L. interrogans* sorovar Canicola, avaliados pelo teste de inibição do crescimento - São Paulo – 2007..... 81

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Grupos experimentais para indução do estado de portador renal e genital por inoculação de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4, segundo a via, a concentração do inóculo e o sexo dos animais - São Paulo – 2007..... 46
- Tabela 2 – Vacinas monovalentes formuladas de acordo com a estirpe de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, número de passagens *in vitro* e adjuvantes utilizados - São Paulo – 2007..... 50
- Tabela 3 - Grupos experimentais de hamsters vacinados e controle (sem vacinação) e desafiados com a estirpe LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, para avaliação da eficácia de vacinas monovalentes na prevenção do estado de portador renal e genital, segundo a via de desafio, volume inoculado e sexo dos animais - São Paulo – 2007..... 52
- Tabela 4 – Padrão para avaliação da eficácia de vacinas contra leptospirose pelo teste de desafio, segundo *Code Federal Regulation* (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) - São Paulo – 2007..... 53
- Tabela 5 – Grupos experimentais para teste de eficácia de vacinas monovalentes na proteção contra *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, segundo o número de passagens *in vitro* e adjuvante - São Paulo – 2007..... 54
- Tabela 6 – Frequência de óbitos e de órgãos de hamsters positivos após a inoculação com duas concentrações de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4, pelas vias conjuntiva-nasal e cervico-vaginal e sexo, Experimento 1 - São Paulo – 2007..... 64
- Tabela 7 – Eficácia de vacinas monovalentes formuladas com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4 com duas e cinco passagens *in vitro* no teste de desafio pelas vias conjuntiva-nasal (CN), cervico-vaginal (CV) e intraperitoneal (IP) em hamsters, frente a vacina monovalente com a estirpe adaptada *in vitro*, *Hond Utrecht IV* (Experimento 2) - São Paulo – 2007..... 67
- Tabela 8 – Distribuição de títulos de anticorpos aglutinantes na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes A, B e C e não vacinados, desafiados com a estirpe LO4, segundo a via de desafio e sexo (Experimento 2) - São Paulo – 2007..... 69

Tabela 9 – Médias aritméticas dos títulos de anticorpos aglutinantes na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e <i>Hond Utrecht IV</i> , de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes A, B e C e não vacinados (Controle), desafiados com a estirpe LO4, segundo a via de desafio e sexo (Experimento 2) - São Paulo – 2007.....	71
Tabela 10 – Eficácia de vacinas monovalentes formuladas com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola estirpe LO4 e <i>Hond Utrecht IV</i> , com dois tipos de adjuvantes, saponina e hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃) no teste de desafio por via IP, de acordo com o CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) em hamsters (Experimento 3) - São Paulo – 2007.....	74
Tabela 11 – Distribuição de títulos de anticorpos aglutinantes na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e <i>Hond Utrecht IV</i> , de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes B, C, D, E e não vacinados, desafiados com a estirpe LO4 por via IP (Experimento 3) - São Paulo – 2007.....	76
Tabela 12 – Médias aritméticas dos títulos de anticorpos na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e <i>Hond Utrecht IV</i> , de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes B, C, D, E e não vacinados (Controle), desafiados com a com a estirpe LO4 por via IP (Experimento 3) - São Paulo – 2007.....	77
Tabela 13 – Médias aritméticas dos títulos de anticorpos na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e <i>Hond Utrecht IV</i> , de hamsters imunizados, via subcutânea, com as vacinas monovalentes A, B, C, D, E e não vacinados (Controle), conforme a dose preconizada pelo CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), Experimento 4 - São Paulo – 2007.....	79
Tabela 14 – Títulos e médias aritméticas de anticorpos neutralizantes dos <i>pools</i> de soros sanguíneos de hamsters vacinados com diferentes formulações de bacterinas contra <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola frente a estirpe <i>Hond Utrecht IV</i> - São Paulo - 2007.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
Ac.	anticorpos
Al(OH) ₃	hidróxido de alumínio
Al ₂ O ₃	óxido de alumínio
BVDV	vírus da diarreia viral bovina
CD4	cluster of differentiation type 4
CD4	cluster of differentiation type 4
cels	células
CFR	Code of Federal Regulation
CN	via conjuntiva-nasal
CO ₂	gás carbônico
CV	via cérvico-vaginal
Depto.	departamento
DL ₅₀	dose letal para 50% dos animais
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNPT	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
d.p.i	dia pós-infecção
Dr.	doutor
EDTA	ácido detilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMJH	Ellinghausen, MacCullough, Johnson & Harris
EUA	Estados Unidos da América
f.	fêmea
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	grama
H.E.	coloração de Hematoxilina-Eosina
HCl	ácido clorídrico
IC	teste de inibição do crescimento
IFN-γ	interferon-gama

Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IP	via intraperitoneal
L.	gênero <i>Leptospira</i>
LDBR	Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução
Lig	proteins <i>Leptospira</i> Ig-like
LipL	lipoproteína
LO4	estirpe de <i>L. Interrogans</i> sorovar Canicola isolada no estado do Paraná
LPS	lipopolissacáride
M	molar
m.	macho
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCE	microscópio de campo escuro
Méd. Arit.	média aritmética
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MHC	Major Histocompatibility Complex
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetros
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OmpL	Out membrane protein
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	nível de significância
pb	pares de base
PBS	solução salina fosfatada tamponada
PCR	Reação da polimerase em cadeia
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
PR	estado do Paraná
Prof.	professor
r RNA	ácido ribonucléico recombinante
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro

RS	estado do Rio Grande do Sul
SAM	teste de soroaglutinação microscópica
SP	estado de São Paulo
TBE	solução tampão Tris-Borato-EDTA
Th1	linfócitos T helper tipo 1
Th2	linfócitos T helper tipo 2
TNF- α	fator de necrose tumoral - alfa
U	unidade referente a atividade da enzima Taq Polimerase
USP	Universidade de São Paulo
V/cm	volts por centímetro
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
VPT	Departamento de Patologia
v/v	volume por volume

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
+	sinal matemático de mais ou indicação de intensidade (ex: 1+, 2+, 3+)
-	sinal matemático de menos, hífen ou valor numérico nulo (tabelas)
<	menor
>	maior
≥	maior ou igual
=	igual
α	alfa
μ	micro
γ	gama
US\$	dólar americano
®	marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Objetivos	27
2 REVISÃO DA LITERATURA	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Estirpes utilizadas	43
3.2 Estabilização da virulência da estirpe LO4	44
3.3 Animais	45
3.4 Preparo do inóculo infectante	45
3.5 Concentrações, vias de inoculação e indução do estado de portador (Experimento 1)	46
3.6 Metodologias empregadas para a identificação de portadores renais e genitais	48
3.6.1 Visualização microscópica direta.....	48
3.6.2 Cultivo de leptospira.....	48
3.6.3 Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	49
3.7 Preparo das vacinas	50
3.8 Eficácia das vacinas contra a formação de portadores (Experimento 2)	51
3.9 Influência do adjuvante e da virulência da estirpe na eficácia das vacinas (Experimento 3)	53
3.10 Avaliação sorológica das vacinas (Experimento 4)	54
3.10.1 Preparo dos antígenos.....	55
3.10.2 Prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM).....	55
3.10.3 Teste de inibição do crescimento (IC).....	56
3.11 Histopatologia	57

3.11.1 Coloração pelo método de Warthin-Starry.....	57
3.11.2 Coloração por Hematoxilina-Eosina (H.E.).....	57
3.12 Tratamento Estatístico.....	57
4 RESULTADOS.....	59
5 DISCUSSÃO.....	90
6 CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	106
APÊNDICES.....	123

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 1950, a leptospirose despertou grande interesse do meio veterinário, sendo reconhecida como uma das principais doenças dos bovinos. Durante o período de 1960 a 1990 foi considerada como a principal zoonose de implicação veterinária no mundo (FAINE et al., 1999). As perdas econômicas decorrentes da doença estão associadas direta e indiretamente ao abortamento, queda de produção de leite e carne, além dos custos com medicamentos e assistência veterinária (BLOOD; RADOSTITS, 1991; FAINE et al., 1999). As implicações da leptospirose em saúde pública, também tem sido preocupantes. Em 1999, na China, foram registrados 500.000 casos e no Brasil 28.360 com 0,8% de mortalidade (VINETZ, 2001).

Na cadeia epidemiológica da doença a perpetuação da leptospirose em determinado ecossistema depende, sobretudo de condições adequadas para a sobrevivência e multiplicação da bactéria, tais como clima, solo e hospedeiros. A interação desses componentes como um todo favorece o estabelecimento de focos endêmicos que podem se tornar epidemias. Os portadores renais provenientes de infecções crônicas são os principais mantenedores de leptospiras no ambiente (FAINE et al., 1999).

A resposta imune humoral é o principal mecanismo de resistência à infecção e reinfecção por leptospiras, sendo instalada entre dois a 10 dias pós-infecção e detectável na mucosa vaginal a partir do 14º dia (HUHN et al., 1975; ADLER; FAINE, 1977, FAINE et al., 1999). A imunização é imprescindível para o controle da leptospirose dos animais domésticos, pois reduz sintomas clínicos de metrite, mastite sanguinolenta, nascimento precoce e abortamentos, entretanto, alguns estudos evidenciam que não impede a formação do portador renal (HOLROYD, 1980; MADRUGA et al., 1983).

No mercado brasileiro existem várias bacterinas contra a leptospirose bovina, cuja composição contém cinco ou seis sorovares, sendo os mais comuns: Hardjo e/ou Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona e Grippotyphosa.

A avaliação da eficácia das vacinas é muito complexa e discutível. Alguns autores aceitam a sorologia como parâmetro de verificação da qualidade da vacina (FAINE et al., 1999). O *Code Federal Regulation*, CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2004)

recomendam que seja empregado o teste de desafio em hamsters ou em cobaias jovens. Esses testes avaliam a eficácia das vacinas através do índice de sobrevivência à infecção aguda e não no combate às infecções crônicas e a formação de portadores renais ou genitais.

O Brasil possui grande potencial pecuário, com o rebanho bovino estimado em 207 milhões de cabeças (IBGE, 2005) e as doenças da esfera reprodutiva causam grandes prejuízos ao setor. Em decorrência da grande importância econômica da leptospirose nas criações zootécnicas, principalmente pela infecção crônica, responsável pela propagação e permanência da bactéria no ambiente, esta pesquisa pretendeu estudar a relação das vias e dose de infecção no estabelecimento do estado de portador renal e/ou genital, avaliação da eficácia de vacinas experimentais e influência da virulência da estirpe e do adjuvante na melhoria da vacina.

1.1 Objetivos

Utilizar a *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4, autóctone e virulenta e o hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental para:

- 1) Avaliar o efeito da concentração de leptospiros do inóculo infectante e das vias conjuntiva-nasal e cérvico-vaginal comparadas à intraperitoneal (via controle) no estabelecimento do portador renal e genital.
- 2) Verificar a importância da manutenção da virulência da estirpe empregada na produção de bacterinas monovalentes, comparando o efeito de duas e cinco passagens *in vitro*, na prevenção da leptospirose e do estado de portador renal e genital.
- 3) Avaliar a resposta humoral induzida por bacterinas monovalentes empregando-se a reação de soroaglutinação microscópica.
- 4) Correlacionar os níveis de anticorpos neutralizantes detectados no teste de inibição de crescimento com o teste de eficácia vacinal pelo desafio realizado pelas vias conjuntiva-nasal, cervico-vaginal e intraperitoneal (controle).
- 5) Comparar o efeito de dois tipos de adjuvantes na eficácia de bacterinas monovalentes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A leptospira é uma bactéria aeróbica obrigatória e cresce *in vitro* em temperaturas de 28 a 30°C. Apresenta formato helicoidal e dois filamentos axiais, também denominados de flagelos periplásmicos, responsáveis pela mobilidade. Sua membrana externa, assim como de outras espécies de espiroquetas, possui várias camadas que envolvem completamente os filamentos axiais e o cilindro protoplásmico helicoidal. É nesse cilindro que se encontra o material nuclear, o citoplasma, a membrana citoplasmática e a porção de peptidoglicano da parede celular (QUINN et al., 1994; HAAKE, 2000a). Seus componentes de lipopolissacáride (LPS) são similares aos de outras bactérias Gram negativas, porém com menor atividade endotoxigênica (SHIMIZU et al., 1987). Até 1988, a classificação do Gênero *Leptospira* era realizada por requerimentos nutricionais que o subdividia em duas espécies, *L. interrogans*, contendo os sorovares patogênicos e *L. biflexa*, reunindo as leptospiras saprófitas. Com essa divisão, foi possível identificá-las pelas características fenotípicas (sorológicas) e virulência, subdividindo-as em sorogrupos e sorovares. Estima-se a existência de aproximadamente 300 sorovares de leptospiras patogênicas e 25 sorogrupos (AHMED et al., 2006). Posteriormente, com a introdução da classificação por hibridização do DNA, o gênero *Leptospira* foi dividido em 17 genomoespécies (YASUDA et al., 1987; BRENNER et al., 1999; LEVETT, 2001; AHMED et al., 2006).

Diferentes espécies de roedores podem ser reservatórios de distintos sorovares, mas normalmente, os ratos sinantrópicos são os principais responsáveis pela persistência dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Ballum. Os animais domésticos também se comportam como reservatórios para alguns sorovares, como os bovinos para Hardjo, Pomona e Grippotyphosa; suínos para Pomona, Tarassovi e Bratislava; ovinos para Pomona e Hardjo e cães para o sorovar Canicola (FAINE et al., 1999).

A leptospirose pode ser transmitida pelo contato com água e solo contaminados por urina, líquidos e tecidos reprodutivos de animais infectados (FAINE et al., 1999). O sêmen contaminado também é uma via de eliminação que pode proporcionar a transmissão da doença (KIKTENKO; BALASHOV; RODINA, 1976; GOTTI, 2006). A presença da leptospira no útero pode causar a infecção fetal

e subseqüentes problemas reprodutivos crônicos, além de excreção de leptospira pós-parto nas descargas uterinas (ELLIS, 1994).

Soto et al. (2006) evidenciaram que em suínos, a leptospira foi capaz de ser transmitida verticalmente, isto é, de mães para fetos, e nascerem leitões aparentemente saudáveis, mas infectados e possíveis propagadores da bactéria no ambiente.

São poucos os trabalhos que avaliam efetivamente perdas econômicas atribuídas à leptospirose. Bennett (1993) estimou que a cada 100 vacas leiteiras de alta produção infectadas pelo sorovar Hardjo, os prejuízos podem chegar até US\$ 29.500,00 em sete anos.

Dhaliwal et al. (1996) correlacionaram as falhas reprodutivas de rebanhos leiteiros com títulos de anticorpos contra a leptospira, mesmo que baixos. Porém, Genovez et al. (2001) constataram que a soropositividade dos animais para os sorovares Hardjo e Wolffi não influenciou o desempenho reprodutivo do rebanho bovino de corte criados em sistema extensivo.

O sorovar Canicola é descrito como altamente patogênico e responsável por causar prejuízos em decorrência da doença clínica em bezerros, cujos principais sintomas são síndrome hemolítica, hemoglobinúria e morte (YERUHAM et al., 1997; TERCILLA; CUETO; CHAMIZO, 2006).

Ahmed et al. (2006) descreveram a leptospirose como uma doença infecciosa emergente, recentemente considerada como um problema importante na saúde mundial, por sua alta morbidade e mortalidade em diferentes partes do planeta. O número de casos de leptospirose seria subestimado em decorrência da anamnese e exame clínico mal realizados e o não uso dos testes apropriados para o seu diagnóstico.

O mecanismo de transmissão mais freqüente para humanos e animais é o contato direto ou indireto com a urina de animais infectados. A incidência é significativamente maior em países tropicais úmidos (EVERARD; EVERARD, 1993), devido a maior sobrevivência da bactéria no ambiente, decorrente dos altos índices pluviométricos (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Os cães são considerados como a segunda fonte de infecção mais importante para os humanos, perdendo apenas para os roedores, possivelmente, por coabitarem, principalmente nos grandes centros urbanos (BROD et al., 2005). O uso constante de vacinas em cães, em algumas regiões da Europa e da América do

Norte, está ocasionando uma interferência na prevalência de alguns sorovares e aumentando a de outros, como é o caso dos sorovares Grippotyphosa, Sejroe e Bratislava (ANDRÉ-FONTAINE et al., 2003; KLASSEN et al., 2003; SCHREIBER et al., 2005).

Alguns levantamentos sorológicos em humanos ressaltam a importância dos animais domésticos como fontes de infecção para o homem. Corrêa (1975) encontrou na Amazônia 8,5% de pessoas aparentemente saudáveis, reagentes sorologicamente para os sorovares Grippotyphosa, Panama, Icterohaemorrhagiae e Wolffi. Agesilas et al. (2005) descreveram 16 casos de leptospirose humana no Hospital de Saint-Denis na França entre os anos de 2001 e 2004, dos quais 66% causados pelo sorovar Canicola e 17% pelos sorovares Icterohaemorrhagiae e Sejroe. Hernandez et al. (1991) relataram um surto em seis crianças no Canal de Cimarron em Cuba no ano de 1986 atribuídos ao sorogrupo Canicola, sendo, possivelmente, os cães da redondeza a fonte de infecção.

No Brasil, a leptospirose bovina é descrita em praticamente todos os estados, sendo considerada endêmica em quase todos os rebanhos (SALLES; LILENBAUM, 2000). Favero et al. (2001), em 31.325 amostras de soros de bovinos examinadas provenientes de 21 estados, constataram rebanhos sororeagentes em todos os estados, num total de 37,9% das amostras, sendo o sorovar Hardjo o mais freqüente. Vasconcellos et al. (1997) também verificaram maior prevalência de Hardjo em 2.448 amostras de soros de bovinos provenientes de 56 rebanhos de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul.

Genovez et al. (2001) referiram que os sorovares Hardjo e Wolffi têm sido os mais prevalentes no estado de São Paulo, tanto nos rebanhos de corte como nos de leite. O mesmo foi observado por Pellegrin et al. (1999) no Pantanal Matogrossense, por Lilenbaum, Santos e Barbosa (1995) no estado do Rio de Janeiro e por Oliveira et al. (2001) em Guaranhuss, Pernambuco. No estado de São Paulo, Castro (2006) encontrou 46% de fêmeas bovinas sororeagentes e 55% das propriedades rurais positivas para o sorovar Hardjo.

No município de Aruará no Pará, 97% das propriedades pesquisadas por Homem et al. (2001) apresentaram animais reagentes para pelo menos um dos 24 sorovares de leptospiros testados e verificaram que 61,2% das amostras examinadas foram positivas para o sorovar Hardjo e 9% para o sorovar Bratislava. A

prevalência de aglutininas em amostras de soro sangüíneo de pessoas, que tinham contato com tais animais, foi de 32,8% e os sorovares Bratislava, Hardjo e Grippytyphosa foram os mais freqüentes. Esses dados confirmam a participação dos bovinos como fonte de infecção para os humanos.

Os testes sorológicos são sorogrupo-específicos e a identificação dos sorovares de leptospiras circulantes em uma determinada região só é possível com o isolamento e tipificação.

No Brasil foram isolados diversos sorovares de leptospiras de animais tais como: Brasiliensis (SANTA ROSA, 1970), Goiano (SANTA ROSA et al., 1980a), Guaicurus (SANTA ROSA et al., 1980a; VASCONCELLOS et al., 2001), Canicola, Pyrogenes, Grippytyphosa (SANTA ROSA et al., 1980b), Ranarum (GENOVEZ et al., 1986), Hardjo, Pomona e Wolffi (GENOVEZ et al., 1984; LANGONI et al., 1999). Brod et al. (2005) isolaram de um cão o sorovar Canicola em Pelotas (RS), com sinais clínicos de diarréia sanguinolenta, vômito e saliva sanguinolenta.

Novas estirpes dos sorovares Copenhageni, Bananal, Ranarum e Rushan tem sido encontradas em animais no Brasil (Informação verbal¹). Esses relatos demonstram a grande diversidade de sorovares circulantes no país. Recentemente, Silva et al. (2006) isolaram pela primeira vez uma amostra de *L. noguchii* sorovar Autumnalis de um ovino abatido em Pelotas (RS).

O sucesso no controle da leptospirose dos animais domésticos depende do diagnóstico correto, tratamento apropriado dos doentes e portadores da doença crônica e adoção de medidas preventivas, dentre elas a vacinação (HUHN et al., 1975; FAINE et al., 1999).

As provas laboratoriais mais utilizadas para o diagnóstico da leptospirose são a soroaglutinação microscópica (SAM), teste de referência da OMS (Organização Mundial da Saúde), e o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Porém, o sinal nessas provas depende da produção de anticorpos circulantes em quantidade suficiente para sua detecção, o que pode levar de oito a dez dias pós-infecção (SMYTHE et al., 2002). Na mucosa vaginal, o pico de produção de IgG e IgA ocorre por volta da oitava semana e não apresenta correlação com os níveis de anticorpos séricos (LEONARD et al., 1994; DHALIWAL et al., 1996).

¹ VASCONCELLOS, S. A., 2005. Palestra: “ Revisão dos sorovares de leptospiras isolados no Brasil em animais silvestres e domésticos”, proferida no XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia – 22 a 25 de novembro de 2005, Santos, SP.

A Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), vem sendo utilizada com vantagens, por ser uma técnica sensível, específica e rápida. A PCR é aplicada com grande sucesso para a detecção de muitos microrganismos em uma variedade de amostras clínicas tais como soro, líquido cerebrospinal, urina, fezes e tecidos (BAL et al., 1994). Tem como vantagem a redução do árduo trabalho de isolamento e cultivo e agilidade de diagnóstico de casos agudos (SMYTHE et al., 2002).

A PCR também é uma alternativa para identificação de leptospiras em materiais de difícil isolamento, tais como o sêmen nas centrais de inseminação artificial (HEINEMANN et al., 1999; GOTTI, 2006).

A técnica de PCR possibilitou a identificação da presença de leptospira no trato genital de suíno infectado com o sorovar Bratislava o que não foi possível pelo isolamento da bactéria por cultivo da urina do animal (SCHÖNBERG et al., 2005).

As colorações com prata auxiliam na identificação de leptospiras nos diferentes órgãos dos hamsters inoculados, como fígado, pulmão, cérebro, rins, testículo, útero e ovário (SANGER et al., 1961; ABDU; SLEIGHT, 1965; BADIOLA; THIERMANN; CHEVILLE, 1983; OLIVA et al., 1998; HAANWINCKEL; MEGID, 2004).

Wild et al. (2002) demonstraram que a impregnação com prata nos cortes histológicos para identificação de leptospiras nos órgãos de cães infectados apresenta correlação com a imunohistoquímica. Rossetti et al. (2004) compararam os resultados de exames efetuados pelas técnicas de cultivo, impregnação pela prata e imunohistoquímica aplicadas para a detecção de leptospiras nos rins de camundongos naturalmente infectados e não encontraram diferenças significantes entre as mesmas, com percentuais de positividade de 39%, 44% e 46% respectivamente. Porém, não conseguiram estabelecer relação entre presença de leptospiras e lesões histopatológicas.

Brandespim et al. (2004) observaram que na fase aguda da doença em hamsters, a coloração pela prata foi mais eficaz na identificação da presença de leptospiras no aparelho reprodutor do que a imunohistoquímica, entretanto, na fase crônica não houve diferença entre as duas técnicas.

Silva et al. (2005) constataram que a visualização direta em microscópio de campo escuro de amostras de urina de vacas abatidas foi mais eficiente na identificação de leptospira do que o isolamento e da imunohistoquímica.

A vacinação é a principal medida de prevenção e controle da enfermidade. Mas para uma vacina ser eficaz é necessário que tenha capacidade de prevenir a leptospirúria dos portadores e reduza a incidência da doença em humanos, principalmente os trabalhadores rurais (ALLEN; MENEY; WILKS, 1982; FREUDENSTEIN; HEIN, 1991). As vacinas veterinárias comerciais para bovinos são bacterinas, variando na sua composição o número de sorovares e o tipo de adjuvante utilizado.

Para humanos, atualmente, apenas a vacina cubana *Vax-Spiral*[®], produzida pelo Instituto Finlay está disponível comercialmente. Essa bacterina contém os sorovares Icterohaemorrhagiae, Canicola e Mozdok e utiliza o hidróxido de alumínio como adjuvante. A eficácia e segurança da *Vax-Spiral*[®] foram confirmadas em hamsters e em seres humanos (OLIVA et al., 1998; MARTINÉZ et al., 2004).

O LPS da leptospira, caracterizado como antígeno imunodominante, induz resposta imune contra seus epítomos, e promove proteção do tipo sorovar-específica (ISOGAI et al., 1990; BOLIN et al., 1991; LEVETT, 2001; MATSUNAGA et al., 2003; KOIZUMI; WATANABE, 2004), por essa razão é necessário que as vacinas sejam produzidas com os sorovares presentes na região (LEVETT, 2001).

Há relatos de respostas cruzadas entre alguns sorovares, tais como Hardjo e Wolffi (COSTA et al., 1998; TABATA et al., 2002). As bacterinas com os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae podem prevenir a forma letal da doença provocada por sorogrupos heterólogos como Australis, Autumnalis, Sejroe e Pyrogenes (SONRIER et al., 2000).

Além da resposta imune humoral, a resposta mediada por células também é importante para a proteção contra a leptospirose (MARINHO et al., 2005; PALANIAPPAN et al., 2006). Naiman et al. (2001) observaram que a vacinação com bacterina composta com o sorovar Hardjo promoveu a proliferação de células mononucleares, principalmente a do tipo Th1, produtoras de interferon- γ (IFN- γ) e as bacterinas contendo adjuvante de hidróxido de alumínio ou mesmo os próprios componentes da espiroqueta aumentaram resposta do tipo Th1.

Vernel-Pauillac e Mérien (2006) verificaram que hamsters infectados experimentalmente com o sorovar Icterohaemorrhagiae aumentaram a produção de RNAm das citocinas de resposta do tipo Th1, como TNF- α , IFN- γ e IL-12 nas primeiras horas pós-infecção. As citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e IL-10 foram detectadas entre 24 a 96 horas pós-infecção.

A elaboração da resposta imunológica contra microrganismos pelo hospedeiro depende do local de exposição. Nas mucosas, por exemplo, a resposta imune pode ser desencadeada por diferentes mecanismos que influenciam na patogenia da doença. A mucosa do sistema respiratório, quando sensibilizada por bactérias, pode aumentar a liberação de peptídios antimicrobianos na luz do órgão, seguida por secreção de quimoquinas e citocinas na submucosa iniciando um processo inflamatório com migração de fagócitos, células dendríticas e linfócitos (BALS; HIEMSTRA, 2004). Na mucosa do sistema reprodutivo das fêmeas, a resposta imune é influenciada pela progesterona e pelo estradiol que interferem na transferência de imunoglobulinas do sangue para o tecido, na migração de linfócitos e macrófagos e na síntese de receptores para IgA nas células epiteliais uterinas (WIRA; ROSSOL, 1995). Os testículos são considerados sítios “privilegiados” do sistema imune, caracterizado pela tolerância ou “inércia imunológica” (NARS et al., 2005).

Os isótipos de imunoglobulinas produzidos pela resposta imune podem estar relacionados à eficácia no controle da enfermidade. Natarajaseenivasan et al. (2004) identificaram diferenças no reconhecimento de proteínas de membrana de leptospiros para os isotipos IgG e IgM em infecções agudas e crônicas de pacientes doentes, demonstrando que dependendo do predomínio do isótipo de imunoglobulinas e da fase da doença, os alvos da resposta imune mudam.

Hanson (1976) relatou que os níveis de IgG neutralizantes induzidos por bacterinas reduzem significativamente entre oito a 12 meses pós-vacinação, sendo necessária revacinação semestral ou anual para estabelecer os níveis adequados. A detecção desses anticorpos é um pouco mais tardia e as imunoglobulinas são do tipo IgG, enquanto que nos anticorpos aglutinantes predomina o tipo IgM, considerado menos efetivo na proteção (HANSON, 1977).

Em ensaios de campo, a proteção conferida pelas bacterinas antileptospirose, não foi capaz de eliminar o estado de portador renal e a leptospirúria. De fato, o poder imunogênico destas bacterinas é restrito e conseqüentemente, os títulos de anticorpos pós-vacinais são baixos e de curta duração (BOLIN et al., 1989; BOLIN; ZUERNER; TRUEBA, 1989; BOLIN et al., 1991; LEVETT, 2001; ARDUINO et al., 2004).

Vacinas constituídas por mais de um sorovar podem ocasionar supressão da resposta imune contra alguns sorovares presentes na composição e as diferentes

concentrações de antígenos empregadas por dose também podem ocasionar falhas vacinais (SIDDIQUE; SHAH, 1990; BOLIN et al., 1991; SRIVASTAVA, 2006). Além disso, as diferenças fenotípicas dentro de um mesmo sorovar podem agravar a ausência de proteção entre estirpes vacinais e selvagens (ELLIS et al. 1988; SILBECK; LYON; STALLMAN, 1992).

Algumas vacinas comerciais preparadas com o sorovar Canicola e destinadas a cães têm demonstrado eficácia contra os principais sintomas clínicos, a leptospiremia, a leptospirúria e lesões renais (BROUGHTON; SCARNELL, 1985; ANDRE-FONTAINE et al., 2003; SCHREIBER et al., 2005). A vacinação com o sorovar Bratislava tem mostrado aumento no tamanho da leitegada e na taxa de parição de matrizes suínas (FRANTZ; HANSON; BROWN, 1989; ELLIS et al., 1986).

O baixo desempenho da bacterina contendo o sorovar Hardjo pode ser conseqüência de pouca capacidade imunogênica da estirpe utilizada, ou mesmo pela baixa quantidade de massa antigênica do sorovar na vacina (BOLIN et al., 1991, TABATA et al., 2002). Bolin e Alt (2001) observaram que uma vacina monovalente com a estirpe Hardjobovis foi capaz de proteger os bovinos da colonização renal e da leptospirúria na infecção experimental.

Madruga et al. (1983) verificaram que a imunização de vacas prenhes reduziu os sintomas clínicos, como metrite, parto pré-maturo e mastite sanguinolenta, observados nas vacas não vacinadas após o desafio com o sorovar Hardjo. A vacinação não evitou a leptospirúria, mas reduziu a duração, passando de 12,5 semanas nos animais não vacinados para nove semanas e meia nos animais vacinados.

Bacterinas produzidas com os sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Canicola, contendo $1,2 \times 10^9$ leptospiros/mL por sorovar e 1,5 mg/mL de hidróxido de alumínio protegeram 100% dos hamsters contra letalidade e persistência da infecção. O índice de sobrevivência foi proporcional a quantidade de antígeno por dose vacinal aplicada aos animais (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991).

A virulência das estirpes sementes empregadas na produção de vacinas tem sido destacada como ponto importante para a melhoria da qualidade das bacterinas (GONZÁLEZ et al., 2005; MAURA et al., 2006). A atenuação da virulência ocasiona perda da antigenicidade da estirpe (BERNASOVSKAIA; KONDRATENKO; MEL'NITSKAIA, 1994). A constante ativação das estirpes por passagens em hamsters seleciona as populações de bactérias capazes de resistir ao sistema imune

do animal e, conseqüentemente, conserva a virulência da estirpe (FAINE et al., 1999; MAURA, et al., 2006).

Bacterina produzida com a estirpe *Hond Utrecht IV* protegeu hamsters quanto a letalidade e contra a colonização renal, quando se utilizou dose de 6×10^8 leptospiras/dose (AURAN; JOHSON; RITZI, 1972).

Painter e Ellinghausen Junior (1976) induziram o mesmo nível de proteção contra a letalidade e colonização renal em hamsters, utilizando uma vacina produzida com uma estirpe virulenta do sorovar Canicola e outra produzida com a estirpe *Hond Utrecht IV*. Eles verificaram que o desafio realizado antes do 30º dia pós-vacinação necessitou de maior concentração de antígeno nas bacterinas do que quando o desafio ocorreu posteriormente.

A variação dos meios empregados para o cultivo de leptospiras, principalmente os que contêm soro, prejudicam a estabilização da virulência das estirpes e causam heterogeneidade nos lotes de vacinas. Por isso, o congelamento é o método de estocagem que minimiza eventuais problemas desta ordem (MAURA et al., 2006).

Além da quantidade e qualidade dos antígenos, o adjuvante também exerce papel essencial na eficácia das bacterinas. Adjuvante imunológico é qualquer substância capaz de proporcionar uma resposta imune maior contra um antígeno do que o uso do mesmo sozinho (RAMON, 1924). Os adjuvantes podem modular a resposta imune humoral, não só aumentando o título de imunoglobulinas, mas também a avidéz , a especificidade e o tipo de isótipo. Pode ainda prolongar a duração e a velocidade da resposta imune e direcioná-la para celular, humoral sistêmica ou local, como por exemplo, nas mucosas. Assim, seria possível reduzir a quantidade de antígeno, o número de imunizações e, conseqüentemente, o custo da vacina (SINGH; O'HAGAN, 1999; RAJPUT et al., 2007). Porém, a eficácia do adjuvante pode ser influenciada pela via de aplicação da vacina (AGUILAR; RODRIGUEZ, 2007).

Dentre os diferentes adjuvantes, a saponina e o hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) são os mais utilizados em medicina veterinária.

As saponinas são esteróides ou glicosídeos triterpenóides encontradas em plantas, algas e em algumas bactérias, e modulam a resposta mediada por células assim como aumentam a produção de anticorpos. A Quil A, normalmente utilizada nas vacinas veterinárias, é a fração de saponina derivada do extrato aquoso da

casca da *Quillaja saponaria* que contêm mais de 23 compostos diferentes e é classificada como adjuvante não-particulado. A principal fração do extrato purificada por cromatografia reversa é o QS21, que tem sido estudado como estimulador de resposta celular (CAMPBELL; PEERBAYE, 1992; COX; COUTLER, 1997; RAJPUT et al., 2007).

De forma geral, as saponinas induzem a expansão de células imunocompetentes, como as células T *helper* e linfócitos B, resultando em alta produção de anticorpos (CAMPBELL; PEERBAYE, 1992; COX; COUTLER, 1997). Também estimulam a apresentação de antígenos pelo MHC tipo I e conseqüentemente, resposta citotóxica via células T CD8+ (NEWMAN et al., 1992; NAIMAN et al., 2001).

O hidróxido de alumínio é largamente utilizado em medicina veterinária pelo seu baixo custo, segurança e facilidade de formulação, sendo utilizado desde 1930. É considerado como um adjuvante particulado, capaz de produzir efeito de depósito do antígeno, o que pode formar granulomas. Estimula forte resposta do tipo Th2, além de linfócitos citotóxicos, resposta mediada por células e aumenta a produção de IgE (VANSELOW, 1987; COX; COULTER, 1997).

O uso do hidróxido de alumínio foi capaz de induzir resposta antígeno-específica pelas células T contra a ovoalbumina, direcionando a resposta imune para o tipo Th2 e aumento na produção de IL-1 β e IL-18, além das interleucinas IL-4, IL-5 e IFN- γ pelas células dendríticas (SOKOLOVSKA; HEM; HOGENESCH, 2007).

Os fabricantes de vacinas contra a leptospirose necessitam seguir protocolos internacionais para avaliação da eficácia, como o CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) e da OIE (2004). Esses testes exigem desafio em animais de laboratório para os sorovares incluídos na vacina. Por isso, torna-se necessária a manutenção em laboratório de estirpes virulentas dos diversos sorovares. Entretanto, essas amostras costumam perder rapidamente a virulência quando cultivadas *in vitro* e nem sempre causam a morte dos animais no intervalo preconizado (SANGER et al., 1961; STALHEIM, 1966; FAJARDO et al., 1998; GONZÁLEZ; DÍAZ; MATOS, 1999).

González, Díaz e Matos (1999) ressaltaram a importância da reativação das estirpes para testes de eficácia de vacinas, com o uso de inóculos padronizados que permitam a estimativa do tempo de morte do hamster e dessa forma seguir os protocolos com maior exatidão. Sanger et al. (1961) reverteram a virulência de uma

estirpe do sorovar Pomona, após perda por cultivo *in vitro* com passagens sucessivas em hamsters. Foram necessárias 11 passagens em animais para o aparecimento de sintomas e 16 para a estabilização da mortalidade dos hamsters no quarto dia pós-inoculação.

O hamster (*Mesocricetus auratus*) é considerado modelo para a leptospirose humana e animal, sendo utilizado nos estudos da evolução clínica, da patogenicidade e caracterização patológica da leptospirose (OLIVA et al., 1998).

Os principais sintomas clínicos observados nestes animais após a inoculação com leptospirosas virulentas são mudanças comportamentais como prostração e depressão, irritabilidade e excitabilidade quando molestados, além de piloereção, diminuição da abertura palpebral e dependendo do sorovar inoculado, icterícia, epistaxe e hematuria. As lesões macroscópicas mais frequentes são: petéquias e equimoses hemorrágicas pulmonares, nas pleuras e serosas, congestão hepática, esplênica e renal, hemorragias intestinais e icterícia. As características e severidade das lesões dependem do sorovar e da virulência da estirpe. Microscopicamente são observados edema, congestão e hemorragia nos pulmões, rins e fígado. As lesões teciduais nos rins se caracterizam por degeneração e necrose do epitélio tubular e na fase crônica é possível observar tecido conjuntivo no parênquima, degeneração hialina e infiltrados de células inflamatórias (SANGER et al., 1961; ABDU; SLEIGHT, 1965; BADIOLA; THIERMANN; CHEVILLE, 1983; OLIVA et al., 1998; HAANWINCKEL; MEGID, 2004).

A infecção experimental de animais de diferentes espécies depende da virulência da estirpe, sorovar, concentração do inóculo infectante e via de inoculação, além da susceptibilidade da espécie à bactéria.

Miller (1972) induziu infecção crônica em hamsters com duas estirpes do sorovar Pomona por até 100 dias após a inoculação via intraperitoneal, confirmado pelo cultivo de urina e presença de leptospirosas no tecido renal, porém este autor não mencionou a concentração de leptospirosas contidas no inóculo.

Bielanski et al. (1998) infectaram novilhas por inoculação da *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis pelas vias uterina, cervical, subconjuntival e intranasal com a dose-infectante de 5×10^4 leptospirosas. A confirmação da infecção foi estabelecida pelo teste de SAM e a presença de leptospirosas nas mórulas e embriões por cultivo e PCR, comprovando que a transferência de embriões também pode ser uma via de transmissão da leptospirose em bovinos.

Brandespim et al. (2004) estabeleceram a infecção crônica em hamsters com inoculação via intraperitoneal de estirpe do sorovar Pomona associada a subdosagens de antibióticos, e desse modo acompanharam a patogenia da doença no aparelho reprodutor masculino durante 30 dias.

Macedo et al. (2004) constataram que a via de inoculação interfere na reprodutibilidade da leptospirose em hamsters, e a via oral foi a menos eficaz na indução de sintomas e a via intraperitoneal, a mais eficiente.

Gallo et al. (2006) induziram a leptospirose experimental em bovinos por instilação de suspensão do sorovar Hardjo (genótipo Hardjobovis) via conjuntival por três dias consecutivos. A infecção foi confirmada com cultivo de amostras de urina.

Os sorovares Hardjo, Wolffi e Guaricura, com raras exceções, não induzem morte ou estabelecem infecção em hamsters, quando mantidas *in vitro* por longo tempo (TABATA et al., 2002), impossibilitando o seu uso no teste de potência com desafio. A OIE (2004) recomenda nesses casos, que a eficácia seja medida por proteção contra a colonização renal ou a indução de anticorpos após a inoculação em coelhos.

Avaliação sorológica das vacinas por títulos de anticorpos aglutinantes é complicada devido a grande variação da resposta dos animais aos diferentes sorovares.

Ris e Hamel (1979) verificaram que bacterinas produzidas com o sorovar Pomona e Al(OH)₃ induziram títulos de anticorpos aglutinantes e neutralizantes em novilhas inferiores aos títulos induzidos pela bacterina contendo o adjuvante completo de Freund.

Broughton e Scarnell (1985) observaram que uma bacterina contendo os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae protegeu cães contra pirexia, colonização renal e leptospirúria, porém o sorovar Icterohaemorrhagiae induziu título de anticorpos aglutinantes maior do que o sorovar Canicola. Após a inoculação do desafio os títulos de anticorpos dos animais vacinados foram iguais aos dos animais não vacinados.

O aumento na quantidade de antígeno do sorovar Hardjobovis contido na vacina não resultou no aumento do título sorológico de aglutininas em bovinos vacinados e revacinados. Além disso, após o desafio, o grupo vacinado apresentou títulos de anticorpos menores do que os animais não vacinados (BOLIN et al., 1991).

Arduino et al. (2004) verificaram que a vacinação com bacterina comercial de bovinos previamente sororeagentes e animais não reagentes não induziu títulos sorológicos de anticorpos aglutinantes maior ou igual a 100.

Genovez et al. (2004) também observaram a redução dos títulos de anticorpos pós-vacinação em bovinos nelores previamente sororeagentes, sugerindo que esta redução possa ser utilizada para monitoramento do efeito vacinal e que o surgimento de altos títulos seja indicativo da introdução de um sorovar no rebanho.

Arduino (2005) verificou que mesmo com a revacinação, vacinas comerciais não induziram altos títulos de aglutininas em bovinos. Os sorovares Hardjo e Wolffi foram os que induziram maiores títulos com média de 500. Para o sorovar Canicola, duas vacinas testadas não induziram títulos iguais ou maiores que 100 para nenhum dos animais vacinados e revacinados e outras duas induziram títulos de 100 em apenas 20% dos animais, demonstrando que este sorovar estimula menos a produção de aglutininas do que os demais sorovares contidos nas vacinas.

Vega et al. (2005) avaliaram a indução de anticorpos aglutinantes em bovinos por bacterinas antileptospirose com diferentes adjuvantes e observaram aumento na produção de anticorpos com o uso do hidróxido de alumínio, porém os títulos não foram superiores a 100.

Nardi Junior et al. (2006) também verificaram que a vacinação de búfalos com bacterinas comerciais, mesmo com a dose reforço, não induziram títulos de aglutininas maiores que 100 para os cinco sorovares contidos nas vacinas.

Soto et al. (2007) verificaram que bacterinas comerciais ocasionaram baixos títulos de anticorpos aglutinantes e neutralizantes em porcas, resultando na deficiência de transferência de imunidade via colostro aos leitões.

Nas provas sorológicas o título de anticorpos mensurado pós-vacinação pode ser alterado pelo antígeno empregado. Normalmente, quando se utiliza o antígeno homólogo ao da vacina os títulos de anticorpos tendem a ser maiores do que quando se utiliza antígeno heterólogo.

Brod et al. (2005) usaram uma estirpe selvagem regional do sorovar Canicola na prova de SAM, comparando com a estirpe de coleção de referência antigênica proveniente da OIE, e observaram que soros de cães e humanos sabidamente reagentes para o sorovar Canicola apresentaram títulos de aglutininas maiores do que os obtidos quando a prova foi executada com a estirpe de referência, o que

confirma a existência de diferenças antigênicas entre a estirpe circulante e a referência, proveniente do exterior.

Uma alternativa é a quantificação da resposta das vacinas através da inibição do crescimento de leptospiras *in vitro*, que permite a utilização de sorovares não patogênicos para hamsters (TRIPATHY; HANSON; MANSFIELD, 1973). Hanson (1976) afirma que estes anticorpos poderiam ser mensurados pelo teste de desafio em hamsters, mostrando correlação entre eles.

Dada a importância e a complexidade da virulência das leptospiras, vários grupos de pesquisadores estão tentando decifrar seus mecanismos, que podem estar correlacionados com a presença e ativação de genes, como é o caso do gene LipL32, presente nos sorovares virulentos e outros com frequência mais variável como o LipL36 e o Ia1608, este último presente em 87,5% das estirpes de *L. interrogans* (ZHAO et al., 2003).

Faine e Van der Hoeden (1964) já tinham observado diferenças fenotípicas entre estirpes virulentas e avirulentas, tanto nas colônias crescidas em meio sólido, como na microscopia. Haake et al. (1991) demonstraram que estirpes do sorovar Grippotyphosa atenuadas em meio de cultivo apresentaram maior quantidade de proteínas transmembrânicas que as virulentas. Possivelmente, essas alterações sejam adaptativas às mudanças nutricionais e osmóticas.

Cullen et al. (2002) relataram que as proteínas LipL36 e LipL50 de *L. interrogans* são termorreguladas, não sendo expressas quando as culturas de leptospira são incubadas acima de 30°C.

Extratos protéicos de leptospiras patogênicas podem induzir proteção contra sorovares heterólogos (KOIZUMI; WATANABE, 2004). Algumas proteínas tais como OmpL1, LipL41, LipL32, têm sido descritas como importantes imunógenos conservados nas leptospiras patogênicas (HAAKE et al., 1999; HAAKE et al., 2000b). Outras proteínas chamadas de *Big domain protein* são expressas na superfície bacteriana e responsáveis pela mediação da invasão ou adesão à célula hospedeira, as chamadas proteínas Lig (*Leptospira Ig-Like*). Dois genes, designados Lig A e Lig B codificam seqüências peptídicas, presentes em leptospiras patogênicas como *L. interrogans* e *L. kirschneri*, mas não nas saprófitas (MATSUNAGA et al., 2003; PALANIAPPAN et al., 2006).

Recentemente, Ristow et al. (2007) relataram que a presença da lipoproteína Loa22 é essencial na virulência das estirpes de leptospiras. A supressão do gene

que codifica a Loa22 na estirpe mutante *Loa22⁻* tornou-a atenuada, ou seja, incapaz de provocar morte nos cobaios, porém colonizou os rins da maioria dos cobaios infectados.

A identificação de antígenos de leptospira expressos durante a infecção tem importante implicação no desenvolvimento de novas técnicas para diagnóstico e de novos antígenos protetores (MATSUNAGA et al., 2003; AHMED et al., 2006).

Barnett et al. (1999) verificaram aumento na expressão do LPS, OmpL1 e da LipL41 e redução da expressão da LipL36 no sorovar *Grippotyphosa* durante a infecção experimental em hamsters. Também foi observado aumento na expressão das proteínas Loa22 e LipL32 quando se comparam a estirpe do sorovar *Copenhageni* *in vivo* e *in vitro* (NALLY et al., 2007) e que os antígenos da cadeia O do LPS é menor *in vivo* do que *in vitro* (NALLY et al., 2005).

As proteínas da membrana externa (OMP) da estirpe *Hond Utrecht IV* com peso molecular de 22,5; 25; 32; 36; 41; 77 e 112 KDa foram mais imunogênicas (AMUTHA et al., 2006). A OMP de 41 KDa foi descrita como imunodominante no sorovar *Grippotyphosa* (SHANG et al., 1996).

Uma vacina antileptospirose utilizando somente a Lig-A recombinante protegeu hamsters contra o desafio com o sorovar *Pomona* homólogo e impediu a formação de lesões histopatológicas (PALANIAPPAN et al., 2006).

As proteínas Lig B-m não são expressas por leptospiras cultivadas *in vitro* e sim no hospedeiro, por isso, as Lig A-m e Lig B-m extraídas de *L. interrogans* sorovar *Manilae* homólogas são referidas como potenciais candidatas à vacina sorogrupo-específica contra a leptospirose (KOIZUMI; WATANABE, 2004). A ausência das proteínas Lig por não transcrição do RNA, está correlacionada com a perda ou atenuação de virulência durante o cultivo *in vitro* (MATSUNAGA et al., 2003, PALANIAPPAN et al., 2006).

Enquanto novas vacinas não são disponibilizadas comercialmente, as bacterinas ainda são a única opção contra a leptospirose animal, e seu desempenho é dependente da qualidade e concentração de antígeno, por isso as preparações comerciais podem apresentar resultados variados (HUHN et al., 1975).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o esquema do apêndice A.

3.1 Estirpes utilizadas

Foi utilizada uma estirpe de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, autóctone e virulenta, isolada do fígado de um suíno no estado do Paraná (FREITAS et al., 2004). Esta estirpe foi tipificada com kit de anticorpos monoclonais pelo *Royal Tropical Institute*, Amsterdã, Holanda. Desde então, a estirpe foi denominada como LO4.

Uma amostra dessa estirpe foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos (FMVZ/USP) ao Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução (LDBR) do Instituto Biológico de São Paulo e cultivada em meio EMJH² modificado, com a adição de soro de coelho inativado, asparagina, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio (ALVES, 1995).

A estirpe LO4 foi escolhida para o estudo por ser um isolado nacional, estar devidamente tipificada e cuja DL₅₀ pôde ser estabelecida. Além disso, em estudos prévios, foi capaz de colonizar diferentes órgãos dos hamsters inoculados.

A estirpe *Hond Utrecht IV* proveniente da Organização Mundial da Saúde (OMS) foi utilizada como estirpe padrão. Essa estirpe é originária da Holanda, pertencente ao sorovar Canicola, adaptada aos meios de cultivo EMJH e Fletcher, por passagens *in vitro* por anos consecutivos no LDBR. A ausência de virulência da *Hond Utrecht IV* foi comprovada com a inoculação em hamster, sem ocasionar mortes e lesões macroscópicas.

² Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (Difco, Detroit, EUA).

3.2 Estabilização da virulência da estirpe LO4

Para a estabilização e manutenção da virulência da estirpe LO4 foi utilizada a metodologia clássica de passagens sucessivas em hamsters (GONZÁLEZ; DÍAZ; MATOS, 1999). O inóculo para as passagens em hamsters foi preparado com 1,0 g de órgãos (fígado e rins) de um hamster agônico e com lesões características de leptospirose diluído em 9,0 mL de solução salina estéril. Uma suspensão foi obtida com o uso do homogeneizador *Stomacher® 80 Biomaster*³ por 60 segundos na potência média (Figura 1). O volume de 1,0 mL dessa suspensão foi submetido a cinco diluições seriadas de razão dez (10^{-1} a 10^{-5}), e 1,0 μ L por diluição foi examinado em microscópio óptico Jena Zeiss com condensador de campo escuro (MCE), objetiva Epiplan 20x/0,2 e ocular de 10 (aumento de 200 vezes) para verificação de leptospiras. Um mililitro da diluição contendo de 20 a 30 leptospiras por campo microscópico foi inoculado via intraperitoneal em hamsters saudáveis. Essas passagens foram realizadas sucessivamente até a estabilização da virulência da estirpe, ou seja, morte entre três a seis dias.

O mesmo procedimento foi adotado para a determinação da DL_{50} , de acordo com a metodologia de Reed e Muench (1938), inoculando-se cinco grupos de dez hamsters com 0,2 mL de uma suspensão semelhante a anterior, ou seja, por diluição seriada na base 10 (10^{-1} a 10^{-7}).



Figura 1 – Macerado de órgãos de hamster infectado com a estirpe LO4, utilizando o homogeneizador *Stomacher® 80 Biomaster* para preparo do inóculo

³ *Stomacher® 80 Biomaster*, Lab System – Seward, England.

3.3 Animais

Foram utilizados hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) com peso entre 55 e 65 gramas alocados no infectório do LDBR do Instituto Biológico.

Os animais foram subdivididos em grupos de dez, separados segundo o sexo e acondicionados em gaiolas forradas com maravalha de pinho autoclavada e alimentados *ad libitum* com ração comercial e água de acordo com o *Guide for the care and use of laboratory animals* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

Antes do início dos experimentos, alguns hamsters dos grupos experimentais foram escolhidos aleatoriamente e sacrificados. As suspensões do macerado de rins e fígado foram examinadas pela microscopia direta, cultivo e PCR. O soro sanguíneo foi avaliado através da SAM para assegurar que os animais não haviam tido contato prévio com leptospiras.

O método adotado em todos os sacrifícios foi a câmara de CO₂, de acordo com o estabelecido pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sendo o projeto aprovado em 10 de fevereiro de 2005 sob o protocolo nº 590/2004.

3.4 Preparo do inóculo infectante

No inóculo infectante, a concentração de leptospiras foi determinada por contagem de bactérias viáveis em 1,0 µL da suspensão de órgãos (rins e fígado), conforme descrito no item 3.2., em pelo menos dois campos microscópicos no aumento de 200 vezes.

A concentração foi ajustada por meio de diluição seriada na base dez da suspensão em solução salina estéril até a obtenção da quantidade desejada por campo microscópico, ou seja, entre 100 a 130 leptospiras/campo (concentração elevada) e 20 a 30 leptospiras/campo (baixa concentração).

3.5 Concentrações, vias de inoculação e indução do estado de portador (Experimento 1)

Para a indução do estado de portador renal e/ou genital foram testadas as duas doses de inóculo da estirpe LO4, com elevada concentração (entre 100 a 130 leptospiros/campo no MCE) e outra com baixa concentração (entre 20 a 30 leptospiros/campo no MCE) aplicadas por dois dias consecutivos pelas vias conjuntiva-nasal (CN) e cérvico-vaginal (CV), conforme a tabela 1. A via intraperitoneal (IP) foi utilizada como controle de infecção, sendo inoculados dez hamsters com 0,2 mL contendo 20 a 30 leptospiros/campo de MCE. Os animais sobreviventes foram observados diariamente e eutanasiados após 21 dias da inoculação (d.p.i.).

As figuras de 2 a 5 ilustram os procedimentos de inoculação pelas diferentes vias.

Tabela 1 – Grupos experimentais para indução do estado de portador renal e genital por inoculação de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4, segundo a via, a concentração do inóculo e o sexo dos animais - São Paulo - 2007

Concentração do inóculo ^a	Via de inoculação - Sexo	Volume do inóculo ^b	Número de animais
100 a 130	CN-m.	75 µL ^c	10
	CN-f.	75 µL ^c	10
	CV	50 µL	10
20 a 30	CN-m.	75 µL ^c	10
	CN-f.	75 µL ^c	10
	CV	50 µL	10
Controle	IP	200 µL ^d	10

CN = conjuntiva-nasal, CV = cérvico-vaginal, IP = intraperitoneal, m.= macho, f.= fêmea

^a = quantidade de leptospiros/campo do MCE no aumento de 200 vezes)

^b = volume do inóculo diário/dois dias consecutivos

^c = 25 µL por instilação conjuntival (50 µL) e nasal (25 µL)

^d = volume do inóculo de dose única



Figura 2 – Inoculação via intraperitoneal (IP)



Figura 3 – Inoculação via cérvico-vaginal (CV)



Figura 4 – Inoculação via nasal (CN)

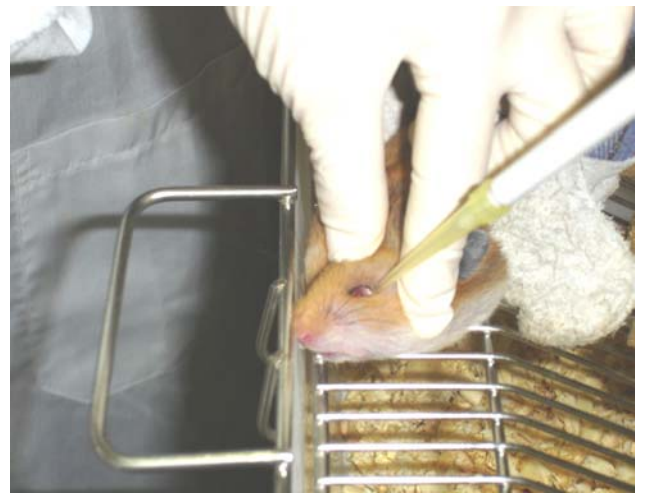


Figura 5 – Inoculação via conjuntival (CN)

3.6 Metodologias empregadas para a identificação de portadores renais e genitais

Para a identificação do portador renal e genital foram empregadas as seguintes técnicas:

3.6.1 Visualização microscópica direta

Durante a necrópsia, rins e genitais (útero ou testículos) foram retirados e separadamente uma porção do órgão (2/3 de um dos rins e 1/2 de um dos testículos ou útero) foi fragmentada e colocada em tubo plástico tipo *ependorf* estéril e identificado. Adicionou-se aproximadamente 1,0 mL de meio EMJH modificado (ALVES, 1995) contendo os antibióticos 5-fluorouracil⁴ e ácido nalidíxico⁵ nas concentrações finais de 12,0 mg e 8,0 mg por 100,0 mL, respectivamente, em cada tubo e agitado vigorosamente em vórtex por 30 segundos.

Na câmara de biossegurança e de forma asséptica, com auxílio de uma pipeta, 1,0 µL de cada suspensão foi depositado sobre uma lâmina e levada ao MCE para pesquisa direta de leptospiros com aumento de 200 vezes.

3.6.2 Cultivo de leptospira

Da suspensão de órgãos dos hamster foi semeado individualmente cerca de 0,5 mL em 5,0 mL de meio de cultivo EMJH modificado (ALVES, 1995) e com antibióticos (conforme item 3.6.1) e incubados a 30°C. Após 24 horas, 1,0 mL desse cultivo foi semeado em tubo contendo 5,0 mL de meio EMJH modificado (ALVES, 1995), sem antibióticos e incubado nas mesmas condições.

⁴ 5-Fluorouracil – Sigma, Saint Louis, EUA.

⁵ Ácido Nalidíxico – INLAB, Sorocaba, Brasil.

As leituras em microscópio de campo escuro foram realizadas semanalmente durante 28 dias.

3.6.3 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Uma alíquota dos fragmentos dos órgãos dos hamsters foi armazenada a temperatura de -20°C para pesquisa de DNA de leptospira.

Para a extração do DNA da suspensão dos órgãos (rim e genital) foi utilizado o protocolo de fervura-fenol como descrito por Cortez et al. (2001).

A reação foi procedida utilizando-se o DNA extraído com os *primers* Lig1 e Lig2 (PALANIAPPAN et al., 2005) que amplificam fragmentos de 468 pares de base (pb) referentes ao gene que codifica a proteína *Lig*.

O protocolo de amplificação de DNA foi empregado em volume total de 50,0 μL , com 200 μM de cada dNTP, 5,0 μL de tampão 10X (500mM de KCL, 15 mM de MgCl_2 , 100 mM de TRIS - HCl, pH 9,0); 2,5 mM de MgCl_2 , 30 pmol de cada primer (Lig1- 5'TCA ATC AAA ACA AGG GGC T 3', Lig2 - 5'ACT TGC ATT GGA AAT TGA GAG 3'), 1,5 U de Taq DNA polimerase e 10,0 μL de DNA.

Anteriormente ao ciclo de temperaturas, foi realizada a desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos. Em seguida, foram realizados 30 ciclos de amplificação, constituídos de desnaturação a 95°C por um minuto, hibridização a 58°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos.

As amplificações foram realizadas no termociclador Peltier Thermal Cycler-100 (MJ Research) e a análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,3% com tampão de corrida TBE 0,5 X. (0,045 M TRIS-Borato e 1 mM de EDTA pH 8,0) e submetido à voltagem constante de 6 a 7 V/cm.

O gel foi corado com solução de brometo de etídeo a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fotografado sob luz ultravioleta (300 a 320 nm) pelo sistema de foto-documentação (Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom) e analisado com o software 1 D Image Analysis (Kodak Digital Science).

3.7 Preparo das vacinas

As vacinas monovalentes foram formuladas segundo a estirpe, passagem *in vitro* e adjuvante descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Vacinas monovalentes formuladas de acordo com a estirpe de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, número de passagens *in vitro* e adjuvantes utilizados - São Paulo - 2007

Vacina	Estirpe	Nº de passagens <i>in vitro</i>	Adjuvante
A	LO4	2	Saponina
B	LO4	5	Saponina
C	<i>Hond Utrecht IV</i>	Indeterminado ^a	Saponina
D	LO4	5	Al(OH) ₃
E	<i>Hond Utrecht IV</i>	Indeterminado ^a	Al(OH) ₃

^a = estirpe mantida em laboratório por anos com repiques semanais
Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio

Para a produção da vacina com a estirpe LO4 de duas passagens *in vitro* em meio de cultivo, foi utilizado 1,0 mL da suspensão de fígado e rins de dois hamsters agônicos (item 3.2). Essa suspensão de órgãos foi inoculada em 10,0 mL meio EMJH modificado com antibiótico (item 3.4).

Após 24 horas esse cultivo foi inoculado (10% v/v) em 100,0 mL de meio EMJH modificado sem antibióticos e incubado em estufa bacteriológica a 30°C. No sétimo dia, foi realizada outra passagem *in vitro* (10% v/v) em 100,0 mL de meio EMJH modificado, e decorridos mais sete dias efetuou-se a contagem de leptospiras em câmara de *Petroff-Hausser*. Essa suspensão foi utilizada para a produção da vacina A, considerando-a com duas passagens *in vitro*.

Para a elaboração das vacinas B e D, procedeu-se da mesma maneira, porém foram realizadas cinco passagens *in vitro* a cada sete dias antes da contagem e inativação.

Para a produção das vacinas (C e E) com a estirpe adaptada *in vitro*, foi utilizada a estirpe *Hond Utrecht IV*, mantida na bateria antigênica no LDBR, sem ativação da virulência. Essas vacinas foram consideradas como controle para estudo da interferência da virulência na qualidade da bacterina.

A concentração das suspensões de leptospiras empregadas na produção das vacinas foi determinada pela contagem em câmara de *Petroff-Hausser*, e ajustada para 4×10^8 cels/mL por diluições em salina estéril (AURAN; JOHSON; RITZI, 1972; LANGONI et al., 2001). Esses cultivos foram inativados com 0,4% (v/v) de formalina (FREUDESTEIN; HEIN, 1991; LANGONI et al., 2001; GONZALEZ et al., 2005). Decorridos 48 horas da adição da formalina, 1,0 mL de cada cultivo tratado foi inoculado em tubos contendo 10,0 mL de meio EMJH modificado e incubado a 30°C por 14 dias, como controle da inativação das leptospiras, não podendo ocorrer crescimento.

Foi adicionado 0,6 mg/mL de saponina como adjuvante nas vacinas A, B e C (SMITSAART et al., 2000) e 5% (v/v) de $Al(OH)_3$, com 2,2% de óxido de alumínio (Al_2O_3), nas vacinas D e E (BOLIN; ALT, 2001).

As vacinas foram testadas quanto à esterilidade em meio de tioglicolato de sódio e ágar sangue (BOLIN; ALT, 2001). Para o teste de inocuidade foram utilizados cinco hamsters por bacterina, sendo aplicado 0,25 mL da vacina sem diluir, via subcutânea, e foram consideradas inócuas após 14 dias pós-inoculações se não ocasionaram nenhuma reação cutânea ou sistêmica.

3.8 Eficácia das vacinas contra a formação de portadores (Experimento 2)

Para o teste de eficácia das vacinas contra a formação dos portadores renais e/ou genitais, 40 hamsters foram vacinados com 1/80 da dose estipulada para bovinos (5 mL), no volume de 0,25 mL pela via subcutânea, por tipo de vacina e outros 40 animais serviram de testemunho (grupo controle), não vacinados, conforme recomenda o CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006). Catorze dias pós-vacinação, os animais foram desafiados pelas vias CN, CV e IP com a dose de desafio contendo de 20 a 30 leptospiras/campo de MCE por dois dias consecutivos e observados durante 14 dias conforme a tabela 3.

A via IP foi utilizada para o teste de eficácia da vacina (método clássico) e para comprovação da infecção no grupo controle. Os animais foram desafiados com 0,2 mL da suspensão virulenta da estirpe LO4 contendo entre 10 a 10.000 DL₅₀, de acordo com o protocolo do CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006).

Nesse experimento, a bactéria C foi empregada como controle da imunização, ou seja, apenas com intuito de compará-la com os demais grupos pela via IP.

Tabela 3 - Grupos experimentais de hamsters vacinados e controle (sem vacinação) e desafiados com a estirpe LO4 de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, para avaliação da eficácia de vacinas monovalentes na prevenção do estado de portador renal e genital, segundo a via de desafio, volume inoculado e sexo dos animais - São Paulo - 2007

Grupo	Via de inoculação - Sexo	Volume do inóculo ^a	Nº de animais
Controle (não vacinado)	CN-m.	75 µL ^b	10
	CN-f.	75 µL ^b	10
	CV	50 µL	10
	IP	200 µL ^c	10
Vacina A	CN-m.	75 µL ^b	10
	CN-f.	75 µL ^b	10
	CV	50 µL	10
	IP	200 µL ^c	10
Vacina B	CN-m.	75 µL ^b	10
	CN-f.	75 µL ^b	10
	CV	50 µL	10
	IP	200 µL ^c	10
Vacina C	IP	200 µL ^c	10

CN = conjuntiva-nasal, CV = cérvico-vaginal, IP = intraperitoneal, m.= macho, f.= fêmea
^a = volume do inóculo diário, ^b = 25 µL por instilação conjuntival (50 µL) e nasal (25 µL), ^c = volume do inóculo de dose única

A eficácia das bacterinas foi avaliada frente ao desafio de hamsters com a estirpe LO4 nas vias CN, CV e IP, segundo o padrão do CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), conforme mostra a tabela 4.

Tabela 4 – Padrão para avaliação da eficácia de vacinas contra leptospirose pelo teste de desafio, segundo *Code Federal Regulation* (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) - São Paulo - 2007

Estágio	Número de Vacinados	Total Acumulativo vacinado vivo	Total Acumulativo morto, para partida satisfatória	Total Acumulativo morto para partida insatisfatória
I	10	10	2 ou menos	5 ou mais
II	10	20	5 ou menos	6 ou mais

Caso três ou quatro animais vacinados morressem no primeiro estágio, o teste deveria ser repetido e os resultados avaliados de acordo com o estágio II.

O teste foi considerado válido com a morte por leptospirose, de pelo menos oito animais do grupo controle inoculados pela via IP.

Todos os animais mortos foram submetidos à necrópsia e examinados conforme as metodologias descritas no item 3.6.

Amostras de soros sanguíneos dos animais mortos por leptospirose ou eutanasiados após o 14^o dia foram examinadas para anticorpos aglutinantes.

3.9 Influência do adjuvante e da virulência da estirpe na eficácia das vacinas (Experimento 3)

Com base nos resultados do Experimento 2, foi definido o delineamento do experimento para avaliar a influência da estirpe virulenta LO4, com cinco passagens *in vitro* comparada com a estirpe não virulenta *Hond Utrecht IV*, e do adjuvante na eficácia das vacinas no teste de desafio em hamsters (CFR, UNITED STATES OF

AMERICA, 2006) descrito no item 3.8. Os grupos experimentais são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Grupos experimentais para teste de eficácia de vacinas monovalentes na proteção contra *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, segundo o número de passagens *in vitro* e adjuvante - São Paulo - 2007

Grupo/Adjuvante	Estirpe da Vacina	Nº de passagens <i>in vitro</i>	Sexo	Nº de Hamsters
Controle (sem vacinação)	-	-	m.	10
Vacina B - saponina	LO4	5	m.	10
Vacina C - saponina	<i>Hond Utrecht IV</i>	indeterminado ^a	m.	10
Vacina D – Al(OH) ₃	LO4	5	m.	10
Vacina E- Al(OH) ₃	<i>Hond Utrecht IV</i>	indeterminado ^a	m.	10

m. = macho

^a = estirpe mantida em laboratório por anos com repiques semanais

Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio

Todos os animais mortos foram submetidos à necrópsia e examinados conforme as metodologias descritas no item 3.6.

Amostras de soros sanguíneos dos animais mortos por leptospirose ou eutanasiados após o 14^o dia foram examinadas na prova de SAM.

3.10 Avaliação sorológica das vacinas (Experimento 4)

Foram vacinados dez animais com 1/80 da dose preconizada para bovino para o sorovar Canicola, segundo CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), no volume de 0,25 mL por via subcutânea, por vacina (item 3.7) e outros dez serviram de testemunho (não vacinados). Após 15 dias, os animais foram sacrificados e colhidas amostras de sangue, que depois de dessoradas foram estocadas a -20°C até a realização dos exames sorológicos.

Os soros foram avaliados quanto à presença de anticorpos aglutinantes pela prova de SAM (SANTA ROSA, 1970; OIE, 2004) e para detecção de anticorpos neutralizantes pelo teste de inibição do crescimento *in vitro* conforme descrito por Tripathy, Hanson e Mansfield (1973) e por Tabata et al. (2002) com algumas modificações.

3.10.1 Preparo dos antígenos

Para a prova sorológica de SAM foram utilizadas as estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV* como antígenos e para a IC, somente a estirpe *Hond Utrecht IV*, provenientes de cultivos em EMJH modificado (ALVES, 1995), repicados semanalmente e mantidos em estufa bacteriológica a 30°C, livres de contaminação e de autoaglutinação (SULZER; JONES, 1980).

A concentração dos antígenos padronizada para o uso nas provas foi de 100 a 200 leptospiiras/campo no aumento de 200 vezes.

3.10.2 Prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM)

Os soros foram testados individualmente pela prova de SAM frente às duas estirpes, partindo de uma diluição inicial de 1/12,5 (0,1 mL de soro para 1,15 mL de solução PBS estéril, pH 7,2). Cinquenta microlitros do soro diluído foram depositados em placas de fundo chato de 96 cavidades e misturados com igual volume de antígeno de uma das estirpes. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por três horas.

A leitura da reação foi efetuada em microscópio óptico Jena Zeiss com condensador de campo escuro (MCE), objetiva Epiplan 10x/0,2 e ocular de 10 (aumento de 100 vezes), sendo avaliado o grau de aglutinação. Na triagem dos soros, foram consideradas reagentes as amostras sorológicas que aglutinaram pelo menos 50% das leptospiiras.

Posteriormente, os soros positivos (≥ 25) foram diluídos na proporção geométrica na razão dois para determinação da titulação final. Foi considerado como título final, a recíproca da maior diluição que apresentou pelo menos 50% de leptospiros aglutinadas (CORRÊA et al., 1965/67; SANTA ROSA, 1970).

3.10.3 Teste de inibição do crescimento (IC)

Para o teste de inibição do crescimento *in vitro* foram utilizados *pools* de cinco soros dos animais por grupo (Vacinas A, B, C, D, E e grupo controle), ou seja, dois *pools* para cada vacina, frente à estirpe *Hond Utrecht IV*.

Os *pools* de soros foram diluídos em escala geométrica na razão dois, partindo-se inicialmente do soro puro até 1/16, com solução tamponada de Sorensen (pH 7,4), contendo os antibióticos 5-fluorouracil e ácido nalidíxico nas concentrações finais de 12,0 mg e 8,0 mg por 100,0 mL, respectivamente. Foram utilizadas cinco repetições por *pool* examinado. Em cada tubo de ensaio de vidro com tampa baquelite e esterilizado, com capacidade para 5,0 mL foram adicionados 1,25 mL de meio EMJH modificado (ALVES, 1995), 50,0 μ L de um dos antígenos (item 3.10.1) e 100,0 μ L da diluição do *pool* de soros. Os tubos foram incubados a 30°C por 10 dias. Cinco tubos contendo 1,25 mL e 50,0 μ L da suspensão do antígeno por estirpe foram utilizados como controle do cultivo.

Após o décimo dia os tubos foram avaliados macroscopicamente quanto a turvação característica do crescimento de leptospira, comparando-os com os tubos dos controles do cultivo e confirmando-se o crescimento ou ausência de crescimento pelo MCE no aumento de 200 vezes.

Foi empregada a escala de 1+ para algumas leptospiros visíveis, e 2+ ou 3+ para muitas leptospiros por campo. O crescimento foi considerado positivo, ou seja, sem inibição do crescimento, a partir de 2+ e considerado negativo, com inibição do crescimento, na reação 1+ (TABATA et al., 2002).

O título da inibição do crescimento foi calculado pelo método de Reed e Muench (1938) pela capacidade de inibir 50% dos tubos inoculados (TABATA et al., 2002).

3.11 Histopatologia

Os fragmentos dos órgãos (rim e genital) dos hamsters que morreram por leptospirose ou eutanasiados foram fixados em formalina (uma parte de formol a 37% em oito partes de água) e posteriormente, alguns animais de cada grupo experimental foram escolhidos aleatoriamente para o exame histopatológico, destinados a verificar a presença de leptospiros e comparar as lesões histopatológicas entre os grupos experimentais.

3.11.1 Coloração pelo método de Warthin-Starry

Para a visualização tecidual das leptospiros foi utilizada a técnica de Young (1969) com modificações, de acordo com o protocolo do Departamento de Patologia (VPT) da FMVZ/USP descrito no apêndice B.

3.11.2 Coloração por Hematoxilina-Eosina (H.E.)

A coloração da H.E. utilizada para a observação das alterações patológicas dos órgãos foi realizada pela técnica de Behmer, Tolosa e Freitas (1976).

3.12 Tratamento Estatístico

A comparação entre o número de mortos por leptospirose inoculados pelas diferentes vias, dose-desafio e tratamentos, assim como a formação do portador renal e genital foi efetuada pelo Teste Exato de Fisher.

A comparação entre os resultados da leitura pela microscopia a fresco, do cultivo e da PCR das vias de infecção, com baixa concentração de leptospiras foi efetuada pelo teste de concordância Kappa.

Os dados da sorologia foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov e Smirnov e quanto a homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett.

Posteriormente, para os dados considerados normais, foram aplicados os testes paramétricos de análise de variância e Tukey para a comparação entre os grupos e o Teste T para comparação entre os títulos de anticorpos com as diferentes estirpes empregadas.

Para os dados considerados não normais foram aplicados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Dunn para comparação entre os grupos e o teste de Mann-Whitney para comparação entre os títulos de anticorpos resultantes do uso das estirpes empregadas como antígeno na prova de SAM.

Os tratamentos estatísticos foram efetuados com o auxílio do *software* GraphPad InStat® versão 3.01 (1998) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

A leitura direta em MCE das suspensões de órgãos dos animais dos Experimentos 1, 2 e 3, efetuada logo após a necrópsia foi eficiente para a detecção de leptospiras na suspensão de órgãos (testículos/úteros e rins) de hamsters, experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4. A fragmentação dos órgãos, o acréscimo de pequeno volume de meio de cultura e o uso do vórtex permitiram a fácil visualização em MCE das leptospiras presentes nas suspensões. O exame dos testículos, pela enorme presença de espermatozoides, exigiu diluições na própria lâmina de leitura.

Apesar da assepsia na necrópsia, a maioria dos cultivos apresentou contaminação mesmo com o uso do meio EMJH modificado contendo antibióticos, o que pode ter interferido no crescimento da bactéria, ainda que realizada a segunda passagem em meio livre de antibióticos.

A reação de PCR não apresentou a sensibilidade esperada na suspensão de órgãos. O limiar de detecção da técnica foi de 10^3 leptospiras/mL da suspensão de rins e 10^4 leptospiras/mL da suspensão dos órgãos genitais.

A análise comparada dos resultados das três técnicas pelo teste Kappa mostrou baixa concordância para os rins (Kappa = 0,11) e nenhuma concordância para os genitais (Kappa = -0,13).

A figura 6 apresenta algumas amostras (rim e genital) de hamsters positivas na PCR.

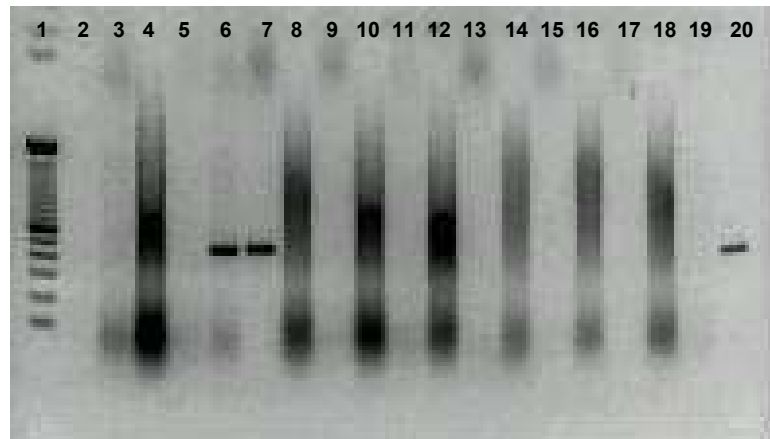


Figura 6 – Reação de PCR. 1- Padrão molecular 100 bp; 6- rim positivo para *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4; 7- genital positivo para *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4; 2, 3, 4, 5 e 8 a 18 – amostras negativas; 19- controle negativo; 20- controle positivo: cultivo de *Leptospira* spp. sorovar Hardjo

A determinação da DL_{50} dos inóculos de desafio utilizados nos Experimentos 1, 2, e 3 foi realizada pela via de referência (IP). Nos Experimentos 1, 2 a diluição da DL_{50} foi 10^{-5} e foi utilizada a diluição 10^{-2} na dose-desafio, resultando no inóculo equivalente a 1.000 DL_{50} . No Experimento 3 não foi possível determinar a DL_{50} , uma vez que ficou acima da diluição 10^{-7} , portanto o inóculo deste experimento foi maior de 10.000 DL_{50} .

Nos experimentos 1, 2 e 3 todos os animais infectados pela via IP (controle) morreram por leptospirose entre cinco e sete dias pós-inoculação (d.p.i.). Os óbitos ocasionados pelas inoculações nas vias CN e CV ocorreram até no máximo nove e 11 d.p.i. respectivamente.

Em todos os animais que vieram a óbito por leptospirose, independentemente da via e da concentração do inóculo, clinicamente apresentaram pêlos arrepiados a partir do 3º d.p.i., evoluindo para hematúria, prostração e alguns apresentaram epistaxe e convulsões antes da morte.

As lesões macroscópicas foram: hemorragias pulmonares (Figuras 7 e 8), útero hiperêmico (Figura 9) e aumentado de volume, rins e fígados congestos e enterite hemorrágica (Figura 10).

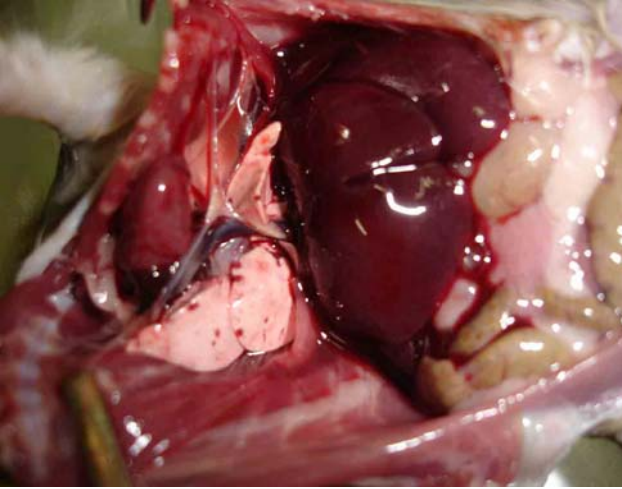


Figura 7 – Hemorragias pulmonares e congestão hepática em hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via conjuntiva-nasal (CN)

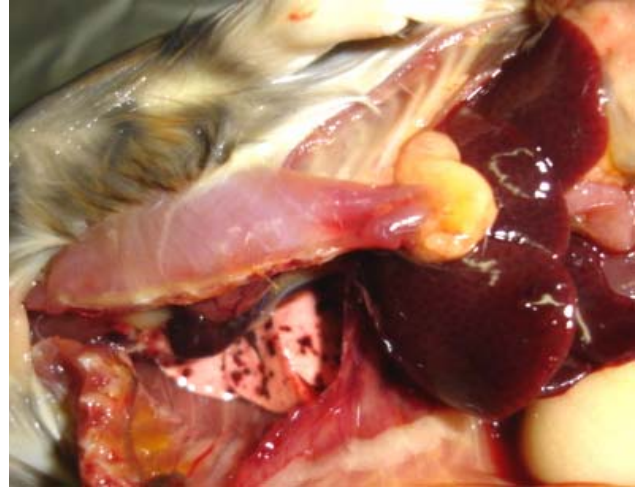


Figura 8 – Hemorragias pulmonares e congestão hepática em hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal (IP)

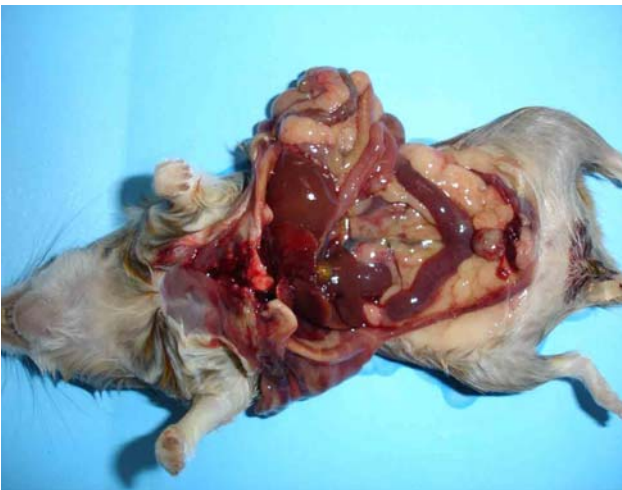


Figura 9 – Útero hiperêmico e aumentado de volume em hamster inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via cervico-vaginal (CV) e eutanasiado

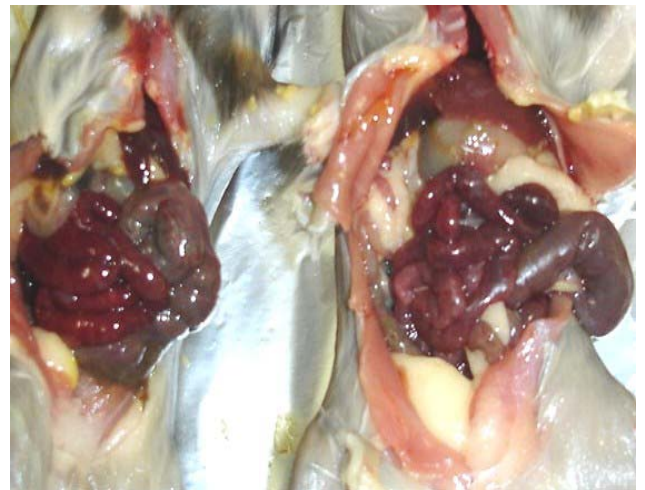


Figura 10 – Enterite hemorrágica em hamsters mortos por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculados pela via conjuntiva-nasal (CN)

Na tabela 6 estão tabulados os resultados observados em hamsters inoculados com duas concentrações da estirpe LO4 em relação as vias empregadas e ao sexo para o estudo da condição de portador (Experimento 1). Foram considerados positivos os órgãos em que pelo menos uma das três metodologias utilizadas, visualização direta ou cultivo ou PCR, detectou leptospira.

A infecção com a concentração elevada de leptospiras (100 a 130 leptospiras/campo) ocasionou 24/30 (80%) de óbitos por leptospirose no total, contra 10/30 (33,3%) na baixa concentração (20 a 30 leptospiras/campo), quando inoculadas em dois dias consecutivos ($p < 0,0006$).

Pela via CN a distinção do sexo dos animais não apresentou interferência na taxa de letalidade, tanto na concentração elevada, com dez óbitos por leptospirose para ambos, quanto na baixa concentração, com quatro mortes de machos e seis de fêmeas ($p > 0,65$).

A concentração elevada de leptospiras inoculada pela via CN foi tão letal quanto pela via IP (via de controle da infecção) com 100% de óbitos, mas na menor concentração, a via IP foi mais letal contra os 50% (10/20 machos e fêmeas) de mortos pela via CN ($p < 0,01$). A taxa de letalidade da via CN foi dependente da concentração de leptospiras presentes no inóculo diferindo entre as duas concentrações ($p < 0,0004$).

A via CN também foi efetivamente mais letal que a via CV nas duas concentrações de leptospiras do inóculo: 20/20 (100%) contra 4/10 (40%) na concentração maior ($p < 0,0004$) e 10/20 (50%) contra nenhuma morte na menor concentração ($p < 0,01$), respectivamente. A via CV foi menos letal que a via IP (10/10), tanto com elevada concentração de leptospiras (4/10) ($p < 0,01$), quanto com baixa concentração (0/10) ($p < 0,0001$). Entretanto, não houve diferença na taxa de letalidade entre as duas concentrações de leptospiras inoculadas pela via CV ($p > 0,08$).

Com relação à presença de leptospiras nos órgãos dos animais que vieram a óbito por leptospirose e inoculados por qualquer das duas vias (CN ou CV), foram observadas leptospiras nos rins e genitais sem diferença estatística, igualando-se a via IP.

No total de animais inoculados, comparando a maior e menor concentração de inóculo de leptospiros e via de infecção, não houve diferença quanto à presença de leptospiros nos rins e genitais, com 28/30 (93,3%) dos rins e 17/30 (56,7%) dos genitais positivos para o inóculo mais concentrado e de 27/30 (90%) e de 21/30 (70%) respectivamente, para o inóculo menos concentrado ($p>0,42$).

Pela via CN com maior concentração de leptospiros no inóculo, todos os animais que vieram a óbito apresentaram rins positivos e 11/20 (55%) genitais positivos para leptospira, sendo cinco machos e seis fêmeas, e, portanto, sem relação com o sexo. Na via CV com essa concentração do inóculo, quatro animais que vieram a óbito por leptospirose, foram positivos nos rins e três nos genitais. Entre os animais sobreviventes por esta via, quatro foram portadores renais e três portadores genitais durante o período de observação de 21 dias.

Com a menor concentração de leptospiros, dos animais que vieram a óbito pela via CN, nove dos rins (machos e fêmeas) e sete dos genitais foram positivos. Entre os sexos, três machos mortos foram positivos nos rins e um nos genitais, e seis fêmeas com os dois órgãos positivos.

Ainda sobre a via CN com baixa concentração de leptospiros, dos dez animais sobreviventes, oito apresentaram rins e genitais positivos, dos quais quatro machos e quatro fêmeas com rins positivos e cinco e três com os genitais positivos, respectivamente, porém essas diferenças não foram significantes ($p>0,05$).

Na inoculação de baixa concentração de leptospiros pela via CV, dos dez animais sobreviventes, todos foram confirmados como portadores renais e seis como portadores genitais.

Em vista da menor letalidade da via CV do que a CN, e de acordo com a definição do portador, a via CV induziu o estado de portador renal e genital com maior frequência.

Ao exame da SAM, tanto os animais inoculados com a LO4 que morreram por leptospirose, quanto os eutanasiados após o 21^o d.p.i. com ambas as concentrações de leptospiros pelas vias CN, CV e IP, foram não reagentes (título <25) para *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpes LO4 e Hond Utrecht IV.

Tabela 6 – Frequência de óbitos e de órgãos de hamsters positivos após a inoculação com duas concentrações de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4, pelas vias conjuntiva-nasal e cervico-vaginal e sexo, Experimento 1 - São Paulo - 2007

Concentração do inóculo ^a	Via-Sexo	Nº animais	Nº mortos antes 21º dia	Nº eutanasiados no 21º dia	Nº de rins positivos ^b						Nº de genitais positivos ^b					
					mortos ^c	%	eutanasiados ^c	%	Total	%	mortos ^c	%	eutanasiados ^c	%	Total	%
100 a 130	CN-m.	10	10	0	10	100,0	0	0,0	10	100,0	5	50,0	0	0,0	5	50,0
	CN-f.	10	10	0	10	100,0	0	0,0	10	100,0	6	60,0	0	0,0	6	60,0
	CV	10	4	6	4	100,0	4	66,7	8	80,0	3	75,0	3	50,0	6	60,0
		30	24	6	24	100,0	4	66,7	28	93,3	14	58,3	3	50,0	17	56,7
20 a 30	CN-m.	10	4	6	3	75,0	4	66,7	7	70,0	1	25,0	5	83,3	6	60,0
	CN-f.	10	6	4	6	100,0	4	100,0	10	100,0	6	100,0	3	75,0	9	90,0
	CV	10	0	10	0	0,0	10	100,0	10	100,0	0	0,0	6	60,0	6	60,0
		30	10	20	9	90,0	18	90,0	27	90,0	7	70,0	14	70,0	21	70,0
Controle	IP ^d	10	10	0	10	100,0	0,0	0,0	10	100,0	10	100,0	0,0	0,0	10	100,0
		10	10	0	10	100,0	0,0	0,0	10	100,0	10	100,0	0,0	0,0	10	100,0

CN = conjuntiva-nasal, CV = cervico-vaginal, IP = intraperitoneal, m.= macho, f.= fêmea

Volume do inóculo por dois dias consecutivos – CN = 75µL, CV = 50µL e IP = 200µL

^a = quantidade de leptospiros/campo do MCE no aumento de 200 vezes)

^b = suspensão do órgão positivo para uma das técnicas (microscopia direta, cultivo ou PCR)

^c = mortos = animais que morreram por leptospirose antes do 21º d.p.i.; eutanasiados = animais que sobreviveram até o 21º d.p.i.

^d = via IP utilizada como controle da infecção

Uma vez que a inoculação com o cultivo com menor concentração de leptospiras (20 a 30 leptospiras/campo) em dois dias consecutivos, foi capaz de causar a colonização de rins e genitais, esta concentração foi escolhida para o teste de desafio no estudo de eficácia das vacinas.

Na avaliação da eficácia das vacinas (Tabela 7), observa-se que pelo teste preconizado pelo CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), ou seja, desafio pela via IP, as duas bacterinas A e B apresentaram 89% (1/8), 100% (0/10) de proteção, respectivamente, sendo consideradas aprovadas no primeiro estágio. A vacina C preparada com a *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe *Hond Utrecht IV*, adaptada *in vitro*, apresentou 90% (1/10) de proteção e foi empregada como controle do efeito das passagens *in vitro* sobre a virulência da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4, utilizada nas bacterinas A e B, com duas e cinco passagens respectivamente. Não houve diferença significativa entre a eficácia de proteção das vacinas preparadas com estirpe virulenta (A e B), com duas e cinco passagens *in vitro*, em relação à vacina C, com estirpe adaptada *in vitro*.

Observa-se que a vacinação com as bacterinas A, B e C reduziu significativamente o número de mortos por leptospirose nos grupos de animais, de 75% (30/40) ocorrido no grupo controle (não vacinado) para 2,6% (1/38), zero e 10% (1/10), respectivamente ($p < 0,0001$), independentemente da via de desafio empregada. As vacinas A e B foram 100% eficazes contra o desafio pela via CN, independente do sexo dos animais ($p < 0,0001$).

No grupo controle (não vacinado), o desafio pela via CN apresentou resultados semelhantes ao do Experimento 1, sendo que 18/20 (90%) dos hamsters inoculados por essa via morreram de leptospirose, enquanto que pela via CV a proporção foi 2/10 ($p < 0,0003$). Como controle da infecção, a via IP confirmou 100% de óbitos com altas taxas de rins e genitais positivos.

A frequência de órgãos positivos nos grupos vacinados desafiados pelas vias CN e CV, pouco diferiu do grupo controle. No grupo imunizado com a vacina A, 29/30 (96,7%) dos rins e 20/30 (66,7%) dos genitais foram positivos para leptospira. No grupo da vacina B essas frequências foram de 29/30 (96,7 %) de rins e 17/30 (56,7%) de genitais positivos, não mostrando diferença entre eles e entre o grupo controle.

Nos grupos desafiados pela via IP (método clássico), os animais sobreviventes vacinados A, B e C apresentaram proporções de rins positivos para leptospiros respectivamente de 7/7, 10/10, 7/9 e de genitais 7/7, 9/10 e 10/10.

Nenhuma das três vacinas preveniu os estados de portador renal e/ou genital, independente da via de desafio.

Tabela 7 – Eficácia de vacinas monovalentes formuladas com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4 com duas e cinco passagens *in vitro* no teste de desafio pelas vias conjuntiva-nasal (CN), cérvico-vaginal (CV) e intraperitoneal (IP) em hamsters, frente à vacina monovalente com a estirpe adaptada *in vitro*, *Hond Utrecht IV* (Experimento 2) - São Paulo - 2007

Grupo	Via-Sexo	Nº animais	Nº mortos antes 14º dia	Nº eutanasiados no 14º dia	% Proteção da vacina ^a	Nº de rins positivos ^b				Nº de genitais positivos ^b						
						mortos ^c	%	eutanasiados ^c	%	Total	%	mortos ^c	%	eutanasiados ^c	%	Total
Controle (não vacinados)	CN-m.	10	9	1	-	9	100,0	1	100,0	10	100,0	9	100,0	1	100,0	10
	CN-f.	10	9	1	-	8	88,9	1	100,0	9	90,0	6	66,7	0	0,0	6
	CV	10	2	8	-	2	100,0	8	100,0	10	100,0	2	100,0	3	37,5	5
	IP	10	10	0	-	10	100,0	-	-	10	100,0	7	70,0	-	-	7
	Total	40	30	10		29	96,7	10	100,0	39	97,5	24	80,0	4	40,0	28
Vacina A	CN-m.	10	0	10	100,0	-	-	9	90,0	9	90,0	-	-	7	70,0	7
	CN-f.	10	0	10	100,0	-	-	10	100,0	10	100,0	-	-	9	90,0	9
	CV	10	0	10	-	-	-	10	100,0	10	100,0	-	-	4	40,0	4
	IP	8 ^d	1	7	87,5	1	100,0	7	100,0	8	100,0	1	100,0	7	100,0	8
	Total	38	1	37		1	100,0	36	97,3	37	97,4	1	100,0	27	73,0	28
Vacina B	CN-m.	10	0	10	100,0	-	-	9	90,0	9	90,0	-	-	6	60,0	6
	CN-f.	10	0	10	100,0	-	-	10	100,0	10	100,0	-	-	8	80,0	8
	CV	10	0	10	-	-	-	10	100,0	10	100,0	-	-	3	30,0	3
	IP	10	0	10	100,0	-	-	10	100,0	10	100,0	-	-	9	90,0	9
	Total	40	0	40		-	-	39	97,5	39	97,5	-	-	26	65,0	26
Vacina C*	IP	10	1	9	90,0	1	100,0	7	77,8	8	80,0	1	100,0	9	100,0	10
	Total	10	1	9		1	100,0	7	77,8	8	80,0	1	100	9	100,0	10

CN = conjuntiva-nasal, CV = cérvico-vaginal, IP = intraperitoneal, m.= macho, f.= fêmea

*Vacina C = vacina controle produzida com *L. interrogans* sorovar Canicola estirpe *Hond Utrecht IV*, proveniente de múltiplas passagens *in vitro*.

^a = proteção de acordo com a letalidade (CFR - UNITED STATES OF AMERICA, 2006)

^b = suspensão do órgão positivo para uma das técnicas (microscopia direta, cultivo ou PCR)

^c = mortos = animais que morreram por leptospirose antes do 14º d.p.i.; eutanasiados = animais que sobreviveram até o 14º d.p.i.

^d = 2 animais morreram de causas desconhecidas, antes do desafio.

Volume do inóculo por dois dias consecutivos – CN = 75µL, CV = 50µL e IP = 200µL

No exame sorológico dos animais pertencentes ao Experimento 2 (Apêndices C a F), apenas os vacinados e desafiados apresentaram títulos de anticorpos na prova de SAM (Tabela 8). No grupo controle (não vacinado), o desafio não foi capaz de induzir a produção de anticorpos aglutinantes nos animais sobreviventes independentemente da via de inoculação.

As vacinas A e B induziram baixos títulos de anticorpos aglutinantes na SAM, com título máximo de 25, quando confrontados com a estirpe homóloga (LO4) em quatro e cinco animais respectivamente. Quando se utilizou a estirpe de referência (*Hond Utrecht IV*) heteróloga às vacinas, a bacterina A induziu títulos de 25 em seis animais e de 50 em dois e a bacterina B induziu títulos de 25 em sete animais, título de 50 em um animal e título de 100 em dois animais. Para ambas, a via de inoculação não influenciou no título de anticorpos.

A bacterina C, utilizada como vacina controle, produzida com a estirpe de referência, induziu títulos de aglutininas em todos os animais vacinados e desafiados. Quando se utilizou a estirpe heteróloga (LO4) como antígeno na SAM, todos os animais responderam com título máximo de 25, porém quando com o uso da estirpe homóloga (*Hond Utrecht IV*) como antígeno na SAM, dois animais responderam com título de 25, um com 50, cinco com de 100 e um com 400.

Tabela 8 – Distribuição de títulos de anticorpos aglutinantes na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes A, B e C e não vacinados, desafiados com a estirpe LO4, segundo a via de desafio e sexo (Experimento 2) - São Paulo - 2007

Grupo	Via-Sexo	Nº animais	Distribuição de títulos de anticorpos aglutinantes/ Estirpe (antígeno)						
			LO4		<i>Hond Utrecht IV</i>				
			Negativo	25	Negativo	25	50	100	400
Controle (não vacinado)	CN-m.	10	10	0	10	0	0	0	0
	CN-f.	10	10	0	10	0	0	0	0
	CV	10	10	0	10	0	0	0	0
	IP	10	10	0	10	0	0	0	0
	Total	40	40	0	40	0	0	0	0
Vacina A	CN-m.	10	9	1	6	3	1	0	0
	CN-f.	10	9	1	8	2	0	0	0
	CV	10	10	0	10	0	0	0	0
	IP	7 ^a	5	2	5	1	1	0	0
	Total	37	33	4	29	6	2	0	0
Vacina B	CN-m.	10	10	0	9	1	0	0	0
	CN-f.	10	9	1	7	3	0	0	0
	CV	10	9	1	8	2	0	0	0
	IP	10	7	3	7	1	1	1	0
	Total	40	35	5	31	7	1	1	0
Vacina C	IP	9 ^b	0	9	0	2	1	5	1
	Total	9	0	9	0	2	1	5	1

CN = conjuntiva-nasal, CV = cérvico-vaginal, IP = intraperitoneal, m.= macho, f.= fêmea

^a = 2 animais morreram de causas desconhecidas, antes do desafio e de um animal não foi possível a obtenção de soro sanguíneo.

^b = de um animal não foi possível a obtenção de soro sanguíneo

Vacina A – estirpe LO4 com 2 passagens *in vitro*, Vacina B - estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro*, Vacina C – estirpe *Hond Utrecht IV* – todas contendo saponina.

Na tabela 9 foi apresentada a média aritmética dos títulos de anticorpos dos animais, transformados em $\log_2 (x+1)$ e neste caso, para o tratamento estatístico aplicou-se os testes não paramétricos .

Os resultados demonstram que os animais vacinados com as bacterinas A e B apresentaram baixos títulos médios, independentemente da via de inoculação do desafio e do sexo, sendo as maiores médias de 1,34 nos animais desafiados pela via IP no grupo da vacina A e de 1,41 nos animais inoculados via IP e vacinados com a bacterina B. Os títulos foram ligeiramente maiores quando se utilizou a estirpe heteróloga, 1,98 nos machos vacinados com a bacterina A e desafiados pela via CN e 1,70 nos animais vacinados com a bacterina B e desafiados pela via IP.

As diferenças dos títulos de aglutininas entre os grupos de animais vacinados com as bacterinas A e B, vias de desafio e estirpes utilizadas na prova de SAM não foram significantes.

Entretanto, quando as médias aritméticas dos títulos de aglutininas entre as três vacinas (A, B e C) dos animais desafiados pela via IP (Gráfico 1) são comparadas, observa-se que a bacterina C induziu os maiores títulos de anticorpos. Com o uso da estirpe LO4 na prova de SAM, a vacina monovalente C obteve título médio de 4,7. Essa diferença foi significativa em relação aos títulos induzidos pelas bacterinas A ($p < 0,05$) e B ($p < 0,01$).

Comparando os títulos de aglutininas da vacina C com o uso da estirpe homóloga na prova de SAM, título médio de 6,33, com o obtido com o uso da estirpe heteróloga como antígeno, 4,7, houve diferença significativa ($p < 0,0006$).

E em relação as outras duas vacinas (A e B) também houve diferença dos títulos médios de anticorpos com o uso da estirpe *Hond Utrecht IV* como antígeno na SAM ($p < 0,01$).

Tabela 9 – Médias aritméticas dos títulos de anticorpos aglutinantes na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes A, B e C e não vacinados (Controle), desafiados com a estirpe LO4, segundo a via de desafio e sexo (Experimento 2) - São Paulo - 2007

Grupo	Via-Sexo	Média Aritmética dos títulos de anticorpos aglutinantes*	
		LO4	<i>Hond Utrecht IV</i>
CONTROLE (não vacinado)	CN-m.	0,00	0,00
	CN-f.	0,00	0,00
	CV	0,00	0,00
	IP	0,00	0,00
VACINA A	CN-m.	0,47	1,98
	CN-f.	0,47	0,94
	CV	0,00	0,00
	IP	1,34	1,48
VACINA B	CN-m	0,00	0,47
	CN-f	0,47	1,41
	CV	0,47	0,94
	IP	1,41	1,70
VACINA C	IP	4,70	6,33

CN = conjuntiva-nasal, CV = cérvico-vaginal, IP = intraperitoneal, m.= macho, f.= fêmea

* = Títulos médios de anticorpos aglutinantes transformados em $\text{Log}_2(x+1)$

Vacina A – estirpe LO4 com 2 passagens *in vitro*, Vacina B - estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro*, Vacina C – estirpe *Hond Utrecht IV* – todas contendo saponina.

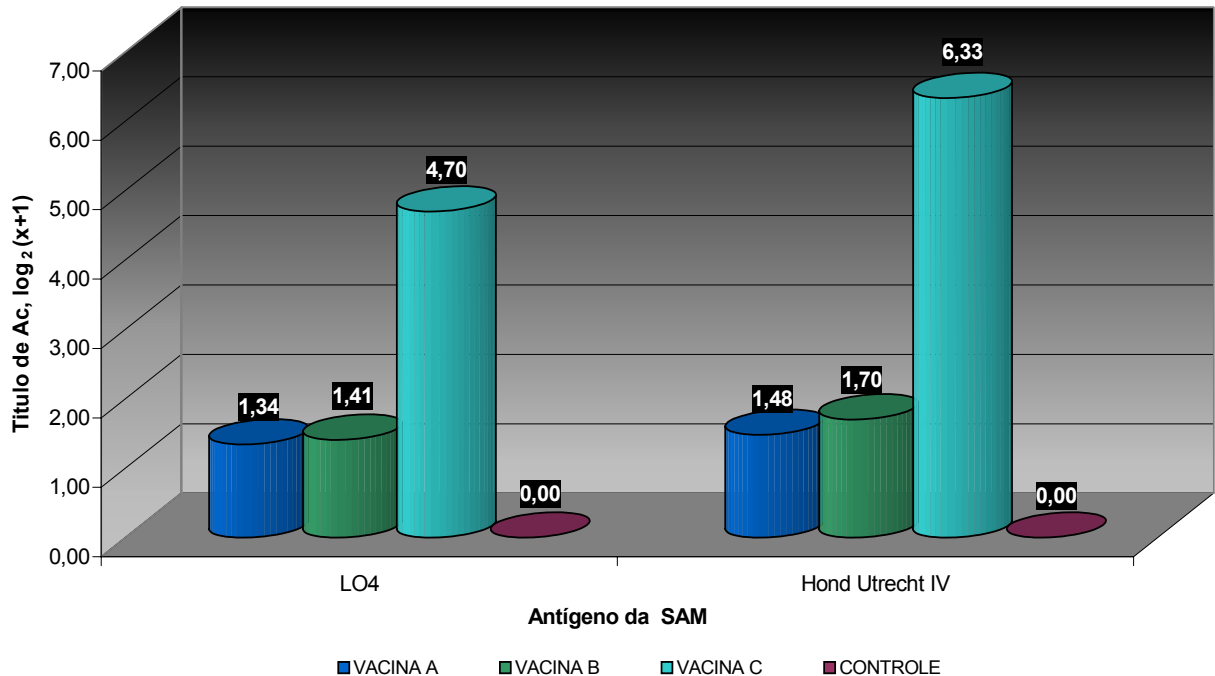


Gráfico 1 - Médias aritméticas dos títulos de anticorpos aglutinantes, na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes A, B e C e grupo controle (não vacinado) e desafiados com a estirpe LO4 pela via IP, (Experimento 2) - São Paulo - 2007

Como não houve diferença entre os animais imunizados com a vacina A e com a vacina B no Experimento 2, ou seja, o fato de terem sido realizadas duas ou cinco passagens *in vitro* da estirpe LO4, não interferiu na eficácia contra a letalidade e contra a formação do portador renal e genital, optou-se pela retirada da formulação A do Experimento 3, reduzindo o número de animais utilizados.

Com os resultados do Experimento 3 sumarizados na tabela 10 é possível verificar que os adjuvantes, $Al(OH)_3$ e saponina, e a virulência da estirpe não influenciaram na eficácia das vacinas. Todas as vacinas obtiveram 100% de eficácia quanto a letalidade, com diferença significativa em relação ao grupo controle, não vacinado, ($p < 0,0001$), cuja morte de 100% dos animais ocorreu entre o 5º e 8º d.p.i. As vacinas B e D produzidas com a estirpe LO4 com cinco passagens *in vitro*, e as vacinas C e E produzidas com a estirpe referência *Hond Utrecht IV*, apresentaram a mesma eficácia e não obtiveram sucesso na proteção contra a formação do portador

renal e genital, com freqüências de positividade entre 7/10 a 9/10 para rins e genitais, não diferindo estatisticamente dos resultados do grupo controle (não vacinado) para estes órgãos ($p > 0,21$). Todos animais apresentaram lesões compatíveis com leptospirose e com grande quantidade da bactéria nos macerados dos órgãos, enquanto que nos animais vacinados e eutanasiados após o 14^o d.p.i. os macerados apresentaram poucas leptospiras.

Tabela 10 – Eficácia de vacinas monovalentes formuladas com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4 e *Hond Utrecht IV*, com dois tipos de adjuvantes, saponina e hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) no teste de desafio por via IP, de acordo com o CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) em hamsters (Experimento 3) - São Paulo - 2007

Grupo	Via-Sexo	Nº animais	Nº mortos antes 14º dia	Nº eutanasiados no 14º dia	% Proteção da vacina ^a	Nº de rins positivos ^b				Nº de genitais positivos ^b							
						mortos ^c	%	eutanasiados ^c	%	Total	%	mortos ^c	%	eutanasiados ^c	%	Total	%
Controle (não vacinado)	IP - m.	10	10	0	-	10	100,0	-	-	10	100,0	10	100,0	-	-	10	100,0
VACINA B	IP - m.	10	0	10	100	-	-	8	80,0	8	80,0	-	-	9	90,0	9	90,0
VACINA C	IP - m.	10	0	10	100	-	-	9	90,0	9	90,0	-	-	8	80,0	8	80,0
VACINA D	IP - m.	10	0	10	100	-	-	7	70,0	7	70,0	-	-	8	80,0	8	80,0
VACINA E	IP - m.	10	0	10	100	-	-	7	70,0	7	70,0	-	-	9	90,0	9	90,0

IP = intraperitoneal, m.= macho

^a = proteção de acordo com a letalidade (CFR - UNITED STATES OF AMERICA, 2006)

^b = suspensão do órgão positivo para uma das técnicas (microscopia direta ou cultivo)

^c = mortos = animais que morreram por leptospirose antes do 14º d.p.i.; eutanasiados = animais que sobreviveram até o 14º d.p.i.

Vacina B – estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro* e saponina, Vacina C – estirpe *Hond Utrecht IV* e saponina, Vacina D - estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro* e Al(OH)₃ e Vacina E – estirpe *Hond Utrecht IV* e Al(OH)₃.

No exame sorológico dos animais do Experimento 3 (Apêndice G), apenas os vacinados e desafiados apresentaram títulos de anticorpos na prova de SAM conforme a distribuição descrita na tabela 11.

Com o emprego da estirpe LO4 como antígeno na prova de SAM, observou-se os maiores títulos de aglutininas, mesmo nos animais vacinados com as bacterinas C e E, formuladas com a estirpe referência, e desafiados com a estirpe LO4. Os grupos dos animais vacinados com as formulações B e D e desafiados apresentaram maior número de indivíduos negativos (<25), cinco e quatro respectivamente, e dois animais de cada grupo apresentaram títulos de 100 com a utilização da estirpe homóloga (LO4). Com o emprego da estirpe referência, todos os animais desses grupos foram não-reagentes (Tabela 11).

As vacinas C e E, induziram o maior número de animais reagentes tanto frente à estirpe LO4 como frente à estirpe referência (homóloga) na prova de SAM. Apenas um indivíduo por grupo foi negativo com ambos os antígenos. A bacterina C induziu título de 25 em um animal, de 50 em quatro e de 100 em outros quatro animais. A vacina E induziu título de 25 em dois indivíduos, 50 em três, 100 em dois e 200 em outros dois animais (Tabela 11). Nesse caso, o uso da estirpe homóloga como antígeno revelou redução nos títulos sorológicos. As vacinas C e E induziram título máximo de 50 em quatro e dois animais e título de 25 em cinco e sete animais, respectivamente.

Tabela 11 – Distribuição de títulos de anticorpos aglutinantes na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes B, C, D, E e não vacinados (Controle), desafiados com a com a estirpe LO4 por via IP (Experimento 3) - São Paulo - 2007

Grupo	Nº animais	Distribuição de títulos de anticorpos aglutinantes/ Estirpe (antígeno)							
		LO4					<i>Hond Utrecht IV</i>		
		Negativo	25	50	100	200	Negativo	25	50
CONTROLE	10	10	0	0	0	0	10	0	0
VACINA B	10	5	1	2	2	0	10	0	0
VACINA C	10	1	1	4	4	0	1	5	4
VACINA D	10	4	2	3	1	0	10	0	0
VACINA E	10	1	2	3	2	2	1	7	2
TOTAL	50	21	6	12	9	2	32	12	6

Vacina B – estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro* e saponina, Vacina C – estirpe *Hond Utrecht IV* e saponina, Vacina D - estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro* e Al(OH)₃ e Vacina E – estirpe *Hond Utrecht IV* e Al(OH)₃.

Na tabela 12 e gráfico 2 foram apresentadas as médias aritméticas dos títulos de anticorpos dos animais do Experimento 3, transformados em $\log_2(x+1)$. Para o tratamento estatístico desses dados, foram utilizados os testes paramétricos, uma vez que estavam dentro da normalidade. Com o uso da estirpe LO4 como antígeno observou-se títulos maiores de aglutininas em todos os grupos, com exceção dos animais não vacinados (grupo controle), ou seja, o desafio com a estirpe LO4 não foi capaz de induzir títulos de anticorpos ≥ 25 na SAM.

Os resultados mostraram que as vacinas C e E induziram os maiores títulos médios de aglutininas com média de 5,4 e 5,5 com a estirpe LO4 e com média de 4,62 e 3,95 com a estirpe referência (homóloga), entretanto, essas diferenças não foram significantes ($p > 0,91$ e $p > 0,13$).

As vacinas B e D apresentaram-se reagentes apenas quando se utilizou a estirpe homóloga (LO4), com títulos médios de anticorpos de 2,94 e 3,31,

respectivamente ($p>0,78$). Os títulos médios dos grupos vacinados com as bacterinas C e E quando comparados com o título médio do grupo vacinado com a bacterina B foram significantes ($p<0,05$).

O uso das estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV* não ocasionou diferença significativa nos títulos médios de nenhum dos grupos vacinados ($p>0,12$).

Tabela 12 – Médias aritméticas dos títulos de anticorpos na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes B, C, D, E e não vacinados (Controle), desafiados com a com a estirpe LO4 por via IP (Experimento 3) - São Paulo - 2007

Grupo	Média Aritmética $\text{Log}_2 (x+1)$ / Estirpe (Antígeno)	
	LO4	<i>Hond Utrecht IV</i>
CONTROLE (não vacinado)	0,00	0,00
VACINA B	2,94	0,00
VACINA C	5,40	4,62
VACINA D	3,31	0,00
VACINA E	5,50	3,95

Vacina B – estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro* e saponina, Vacina C – estirpe *Hond Utrecht IV* e saponina, Vacina D - estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro* e Al(OH)_3 e Vacina E – estirpe *Hond Utrecht IV* e Al(OH)_3 .

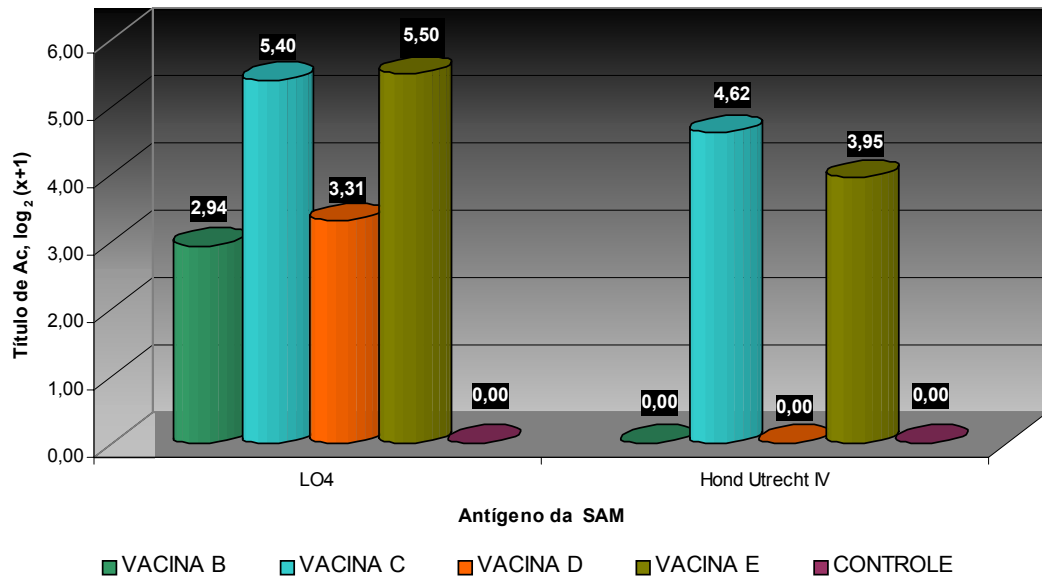


Gráfico 2 - Médias aritméticas dos títulos de anticorpos aglutinantes, na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados com as vacinas monovalentes B, C, D, E e grupo controle (não vacinado) e desafiados com a estirpe LO4 pela via IP (Experimento 3) - São Paulo - 2007

Os resultados da avaliação sorológica dos animais somente vacinados com as bacterinas (Experimento 4) demonstraram que as vacinas A, B, C e D não induziram título de anticorpos aglutinantes maior ou igual a 25 para nenhuma das duas estirpes utilizadas como antígenos na prova de SAM.

Apenas a vacina E induziu aglutininas detectáveis apenas quando se utilizou a estirpe homóloga (*Hond Utrecht IV*) como antígeno, sendo em cinco dos nove animais examinados, nos quais quatro hamsters apresentaram título de 25 e um, título de 50 (Apêndice H). A média aritmética dos dados transformados em log₂(x+1) dos dez animais do grupo foi 2,72 (Tabela 13).

Tabela 13 – Médias aritméticas dos títulos de anticorpos na prova de SAM, frente às estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, de hamsters imunizados, via subcutânea, com as vacinas monovalentes A, B, C, D, E e não vacinados (Controle), conforme a dose preconizada pelo CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), Experimento 4 - São Paulo - 2007

Grupo	Média Aritmética $\text{Log}_2 (x+1)$ / Estirpe (Antígeno)	
	LO4	<i>Hond Utrecht IV</i>
CONTROLE (não vacinado)	0,00	0,00
VACINA A	0,00	0,00
VACINA B	0,00	0,00
VACINA C	0,00	0,00
VACINA D	0,00	0,00
VACINA E	0,00	2,72

Vacina A – estirpe LO4 com 2 passagens *in vitro* e saponina, Vacina B – estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro* e saponina, Vacina C – estirpe *Hond Utrecht IV* e saponina, Vacina D - estirpe LO4 com 5 passagens *in vitro* e $\text{Al}(\text{OH})_3$ e Vacina E – estirpe *Hond Utrecht IV* e $\text{Al}(\text{OH})_3$.

As vacinas também não induziram títulos elevados de anticorpos neutralizantes no teste de inibição do crescimento (Tabela 14, Gráfico 3 e Apêndice I). No grupo imunizado com a vacina A, um *pool* de soro de cinco animais não revelou título de anticorpos neutralizantes com o método de Reed Muench, uma vez que dos cinco tubos do *pool* com soros puros (sem diluição), apenas dois apresentaram inibição do crescimento. No outro *pool* dos cinco animais o título foi de 1,41, resultando na média do grupo de 0,71.

Os dois *pools* dos animais imunizados com a vacina B apresentaram títulos de anticorpos semelhantes: 2,24 e 2,45 com média de 2,35. A vacina C induziu os maiores títulos de anticorpos neutralizantes nos dois *pools*, com 5,13 e 8,91 e média de 7,02. As vacinas D e E formuladas com hidróxido de alumínio induziram títulos de

anticorpos neutralizantes semelhantes nos dois *pools* com 1,29, 1,12 e 1,41, 2,82, e médias de 1,21 e 2,12, respectivamente.

A vacina C contendo saponina induziu maior título de anticorpos neutralizantes, com média aritmética de 7,02, e a vacina E com hidróxido de alumínio induziu títulos de aglutininas em cinco dos nove animais vacinados, ambas formuladas com a estirpe *Hond Utrecht IV*.

Tabela 14 – Títulos e médias aritméticas de anticorpos neutralizantes dos *pools* de soros sangüíneos de hamsters vacinados com diferentes formulações de bacterinas contra *Leptospira interrogans* sorovar Canicola frente à estirpe *Hond Utrecht IV* - São Paulo, 2007

Grupo	Adjuvante	Estirpe da Vacina	Nº do Pool	Título de Ac. neutralizantes
CONTROLE (não vacinado)	-	-	1	0,00
			2	0,00
			Média	0,00
VACINA A	saponina	LO4	1	0,00
			2	1,41
			Média	0,71
VACINA B	saponina	LO4	1	2,24
			2	2,45
			Média	2,35
VACINA C	saponina	<i>Hond Utrecht IV</i>	1	5,13
			2	8,91
			Média	7,02
VACINA D	Al(OH) ₃	LO4	1	1,29
			2	1,12
			Média	1,21
VACINA E	Al(OH) ₃	<i>Hond Utrecht IV</i>	1	1,41
			2	2,82
			Média	2,12

Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio

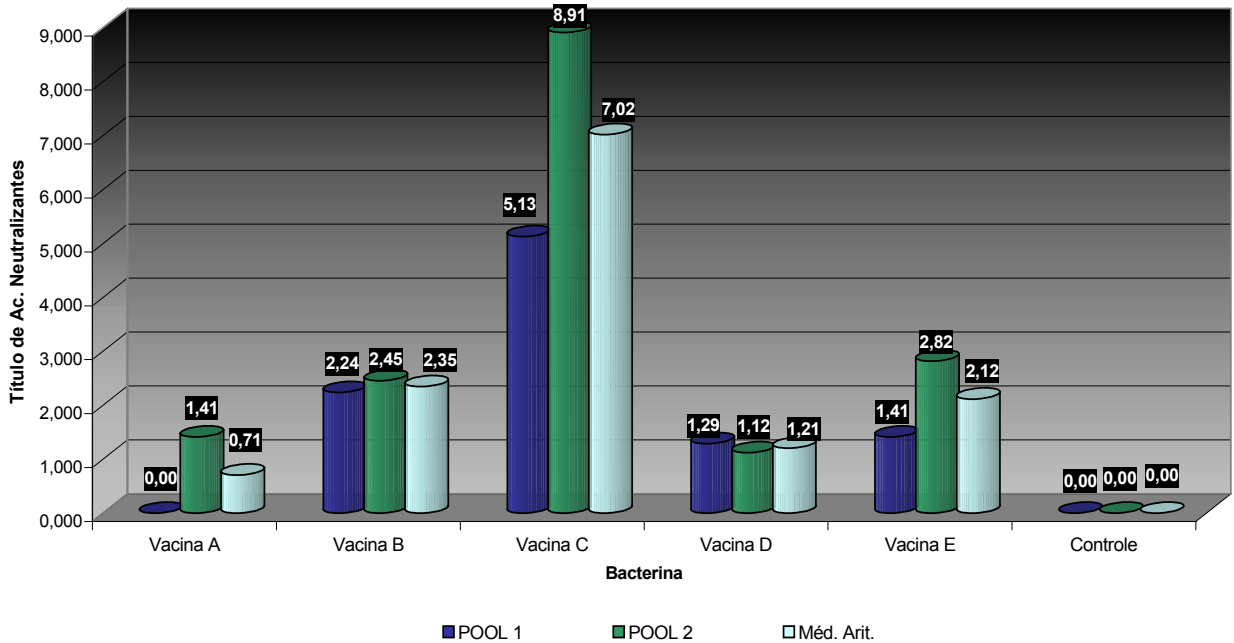


Gráfico 3 – Títulos e médias aritméticas de anticorpos neutralizantes de *pools* de soros sanguíneos de hamsters imunizados com vacinas monovalentes A, B, C, D e E contra a *L. interrogans* sorovar Canicola, avaliados pelo teste de inibição do crescimento - São Paulo - 2007

Nos exames histopatológicos dos animais que morreram por leptospirose nos Experimentos 1, 2, e 3, pode-se observar que independentemente da via de inoculação, concentração do inóculo e se o animal foi vacinado ou não, as lesões foram semelhantes as ocasionadas nos animais controle (não vacinados) inoculados pela via IP. As lesões mais freqüentes nos rins foram: congestão, hemorragia tubular e glomerular, degeneração tubular e áreas de necrose (Figuras 11 a 13). No útero foram observadas congestões, hemorragia da subserosa, hemorragia intersticial na submucosa (Figura 14) e na camada muscular. Algumas fêmeas apresentaram células inflamatórias na luz do útero e da tuba uterina (Figuras 15).

Nos animais que foram eutanasiados após o período de observação pós-inoculação (21 d.p.i no Experimento 1 e 14 d.p.i nos Experimentos 2 e 3) a maioria dos animais apresentou tecidos renais (Figuras 16 e 17) e uterinos (Figura 18) normais e em apenas alguns observou-se leve grau de congestão nos órgãos e infiltrados inflamatórios discretos e focais (Figuras 19 e 20). Entretanto, não houve

diferença quanto a via de inoculação, concentração de inóculo ou se o animal foi vacinado ou não.

Todos os testículos avaliados, independentemente se os animais vieram a óbito por leptospirose ou foram eutanasiados após o período de observação, apresentaram estruturas normais e sem a presença de células inflamatórias (Figuras 21 e 22).

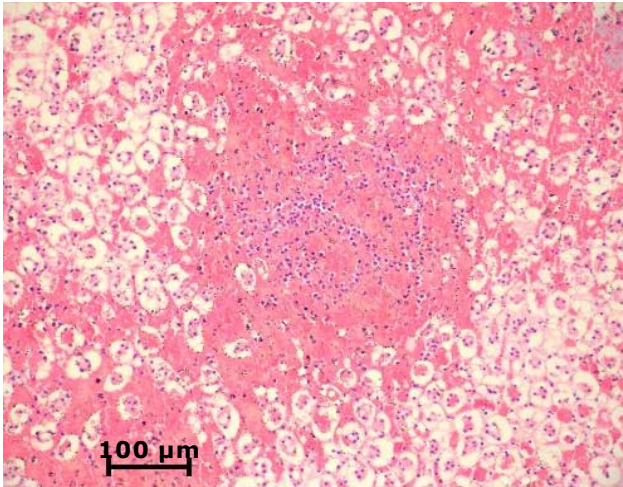


Figura 11 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com hemorragia difusa, necrose tubular de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via conjuntiva-nasal (CN)



Figura 12 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com hemorragia glomerular e tubular com degeneração tubular de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal (IP)

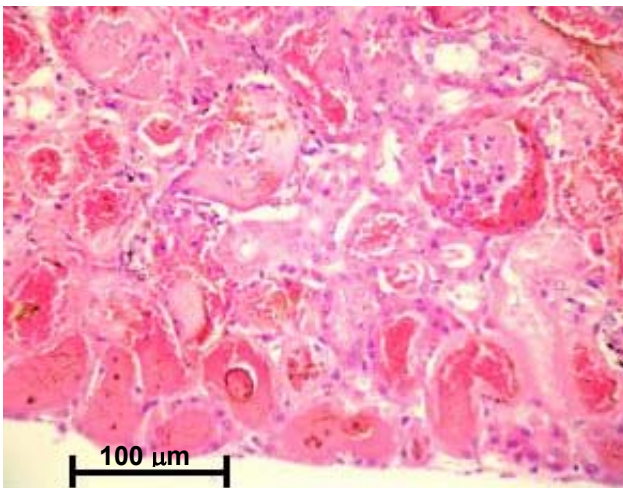


Figura 13 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com congestão e hemorragia glomerular e tubular com degeneração tubular, necrose focal de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal (IP)

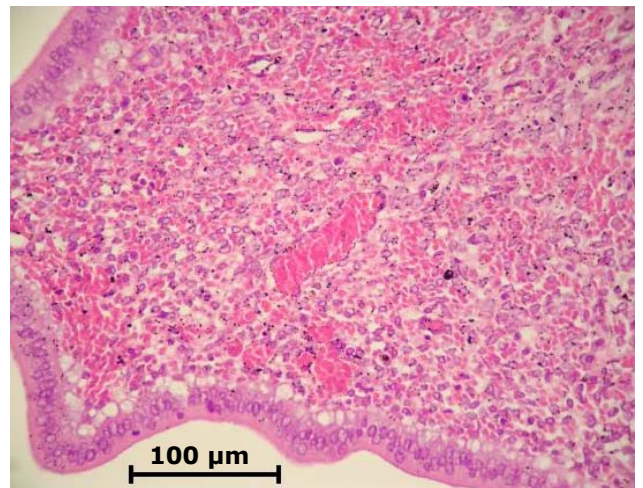


Figura 14 – Corte histológico de útero, corado pela técnica de H.E., com congestão e hemorragia intersticial difusa de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via conjuntiva-nasal (CN)

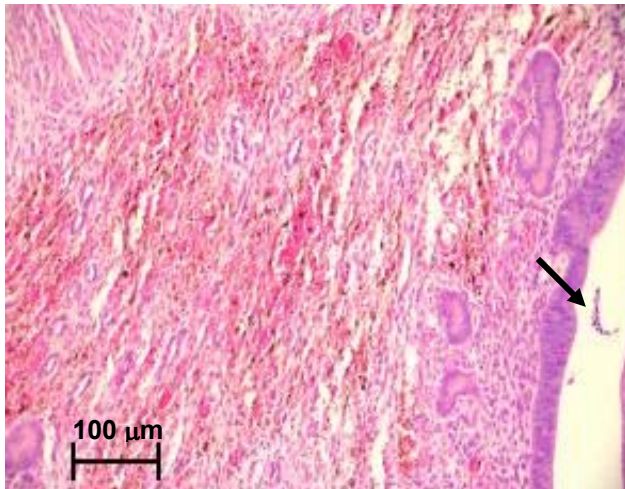


Figura 15 – Corte histológico de útero, corado pela técnica de H.E., com congestão e hemorragia intersticial e infiltrado inflamatório na luz do órgão (seta) e na mucosa de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal (IP)

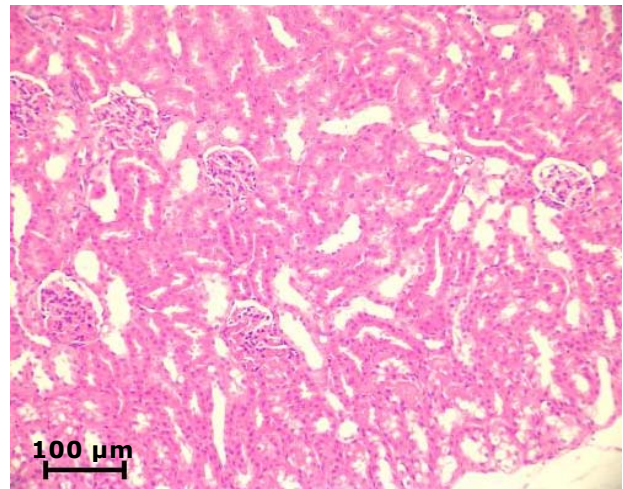


Figura 16 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via conjuntiva-nasal (CN) e eutanasiado

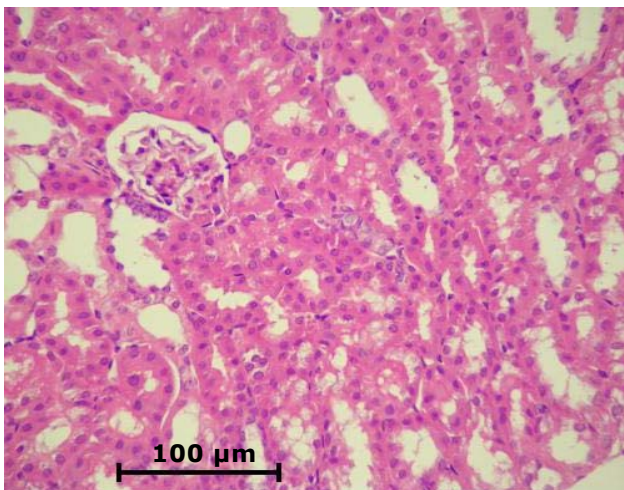


Figura 17 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via conjuntiva-nasal (CN) e eutanasiado (maior aumento)

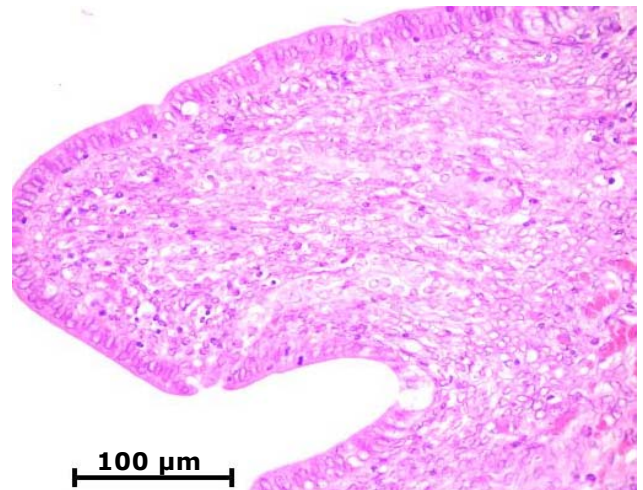


Figura 18 – Corte histológico de útero, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via conjuntiva-nasal (CN) e eutanasiado

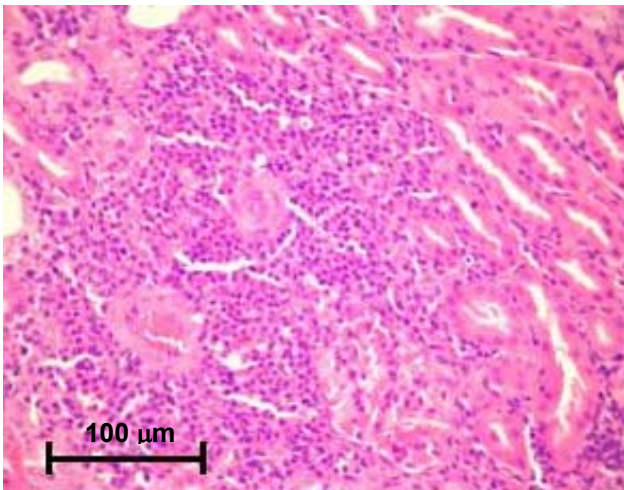


Figura 19 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com infiltrado inflamatório intersticial de hamster imunizado com a vacina C e inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via intraperitoneal (IP) e eutanasiado

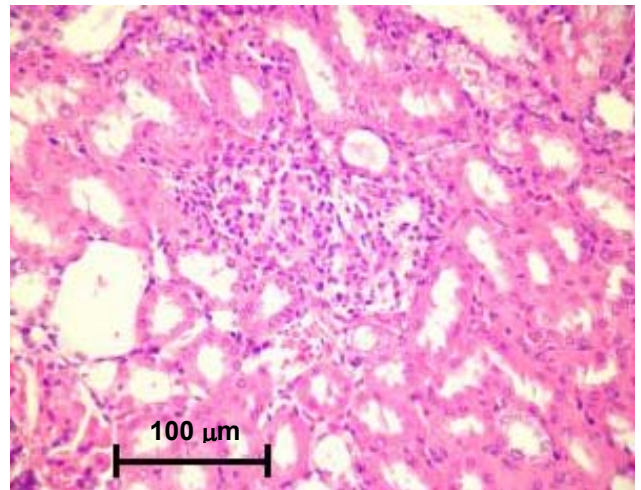


Figura 20 – Corte histológico de rim, corado pela técnica de H.E., com infiltrado inflamatório intersticial de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via conjuntiva-nasal (CN) e eutanasiado

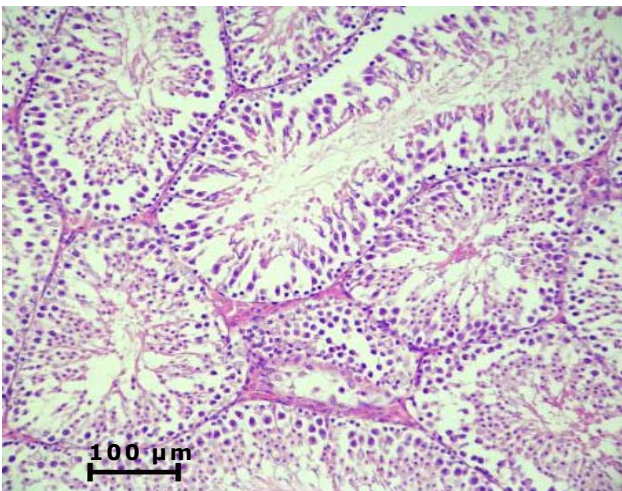


Figura 21 – Corte histológico de testículo, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal (CN)

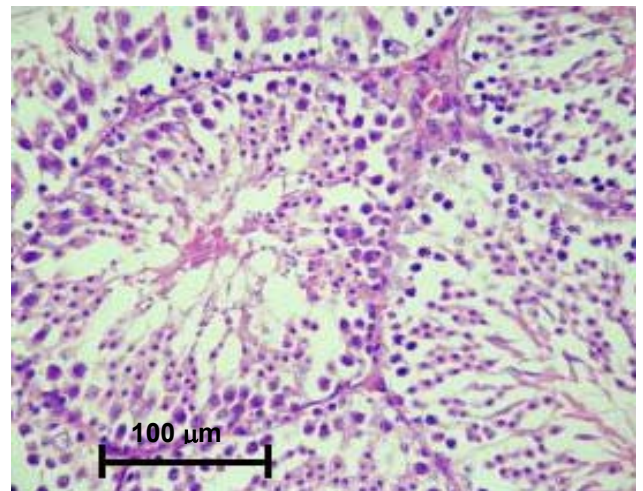


Figura 22 – Corte histológico de testículo, corado pela técnica de H.E., com aspecto normal de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal, CN (maior aumento)

Com a coloração dos tecidos com a técnica de Warthin-Starry foi possível identificar a presença de leptospiras, principalmente nos tecidos renais dos animais que morreram por leptospirose. Independentemente da via, concentração do inóculo e do tratamento (vacinado ou não vacinado) observou-se grande quantidade de leptospiras (Figuras 23 a 26).

Comparando as demais vias com a IP, considerada como controle da infecção, pode-se evidenciar que a inoculação pelas vias CN e CV quando letais, apresentaram o mesmo poder de disseminação da leptospira pelo organismo dos hamsters.

Nos genitais desses animais que vieram a óbito foi observada a presença de leptospiras, porém a quantidade da bactéria foi mais abundante nos úteros (Figuras 27 e 28) do que nos testículos (Figuras 29 e 30). Vale ressaltar que apenas em alguns poucos cortes histológicos de testículo foi detectado a presença de leptospira, mesmo os rins destes animais apresentando lesões e presença da bactéria.

Nos animais pertencentes ao Experimento 1, em que os animais não foram vacinados, os que foram eutanasiados no 21^o d.p.i verificou-se a presença de poucas leptospiras em algumas amostras de rins. Porém, esses achados não foram correlacionados quanto a via ou concentração do inóculo.

Nos animais do Experimento 2 e 3, que foram imunizados com as diferentes vacinas, não foi observado a presença de leptospiras nos tecidos (Figuras 31 a 34), ao contrário dos animais do grupo controle que vieram a óbito, porém não houve diferença entre os animais vacinados com as cinco formulações.

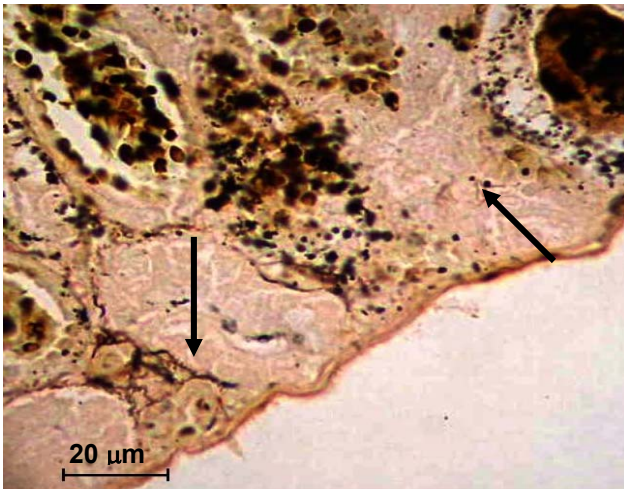


Figura 23 – Corte histológico de rim contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal, CN. Técnica de Warthin-Starry

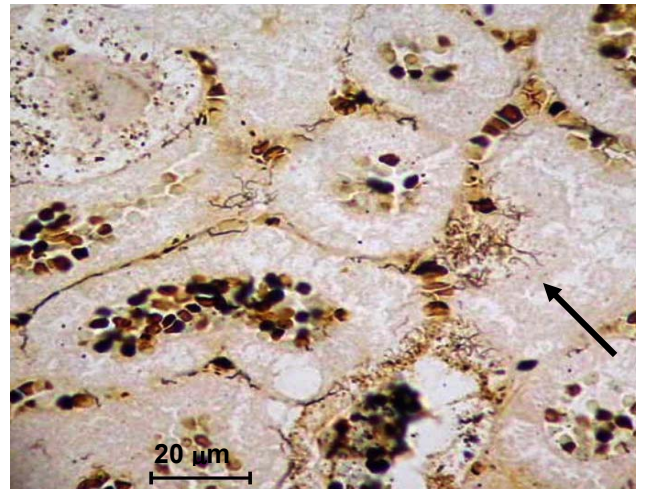


Figura 24 – Corte histológico de rim contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal, CN. Técnica de Warthin-Starry

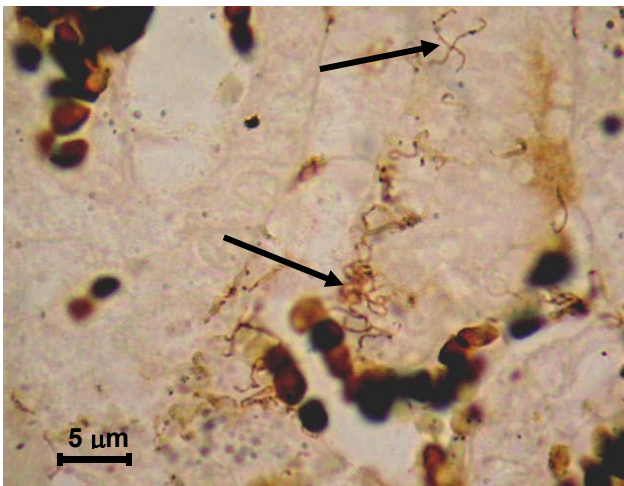


Figura 25 – Corte histológico rim contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 pela via intraperitoneal, IP. Técnica de Warthin-Starry

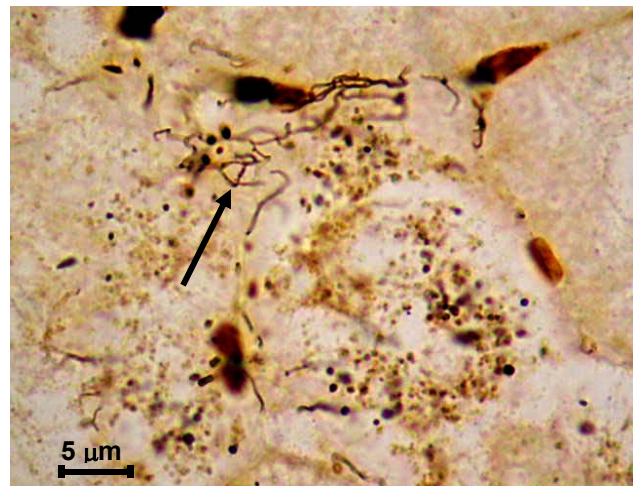


Figura 26 – Corte histológico de rim contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 pela via intraperitoneal, IP. Técnica de Warthin-Starry

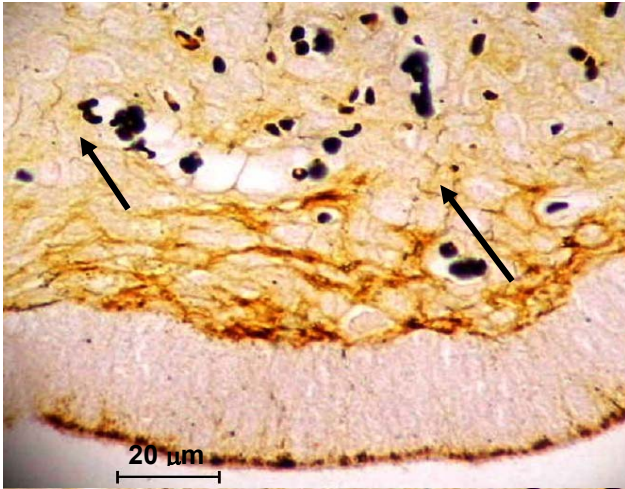


Figura 27 – Corte histológico de útero contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal , CN. Técnica de Warthin-Starry

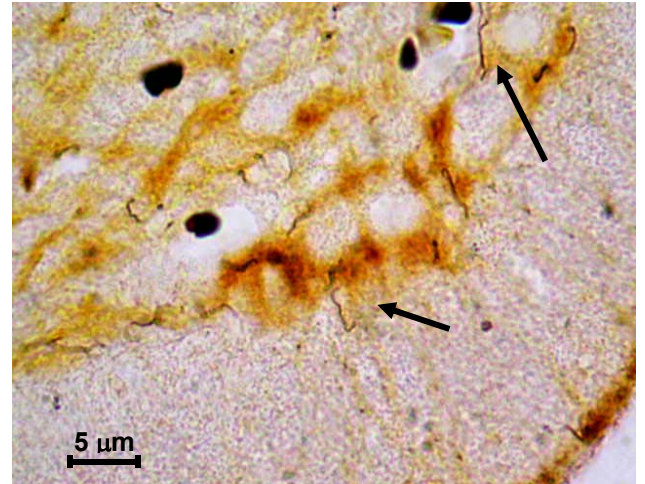


Figura 28 – Corte histológico de útero contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 inoculado pela via conjuntiva-nasal , CN (maior aumento). Técnica de Warthin-Starry

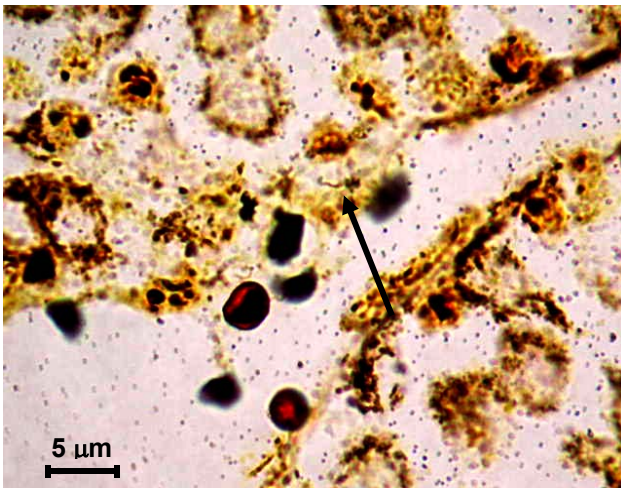


Figura 29 – Corte histológico de testículo contendo a presença de leptospira (seta) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, IP. Técnica de Warthin-Starry

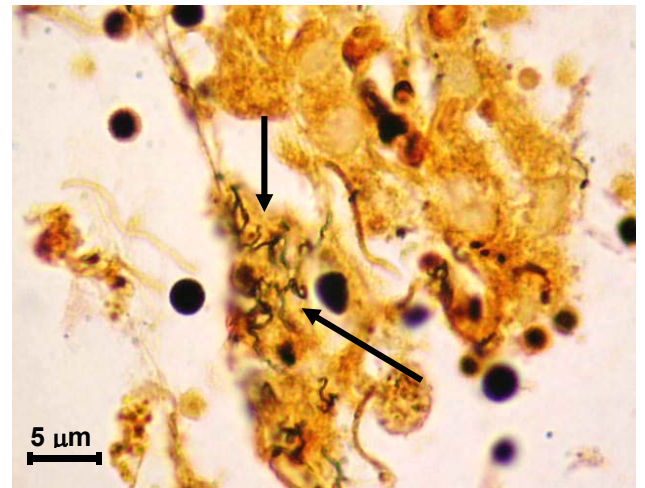


Figura 30 – Corte histológico de testículo contendo leptospiras (setas) de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4 pela via intraperitoneal, IP. Técnica de Warthin-Starry

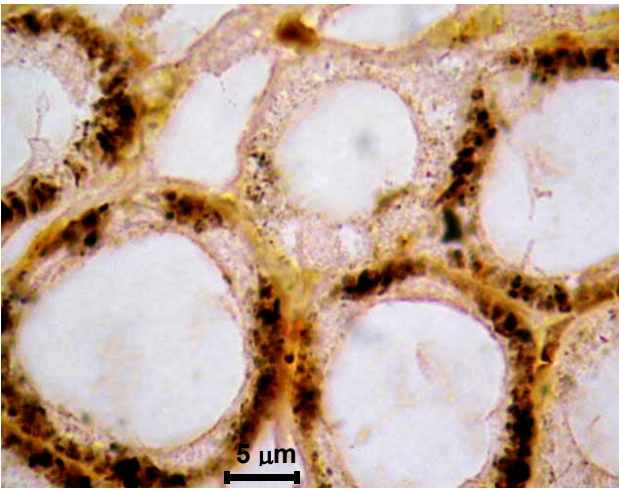


Figura 31 – Corte histológico de rim com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina B, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via IP e eutanasiado. Técnica de Warthin-Starry

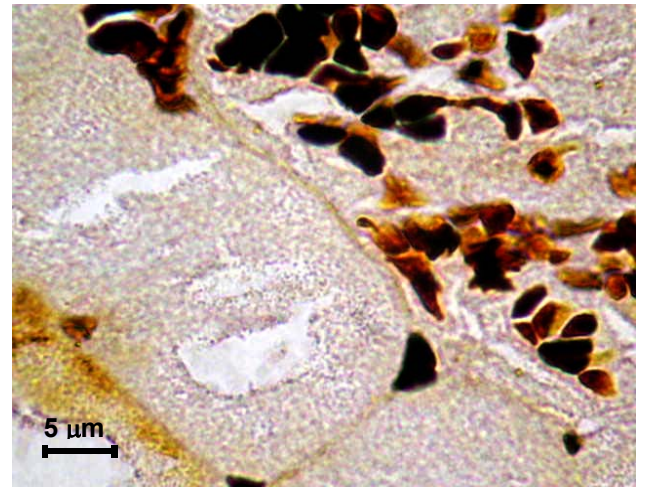


Figura 32 – Corte histológico de rim com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina C, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via CN e eutanasiado. Técnica de Warthin-Starry

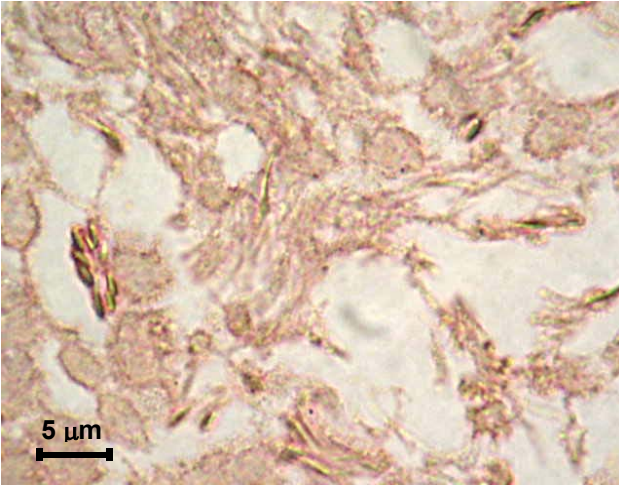


Figura 33 – Corte histológico de testículo com aspecto normal de hamster imunizado com a vacina E, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via IP e eutanasiado. Técnica de Warthin-Starry

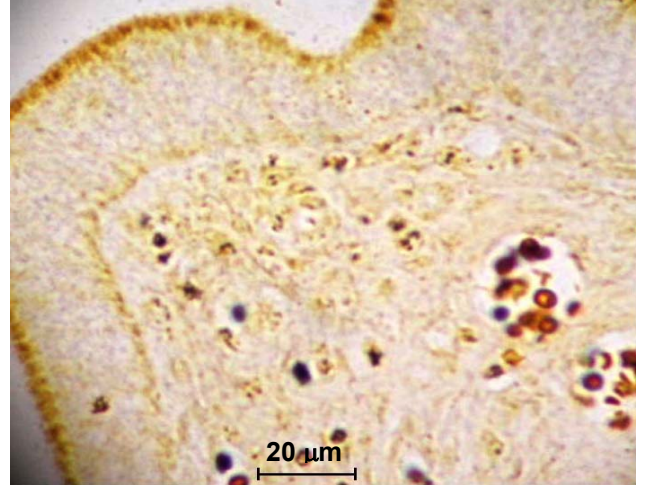


Figura 34 – Corte histológico de útero com aspecto normal de hamster de hamster imunizado com a vacina A, inoculado com *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via CV e eutanasiado. Técnica de Warthin-Starry

5 DISCUSSÃO

Para atingir os objetivos propostos, o presente estudo baseou-se na observação de leptospiros nos órgãos dos hamsters inoculados pelas vias CN, CV e IP (controle), no estabelecimento do portador renal e genital. Há vários relatos de que as bacterinas não protegem contra a formação do portador, principal disseminador e mantenedor da bactéria no ambiente. Por isso, este trabalho avaliou a eficácia de formulações de bacterinas produzidas com dois adjuvantes e duas estirpes diferentes, na prevenção do portador utilizando o hamster como modelo experimental.

A estirpe LO4 utilizada na produção das vacinas (formulações A, B e D) e no desafio é autóctone, isolada do fígado de um suíno com o histórico clínico desconhecido, abatido na cidade de Londrina - PR (Freitas et al., 2004). A estirpe *Hond Utrecht IV* utilizada nas bacterinas C e E pertence ao banco de estirpes de referência da OMS, originária da Holanda e foi empregada para efeito comparativo. O estudo de patogenicidade e virulência de uma estirpe isolada no Brasil, é fundamental para entender aspectos clínicos e epidemiológicos da leptospirose regional. Apesar do isolamento de amostras de vários sorovares, poucos estudos deste tipo foram realizados.

A virulência da estirpe LO4 destacou-se pelas hemorragias pulmonares e enterites severas independentemente da via e dose de inoculação. Entretanto, no presente estudo, os animais sobreviventes e eutanasiados não apresentaram alteração pertinente à infecção aguda ou crônica.

Os sinais clínicos observados nos hamsters que adoeceram após a inoculação com a estirpe LO4 foram semelhantes aos descritos para os sorovares Canicola, Mozdok, Copenhageni (OLIVA et al., 1998), para o sorovar Pomona (SANGER et al., 1961; ABU; SLEIGHT, 1964, HAANWINCKEL; MEGID; SOUZA, 2004) e para o sorovar Szwajizak (BADIOLA; THIERMANN; CHEVILLE, 1983), como depressão, hematúria, piloereção, epistaxe, convulsões, hiperexcitabilidade e hematúria. Porém, não foi observada icterícia nos animais mortos pela infecção com a estirpe LO4, descrita nas infecções com estirpes do sorovar Pomona (SANGER et al., 1961; BRANDESPIM et al., 2004; HAANWINCKEL; MEGID; SOUZA, 2004).

As lesões microscópicas mais freqüentes nos animais mortos por leptospirose foram associadas aos acidentes vasculares, com hemorragias tanto no tecido renal como no uterino e pulmões, além de degenerações de células tubulares e necroses focais, sendo semelhantes às lesões descritas na literatura para os diferentes sorovares (SANGER et al., 1961; OLIVA et al., 1998; BRANDESPIM et al., 2004; HAANWINCKEL; MEGID; SOUZA, 2004). Os infiltrados de células inflamatórias não foram unânimes em todos os animais ao contrário do observado por Madruga et al. (1983) e Wild et al. (2002) que relataram nefrites multifocais ocasionados por leptospiroses em bovinos e cães, respectivamente. Nos animais eutanasiados não foi observada a presença de tecido conjuntivo no parênquima dos órgãos renal e uterino, conforme descrito por Sanger et al. (1961), característico de infecção crônica.

Apesar de leptospiras terem sido detectadas no parênquima testicular, nenhum dos animais examinados apresentaram lesões histológicas neste tecido. Estes resultados corroboram com os encontrados por Brandespim et al. (2004) que também não observaram lesões nos testículos de hamsters inoculados com o sorovar Pomona, caracterizando desta forma que o órgão seja um dos locais de escape da bactéria ao sistema imunológico, conforme relatado por Faine et al. (1999). Possivelmente, a colonização das leptospiras neste órgão não provoque processo inflamatório acentuado a ponto de causar injúrias teciduais, fenômeno que foi chamado de “inércia imunológica” ou de sítios “privilegiados” imunologicamente (FAINE et al., 1999; NARS et al., 2005.)

Com o uso da técnica de impregnação por prata pelo método de Warthin-Starry nos cortes histológicos provenientes dos animais que morreram e apresentaram lesões características da leptospirose, foi possível detectar espiroquetas em grande quantidade nos rins e menos abundantes em algumas amostras de útero e testículo. O mesmo resultado foi observado por Abdul e Sleight (1964), Miller (1972), Oliva et al. (1998) e por Haanwinckel, Megid e Souza (2004). Entretanto, a técnica de Warthin-Starry não foi capaz de demonstrar a localização das leptospiras em todos os animais portadores com as concentrações de inóculo, vias e estirpe estudada, principalmente nos órgãos genitais. Sanger et al. (1961) também relataram dificuldades na observação de leptospiras em tecidos de hamsters com infecção crônica, ao contrário do observado por Brandespim et al.

(2004) com a técnica de Levaditti que identificaram a presença de espiroquetas nos testículos, epidídimo e vesícula seminal mesmo 30 d.p.i.

A passagem em animais é descrita como o melhor método para garantir e preservar a virulência das estirpes (FAINE et al.,1999). Neste trabalho, a estabilização da virulência da estirpe LO4 por passagens consecutivas em hamsters foi eficaz, no entanto, o processo foi demorado e com inconveniente da utilização de grande quantidade de animais. Sanger et al. (1961) conseguiram a estabilização da virulência para uma estirpe do sorovar Pomona somente após 16 passagens *in vivo*. Para a estirpe LO4 foram necessárias 20 passagens em hamsters e mesmo assim, em alguns momentos houve instabilidade da virulência, mesmo em passagens subseqüentes *in vivo*. Neste caso, foi necessário voltar ao cultivo *in vitro* proveniente da inoculação anterior, ou seja, uma cultura sem repiques sucessivos, para reiniciar o processo de estabilização. Dessa forma, mostrou-se necessária a manutenção de vários cultivos primários da estirpe LO4 virulenta em meio de cultura e também armazenadas em nitrogênio líquido.

Uma das possibilidades para explicar a instabilidade da virulência *in vivo* seria que, inicialmente a passagem em animal seleciona as leptospiros mais virulentas, capazes de escapar do sistema imune e que expressam fatores de virulência ocasionando a morte do animal conforme comentado por Faine et al. (1999). Porém, num segundo momento, por razões desconhecidas e imprevisíveis, ocorreria o “desligamento” de genes correlacionados à virulência ou ainda por alterações nos antígenos de superfície que poderiam refletir na multiplicação ou mesmo na interação entre a bactéria e o hospedeiro (NATARAJASEENIVASAN et al., 2004; NALLY et al., 2005; PALANIAPPAN et al., 2006; NALLY et al., 2007).

Quanto a identificação da bactéria pelas técnicas empregadas, a visualização direta dos macerados de tecidos foi facilitada pelas características morfológicas, mas sobretudo pelos movimentos de rotação e propulsão e pela diluição da amostra em salina estéril na própria lâmina de preparo para a microscopia. Macedo et al. (2004), Haanwinckel, Megid e Souza (2004) e Silva et al. (2005) também obtiveram maior sucesso na avaliação direta das amostras de órgãos. Além de se mostrar mais eficiente, a técnica é simples e rápida, sendo a única desvantagem a necessidade de se analisar o material imediatamente após a morte do animal, semelhante ao cultivo, no qual as amostras devem ser processadas rapidamente, evitando contaminações e morte das leptospiros.

O cultivo dos macerados de órgãos para a identificação da presença de leptospiros teve como maior fator de insucesso o alto grau de contaminação, o que pode ter inibido o crescimento das leptospiros pela competição por nutrientes, alteração do pH e liberação de substâncias tóxicas (SILVA et al., 2005). Mesmo com a utilização de antibióticos seletivos e adotando-se procedimentos para redução de contaminação, como uso de materiais estéreis e assepsia com álcool 70% (v/v) dos animais antes de iniciar a necrópsia. Possivelmente, o uso de antibióticos mais potentes poderia reter as contaminações, como no protocolo descrito por Freitas et al. (2004) que recomenda o uso, além do ácido nalidíxico e do 5-fluorouracil, do cloranfenicol, da neomicina e da vancomicina. Todavia, a OIE (2004) alerta que os antibióticos seletivos podem reduzir as chances de crescimento de leptospiros, principalmente em amostras com poucas espiroquetas viáveis. Este fato também pode ter prejudicado o isolamento no presente trabalho, apesar das amostras terem permanecido apenas 24 horas no meio contendo antibióticos. Também deve ser considerado que, independentemente da contaminação das amostras clínicas, há a dificuldade inerente ao crescimento de leptospiros *in vitro* (HAANWINCKEL; MEGID; SOUZA, 2004).

Alguns autores enriquecem o meio EMJH ou outros meios de isolamento com tween 80 para favorecer o crescimento da bactéria (MILLER, 1972; PAINTER; ELLINGHAUSEN JUNIOR, 1976; BADIOLA; THIERMANN; CHEVILLE, 1983). Porém, neste trabalho foi utilizado o meio EMJH enriquecido com soro inativado de coelho, asparagina, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio como sugerido por Alves (1995), que propiciam o crescimento das leptospiros.

A PCR não apresentou sensibilidade satisfatória, discordando de Palaniappan et al. (2005) que obtiveram limiar de detecção de seis leptospiros/mL. A baixa sensibilidade da técnica também foi observada por Gotti (2006) em sêmen bovino tratado com antibióticos, cujo limiar de detecção foi de 10.000 leptospiros/mL de sêmen para o sorovar Wolffi.

Com estes resultados discrepantes entre as três técnicas, o índice Kappa para as amostras de tecido renal foi baixo e para o tecido genital foi negativo, ou seja, sem concordância entre elas, sendo reflexo do grande número de resultados falsos negativos obtidos tanto na PCR como no cultivo.

No estudo das concentrações do inóculo e das vias de inoculação (Experimento 1), observou-se que ambos interferiram na letalidade dos hamsters

infectados com a estirpe LO4 (Tabela 6). A inoculação pela via CN mostrou-se tão letal quanto a via IP com a concentração de 100 a 130 leptospiras/campo, e com redução na letalidade significativa com a concentração de 20 a 30 leptospiras/campo em inoculações por dois dias consecutivos. As leptospiras inoculadas pela via CN conseguiram transpassar pelas barreiras do aparelho respiratório, apesar desse órgão ser capaz de responder aos microrganismos com substâncias bactericidas inespecíficas e citocinas presentes na mucosa (BALS; HIEMSTRA, 2004), enquanto que a via IP, que não enfrenta estas barreiras, foi mais letal com concentração menor de leptospira e com dose única. Macedo et al. (2004) também constataram alta letalidade pela via IP (100%) e pela via conjuntival (80%) em hamsters infectados com suspensão do sorovar Pomona com inóculo de desafio contendo 20 a 30 leptospiras/campo.

O emprego de inoculações sucessivas em dias consecutivos pode simular ambientes contaminados onde geralmente, ocorrem múltiplas exposições ao agente, e neste trabalho, apresentou resultados satisfatórios na infecção pelas vias CN e CV nas concentrações dos inóculos estudadas, assim como Gallo et al. (2006) com a inoculação do sorovar Hardjobovis pela via conjuntiva por três dias consecutivos que conseguiram estabelecer a infecção de novilhas.

A infecção pela via CV, resultou em maior número de hamsters sobreviventes, variando de 60 a 100% (Tabelas 6 e 7), dependendo da concentração do inóculo, com leptospiras presentes nos tecidos renais e genitais. Entretanto, sem lesões macro e microscópicas, e ainda desprovidos de resposta sorológica na prova de SAM (título <25), o que caracteriza o estado de portador. Vale ressaltar que em virtude da gravidade das lesões apresentadas pelos animais que morreram por leptospirose com a infecção por esta via, não se descarta a possibilidade de perfuração uterina ou lesões ocasionadas durante a inoculação, o que resultaria no efeito da via IP, e mesmo no caso de lesões, facilitaria a penetração da bactéria na corrente sangüínea.

A mucosa uterina cérvico-vaginal apresenta condições naturalmente protetoras como pH ácido, presença de IgA secretora e a própria microbiota, podendo interferir na colonização pelas leptospiras. Os dados observados neste experimento mostram a via CV permite o escape da bactéria para a circulação, alcançando os órgãos e estabelecendo a infecção sistêmica que dará origem ao portador. A razão pela qual não ocorre lesão e morte do animal ainda é

desconhecida. Bielanski et al. (1998) demonstraram a possibilidade de infecção de novilhas pela inoculação única da estirpe Hardjobovis pelas vias conjuntival e uterina, tornando-as portadoras.

Com relação à infecção dos órgãos, independentemente da via e concentração do inóculo, a frequência de rins e genitais positivos foi semelhante (Tabela 6). No caso dos animais mortos por leptospirose, a infecção dos rins e genitais foi conseqüente à leptospiremia e, portanto, não é indicativa de predileção pelo órgão (BRANDESPIM et al., 2004). Esse resultado foi confirmado também nos animais sobreviventes, demonstrando que a leptospira tende a colonizar esses órgãos durante a infecção crônica com maior incidência de leptospiras nos tecidos renais, tornando o animal portador.

O sexo dos animais não interferiu na letalidade pela via CN, no total de rins e genitais positivos com uso as concentrações do inóculo e via estudados, assim como na indução de anticorpos.

Os exames sorológicos dos hamsters do Experimento 1 com a técnica de SAM demonstraram que as duas concentrações de leptospiras inoculadas pelas diferentes vias não induziram títulos de aglutininas detectáveis, ou seja, ≥ 25 . Abdu e Sleight (1964), ao contrário destes resultados, detectaram títulos de anticorpos ≥ 100 a partir do 5º d.p.i. em hamsters com a inoculação do sorovar Pomona e Badiola, Thiermann e Cheville (1983) observaram soroconversão somente a partir do 8º d.p.i. para o sorovar Hardjo e do 10º d.p.i para o sorovar Szwajizak, sendo os maiores títulos de 1.280 para os dois sorovares. Soto et al. (2006) observaram títulos de 100 a 1.600 em porcas inoculadas pela via endovenosa com a estirpe LO4 após 30 d.p.i.

Todavia, Macedo et al. (2004) observaram títulos entre 100 e 1.600 com a inoculação de estirpe do sorovar Pomona em hamsters, e que a via subcutânea e a escarificação cutânea foram as únicas que estimularam a produção de anticorpos, enquanto que as vias conjuntival e intraperitoneal não induziram, corroborando com os resultados deste presente estudo. Contudo, aparentemente, a estirpe LO4 utilizada no presente trabalho mostrou baixo poder imunogênico pelas vias e concentrações utilizadas, não sendo capaz de induzir altos títulos de anticorpos aglutinantes e neutralizantes em hamsters, o que pode ser inerente a esta estirpe.

A vacinação é considerada uma das medidas mais importante no controle da leptospirose nos animais domésticos, minimizando os sintomas clínicos e perdas econômicas (HOLROYD, 1980; MADRUGA et al., 1983). As bacterinas são

empregadas mundialmente, sendo diversas marcas disponíveis, com variações de sorovares e adjuvantes na formulação.

As indústrias veterinárias obedecem às determinações dos órgãos oficiais do país para a produção das vacinas. No caso do Brasil, não há normas específicas para a produção das vacinas antileptospirose, com isso as determinações de órgãos regulatórios estrangeiros, como o Code Federal Regulation - CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) dos EUA e da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) passam a ser seguidas.

A concentração de antígeno por dose da vacina contra a leptospirose animal não é padronizada ou recomendada por qualquer órgão nacional ou internacional, como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006). As empresas produtoras não são obrigadas a fornecer essa informação ao consumidor, sendo unicamente o teste de eficácia o critério de aprovação da vacina para comercialização. A concentração de 4×10^8 leptospiros/mL utilizada na produção das vacinas experimentais seguiu dados da literatura (AURAN; JOHSON; RITZI, 1972; LANGONI et al., 2001).

Alguns autores relataram resultados discrepantes quanto a proteção à formação do portador. Possivelmente, este fato esteja relacionado com as diferentes concentrações de antígenos por dose das vacinas experimentais (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991). Auran, Johson e Ritzi (1972) utilizaram dose de 6×10^8 cels/dose em hamsters, enquanto que no presente trabalho, após a diluição da vacina, correspondendo a 1/80 da dose de bovinos (5 mL), conforme o protocolo do CFR (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), a real dose vacinal inoculada nos hamsters foi de 5×10^6 cels/dose. Outro fator seria o inóculo de desafio, que muitas vezes não é estipulada por DL_{50} , mas somente por contagens bacteriana sem correlação entre elas.

Esses são alguns dos problemas quando são comparados os resultados de eficácia de vacinas antileptospirose entre os autores. A maioria, não segue os protocolos internacionais, não dilui a vacina conforme o sorovar utilizado de acordo com o protocolo do CFR, não cita o inóculo e a dose do desafio, além de usar esquemas de vacinação e de desafio diferentes. Langoni et al. (2001) utilizaram a mesma concentração inicial de antígenos deste trabalho (4×10^8 cels/mL), porém sem efetuar a diluição, e ainda vacinaram e revacinaram os hamsters após 15 dias.

Tabata et al. (2002) também não diluíram as vacinas e utilizaram o esquema de duas vacinações.

A padronização do número de leptospiras no preparo do inóculo para os testes com as vacinas experimentais foi importante para maior exatidão no tempo observado de morte dos animais, conforme recomendado por González, Dias e Matos (1999) se mostrou eficaz. O inóculo com 100 a 130 leptospiras/campo mostrou-se letal entre três a seis dias e o inóculo de 20 a 30 leptospiras/campo, entre cinco a sete dias pós-inoculação pela via IP e CN e de até 11 dias pela via CV nos poucos animais que vieram a óbito infectados por essa via. Estes resultados demonstram a interferência da via no curso da doença, conforme relatado por Macedo et al. (2004) que constataram que a via IP foi a que mais reproduziu a doença em hamsters com o sorovar Pomona.

Todavia, a padronização por contagem não descarta a determinação da DL_{50} para a execução do teste de eficácia, uma vez que a virulência da estirpe oscila com as passagens *in vivo* ou *in vitro* imprevisivelmente. Nos experimentos 1 e 2 a inoculação por via IP da diluição do inóculo contendo de 20 a 30 leptospiras/campo de MCE resultou num inóculo de desafio com 100 DL_{50} , ou seja, dentro do preconizado pelo CFR (entre 10 e 10.000 DL_{50}). Porém, no Experimento 3, após várias passagens *in vivo*, a mesma concentração de leptospiras, resultou numa inóculo de desafio acima de 10.000 DL_{50} , não sendo possível a determinação, porque ocasionou a morte de 80% dos animais na última diluição 10^{-7} empregada na DL_{50} .

As vacinas produzidas experimentalmente neste trabalho foram inócuas aos animais, não induzindo reações locais ou sistêmicas, como perda de apetite, prostração ou choque anafilático. A inativação dos cultivos com a utilização de 0,4% (v/v) de formol foi eficaz, evitando o efeito deletério do excesso do inativante ao antígeno e ao animal (CFR, UNITED STATES OF AMERICA, 2006), apesar de outros autores terem utilizado 0,1% (LANGONI et al., 2001) ou mesmo 10% do formol (TABATA et al., 2002; VEGA et al., 2005) no processo de inativação e sem relatos de problemas de inocuidade.

Faine et al. (1999) relataram instabilidade da virulência de estirpes pelas passagens *in vitro*. Com o intuito de se verificar a necessidade de estirpes virulentas para a produção de vacinas de boa qualidade, conforme preconizam González et al.

(2005) e Maura et al. (2006), foram estudados os efeitos de duas e cinco passagens *in vitro* na estirpe LO4.

No presente trabalho, duas passagens em meio de cultura não provocaram alterações nas características de virulência da estirpe LO4 quando inoculada em hamsters, enquanto que com cinco passagens *in vitro*, foram observadas mudanças do padrão de virulência, diminuindo o número de mortos por lote ou estendendo o tempo de sobrevivência do hamster de cinco para aproximadamente 12 dias. Por isso, a vacina A, a partir da suspensão de leptospiras cultivadas com duas passagens *in vitro*, manteve as características de virulência, enquanto que as vacinas B e D, produzidas com suspensão de LO4 com cinco passagens *in vitro* apresentaram atenuação do padrão de virulência.

A estabilidade da condição de virulência da estirpe LO4 para a produção das vacinas não mostrou interferência na eficácia. Duas ou cinco passagens da estirpe LO4 em meio de cultura não ocasionaram mudanças antigênicas que comprometessem a eficácia das vacinas na prevenção da letalidade dos hamsters inoculados. Os resultados obtidos contrariam as recomendações de González et al. (2005) e Maura et al. (2006) de ativar a virulência das estirpes de leptospiras por passagens *in vivo* para a produção de vacinas, com o intuito de melhoria na qualidade. Essa observação tem grande valia para as indústrias produtoras de vacinas, uma vez que não seria necessária a manutenção da virulência por passagens sucessivas em animais e, tão pouco a manipulação de grandes volumes destas estirpes para produção de vacinas, reduzindo os riscos aos operadores.

No Experimento 2 as vacinas A, B e C, mostraram-se eficazes quanto ao desafio pela via IP e CN (Tabela 7), protegendo os animais contra a letalidade. A vacina C produzida com a estirpe não virulenta (*Hond Utrecht IV*) foi tão eficaz quanto as vacinas produzidas com a estirpe LO4 (A e B), concluindo que a manutenção desta bactéria por longo período *in vitro* não prejudicou sua antigenicidade, resultando na aprovação da vacina. Esse resultado corrobora com os descritos por Auran, Johson e Ritzi (1972) e por Painter e Ellinghausen Junior (1976) que obtiveram proteção contra a letalidade em hamsters com o uso de bacterinas produzidas com a estirpe *Hond Utrecht IV*, porém contrariam as afirmações de Bernasovskaia, Kondratenko e Mel`nitskaia (1994) de que a perda da virulência ocasiona redução na antigenicidade da estirpe.

As vacinas A e B não resultaram em títulos aglutinantes diferentes na prova de SAM realizada com o antígeno homólogo (LO4) ou heterólogo (*Hond Utrecht IV*). Brod et al. (2005) observaram em cães, títulos de aglutininas maiores quando se utilizou uma estirpe do sorovar Canicola isolada na região como antígeno na prova de SAM comparados com os títulos obtidos com o uso da estirpe referência. Mas, nos animais vacinados com a bacterina C foi observado títulos maiores com a utilização da estirpe homóloga (*Hond Utrecht IV*) à vacina do que com a LO4 (Tabelas 8 e 9).

Como o número de duas e cinco passagens *in vitro* não influenciou nos resultados de eficácia das vacinas A e B no Experimento 2, optou-se para a retirada da vacina A do delineamento do Experimento 3.

As vacinas formuladas com saponina e com $Al(OH)_3$ como adjuvantes foram eficazes na prevenção da letalidade por leptospirose (Experimento 3, Tabela 10), para ambas as estirpes utilizadas (LO4 e *Hond Utrecht IV*), mesmo frente ao inóculo de desafio acima de 10.000 DL₅₀.

Entretanto, as vacinas não foram eficazes na prevenção dos portadores renais e genitais. A ausência de proteção das bacterinas contra os portadores foi relatada para o sorovar Hardjobovis em bovinos (BOLIN et al., 1989; BOLIN; ZUERNER; TRUEBA, 1989; BOLIN et al., 1991), para o sorovar Canicola em cães (BROUGHTON; SCARNELL, 1985; ANDRE-FONTAINE et al., 2003; SCHREIBER et al., 2005) e para Guaricura em hamsters mesmo com o uso de duas doses da vacina (TABATA et al., 2002). Mas, alguns autores obtiveram sucesso na proteção contra a formação de portadores com o uso de bacterinas com duas doses contra o sorovar Hardjobovis em bovinos (BOLIN; ALT, 2001), e em hamsters contra os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, com vacinas contendo alta concentração de antígeno (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991) e contra o sorovar Canicola, utilizando bacterina produzida com a estirpe *Hond Utrecht IV* com concentrações maiores de antígeno/dose do que a utilizada neste experimento (AURAN; JOHSON; RITZI, 1972; PAINTER; ELLINGHAUSEN JUNIOR, 1976).

Diante dessas observações, pode-se inferir que uma boa vacina contra a leptospirose estaria muito mais relacionada à capacidade imunogênica das estirpes de sua composição do que à sua virulência e ainda com a concentração por dose vacinal.

Nos exames histopatológicos dos órgãos dos animais vacinados dos experimentos 2 e 3 e eutanasiados após o 14^o d.p.i. observou-se poucas ou mesmo nenhuma leptospira pela técnica de Warthin-Starry e ausência de lesões pela técnica de H.E. Essas observações convergem com os resultados das leituras diretas dos macerados de órgãos desses animais no MCE, com poucos exemplares de espiroquetas nos tecidos e sugerem proteção parcial contra a colonização dos órgãos, a qual necessitaria de outras metodologias não empregadas neste estudo para mensuração.

O efeito dos adjuvantes Al(OH)₃ de alumínio e saponina na resposta imune do tipo celular não foi avaliado neste trabalho, mas segundo a literatura, o Al(OH)₃ estimula predominantemente a resposta imune humoral, enquanto que a saponina estimula a resposta humoral e celular com intensidade satisfatória (CAMPBELL; PEERBAYE, 1992; NEWMAN et al., 1992; COX; COUTLER, 1997; NAIMAN et al., 2001). No Experimento 3 (Tabelas 10 a 12), evidenciou-se que as vacinas formuladas com os adjuvantes supracitados induziram resposta imunológica suficiente para proteger os hamsters contra o desafio e que o estímulo de anticorpos detectados pela prova de SAM após o desafio dos animais foi mais influenciado pela estirpe da formulação da vacina do que pelo adjuvante. Os dados da tabela 10 também demonstram que os adjuvantes não tiveram efeito na melhoria das vacinas na proteção contra a formação do portador. Entretanto, há relatos de bacterinas formuladas com Al(OH)₃ que foram protetoras contra a formação de portadores, apesar dos terem utilizados protocolos diferentes para avaliação da eficácia das vacinas. (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991; BOLIN; ALT, 2001; TABATA et al., 2002).

Pelos resultados sorológicos do Experimento 3 (Tabelas 11 e 12 e Gráfico 2), assim como no Experimento 2, pode-se confirmar que a estirpe LO4 possui baixo poder imunógeno para a indução de aglutininas.

A vacinação dos animais com as bacterinas produzidas com a estirpe LO4 (B e D) induziu aglutininas que reconheceram apenas a estirpe homóloga como antígeno na prova de SAM e não a estirpe *Hond Utrecht IV* (título <25). Porém, as bacterinas contendo a *Hond Utrecht IV* induziram a produção de aglutininas pelos animais que reconheceram tanto a estirpe LO4 como a homóloga na prova de SAM com títulos ≥25. Estes resultados sugerem que há diferenças antigênicas entre elas.

Os baixos títulos de aglutininas induzidos por bacterinas também foram relatados por Arduino et al. (2004), Vega et al. (2005) e Nardi Júnior et al. (2006).

Para Bolin et al. (1991) os baixos títulos de anticorpos não possuem relação com a quantidade de antígeno por dose da vacina. Mas, segundo o presente trabalho, a estirpe e o tipo de adjuvante interferiram na indução de anticorpos, mas não na proteção.

Mesmo após o desafio com a estirpe LO4, os animais vacinados (Experimentos 2 e 3) não apresentaram aumento no título de aglutininas por qualquer das vias empregadas, quando comparados com os títulos de anticorpos dos animais somente desafiados ou somente vacinados (Experimento 4). Essa observação também foi verificada por Broughton e Scarnell (1985) em cães vacinados e desafiados com os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae.

Em animais previamente positivos na prova de SAM e vacinados com bacterinas, ocorreu redução dos títulos sorológicos em bovinos (BOLIN et al., 1991; ARDUINO et al., 2004; GENOVEZ et al., 2004) e em suínos (SOTO et al., 2007). Madruga et al. (1983) também verificaram a diminuição dos títulos de aglutininas pós-desafio com o sorovar Hardjo em bovinos vacinados com bacterina trivalente e consideraram este fenômeno como prova de que o inóculo infectante possuía baixo poder imunogênico. Essas observações diferentes evidenciam que alguns sorovares e/ou estirpes são mais imunogênicos do que outros, como no caso dos sorovares Pomona e Icterohaemorrhagiae que podem provocar aumento dos títulos de aglutininas pós-desafio, ao contrário dos sorovares Canicola e Hardjo (BROUGHTON; SCARNELL, 1985; ARDUINO, 2005).

Como vários autores relataram que o nível de aglutininas não é correlacionado com proteção (BOUGHTON; SCARNELL, 1985; BOLIN et al., 1991; FAINE et al., 1999; VEGA et al., 2005), optou-se por verificar também a indução de anticorpos neutralizantes pela vacinação com as diferentes formulações no Experimento 4 e correlacioná-los com a proteção no teste de desafio. Dessa forma, a metodologia poderia ser utilizada na avaliação da eficácia das vacinas conforme sugerido por Tripathy, Hanson e Mansfield (1973) e Hanson (1977), eliminando o árduo trabalho de manutenção de estirpes virulentas e sua manipulação, reduzindo riscos de acidentes laboratoriais.

Os resultados do Experimento 4 demonstraram que as bacterina C, produzidas com a estirpe *Hond Utrecht IV* induziu os maiores títulos de anticorpos neutralizantes (Tabelas 12), e a bacterina E também produzida com esta estirpe, foi

a única que induziu a produção de aglutininas com títulos ≥ 25 em alguns dos animais vacinados (Tabela 13).

Quanto aos anticorpos neutralizantes, nos resultados descritos na tabela 14 e representados no gráfico 3, observou-se que as formulações com a estirpe LO4 induziram os menores títulos de anticorpos, reforçando a baixa imunogenicidade da estirpe já comentada anteriormente.

Embora a inibição do crescimento tenha mostrado resultados compatíveis com a proteção vacinal pós-desafio, a vacina A apresentou resultado negativo em um dos *pools* de soros de cinco animais, frente à proteção de 87,5% (1/8) dos hamsters desafiados pela via IP e de 100% dos animais pela via CN (Experimento 2, Tabela 7). Esse *pool* poderia albergar soros de animais mau respondedores, resultando em baixa concentração de anticorpos neutralizantes e diluindo as demais respostas dos outros hamsters e assim, prejudicando a correlação entre a presença de anticorpos neutralizantes com a proteção em hamsters, conforme sugerido por Hanson (1977).

Esses resultados também reforçam a evidência de que a estirpe e o adjuvante interferem na indução de anticorpos neutralizantes, possivelmente os adjuvantes induziram diferentes isótipos de imunoglobulinas que reconhecem antígenos também diferentes, como observado por Natarajaseenivasan et al. (2006) com as imunoglobulinas IgM e IgG de pacientes com leptospirose.

A vacina C, formulada com a estirpe *Hond Utrecht IV* e saponina, induziu maior título de anticorpos neutralizantes do que a vacina E formulada com a mesma estirpe e $Al(OH)_3$, 7,02 e 2,12 respectivamente. Os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pelas bacterinas formuladas com a estirpe LO4 pouco diferiram com o uso dos dois adjuvantes, com médias entre 0,71 e 2,35. Tabata et al. (2002) também observaram em hamster vacinados com os sorovares Hardjo, Guaricura e Wolffi, baixos títulos de anticorpos neutralizantes, que variaram de zero a 10,83 e para Pomona de 1,39 a 2,37, assim como Soto et al. (2007) em suínos com títulos entre zero a 3,75. Entretanto, Ris e Hamel (1979) observaram altos títulos de anticorpos neutralizantes (10 a 100) na primovacinação de bovinos com formulações contendo hidróxido de alumínio como adjuvante e títulos de até 1.000 após a revacinação. Enquanto que a bacterina contendo o adjuvante completo de Freund induziu títulos de 1.000 na primovacinação e de aproximadamente 5.000

após o reforço. Estas observações confirmam os relatos de Faine et al. (1999) de que baixos títulos de anticorpos são suficientes para a proteção contra a doença.

Com os resultados deste estudo infere-se que a via CV poderia ser empregada em novos ensaios para elaboração de protocolos alternativos para avaliação de eficácia de vacinas na prevenção de portadores. Além disso, como na literatura não foram encontrados relatos de bacterinas antileptospirose contendo saponina como adjuvante, os resultados apresentados nos dois ensaios (Experimentos 2 e 3) mostraram seu potencial, para uso em vacinas contra a leptospirose dos bovinos, uma vez que se trata de um adjuvante de baixo custo e fácil manipulação. Os resultados também mostraram que a vacinação em hamster não induz altos níveis de anticorpos neutralizantes e aglutinantes, portanto, outras espécies devem ser estudadas para avaliação de vacinas por sorologia.

A harmonização de protocolos para estudo de eficácia de vacinas é fundamental para a interpretação dos resultados e para nortear as futuras pesquisas. Além disso, os mecanismos de proteção contra a leptospirose precisam ser decifrados para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra os diferentes sorovares e melhorar no controle da doença nos rebanhos.

6 CONCLUSÕES

Salienta-se a enorme dificuldade de se estabelecer parâmetros e conclusões em estudos *in vivo* em virtude das várias interações vitais do organismo, mas os resultados apresentados apontam para as seguintes conclusões:

- 1) A técnica da microscopia direta foi mais eficiente do que o cultivo e a PCR na identificação de leptospiros nos órgãos de hamsters inoculados com a estirpe LO4.
- 2) As vias IP e CN proporcionaram maior número de mortes por leptospirose do que a via CV nas duas concentrações do inóculo.
- 3) A via CV induziu a formação do portador renal e genital de leptospira em hamsters.
- 4) A concentração de leptospiros no inóculo foi determinante para a ocorrência de morte dos animais pela via CN.
- 5) As lesões renais e genitais nos animais mortos por leptospirose com a inoculação da estirpe LO4 foram semelhantes pelas três vias (CN, CV e IP) e apresentaram grande quantidade de leptospiros nos tecidos renais e em menor quantidade nos tecidos genitais.
- 6) Os animais eutanasiados não apresentaram lesões compatíveis com leptospirose tanto nos rins como nos genitais e apenas alguns apresentaram

leptospiras nos tecidos e em pequena quantidade, o que condiz com o estado de portador.

- 7) A virulência da estirpe LO4 assim como a da estirpe *Hond Utrecht IV* não interferiram na eficácia das vacinas.
- 8) As vacinas monovalentes produzidas com as estirpes LO4 e *Hond Utrecht IV*, independentemente do adjuvante, foram eficazes na prevenção contra a leptospirose clínica. Entretanto, não foram eficazes na prevenção contra o portador renal e genital pelas três vias de desafio.
- 9) As vacinas induziram baixos títulos de anticorpos neutralizantes e aglutinantes. Os maiores títulos de anticorpos neutralizantes e aglutinantes foram observados nos animais vacinados com a estirpe referência, *Hond Utrecht IV*, contendo saponina e hidróxido de alumínio como adjuvantes, respectivamente.
- 10) Não foi possível estabelecer correlação entre títulos de anticorpos aglutinantes e neutralizantes com proteção contra o desafio.

REFERÊNCIAS*

ABDU, M. T. F.; SLEIGHT, S. D. Pathology of experimetal *Leptospira pomona* infection in hamsters. **Cornell Veterinarian**, Cornell, v. 55, p. 74-86, 1965.

ADLER, B.; FAINE, S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. **Infection and Immunity**, Washington, v. 17, p. 67-72, 1977.

AGESILAS, F.; GEY, F.; MONBRUNT, A.; COMBES, J. C.; LLANAS, B.; SCHLOSSMACHER, P.; GAUZERE, B. A. Acute leptospirosis in children in Reunion Island: a retrospective review of 16 cases. **Archivos de Pediatría**, Barcelona, v. 12, n. 12, p. 1344-1348, 2005.

AGUILAR, J. C.; RODRÍGUEZ, E. G. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**, Amsterdam, v. 25, p. 3753-3762, 2007.

AHMED, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE, M.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG`U, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 28, 2006. doi: 10.1186/1476-0711-5-28. Disponível em: <<http://www.ann-clinmicrob.com/cotents/5/1/28>>. Acesso em: 02 Jan 2007.

ALLEN, J. D.; MENEY, C. L.; WILKS, C. R. Evaluation of a Hardjo-Pomona vaccine to prevent leptospiruria in cattle exposed to a natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 58, n. 3, p. 93-96, 1982.

ALVES, C. J. **Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do estado da Paraíba, Brasil**. 1995. 102 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

AMUTHA, R.; CHAUDHURI, P.; GARG, A. P.; CHEEMA, P. S.; SRIVASTAVA, S. K. Immunoreactiv out membrane proteins of *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain Hond Utrecht IV. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 124, p.569-574, 2006.

* De acordo com a NBR 6023.

ANDRÉ-FONTAINE, G.; BRANGER, C.; GRAY, A. W.; KLAASEN, H. L. B. M. Comparasion of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. **Veterinary Record**, London, v. 153, p. 165-169, 2003.

ARDUINO, G. G. C. **Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina**.115 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

ARDUINO, G. G. C.; GIRIO, R. J. S.; FREIRE, M. M.; MARCHIORI FILHO, M. Anticorpos contra *Leptospira spp.* em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial. Perfil sorológico frente a dois esquemas de vacinação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 865-871, 2004.

AURAN, N. E.; JOHNSON, R. C.; RITZI, D. M. Isolation of the out sheath of *Leptospira* and its immunogenic properties in hamsters. **Infection and Immunity**, Washington, v. 5, n. 6, p.968-975, 1972.

BADIOLA, J.; THIERMANN, A. B.; CHEVILLE, N. F. Pathologic features of leptospirosis in hamsters caused by *Leptospira interrogans* serovars Hardjo and Sz wajizak. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, n. 1, p. 91-99, 1983.

BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.

BALS, R.; HIEMSTRA, P. S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. **The European Respiratory Journal**, Leiden, v. 23, n. 2, p. 327-333, 2004.

BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; SUMMERS, T. A.; WAGAR, E. A.; CHEVILLE, N. F.; HARTSKEERL, R. A.; HAAKE, D. A. Expression and distribution of leptospiral out membrane components during renal infection of hamsters. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 2, p. 853-861, 1999.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, EDUSP, 1976. 259 p.

BENNET, R. M. Decision support models of leptospirosis in dairy herds. **Veterinary Record**, London, v. 132, n. 3, p. 59-61, 1993.

BERNASOVSKAIA, E. P.; KONDRATENKO, V. N.; MEL'NITSKAIA, E. V. The connection of the antigenic activity of *Leptospira* to its virulence. **Mikrobiolochichyi Zhurnal**, Kyiv, v. 56, n. 6, p.46-50, 1994.

BIELANSKI, A.; SURUJBALLI, O. E.; GOLSTEYN THOMAS, E.; TANAKA, E. Sanitary status of oocistes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *L. borgpetersenii* serovar Hardjobovis. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 54, p. 65-73, 1998.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. Doenças causadas por *Leptospira spp.* In: _____. **Clínica veterinária**, 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 637-646.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar *Hardjo*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n. 7, p. 995-1000, 2001.

BOLIN, C. A.; CASSELLS, J. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* type *Hardjo-bovis* vaccine on type *Hardjo-bovis* infection of cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 52, n. 10, p. 1639-1643, 1991.

BOLIN, C. A.; THIERMANN, A. B.; HANDSAKER, A. L.; FOLEY, J. W. Effect of vaccination with a pentavalent vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* type *Hardjo-bovis* infection on pregnant cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, n. 1, p. 161-165, 1989.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* type *Hardjo-bovis* vaccine on type *Hardjo-bovis* infection of cattle. **American Journal of veterinary Research**, Chicago, v. 50, n. 12, p. 2004-2008, 1989.

BRANDESPIM, D. F.; MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. S. J.; LOPES, F. L.; NÜMBERGER JÚNIOR, R.; ALESSI, A. C. Avaliação das técnicas de Levaditti e imunoistoquímica na detecção de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona em órgãos reprodutores de hamsters machos infectados experimentalmente. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 28, n. 3, p. 177-183, 2004.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A.G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. Nov. and four new *Leptospira genomospecies*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Marlborough, v. 49, p. 839-858, 1999.

BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLARD, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 4, p. 294-300, 2005.

BROUGHTON, E. S.; SCARNELL, J. Prevention of renal carriage of leptospirosis in dogs by vaccination. **Veterinary Record**, London, v. 117, p. 307-311, 1985.

CAMPBELL, J. B.; PEERBAYE, Y. A. Saponin. 44th Forum in Immunology. **Research in Immunology**, Oxford, v. 143, p. 526-530, 1992.

CASTRO, V. **Estudo da prevalência da leptospirose bovina em fêmeas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil**. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CORRÊA, M. O. A. Human leptospirosis in Brazil. **International Journal of Zoonoses**, Taiwan, v. 2, n. 1, p.1-9, 1975.

CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; GALVÃO, P. A. A.; AGUIAR, H. A. Estudos sobre a *Leptospira wolffi* em São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 25/27, p. 11-25, 1965/1967.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

COSTA, M. C. R.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; MARTINS, N. R. S. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo horizonte, v. 50, p. 11-17, 1998.

COX, J. C.; COULTLER, A. R. Adjuvants: a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 248-256, 1997.

CULLEN, P. A.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2311-2318, 2002.

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D, DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS, W. A. Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection. **Veterinary Record**, London, v. 139, n. 5, p. 110-114, 1996.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 10, n. 3, p. 463-477, 1994.

ELLIS, W. A.; THIERMANN, A. B. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava from sows in Iowa. **American Journal of veterinary Research**, Chicago, v. 47, n. 7, p. 1458-1460, 1986.

ELLIS, W. A.; THIERMANN, A. B.; MONTGOMERY, J.; HANDSAKER, A.; WINTER, P. J.; MARSHALL, R. B. Restriction endonuclease analysis of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from cattle, **Research in Veterinary Science**, London, v. 44, n. 3, p. 375-379, 1988.

EVERARD, J. D.; EVERARD, C. O. R. Leptospirosis in the Caribbean. **Reviews in Medical Microbiology**, Glasgow, v. 4, p. 114-122, 1993.

FAINE, S.; VAN DER HOEDEN, J. Virulence-linked colonial and morphological variation in *Leptospira*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 88, n. 5, p. 1493-1496, 1964.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, 2 ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272 p.

FAJARDO, E. M.; ORTIZ, B.; CHÁVEZ, A.; GAÍNZA, N.; IZQUIERDO, L.; HERNÁNDEZ, Y.; LABRADOR, I.; ÁLVAREZ, E. Normalización de la dosis letal 50% de cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna antileptosirósica cubana para uso humano. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Havana, v. 50, n. 1, p.22-26, 1998.

FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 Estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.

FRANTZ, J. C.; HANSON, L. E.; BROWN, A. L. Effect of vaccination with a bacterin containing *Leptospira interrogans* serovar Bratislava on the breeding performance of swine herds. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 1044-1047, 1989.

FREITAS, J. C.; SILVA, F. G.; OLIVEIRA, R. C.; DELBEM, A. C. B.; MULLER, E. E.; ALVES, L. A.; TELES, P. S. Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciências Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 853-856, 2004.

FREUDENSTEIN, H.; HEIN, B. Potency of leptospiral vaccines and protection against chronic infection in golden hamsters. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, Davis, v. 14, n. 3, p. 229-234, 1991.

GALLO, G.; JOHNSON, J.; GALVIN, J.; PENKA, D.; WEABER, A.; BOLIN, C. Protection afforded by Spirovac, a *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo (type hardjo-bovis) inactivated vaccine, in challenge studies in cattle In: **WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24**, 2006, Nice. Disponível em: <<http://www.nice-acropolis.com/wbc2006/EN/ProgScient.php>>. Acesso em: 08 Mar 2007.

GENOVEZ, M. E. ; GIORGI, W. ; TERUYA, J. M. ; SILVA, A. S. *Leptospira interrogans* sorotipo wolffi isolada de camundongo capturado no porto de santos. **O Biológico**, São Paulo, v. 50, n. 12, p. 295-297, 1984.

GENOVEZ, M. E.; OLIVEIRA, J. C.; CASTRO, V.; FERRARI, C. I. L.; SCARCELLI, E.; CARDOSO, M. V.; PAULIN, L. M.; LANÇA NETO, P. Serological profile of a nelore herd presenting endemic leptospirosis and submitted to vaccination. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 4, p. 411-416, 2004.

GENOVEZ, M. E.; OLIVEIRA, J. C.; CASTRO, V.; GREGORY, L.; DEL FAVA, C.; FERRARI, C. I. L.; PITUCO, E. M.; SCARCELLI, E.; CARDOSO, M. V.; GRASSO, L. M. P. S.; SANTOS, S. M. Desempenho reprodutivo de um rebanho nelore de criação extensiva com leptospirose endêmica: estudos preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 244-246, 2001.

GENOVEZ, M. E. ; YASUDA, P. H. ; SULZER, C. R. ; GIORGI, W. *Leptospira biflexa* serotipo ranarum isolada de feto abortado de equino. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 17, n. 10, p. 25-27, 1986.

GONZÁLEZ, A.; RODRÍGUEZ, Y.; BATISTA, N.; VALDÉS, Y.; NÚÑEZ, J. F.; MIRABAL, M.; GONZÁLEZ, M. Inmunogenicidad y capacidad protectora en hamsters de vacunas antileptospirósicas monovalentes de células enteras del serogrupo Ballum. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 37, p. 169-175, 2005.

GONZALEZ, Y. H.; DÍAZ, E. M. F.; MATOS, B. O. Método para revitalizar las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en los ensayos de potencia de la vacuna antileptospirósica. **Health I.G. News**. Buenos Aires, v. 3, n. 4, 1999. Disponível em: <<http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaxst-1/T-007.PDF>>. Acesso em: 12 Maio 2004.

GOTTI, T. B. **Avaliação de três protocolos de associações antibióticas na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *Leptospira* spp sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705)**. 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GRAPHPAD INSTAT SOFTWARE. Statistical analysis systems for personal computers. Versão 3.01. San Diego: GraphPad Software, 1998.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, Marlborough House, v. 146, p. 1491-1504, 2000a.

HAAKE, D. A.; WALKER, E. M.; BLANCO, D. R.; BOLIN, C. A.; MILLER, J. N.; LOVETT, M. A. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, n. 3, p.1131-1140, 1991.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. D.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000b.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and

LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 12, p. 6572-6582, 1999.

HAANWINCKEL, M. C. S.; MEGID, J.; SOUZA, L. C. Avaliação da prova de imunoperoxidase como recurso de diagnóstico na leptospirose animal. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 293-301, 2004.

HANSON; L. E. Bovine leptospirosis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 59, n. 6, p. 1166-1170, 1976.

HANSON; L. E. Immunology of bacterial diseases, with special reference to leptospirosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 170, n. 9, p. 991-994, 1977.

HERNANDEZ, M. S.; AGUILA, B. J.; GONZALEZ, L. P.; GONZALEZ, V. G. Outbreak of leptospirosis, predominantly meningoencephalitic, among children in the municipality of Moron. **Revista Cubana Medicina Tropical**, Havana, v. 43, n. 2, p. 136-139, 1991.

HOLROYD, R. G. *Leptospira interrogans* serovar Hardjo vaccination of pregnant beef cows and subsequent growth rate of progeny. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 56, p. 481-483, 1980.

HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAES, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 2, p.173-180, 2001.

HUHN, R. G.; HANSON, L. E.; KILLINGER, A. H.; CARDELLA, M. A. Immunity to leptospirosis: *Leptospira interrogans* serotype Pomona bacterins in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 36, n. 1, p. 59-65, 1975.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=21&i=P>>. Acesso em: 23 Ago 2007.

ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; FUJII, N.; OGUMA, K. Biological effects of leptospiral lipopolysaccharide to mouse, B, T and NK cells. **Japan Journal Veterinay Science**, Tokyo, v. 52, n. 5, p. 923-930, 1990.

KIKTENKO, V. S.; BALASHOV, N. G.; RODINA, V. N. Leptospirosis infection through insemination of animals. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, Praha, v. 21, n. 2, p. 207-213, 1976.

KLAASEN, H. L. B. M.; MOLKENBOER, M. J. C. H.; VRIJENHOEK, M. P.; KAASHOEK, M. J. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 95, p. 121-132, 2003.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, Amsterdam, v. 29, p. 1545-1552, 2004.

LANGONI, H.; DE SOUZA, L. C.; DA SILVA, A. V.; LUVIZOTTO, M. C.; PAES, A. C.; LUCHEIS, S. B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 40, n. 3-4, p. 271-275, 1999.

LANGONI, H.; SEABRA JÚNIOR, R.; CABRAL, K. G.; CUNHA, E. L. P. Baypamun action in hamsters experimentally infected with *Leptospira interrogans* serogroup Canicola. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 6, p.293-295, 2001.

LEONARD, F.; QUINN, P. J.; ELLIS, W. A.; O'FARREL, J. K.; Antibodies in the vaginal mucus of heifers experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo*. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 47, n. 3, p. 123-126, 1994.

LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LILENBAUM, W.; SANTOS, M. R. C.; BARBOSA, A. V. Leptospirose em reprodução animal: II. Bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1995.

MACEDO, N. A.; MORAIS, Z. M.; CAMARGO, C. R. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; NÜRMBERGER JÚNIOR, R.; VASCONCELLOS, S. A. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 194-200, 2004.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; CORTEZ, M.; VILLAFANE, F.; MOREIRA, E. C. Eficiência de bacterina trivalente sobre a infecção de *Leptospira interrogans Hardjo*

em vacas prenhes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo horizonte, v. 35, n. 6, p. 809-822, 1983.

MARINHO, M.; LANGONI, H.; OLIVEIRA, S. L.; LIMA, V. M. F.; PEIRÓ, J. R.; PERRI, S. H. V.; CARREIRA, R. Role of cytokines, NO, and H₂O₂ on the immunopathology of leptospirosis in genetically selected mice. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 198-212, 2005.

MARTINÉZ, R.; PÉREZ, A.; QUIÑOES, M. C.; CRUZ, R.; ÁLVAREZ, A.; ARMESTO, M.; FERNÁNDEZ, C.; MENÉNDEZ, J.; RODRÍQUEZ, I.; BARÓ, M.; DÍAZ, M.; RODRÍQUEZ, J.; SIERRA, G.; OBREGÓN, A. M.; TOLEDO, M. E.; FERNÁNDEZ, N. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 15, n. 4, p. 249-255, 2004.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, Marlborough House, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.

MAURA, R. B.; RODRÍGUEZ, A. G.; SARDIÑAS, C. P.; SANTIESTEBAN, N. B.; ABREU, Y. V. Conservation de cepas vacunales de *Leptospira* a -70° C. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Havana, v. 58, n. 1, p. 50-55, 2006.

MILLER, N. G. Observations of the carrier state in hamsters infected with *Leptospira interrogans* serotype Pomona. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 158, p. 1-8, 1972.

NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 2, p.7550-7558, 2001.

NALLY, J. E.; CHOW, E.; FISHBEIN, M. C.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 6, p. 3251-3260, 2005.

NALLY, J. E.; WHITELEGGE, J. P.; BASSILIAN, S.; M. C.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Characterization of the out membrane proteome of *Leptospira*

interrogans expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 2, p. 766-773, 2007.

NARDI JÚNIOR, G.; RIBEIRO, M. G.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; JORGE, A. M.; GERONUTTI, L.; MORAIS, Z. M. Perfil de aglutininas anti-*Leptospira* em bezerras búfalas vacinadas com bacterina pentavalente comercial contra leptospirose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 299-304, 2006.

NARS, I. W.; WANG, Y.; GAO, G.; DENG, S.; DIGGS, L.; ROTHSTEIN, D. M.; TELLIDES, G.; LAKKIS, F. G.; DAI, Z. Testicular immune privilege promotes transplantation tolerance by altering the balance between memory and regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 174, n. 10, p. 6161-6168, 2005.

NATARAJASEENIVASAN, K.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHARMA, S.; SEHGAL, S. C. Leptospiral proteins expressed during acute & convalescent phases of human leptospirosis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 120, p. 151-159, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Commission on Life Sciences. Institute of Laboratory Animal Resources. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Washington, D. C.: National Academic Press, 1996. 128 p.

NEWMAN, M. J.; WU, J. Y.; GARDNER, B. H.; MUNROE, K. J.; LEOMBRUNO, D.; RECCHIA, J.; KENSIL, C. R.; COUGHLIN, R. T. Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 148, n. 8, p. 2357-2362, 1992.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Leptospirosis. In:____. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, 5th ed. Paris, 2004. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm>. Acesso em: 23 Jan 2007.

OLIVA, R.; INFANTE, J. F.; GONZÁLEZ, M.; PEREZ, P.; FARIÑAS, M.; ESTÉVEZ, L.; PÉREZ, V.; SIERRA, G. Comparación clínico-patológica de la leptospirosis en hámsters sírio dorado y el curiel ducan hartley mediante la infección experimental con tres serovares de *L. interrogans*. **VacciMonitor**, Havana, v. 7, n. 5, p. 8-14, 1998.

OLIVA, R.; INFANTE, J. F.; GONZÁLEZ, M.; PÉREZ, P.; NARANJO, M.; FARIÑAS, M.; GONZÁLEZ, I.; RODRÍGUEZ, Y. Estudio de protección con vax-Spiral en grupos (madre-cría) de hámsters sírio dorado. **VacciMonitor**, Havana, v. 7, n. 12, 1998. Disponível em:

<<http://www.bvv.sld.cu/download.php?url=documentos/11377013949.PDF>>. Acesso em: 26 Abr 2006.

OLIVEIRA, A. A.; MOTA, R. A.; PEREIRA, G. C.; LANGONI, H.; SOUZA, M. I.; NAVEGANTES, W. A.; SA, M. E. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns Municipal District, Pernambuco State, Brazil. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, Onderstepoort, v. 68, n. 4, p.275-279, 2001.

PAINTER, G.M.; ELLINGHAUSEN JUNIOR, H. C. Immunising potency of *Leptospira interrogans* serotype Canicola after heat inactivation at different temperatures. **Journal of Medical Microbiology**. Marlborough House, v. 9, p. 487-492, 1976.

PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y. F.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; YANG, C. W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S. P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, K.; ROE, B. Evaluation of *lig*-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular and Cellular Probes**, Amsterdam, v.19, p.111-117, 2005.

PALANIAPPAN, R. U. M.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 3, p. 1745-1750, 2006.

PELLEGRIN, A. O.; GUIMARAES, P. H. S.; SERENO, J. R. B.; FIGUEIREDO, J. P.; LAGE, A. R.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-grossense. **Comunicado Técnico - Embrapa Pantanal**, Corumbá, n. 22, p. 1-9, 1999.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p.

RAJPUT, Z. I.; HU, S. H.; XIAO, C.; ARIJO, A. G. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **Journal of Zhejiang University Science B**, Zhejiang, v. 8, n. 3, p.153-161, 2007.

RAMON, G. Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtériques. **Annales de Institute Pasteur**, Paris, v. 38, p. 1-10, 1924.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50 percent end-points. **The American Journal of Hygiene**, Northbrook, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, p. 139-147, 2002.

RIS, D. R.; HAMEL, K. L. *Leptospira interrogans* serovar Pomona vaccines with different adjuvants in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 27, n. 8, p.169-171, 1979.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; MCBRIDE, F. W. C.; FIGUEIRA, C. P., HUERRE, M.; AVE, P.; GIRONS, I. S.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. The OmpA-like protein Loa22 essential for leptospiral virulence. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 3, n. 7, 2007. doi: 10.1371/journal.ppat.0030097. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1914066&blobtype=pdf>>. Acesso em 25 Jul 2007.

ROSSETTI, C. A.; VANASCO, B. N.; PINI, N.; CARFAGNINI, C. Comparasion of three diagnostic techniques for the detection of leptospiroses in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 6-10, 2004.

SALLES, R. S.; LILENBAUM, W. Leptospirose bovina no Brasil. **Revista CFMV, Suplemento Técnico**, Brasília, n. 21, 2000. Disponível em: <<http://www.cfmv.org.br/rev21/tecnico3.htm>>. Acesso em: 02 ago. 2004.

SANGER, V. L.; HAMDY, A. H.; FIZETTE, W. B.; BOHL, E. H.; FERGUSON, L. C. *Leptospira pomona* infection in hamsters. **Cornell Veterinarian**, Cornell, v. 51, p. 489-498, 1961.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 1, n. 9, p. 97-109, 1970.

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; DE CASTRO, A. F.; YANAGUITA, R. M.; GIORGI, W. Two new leptospiral serovars in the Hebdomadis group isolated from cattle in Brazil. **International Journal of Zoonoses**, Taiwan, v. 7, n. 2, p. 158-163, 1980a.

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; YANAGUITA, R. M.; DA SILVA, A. S. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of serovars canicola, pyrogenes and

grippotyphosa. **International Journal of Zoonoses**, Taiwan, v. 7, n. 1, p. 40-43, 1980b.

SCHÖNBERG, A.; ORTMANN, G.; REETZ, J.; LUGE, E.; RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; VASCONCELLOS, S. A.; BREM, S. Positive PCR for *Leptospira* spp. in a sow from a German herd presenting animals with MAT titres for *Leptospira interrogans* serovar Bratislava. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 117-120, 2005.

SCHREIBER, P.; MARTIN, V.; NAJBAR, W.; SANQUER, A.; GUEGUEN, S.; LEBREUX, B. Prevention of a severe disease by a *Leptospira* vaccination with a multivalent vaccine. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Lyon, v. 156, n.8-9, p. 427-432, 2006.

SHIMIZU, T.; MATSUSAKA, E.; NAGAKURA, N.; TAKAYANAGI, K.; MASUZAWA, T.; IWAMOTO, Y.; MORITA, T.; MIFUCHI, I.; YANAGIHARA, Y. Chemical properties of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain Moulton. **Microbiology Immunology**, Washington, v. 31, n. 8, p. 717-725, 1987.

SIDDIQUE, I. H.; SHAH, S. M. Evaluation of polyvalent leptospiral vaccine in hamsters. **Indian Veterinary Journal**, Chennai, v. 67, p. 1006-1010, 1990.

SILBECK, N. W.; LYON, M.; STALLMAN, N. Genetic diversity among Australian and New Zealand isolates of *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 69, n. 2, p. 29-30, 1992.

SILVA, E. F.; BROD, C. S.; CERQUEIRA, G. M.; BOURSCHEIDT, D.; SEYFFERT, N.; QUEIROZ, A.; SANTOS, C. S.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Isolation of *Leptospira noguchii* from a sheep. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 144-149, 2006.

SILVA, F. G.; FREITAS, J. C.; ANZAI, E. K.; HASHIMOTO, V. Y.; GIRALDI, N.; DELBEM, A. C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; REIS, A. C. F.; VASCONCELLOS, S. A. Leptospire detection in kidney, liver and uterus of cows slaughtered in Paraná state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 38-42, 2005.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. Advances in vaccine adjuvants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p.1075-1081, 1999.

SMITSAART, E.; MATTION, N.; FILIPPI, J. L.; BOBIOLO, B.; PERIOLO, O.; LA TORRE, J.; BELLINZONI, R. C. Enhancement of the immune response induced by the inclusion of saponin in oil adjuvanted vaccines against foot-and-mouth disease. In: **Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of FMD**, Borovets, Bulgaria. Appendix 32, p. 255-262, 2000. Disponível em: <[http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/FMD%20Saponina%20\(BELLINZONI\).pdf](http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/FMD%20Saponina%20(BELLINZONI).pdf)>. Acesso em 20 Mar 2004

SMYTHE, L.; SMITH, I. L.; SMITH, G. A.; DOHNT, M. F.; SYMONDS, M. L.; BARNETT, L. J.; MCKAY, D. B. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infectious Diseases**, 2002. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/2/13>>. Acesso em: 30 Maio 2004.

SOKOLOVSKA, A.; HEM, S. L.; HOGENESCH, H. Activation of dendritic cells and induction of CD4+ T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. **Vaccine**, Amsterdam, v. 25, p. 4575-4585, 2007.

SONRIER, C. BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVOËN-CLOUET, N.; GANIÈRE, J. P.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, Amsterdam, v. 19, p. 86-94, 2000.

SOTO, F. R.; AZEVEDO, S. S.; MORAIS, Z. M.; PINHEIRO, S. R.; DELBEM, A. C. B.; MORENO, A. M.; PAIXÃO, R.; VUADEN, E. R.; VASCONCELLOS, S. A. Detection of leptospire in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 582-586, 2006.

SOTO, F. R. M.; PINHEIRO, S. R.; ITO, F. H.; MORAIS, Z. M.; GOÇALES, A. P.; AZEVEDO, S. S.; BERNARDI, F.; CAMARGO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A. Evaluation of colostral immunity in swine with commercial anti-leptospira polyvalent whole bacterial vaccine. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Davis, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2007.03.002>. Acesso em: 03 Jul 2007.

SRIVASTAVA, S. K. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Hyderabad, v. 24, n. 4, p. 331-336, 2006. Disponível em: <<http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2006;volume=24;issue=4;page=331;epage=336;aualast=Srivastava>>. Acesso em: 19 Mar 2007.

STALHEIM, O. H. Leptospiral selection, growth, and virulence in synthetic medium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 92, p. 946-951, 1966.

SULZER, C. R.; JONES, W. L. **Leptospirosis**: method in laboratory diagnosis. Atlanta: Center of Disease Control, 1980, 40 p.

TABATA, R.; SCANAVINI NETO, H.; ZUANAZE, M. A. F.; OLIVEIRA, E. M. D.; DIAS, R. A.; MORAIS, Z. M.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of Serogroup Sejroe. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 265-268, 2002.

TERCILLA, D. F.; CUETO, J.; CHAMIZO, E. Aislamento de *Leptospira canicola* em hemocultivo: análisis epidemiológico. **Revista eletrônica de Veterinaria REDVET**, v. 2., n. 6, 2006. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060606.html>>. Acesso em: 04 Jan 2007.

TRIPATHY, D. N.; HANSON, L. E.; MANSFIELD, M. E. Growth inhibition test for measurement of immune response of animals vaccinated with leptospiral bacterins. In: US. ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 77, 1973, Illinois, **Proceedings...**, 1973, p. 113-118.

UNITED STATES OF AMERICA. Department of Agriculture. 113.103 *Leptospira Canicola* bacterin. In: **Code of Federal Regulation**. Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, sec. 113.103, Title 9, v. 1, Whashington, Government Printing Office via GPO Access, 2006, p. 657-58.

VANSELOW, B. A. The application of adjuvants to veterinary medicine. **Veterinary Bulletin**, London, v. 57, n. 11, p. 881-892, 1987.

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINI JÚNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A. C. M.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de Janeiro a Abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 7-15, 1997.

VASCONCELLOS, S. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; MORAIS, Z. M.; BARUSELLI, P. S.; AMARAL, R.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; SCHÖNBERG, A.; HARTSKEERL, R. A. Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 298-300, 2001.

VEGA, L. E. O.; FLORES, R. L.; CERVANTES, L. P. M.; VALIENTE, J. Q. Evaluación de una bacterina homóloga contra la leptospirosis bovina. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Havana, v. 57, n. 1, p. 38-42, 2005.

VERNEL-PAUILLAC, F.; MERIEN, F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 7, p. 4172-4179, 2006.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infection Disease**, London, v. 14, p. 527-538, 2001.

WILD, C. J.; GREENLEE, J. J.; BOLIN, C. A.; BARNETT, J. K.; HAAKE, D. A.; CHEVILLE, N. F. Na improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Athens, v. 14, p. 20-24, 2002.

WIRA, C. R.; ROSSOL, R. M. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of the estrous cycle on antigen presentation by uterine epithelial and stromal cells. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 136, n. 10, p. 4526-4534, 1995.

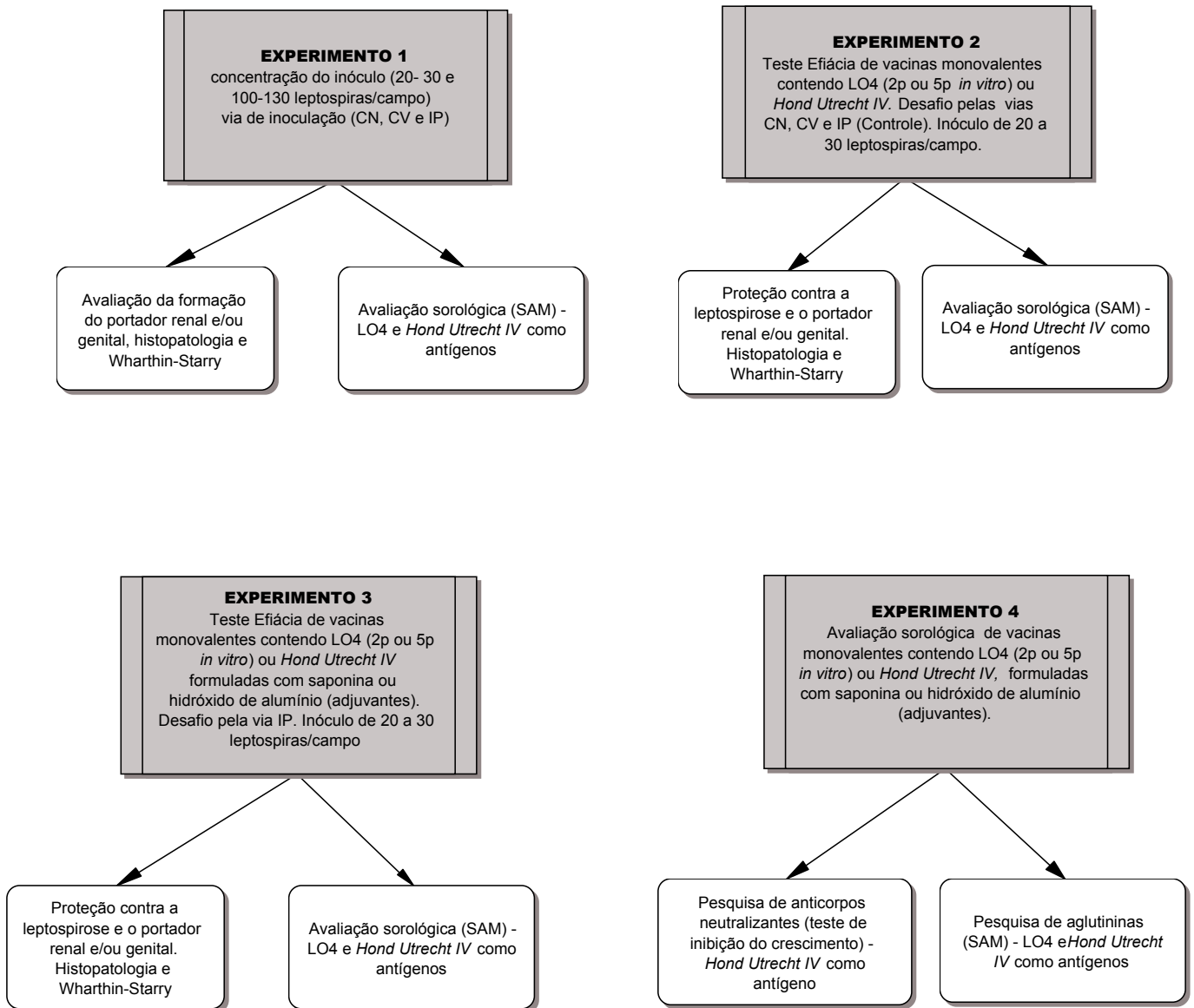
YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. **International journal of systematic bacteriology**, London, v. 37, n. 4, p. 407-415, 1987.

YERUHAM, I.; BERNSTEIN, M.; PERL, S.; IRLIN, S.; COHEN, A.; YACOBSON, B.; MACHNAI, B. Clinical and epizootiological study of a leptospirosis outbreak due to *Leptospira canicola* in a feedlot. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 68, n. 3, p. 105-107, 1997.

YOUNG, B. J. A reliable method for demonstrating spirochaetes in tissue sections. **The Journal of Medical Laboratory Technology**, London, v. 26, n. 3, p. 248-252, 1969.

ZHAO, L.; HIANG, X. G.; NIE, Y. X.; XIAO, Y. C.; XU, J. G. Distribution of virulence associated genes among strains of *Leptospira*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, Beijing, v. 24, n. 12, p. 1122-1125, 2003.

APÊNDICE A – Esquema dos Experimentos



APÊNDICE B – Coloração de Warthin-Starry

Preparo das Soluções

Solução impregnadora: adicionar 1 g de nitrato de prata em 100 mL água acidulada.

Água acidulada: acrescentar 0,1 g ácido nítrico em 10 mL de água bidestilada e depois adicionar por volta de 0,7 mL dessa solução em 500 mL água bidestilada até ajustar o pH para 4,0.

Preparo das soluções reveladoras:

- I) Solução 1: adicionar 2 g de nitrato de Prata a 2% em 100 mL de água acidulada,
- II) Solução 2: colocar 2,62 g de gelatina histológica a 5% em 52,5 mL de água acidulada,
- III) Solução 3: acrescentar 0,15 g de cristais de hidroquinona em 100 mL de água acidulada.

Técnica

Após desparafinar o corte histológico da lâmina, este foi lavado e mantido em água destilada até o momento da impregnação com prata. Em seguida, as lâminas foram então colocadas na solução impregnadora e incubadas por 30 minutos em estufa.

Posteriormente, as três soluções reveladoras foram misturadas, seguindo a ordem crescente até o cobrir totalmente as lâminas. A intensidade da revelação foi acompanhada pela observação ao microscópio. Uma vez atingida a coloração desejada, procedeu-se o enxágüe das lâminas em água destilada. Posteriormente, os cortes histológicos foram desidratados, diafanizados e a lamínula fixada sobre a lâmina de microscópio.

Resultado esperado: na presença de espiroquetas, ocorrerá precipitação da prata corando-as de negra.

**APÊNDICE C – Dados da sorologia (SAM) dos animais do GRUPO CONTOLE
(Experimento 2)**

GRUPO	VIA/SEXO	ANIMAL	ESTIRPE/TITULO AC				
			LO4	log (x +1)	<i>Hond Utrecht IV</i>	log (x +1)	
CONTROLE (SEM VACINAÇÃO)	CN-m	1	0	0,0	0	0,0	
		2	0	0,0	0	0,0	
		3	0	0,0	0	0,0	
		4	0	0,0	0	0,0	
		5	0	0,0	0	0,0	
		6	0	0,0	0	0,0	
		7	0	0,0	0	0,0	
		8	0	0,0	0	0,0	
		9	0	0,0	0	0,0	
		10	0	0,0	0	0,0	
		media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00
		titulo			1,00		1,00
		CN-f	1	0	0,0	0	0,0
			2	0	0,0	0	0,0
			3	0	0,0	0	0,0
			4	0	0,0	0	0,0
			5	0	0,0	0	0,0
			6	0	0,0	0	0,0
			7	0	0,0	0	0,0
			8	0	0,0	0	0,0
			9	0	0,0	0	0,0
			10	0	0,0	0	0,0
		media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00
		titulo			1,00		1,00
		CV	1	0	0,0	0	0,0
			2	0	0,0	0	0,0
			3	0	0,0	0	0,0
			4	0	0,0	0	0,0
			5	0	0,0	0	0,0
			6	0	0,0	0	0,0
			7	0	0,0	0	0,0
			8	0	0,0	0	0,0
			9	0	0,0	0	0,0
			10	0	0,0	0	0,0
		media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00
		titulo			1,00		1,00
		IP	1	0	0,0	0	0,0
			2	0	0,0	0	0,0
			3	0	0,0	0	0,0
			4	0	0,0	0	0,0
			5	0	0,0	0	0,0
			6	0	0,0	0	0,0
	7		0	0,0	0	0,0	
	8		0	0,0	0	0,0	
	9		0	0,0	0	0,0	
	10		0	0,0	0	0,0	
	media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00	
	titulo			1,00		1,00	

título < 25 = 0

**APÊNDICE D – Dados da sorologia (SAM) dos animais do GRUPO VACINA A
(Experimento 2)**

GRUPO	VIA/SEXO	ANIMAL	ESTIRPE/TITULO AC			
			LO4	log (x +1)	<i>Hond Utrecht IV</i>	log (x +1)
VACINA A	CN-m	1	0	0,0	0	0,0
		2	0	0,0	0	0,0
		3	0	0,0	0	0,0
		4	0	0,0	0	0,0
		5	0	0,0	0	0,0
		6	0	0,0	0	0,0
		7	0	0,0	25	4,7
		8	0	0,0	25	4,7
		9	0	0,0	25	4,7
		10	25	4,7	50	5,7
	media arit.		2,50	0,47	12,50	1,98
	titulo			1,39		3,94
	CN-f	1	0	0,0	0	0,0
		2	0	0,0	0	0,0
		3	0	0,0	0	0,0
		4	0	0,0	0	0,0
		5	0	0,0	0	0,0
		6	0	0,0	0	0,0
		7	0	0,0	0	0,0
		8	0	0,0	0	0,0
		9	0	0,0	25	4,7
		10	25	4,7	25	4,7
	media arit.		2,50	0,47	5,00	0,94
	titulo			1,39		1,92
	CV	1	0	0,0	0	0,0
		2	0	0,0	0	0,0
		3	0	0,0	0	0,0
		4	0	0,0	0	0,0
		5	0	0,0	0	0,0
		6	0	0,0	0	0,0
		7	0	0,0	0	0,0
		8	0	0,0	0	0,0
		9	0	0,0	0	0,0
10		0	0,0	0	0,0	
media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00	
titulo			1,00		1,00	
IP	1	0	0,0	0	0,0	
	2	0	0,0	0	0,0	
	3	0	0,0	0	0,0	
	4	0	0,0	0	0,0	
	5	0	0,0	0	0,0	
	6	25	4,7	25	4,7	
	7	25	4,7	50	5,7	
media arit.		7,14	1,34	10,71	1,48	
titulo			2,54		2,79	

título<25 = 0

**APÊNDICE E – Dados da sorologia (SAM) dos animais do GRUPO VACINA B
(Experimento 2)**

GRUPO	VIA/SEXO	ANIMAL	ESTIRPE/TITULO AC			
			LO4	log (x +1)	<i>Hond Utrecht IV</i>	log (x +1)
VACINA B	CN-m	1	0	0,0	0	0,0
		2	0	0,0	0	0,0
		3	0	0,0	0	0,0
		4	0	0,0	0	0,0
		5	0	0,0	0	0,0
		6	0	0,0	0	0,0
		7	0	0,0	0	0,0
		8	0	0,0	0	0,0
		9	0	0,0	0	0,0
		10	0	0,0	25	4,7
	media arit.		0,00	0,00	2,50	0,47
	titulo			1,00		1,39
	CN-f	1	0	0,0	0	0,0
		2	0	0,0	0	0,0
		3	0	0,0	0	0,0
		4	0	0,0	0	0,0
		5	0	0,0	0	0,0
		6	0	0,0	0	0,0
		7	0	0,0	0	0,0
		8	0	0,0	25	4,7
		9	0	0,0	25	4,7
		10	25	4,7	25	4,7
	media arit.		2,50	0,47	7,50	1,41
	titulo			1,39		2,66
	CV	1	0	0,0	0	0,0
		2	0	0,0	0	0,0
		3	0	0,0	0	0,0
		4	0	0,0	0	0,0
		5	0	0,0	0	0,0
		6	0	0,0	0	0,0
		7	0	0,0	0	0,0
		8	0	0,0	0	0,0
		9	0	0,0	25	4,7
		10	25	4,7	25	4,7
	media arit.		2,50	0,47	5,00	0,94
	titulo			1,39		1,92
	IP	1	0	0,0	0	0,0
		2	0	0,0	0	0,0
		3	0	0,0	0	0,0
		4	0	0,0	0	0,0
		5	0	0,0	0	0,0
		6	0	0,0	0	0,0
7		0	0,0	0	0,0	
8		25	4,7	25	4,7	
9		25	4,7	50	5,7	
10		25	4,7	100	6,7	
media arit.		7,50	1,41	17,50	1,70	
titulo			2,66		3,26	

titulo < 25 = 0

**APÊNDICE F – Dados da sorologia (SAM) dos animais do GRUPO VACINA C
(Experimento 2)**

GRUPO	VIA/SEXO	ANIMAL	ESTIRPE/TITULO AC			
			LO4	log (x +1)	<i>Hond Utrecht IV</i>	log (x +1)
VACINA C	IP	1	25	4,7	25	4,7
		2	25	4,7	25	4,7
		3	25	4,7	50	5,7
		4	25	4,7	100	6,7
		5	25	4,7	100	6,7
		6	25	4,7	100	6,7
		7	25	4,7	100	6,7
		8	25	4,7	100	6,7
		9	25	4,7	400	8,6
	media arit.	25,00	4,70	111,11	6,33	
	titulo		26,00		80,71	

titulo < 25 = 0

APÊNDICE G – Dados da sorologia (SAM) dos animais vacinados e não vacinados (Experimento 3)

GRUPO	ANIMAL	ESTIRPE/TITULO AC			
		LO4	log (x +1)	<i>Hond Utrecht IV</i>	log (x +1)
VACINA B	1	100	6,7	0	0,0
	2	50	5,7	0	0,0
	3	0	0,0	0	0,0
	4	100	6,7	0	0,0
	5	0	0,0	0	0,0
	6	0	0,0	0	0,0
	7	50	5,7	0	0,0
	8	0	0,0	0	0,0
	9	0	0,0	0	0,0
	10	25	4,7	0	0,0
media arit.		32,50	2,94	0,00	0,00
titulo			7,65		1,00
VACINA C	1	50	5,7	50	5,7
	2	50	5,7	25	4,7
	3	100	6,7	25	4,7
	4	100	6,7	25	4,7
	5	100	6,7	50	5,7
	6	100	6,7	50	5,7
	7	25	4,7	25	4,7
	8	50	5,7	50	5,7
	9	0	0,0	0	0,0
	10	50	5,7	25	4,7
media arit.		62,50	5,40	32,50	4,62
titulo			42,29		24,58
VACINA D	1	0	0,0	0	0,0
	2	0	0,0	0	0,0
	3	0	0,0	0	0,0
	4	25	4,7	0	0,0
	5	50	5,7	0	0,0
	6	0	0,0	0	0,0
	7	25	4,7	0	0,0
	8	50	5,7	0	0,0
	9	50	5,7	0	0,0
	10	100	6,7	0	0,0
media arit.		30,00	3,31	0,00	0,00
titulo			9,90		1,00
VACINA E	1	100	6,7	25	0,0
	2	100	6,7	25	4,7
	3	50	5,7	25	4,7
	4	25	4,7	25	4,7
	5	0	0,0	0	0,0
	6	200	7,7	50	5,7
	7	25	4,7	25	4,7
	8	200	7,7	25	4,7
	9	50	5,7	25	4,7
	10	50	5,7	50	5,7
media arit.		80,00	5,50	27,50	3,95
titulo			45,37		15,51
CONTROLE	1	0	0,0	0	0,0
	2	0	0,0	0	0,0
	3	0	0,0	0	0,0
	4	0	0,0	0	0,0
	5	0	0,0	0	0,0
	6	0	0,0	0	0,0
	7	0	0,0	0	0,0
	8	0	0,0	0	0,0
	9	0	0,0	0	0,0
	10	0	0,0	0	0,0
media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00
titulo			1,00		1,00

titulo < 25 = 0

**APÊNDICE H – Dados da sorologia (SAM) dos animais somente vacinados
(Experimento 4)**

GRUPO	ANIMAL	ESTIRPE/TITULO AC			
		LO4	log (x +1)	<i>Hond Utrecht IV</i>	log (x +1)
VACINA A	1	0	0,0	0,0	0,0
	2	0	0,0	0,0	0,0
	3	0	0,0	0,0	0,0
	4	0	0,0	0,0	0,0
	5	0	0,0	0,0	0,0
	6	0	0,0	0,0	0,0
	7	0	0,0	0,0	0,0
	8	0	0,0	0,0	0,0
	9	0	0,0	0,0	0,0
media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00
VACINA B	1	0	0,0	0,0	0,0
	2	0	0,0	0,0	0,0
	3	0	0,0	0,0	0,0
	4	0	0,0	0,0	0,0
	5	0	0,0	0,0	0,0
	6	0	0,0	0,0	0,0
	7	0	0,0	0,0	0,0
	8	0	0,0	0,0	0,0
	9	0	0,0	0,0	0,0
media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00
VACINA C	1	0	0,0	0,0	0,0
	2	0	0,0	0,0	0,0
	3	0	0,0	0,0	0,0
	4	0	0,0	0,0	0,0
	5	0	0,0	0,0	0,0
	6	0	0,0	0,0	0,0
	7	0	0,0	0,0	0,0
	8	0	0,0	0,0	0,0
	9	0	0,0	0,0	0,0
media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00
VACINA D	1	0	0,0	0,0	0,0
	2	0	0,0	0,0	0,0
	3	0	0,0	0,0	0,0
	4	0	0,0	0,0	0,0
	5	0	0,0	0,0	0,0
	6	0	0,0	0,0	0,0
	7	0	0,0	0,0	0,0
	8	0	0,0	0,0	0,0
	9	0	0,0	0,0	0,0
media arit.		0,00	0,00	0,00	0,00
VACINA E	1	0	0,0	0	0,0
	2	0	0,0	0	0,0
	3	0	0,0	0	0,0
	4	0	0,0	0	0,0
	5	0	0,0	50	5,7
	6	0	0,0	25	4,7
	7	0	0,0	25	4,7
	8	0	0,0	25	4,7
	9	0	0,0	25	4,7
media arit.		0,00	0,00	16,67	2,72

título < 25 = 0

APÊNDICE I – Tabela de colheita de dados da leitura do teste de inibição do crescimento (IC) - Experimento 4

GRUPO		diluição do <i>pool</i> de soro/tubo																								
		puro					1/2					1/4					1/8					1/16				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Controle negativo	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Controle do Ag	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Vacina A	<i>Pool 1</i>	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>Pool 2</i>	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Vacina B	<i>Pool 1</i>	P	P	P	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>Pool 2</i>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Vacina C	<i>Pool 1</i>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>Pool 2</i>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	N	N	N	N	N	N
Vacina D	<i>Pool 1</i>	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>Pool 2</i>	N	N	P	P	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Vacina E	<i>Pool 1</i>	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>Pool 2</i>	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

P = inibição do crescimento positiva – escore de crescimento de leptospiras de ausente até 1+

N = inibição do crescimento negativa – escore de 2+ a 3+ (Tabata et al., 2002)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)