ROSANA TABATA

**PROTEÇÃO CRUZADA ENTRE BACTERINAS
ANTILEPTOSPIROSE PRODUZIDAS COM TRÊS
REPRESENTANTES DO SOROGRUPO SEJROE. ENSAIO
EXPERIMENTAL EM HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*).**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre, junto à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada
às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos

SÃO PAULO

2002

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

Tabata, Rosana

Proteção cruzada entre bacterinas antileptospirose produzidas com três representantes do Sorogrupo Sejroe. Ensaio experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) / Rosana Tabata.

70 f.: il.

Dissertação (mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2002.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos.

Unitermos: 1.*Leptospira*. 2.Soro sanguíneo. 3.Hamsters.
4.Anticorpos neutralizantes. 5.Vacinas.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Nobuo e Shinobu, exemplos de garra e força
de vontade, pelo incentivo de uma vida inteira;*

Aos meus irmãos, por sempre terem acreditado em mim;

*Ao Sérgio, meu companheiro em todos os momentos, por
encontrarmos no amor e na união motivos
para batalhar pelos mesmos ideais;*

*Ao Robertinho, meu segundo grande amor, por me dar
razões para lutar por um mundo melhor.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos**, por confiar em minha capacidade e acreditar no meu profissionalismo, pela preocupação e dedicação para com seus orientados.

À técnica e amiga **Zenaide Maria de Moraes**, pelo auxílio e apoio durante todo o Mestrado, pela exemplar dedicação aos trabalhos realizados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À grande amiga **Eugenia Márcia de Deus Oliveira**, por compartilharmos momentos de alegrias e de estresse desde o início do Mestrado, pelo auxílio na parte experimental deste trabalho.

Ao estimado amigo **Hugo Scanavini Neto**, pelo auxílio fundamental neste trabalho, pela disposição em solucionar problemas, pelo grande ser humano que é.

Aos **Laboratórios BIOVET S/A**, pela disposição em produzir as vacinas utilizadas neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fumio Honma Ito** e ao amigo **Ricardo Augusto Dias**, pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, especialmente ao **Antonio da Costa Martins**, pelos cuidados com os animais do biotério; à **Gisele Oliveira de Souza**, pelo auxílio e amizade; ao **Renato Caravieri** e à **Sandra Abelardo Sanches**, que

demonstraram ser grandes amigos desde o final da minha graduação.

À bolsista **Gisele Dias Santos** e à **Dona Odete**, pelo cuidadoso preparo dos materiais utilizados neste trabalho e pela amizade.

Aos amigos **Fábio Gregori**, minha “luz filosófica”, e **Paulo Eduardo Brandão**, pela ajuda nos momentos difíceis, pelos conselhos e apoio constantes.

À **Fernanda Bernardi**, uma amiga a quem devo muitos momentos de reflexão.

Aos companheiros de pós-graduação da FMVZ-USP **Adriana Cortez**, **Cesar Alejandro Rosales Rodriguez**, **Cristiene Rosa**, **Fabiana Miraglia**, **Lara Borges Keid**, **Marcos Bryan Heinemann**, **Maria da Conceição Macedo**, **Patrícia Silvia Pozzetti**, **Rodrigo Martins Soares**, **Sidnei Miyoshi Sakamoto** e **Silvio Luís Pereira de Souza**, pela amizade, pelos momentos de descontração, apoio e incentivo durante todo o Mestrado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

À **CAPES**, pela concessão de bolsa de Mestrado.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	- porcentagem
°C	- graus Celsius
/mL	- por mililitro
μL	- microlitro
μm	- micrômetro
1 ^a	- primeira
2 ^a	- segunda
<i>ad libitum</i>	- à vontade
Al ₂ O ₃	- óxido de alumínio
BA	- Bahia
bacterina A	- bacterina bivalente produzida com sv hardjo e sv pomona
bacterina B	- bacterina bivalente produzida com sv wolffi e sv pomona
bacterina C	- bacterina bivalente produzida com sv guaricura e sv pomona
CIR	- controle de infecção renal
CMT	- California Mastitis Test
DL50	- dose letal capaz de matar 50% dos animais e manter 50% vivos
d.p.i.	- dias pós-infecção
EMJH	- Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
et al.	- e colaboradores
EUA	- Estados Unidos da América
Fig.	- figura
FMVZ	- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	- grama

Gráf.	- gráfico
ICL	- inibição do crescimento de leptospiros <i>in vitro</i>
IP	- intraperitoneal
L.	- <i>Leptospira</i>
LPF	- <i>Leptospira interrogans</i> variante sorológica pomona (estirpe Fromm)
MG	- Minas Gerais
mL	- mililitro
MS	- Mato Grosso do Sul
NaCl	- cloreto de sódio
RS	- Rio Grande do Sul
SAM	- soroaglutinação microscópica
SC	- subcutânea
SF	- salina fisiológica
SP	- São Paulo
sv	- sorovar ou variante sorológica
Tab.	- tabela
USDA	- United States Department of Agriculture
USP	- Universidade de São Paulo
VPS	- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
vs	- variante sorológica ou sorovar

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

Tab. 1 - Proporção de hamsters mortos por leptospirose, segundo o tipo de tratamento adotado – São Paulo – 2001.....	42
Tab. 2 - Número de hamsters desafiados com a variante sorológica pomona, ao término do período de observação de 21 dias, segundo a diluição do inóculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL50 de acordo com o método de Reed & Muench – São Paulo – 2001.....	43
Tab. 3 - Intervalos de confiança (95%) dos títulos de aglutininas antileptospiras pós-vacinais dos <i>pools</i> de soros de hamsters, segundo o tipo de vacina utilizado e a variante sorológica reatora empregada na reação de SAM – São Paulo – 2001.....	45
Tab. 4 - Intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes em <i>pools</i> de soros de hamsters, segundo o tipo de vacina adotado e a variante sorológica reatora empregada no teste de inibição do crescimento de leptospiras <i>in vitro</i> – São Paulo – 2001.....	46
Tab. 5 - Proporção de hamsters vacinados e sobreviventes ao desafio com a variante sorológica pomona, caracterizados como portadores renais de leptospiras aos 21 dias pós-infecção, segundo o tipo de vacina adotado – São Paulo – 2001.....	50
Tab. 6 - Proporção de hamsters não vacinados e inoculados com culturas não inativadas de leptospiras que apresentaram estado de portador renal, segundo a variante sorológica inoculada – São Paulo – 2001.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráf. 1** - Médias geométricas e intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes, expressos em valores antilogarítmicos de base dez, dos *pools* de soros dos hamsters vacinados, segundo o tipo de vacina adotado e a variante sorológica reatora do Sorogrupo Sejroe empregada no teste de inibição do crescimento de leptospiros *in vitro* – São Paulo – 2001..... 47
- Gráf. 2** - Médias geométricas e intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes, expressos em valores antilogarítmicos de base dez, dos *pools* de soros dos hamsters vacinados, segundo o tipo de vacina adotado e a variante sorológica pomona empregada como antígeno no teste de inibição do crescimento de leptospiros *in vitro* – São Paulo – 2001..... 48

RESUMO

TABATA, R. **Proteção cruzada entre bacterinas antileptospirose produzidas com três representantes do Sorogrupo Sejroe. Ensaio experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*).** [Cross-protection among leptospiral bacterins produced with three representatives of Serogroup Sejroe. Experimental assay in hamsters (*Mesocricetus auratus*)]. 2002. 70 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foi investigada a existência de proteção cruzada entre bacterinas bivalentes formuladas com um de três representantes do Sorogrupo Sejroe: hardjo (bacterina A), wolffi (bacterina B) e guaricura (bacterina C), e uma estirpe do sorovar pomona, empregada por ser patogênica para hamsters (*Mesocricetus auratus*) e possibilitar a realização do teste de potência com desafio. Os ensaios foram efetuados em hamsters machos, comparando-se os níveis de anticorpos aglutinantes e neutralizantes, respectivamente obtidos nos testes de soroaglutinação microscópica (SAM) e inibição do crescimento de leptospiros *in vitro* (ICL). Os animais receberam duas doses das vacinas pela via subcutânea; aos dez dias da segunda dose, foram inoculados com culturas não inativadas dos respectivos sorovares do Sorogrupo Sejroe. Aos 21 dias pós-infecção (d.p.i.), os animais foram sangrados, os soros (n=8) foram agrupados em *pools* e submetidos aos testes de SAM e ICL. O teste de potência com desafio para o sorovar pomona foi adaptado do protocolo preconizado pelo United States Department of Agriculture, mas as vacinas não foram diluídas e o esquema de imunização empregou duas aplicações de 1,0 mL pela via subcutânea em intervalo de dez dias; o desafio foi efetuado aos dez dias da segunda aplicação; os óbitos por leptospirose foram registrados e, aos 21 d.p.i., os sobreviventes foram sacrificados e a condição de portadores renais foi investigada através de cultivos de tecido renal para isolamento de leptospiros. No teste de potência com o sorovar pomona, o número de doses infectantes empregado para desafio (100) situou-se dentro da faixa preconizada (10 a 1000); respectivamente para as bacterinas A, B e C, as proporções de mortes por leptospirose entre os animais vacinados foram 1/10, 0/10 e 3/10, e as de portadores renais de leptospiros entre os sobreviventes foram 2/9, 1/10 e 2/7. Os resultados do teste de SAM revelaram que a bacterina A induziu reações para os sorovares hardjo e wolffi; a bacterina B, para hardjo, wolffi e

guaricura, e a bacterina C, apenas para guaricura, e do teste de ICL, que animais vacinados com as bacterinas B ou C apresentaram proteção para hardjo, wolffi e guaricura; entretanto, a bacterina A conferiu proteção apenas para wolffi. Apesar das variações no poder imunogênico segundo a estirpe de leptospira empregada para a produção das bacterinas, houve proteção cruzada entre os sorovares hardjo, wolffi e guaricura.

Unitermos: *Leptospira*, vacinas, hamsters, soro sanguíneo, anticorpos neutralizantes.

SUMMARY

TABATA, R. **Cross-protection among leptospiral bacterins produced with three representatives of Serogroup Sejroe. Experimental assay in hamsters (*Mesocricetus auratus*).** [Proteção cruzada entre bacterinas antileptospírose produzidas com três representantes do Sorogrupo Sejroe. Ensaio experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*)]. 2002. 70 f. Tese (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The existence of cross-protection among bivalent bacterins, produced with one of three leptospires belonging to Serogroup Sejroe: hardjo (bacterin A), wolffi (bacterin B) and guaricura (bacterin C), and a strain of serovar pomona (included because of its pathogenicity to hamsters and the possibility of performing potency assay with challenge), was investigated in male hamsters (*Mesocricetus auratus*) by comparison of agglutinating and neutralizing antibodies titers, respectively measured by microscopic agglutination (MAT) and *in vitro* growth inhibition (GIT) tests. All animals received two doses of bacterins by subcutaneous route; after ten days from the second dose, they were inoculated with non-inactivated cultures of respective serovars of Serogroup Sejroe. At 21 post-challenge day (p.c.d.), all animals were bled and their sera (n=8) were joined in pools and tested by MAT and GIT. The potency assay with challenge performed only with serovar pomona was modified from protocol of USDA, but vaccines were not diluted and the immunization schedule employed two 1.0 mL vaccine doses by subcutaneous route with 10-day interval; the challenge was performed after ten days from the second dose; the number of deaths due to leptospirosis was registered; at 21 p.c.d., the survivors were sacrificed and their renal carrier state was investigated by culture of renal tissue for leptospires isolation. In the potency assay with serovar pomona, the number of infectious doses employed for challenge (100 infective units) was in accordance with the recommended range (10-1,000 infective units); respectively to bacterins A, B and C, proportions of deaths due to leptospirosis among vaccinated animals were 1/10, 0/10 and 3/10, and proportions of leptospires renal carrier among survivors were 2/9, 1/10 and 2/7. Results of MAT showed that bacterin A induced reactions against serovars hardjo and wolffi; bacterin B, against hardjo, wolffi and guaricura, and bacterin C, against guaricura; results of GIT revealed that vaccinated animals with

bacterins B or C presented protection against serovar hardjo, wolffi and guaricura; however, bacterin A induced protection only against wolffi. A cross-protection was observed among serovars hardjo, wolffi and guaricura, although variations exist in the immunogenic capacity according to the strain of leptospires used for the bacterins production.

Key words: *Leptospira*, vaccines, hamsters, blood serum, neutralizing antibodies.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVO.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	ANTÍGENOS.....	27
3.2	BACTERINAS.....	28
3.3	ANIMAIS.....	29
3.3.1	Teste de potência de vacinas e titulação do inóculo infectante de desafio com o sorovar pomona.....	29
3.3.2	Teste de inibição de crescimento de leptospiras <i>in vitro</i> com as variantes sorológicas hardjo, wolffi, guaricura e pomona.....	30
3.3.3	Controle das variantes sorológicas hardjo, wolffi e guaricura, não inativadas.....	31
3.4	TESTE DE POTÊNCIA DE VACINAS COM O SOROVAR POMONA.....	31
3.4.1	Preparação do inóculo infectante do sorovar pomona empregado para desafio.....	32
3.4.1.1	Titulação do inóculo infectante do sorovar pomona empregado para desafio.....	33
3.4.2	Microtécnica de soroaglutinação microscópica para diagnóstico sorológico de leptospirose.....	33
3.4.2.1	Antígenos.....	34
3.4.2.2	Reação.....	34

3.4.2.3	Leitura e interpretação.....	34
3.4.3	Isolamento de leptospiras para controle de infecção renal.....	35
3.5	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS <i>IN VITRO</i> COM AS VARIANTES SOROLÓGICAS HARDJO, WOLFFI, GUARICURA E POMONA.....	36
3.5.1	Obtenção dos <i>pools</i> de soro.....	37
3.5.2	Reação.....	37
3.5.3	Leitura e interpretação.....	38
3.6	CONTROLE DAS VARIANTES SOROLÓGICAS HARDJO, WOLFFI E GUARICURA, NÃO INATIVADAS.....	39
3.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	40
4	RESULTADOS.....	41
4.1	RESULTADOS DO TESTE DE POTÊNCIA DE VACINAS E DA TITULAÇÃO DO INÓCULO INFECTANTE DE DESAFIO COM A VARIANTE SOROLÓGICA POMONA.....	41
4.2	RESULTADOS DA PESQUISA DE ANTICORPOS AGLUTINANTES E NEUTRALIZANTES PARA AS VARIANTES SOROLÓGICAS HARDJO, WOLFFI, GUARICURA E POMONA, NOS <i>POOLS</i> DE SOROS DOS HAMSTERS VACINADOS.....	44
4.3	RESULTADOS DA PESQUISA DO ESTADO DE PORTADOR RENAL NOS ANIMAIS VACINADOS E SOBREVIVENTES À LEPTOSPIROSE APÓS O DESAFIO COM O SOROVAR POMONA.....	49
4.4	RESULTADOS DA EVOLUÇÃO DO GRUPO CONTROLE DE ANIMAIS INOCULADOS COM OS SOROVARES HARDJO, WOLFFI E GUARICURA, NÃO INATIVADOS.....	49
5	DISCUSSÃO.....	52

5.1	TESTE DE POTÊNCIA DE VACINAS.....	52
5.2	PESQUISA DE AGLUTININAS ANTILEPTOSPIRAS NOS <i>POOLS</i> DE SOROS DOS HAMSTERS VACINADOS.....	54
5.3	PESQUISA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES NOS <i>POOLS</i> DE SOROS DOS HAMSTERS VACINADOS.....	55
5.4	PESQUISA DO ESTADO DE PORTADOR RENAL DE LEPTOSPIRAS.....	56
6	CONCLUSÕES.....	57
7	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXOS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose, doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem (CÔRTEZ, 1993; COLEMAN, 2000), de curso agudo a crônico que afeta diversas espécies de animais domésticos, silvestres e os seres humanos. É provocada por bactérias, espiroquetas do gênero *Leptospira* (LANGONI, 1999), com seis a 20 micrômetros de comprimento por 0,1 μm de diâmetro, com curvatura em forma de gancho em uma ou nas duas extremidades (MYERS, 1985).

As leptospirosas são sensíveis à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos antissépticos (LANGONI, 1999), mas sobrevivem bem em condições quentes e úmidas, em pH próximo da neutralidade (BINDER e MERMEL, 1998; LANGONI, 1999), entre 7,2 e 7,4 (LANGONI, 1999).

A leptospirose está mundialmente distribuída, mas sua incidência tem forte associação com períodos de alta pluviosidade (SULLIVAN, 1974; ACHA e SZYFRES, 1986; PLANK e DEAN, 2000) e, sob as condições favoráveis anteriormente descritas e na presença de hospedeiros adequados, as leptospirosas podem persistir por semanas (SULLIVAN, 1974) a meses (PLANK e DEAN, 2000) no ambiente, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (SULLIVAN, 1974). Em regiões secas, infecções acidentais ocorrem próximo a águas represadas com altas concentrações animais; em regiões temperadas, as infecções são sazonais,

ocorrendo com maior frequência nos meses quentes e chuvosos (THIERMANN, 1984).

As portas de entrada para as leptospiplas invadirem o organismo dos hospedeiros vertebrados são a pele lesada e membranas mucosas intactas (SULLIVAN, 1974; MYERS, 1985; BINDER e MERMEL, 1998). Após a penetração, percorrem as vias linfáticas e sangüíneas atingindo o fígado, onde se multiplicam por aproximadamente uma semana; segue-se então a fase de leptospiremia com estágio febril e subsequente produção de anticorpos, que facilita a eliminação de leptospiplas dos tecidos por fagocitose (SULLIVAN, 1974; MYERS, 1985).

Na urina, há presença de anticorpos específicos contra leptospiplas, mas não de fagócitos, o que permite a sobrevivência e multiplicação desses microrganismos nos túbulos contornados renais (SULLIVAN, 1974; MYERS, 1985), onde formam microcolônias e podem ser eliminadas (leptospirúria) por dias a anos. Isso explica a existência dos portadores renais, fator essencial para a epidemiologia da leptospirose (SULLIVAN, 1974). A transmissão ocorre por contato com urina dos animais infectados ou ambiente contaminado pela mesma (MICHNA, 1970; SULLIVAN, 1974; ACHA e SZYFRES, 1986; PLANK e DEAN, 2000).

A leptospirose é comum em roedores e em outros mamíferos silvestres e domésticos (ACHA e SZYFRES, 1986). Em bovinos, a infecção com a variante sorológica hardjo causa abortamentos, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos (GIORGI et al., 1981; BOLIN et al., 1989a; BOLIN et al., 1989b; BOLIN et

al., 1991), mastite (BOLIN et al., 1989a; BOLIN et al., 1989b) e agalaxia (BOLIN et al., 1989a).

A localização de leptospiras no trato reprodutivo das vacas resulta em infecção fetal e transtornos persistentes da reprodução. Após a expulsão do feto, que normalmente ocorre no terço final de gestação, pode haver a eliminação de leptospiras pelas descargas uterinas e persistência dessas bactérias nas trompas falopianas (ELLIS, 1984). A infecção pode persistir por até 142 dias no útero de vacas gestantes e por 97 dias em vacas não gestantes (THIERMANN, 1984).

Em vacas leiteiras, a infecção é marcada por febre, depressão e relutância ao movimento, seguindo-se de uma redução na produção de leite, cuja secreção apresenta aumento na contagem de leucócitos, dando reação positiva ao CMT (SULLIVAN, 1974); não são observadas anormalidades ao exame do úbere, mas o órgão torna-se mais flácido que o normal. Todos os quartos são igualmente afetados (SULLIVAN e CALLAN, 1970), passando a secretar leite amarelado com pequenos coágulos e, ocasionalmente, sangue (SULLIVAN e CALLAN, 1970; HANSON, 1977). Esses problemas, além de apresentarem implicações para a saúde pública, também afetam a saúde animal, já que causam transtornos produtivos e reprodutivos nos animais, resultando em grandes prejuízos para os produtores e, conseqüentemente, para a economia dos países acometidos (FAINE, 1994).

Embora o homem seja susceptível a um grande número de variantes sorológicas de leptospiras (SULLIVAN, 1974; ACHA e SZYFRES, 1986), a leptospirose humana é tida como acidental (SULLIVAN, 1974; ANDRADE e

BRANDÃO, 1987), mas em situações particulares também são observados surtos epidêmicos (ACHA e SZYFRES, 1986).

Muitos surtos de leptospirose humana resultam do contato com águas (MICHNA, 1970; ACHA e SZYFRES, 1986; PLANK e DEAN, 2000), solos (MICHNA, 1970; PLANK e DEAN, 2000), pastos e gêneros alimentícios contaminados pela urina de animais portadores (MICHNA, 1970).

Bovinos infectados podem eliminar leptospiros na urina por meses a anos e, portanto, comportam-se como fontes de infecção para outros animais e também para os seres humanos (BOLIN et al., 1989a).

Os roedores são um grupo de animais especialmente envolvido com a epidemiologia da leptospirose, pois apresentam leptospiúria de longa duração. Nas zonas urbanas, o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) é considerado o principal reservatório de leptospiros (LANGONI, 1999).

Na Nova Zelândia, a incidência da leptospirose humana pela variante sorológica hardjo reflete freqüentemente a situação da leptospirose nos bovinos (BROUGHTON et al., 1984). Assim sendo, a redução da incidência da leptospirose humana é primariamente dependente do controle da doença nesses animais (SULLIVAN, 1974; COLEMAN, 2000).

Os trabalhadores de fazendas, de abatedouros (HEATH e JOHNSON, 1994; BINDER e MERMEL, 1998; PLANK e DEAN, 2000), de canaviais (ACHA e SZYFRES, 1986) e arrozais (ACHA e SZYFRES, 1986; BINDER e MERMEL,

1998; PLANK e DEAN, 2000), e médicos veterinários (ACHA e SZYFRES, 1986; BINDER e MERMEL, 1998), são grupos com risco de contrair a leptospirose (HEATH e JOHNSON, 1994).

No Brasil, SANTA ROSA et al. (1969/70) constataram predomínio do sorovar wolffi, em exames sorológicos realizados entre os anos de 1960 e 1968, em soros de bovinos oriundos dos Estados de São Paulo, Paraná, Pernambuco, Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Amapá, Pará e Rio de Janeiro.

MOREIRA et al. (1979) examinaram soros de bovinos em inquérito epidemiológico probabilístico no Estado de Minas Gerais e constataram predominância da variante sorológica wolffi seguida de hardjo, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae e canicola.

GIORGI et al. (1981) constataram, em exames sorológicos realizados entre 1974 e 1980, o predomínio da variante sorológica wolffi seguida das variantes pomona e tarassovi em soros de bovinos provenientes de vários Estados (Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Pará). Nesta época, a variante sorológica hardjo ainda não fazia parte da coleção de antígenos empregada.

ABUCHAIM e DUTRA (1985) examinaram bovinos da bacia leiteira de Porto Alegre/RS constatando predomínio das variantes sorológicas pomona, hardjo e sejroe.

RIBEIRO et al. (1988), em levantamento sorológico de duas propriedades de bovinos leiteiros azebuados e mestiços da região do Triângulo Mineiro/MG, constataram predominância da variante sorológica wolffi seguida de hardjo.

LILENBAUM et al. (1995), no Estado do Rio de Janeiro, verificaram o predomínio da variante sorológica hardjo seguida de wolffi e bratislava em vacas com problemas reprodutivos e não vacinadas contra leptospirose.

CALDAS et al. (1995/96), em bovinos da região de Salvador/BA, verificaram maior frequência das variantes sorológicas wolffi, icterohaemorrhagiae e autumnalis.

VASCONCELLOS et al. (1997), em rebanhos bovinos de seis Estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, constataram o predomínio de reações sorológicas para a variante sorológica hardjo.

GIRIO et al. (1998), na região do Pantanal/MS, verificaram predomínio das variantes sorológicas wolffi, grippotyphosa e pomona em bois baguás (*Bos taurus indicus*), e pomona, hardjo e wolffi em búfalos (*Bubalus bubalis*).

FAVERO (2000) efetuou um estudo retrospectivo dos exames sorológicos de leptospirose realizados no período de 1984 a 1997 pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP, e verificou a predominância de reações com as variantes sorológicas hardjo e wolffi em soros bovinos provenientes dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Bahia, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Piauí, Ceará, Maranhão, Pará, Rondônia, e do Distrito

Federal. Nesta observação, foram consideradas como mais prováveis as variantes sorológicas que apresentaram maior título no teste de soroaglutinação microscópica, e foram descartados os animais que apresentaram títulos mais elevados empatados para dois ou mais sorovares.

Apesar das variantes sorológicas wolffi e hardjo serem predominantes em estudos sorológicos de rebanhos bovinos brasileiros, a primeira só foi isolada no líquido cefalorraquidiano de um paciente humano, dos rins de um exemplar de *Akodon arviculoides* e de um outro roedor não identificado, nas adjacências do Horto Florestal de São Paulo (CORRÊA et al., 1965/67), bem como de um camundongo (*Mus musculus*) capturado no Porto de Santos/SP (GIORGI et al., 1984).

A variante sorológica hardjo foi isolada por MOREIRA (1994) de uma amostra de urina de bovino em uma fazenda da região oeste de Minas Gerais.

SANTA ROSA et al. (1980) isolaram as variantes sorológicas guaicurus e goiano dos rins de bovinos aparentemente sadios provenientes dos Estados de São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Paraná e Minas Gerais.

VASCONCELLOS et al. (1999) isolaram uma variante sorológica pertencente ao sorogrupo Sejroe, identificada como guaricura¹, da urina de uma fêmea bubalina oriunda da região do Vale do Ribeira/SP.

¹ A variante sorológica guaicurus, isolada por SANTA ROSA et al. (1980), foi erroneamente cadastrada com a denominação guaricura no laboratório de referência do Koninklijk Instituut voor de Tropen (KIT) – Tropical Royal Institute (Amsterdã, Holanda).

YANAGUITA (1972) verificou a existência de reações cruzadas entre as variantes sorológicas guaicurus e wolffi em soros de bovinos submetidos ao teste de soroaglutinação microscópica. COSTA et al. (1998) constataram que hamsters (*Mesocricetus auratus*) vacinados com bacterinas produzidas com as variantes sorológicas hardjo ou wolffi apresentaram proteção ao desafio com estirpe virulenta do sorovar hardjo. No entanto, não foi possível a realização de desafio com o sorovar wolffi por não ser disponível uma estirpe deste sorovar com patogenicidade regular para hamsters.

A vacinação é uma importante ação preventiva contra a infecção dos animais por leptospiros. Para este fim, vacinas inativadas são as mais utilizadas (HANSON, 1977; LANGONI, 1999), e sua eficácia é aumentada com a adição de adjuvantes, como o hidróxido de alumínio (HANSON, 1977). Em condições de campo, o uso de vacinas contra leptospirose reduz a ocorrência da infecção e os problemas reprodutivos causados pela variante sorológica hardjo (BOLIN et al., 1989a); em regiões endêmicas, a vacinação contribui substancialmente para a redução do impacto econômico da doença (SULLIVAN, 1974).

Quando de surtos de abortamentos por leptospirose, a recomendação é a vacinação dos animais associada ao tratamento com dose única de estreptomicina (PRESCOTT, 1991).

Touros que desenvolvem anticorpos contra as variantes sorológicas hardjo e pomona comumente são barrados em programas de inseminação artificial (PRESCOTT, 1991), pois uma vez observadas leptospiros no sêmen, há a

possibilidade de transmissão da infecção através do coito ou da inseminação artificial (MICHNA, 1970) e, neste caso, a recomendação é tratar os animais com dihidroestreptomicina para remover o estado de portador renal, que pode resultar em decréscimo dos títulos de anticorpos para a variante sorológica pomona em dois a quatro meses, mas os títulos para a variante hardjo podem persistir por mais tempo (PRESCOTT, 1991).

SAMINA et al. (1997) verificaram que o uso de vacina inativada (mono ou multivalente) pode prevenir a agalaxia, mas pode não conferir proteção contra a infecção ou as localizações renal e uterina das leptospiras, embora o grau de leptospirúria possa estar relacionado aos níveis de anticorpos humorais específicos. Todavia, de acordo com a qualidade da bacterina, a vacinação pode conferir proteção contra a doença clínica (HANSON, 1977; FREUDENSTEIN e HEIN, 1991), a colonização renal (FREUDENSTEIN e HEIN, 1991), abortos e perdas produtivas por seis meses a um ano (HANSON, 1977).

As bacterinas contra a leptospirose devem ser formuladas com o menor número de sorovares possível, dando-se especial destaque para aqueles grassantes na região (ZEMJANIS, 1974).

No Brasil, as evidências sorológicas disponíveis para bovinos e bubalinos destacam o predomínio dos sorovares hardjo e wolffi, ambos pertencentes ao Sorogrupo Sejroe. Contudo, até o presente, nestas espécies animais, só houve isolamento e tipificação dos sorovares hardjo e guaricura. Se fosse possível o encontro de uma estirpe do Sorogrupo Sejroe que conferisse proteção para os três

representantes evidenciados no Brasil: hardjo, wolffi e guaricura, seriam atingidos os objetivos de redução no custo de produção e, provavelmente, aumento do poder imunogênico das bacterinas.

O teste de potência preconizado para bacterinas antileptospiras (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977) prevê o ensaio em hamsters com desafio praticado com estirpes dotadas de patogenicidade regular para estes animais, o que não ocorre com todas as estirpes isoladas, mesmo quando se adota o expediente da realização em passagens sucessivas na espécie (FAINE, 1994).

Uma alternativa para que este impasse seja contornado é a realização do ensaio de inibição do crescimento de leptospiras *in vitro* (TRIPATHY et al., 1971; TRIPATHY et al., 1973), o qual pode mensurar os níveis de anticorpos neutralizantes presentes no soro sanguíneo de animais vacinados, que não apresentam relação direta com os anticorpos aglutinantes demonstrados pelo teste clássico de soroaglutinação microscópica (HANSON, 1977).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi verificar, experimentalmente em hamsters (*Mesocricetus auratus*), se há proteção cruzada entre três sorovares pertencentes ao Sorogrupo Sejroe: *Leptospira interrogans* variante sorológica hardjo (estirpe Hardjoprajitno), *Leptospira interrogans* variante sorológica wolffi (estirpe 3705) e *Leptospira santarosai* variante sorológica guaricura (estirpe M-04), empregando-se análise comparativa dos níveis de anticorpos neutralizantes pelo teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro*, a partir de bacterinas bivalentes que tiveram suas características de potência avaliadas pelo teste em hamsters desafiados com *Leptospira interrogans* sorovar pomona (estirpe Fromm).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANTÍGENOS

As culturas vivas de leptospiros, empregadas como antígenos nas provas sorológicas, foram obtidas da coleção de antígenos (ANEXO 1) do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP. Os antígenos vivos foram mantidos em meio líquido de EMJH² modificado (ALVES, 1995) com 4 a 14 dias de crescimento, livres de contaminação e de autoaglutinação, e contagens de 100 a 200 microrganismos por campo microscópico com ocular de 10 vezes e objetiva de 45 vezes (SANTA ROSA, 1970).

Foram utilizadas três variantes sorológicas pertencentes ao Sorogrupo Sejroe, quais sejam, *Leptospira interrogans* variante sorológica hardjo (estirpe Hardjoprajitno); *Leptospira interrogans* vs wolffi (estirpe 3705) e *Leptospira santarosai* vs guaricura (estirpe M-04). As duas primeiras foram fornecidas pelo BgVV³; a estirpe M-04 foi isolada de búfalos do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil (VASCONCELLOS et al., 1999) e tipificada pelo KIT⁴. Para desafio do teste de potência em hamsters foi utilizada *Leptospira interrogans* vs pomona (estirpe Fromm), única disponível apresentando patogenicidade regular para esta espécie animal, fornecida pelos Salsbury Laboratórios Ltda. (Paulínia, São Paulo, Brasil).

² Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (DIFCO – Detroit, EUA)

³ Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Berlin, Alemanha)

⁴ Koninklijk Instituut voor de Tropen – Royal Tropical Institute (Amsterdã, Holanda)

3.2 BACTERINAS

As três bacterinas bivalentes com adjuvante de hidróxido de alumínio foram produzidas em um laboratório comercial⁵ de escala industrial. Todas incluíram a variante sorológica pomona e uma das representantes do Sorogruppo Sejroe, sendo denominadas da seguinte forma: (1) bacterina A (vs hardjo); (2) bacterina B (vs wolffi); (3) bacterina C (vs guaricura).

As culturas vivas foram inativadas em solução a 10% de formaldeído, centrifugadas, e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado contendo as leptospiras inativadas foi ressuspensão em solução salina tamponada de Sorensen (SANTA ROSA, 1970), obtendo-se uma concentração final de $1,2 \times 10^9$ microrganismos/mL (para as variantes sorológicas hardjo, wolffi e guaricura), e após a adição do adjuvante de hidróxido de alumínio, cada bacterina foi suplementada com a vs pomona inativada e ressuspensa em solução salina tamponada de Sorensen, na concentração de $6,0 \times 10^8$ microrganismos/mL (FREUDENSTEIN et al., 1991).

O adjuvante foi preparado a partir de solução estéril de hidróxido de alumínio equivalente a 2,0% de óxido de alumínio, obtendo-se a concentração final de 0,24% de Al_2O_3 (VENUGOPAL e RATNAM, 1991). As bacterinas foram armazenadas em frascos esterilizados sob refrigeração.

⁵ Laboratórios BIOVET S/A (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil)

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 183 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos jovens, com 80 a 120 gramas de peso vivo, mantidos por seis semanas no infectório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP. Os animais foram mantidos em caixas forradas com maravalha, trocada duas vezes por semana, e foram alimentados com ração comercial peletizada e água da rede pública fornecidos *ad libitum*. Para evitar superpopulação nas caixas, em cada uma foram mantidos de cinco a, no máximo, dez animais.

Os hamsters foram divididos em grupos segundo os tempos experimentais: (1) teste de potência das vacinas e titulação do inóculo infectante de desafio com o sorovar pomona; (2) teste de inibição do crescimento de leptospiras *in vitro* com os sorovares hardjo, wolffi, guaricura e pomona; (3) controle dos sorovares hardjo, wolffi e guaricura não inativados.

3.3.1 Teste de potência de vacinas e titulação do inóculo infectante de desafio com o sorovar pomona

Os 50 hamsters utilizados no teste de potência de vacinas (ANEXO 2, Fig. 1) foram divididos em cinco grupos com dez animais da seguinte forma: (1) grupo controle do ambiente, não vacinado e não desafiado; (2) grupo controle do inóculo infectante de desafio, não vacinado e desafiado; (3) grupo vacinado com bacterina A e desafiado; (4) grupo vacinado com bacterina B e desafiado; (5) grupo vacinado

com bacterina C e desafiado. O desafio dos animais foi efetuado a vs pomona. Aos 21 dias pós-desafio, os animais sobreviventes foram submetidos ao controle de infecção renal para verificação do estado de portador de leptospiras.

Para a titulação do inóculo infectante de desafio (ANEXO 2, Fig. 1) com a vs pomona, foram utilizados 25 hamsters, divididos em cinco grupos com cinco animais. Cada um dos grupos recebeu uma das diluições em escala geométrica de razão dez (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) do inóculo infeccioso.

3.3.2 Teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* com as variantes sorológicas hardjo, wolffi, guaricura e pomona

Neste tempo experimental (ANEXO 2, Fig. 2), foram utilizados 90 hamsters, divididos em: (1) grupo controle, com 18 animais não vacinados; (2) grupo vacinado com a bacterina A e inoculado com cultura viva do sorovar hardjo, com 24 animais; (3) grupo vacinado com a bacterina B e inoculado com sorovar wolffi, com 24 animais; (4) grupo vacinado com bacterina C e inoculado com sorovar guaricura, com 24 animais. Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos, destinados ao preparo dos *pools* de soros.

3.3.3 Controle das variantes sorológicas hardjo, wolffi e guaricura não inativadas

Foram utilizados 18 hamsters (ANEXO 2, Fig. 2), divididos em três grupos com seis animais: (1) grupo inoculado com cultura viva de *Leptospira interrogans* vs hardjo (estirpe Hardjoprajtno); (2) grupo inoculado com cultura viva de *Leptospira interrogans* vs wolffi (estirpe 3705); (3) grupo inoculado com cultura viva de *Leptospira santarosai* vs guaricura (estirpe M-04).

3.4 TESTE DE POTÊNCIA DAS VACINAS COM O SOROVAR Pomona

Os hamsters (ANEXO 2, Fig. 1) mantidos como controles receberam, em intervalo de 10 dias, duas doses de 1,0 mL de solução salina fisiológica estéril a 0,85% de cloreto de sódio pela via subcutânea, e os animais dos três grupos vacinados receberam duas doses de 1,0 mL de bacterina (respectivamente, bacterinas A, B e C) pela via subcutânea. Após 10 dias da segunda dose, todos os animais (exceto os controles negativos, que receberam 200 µL de meio de EMJH modificado pela via intraperitoneal) foram desafiados com o sorovar pomona (3.4.1) a um volume individual de 200 µL pela via intraperitoneal da diluição 10^{-1} , que continha de 20 a 30 leptospiros por campo microscópico no aumento de 200 vezes. A observação prolongou-se por 21 dias consecutivos, e os animais mortos por leptospirose foram contabilizados.

Ao final deste período, o número de animais sobreviventes ao desafio foi registrado, e os mesmos foram sangrados assepticamente através de punção intracardiaca para obtenção de soro destinado à microtécnica de soroaglutinação microscópica, sacrificados por inalação de vapores de éter etílico, e necropsiados para colheita dos rins e realização de cultivos destinados ao controle de infecção renal por leptospiros.

3.4.1 Preparação do inóculo infectante do sorovar pomona empregado para desafio

O desafio no teste de potência de vacinas foi efetuado a partir de tecido hepático de hamster previamente infectado com *Leptospira interrogans* vs pomona (estirpe Fromm)⁶. Este ensaio foi utilizado como controle da potência da vacina segundo o esquema de imunização adotado (ANEXO 2, Fig. 1).

O tecido hepático do hamster experimentalmente infectado com vs pomona foi macerado na proporção de 1,0 g de tecido para 9,0 mL de meio líquido de EMJH modificado, resultando na diluição 10^{-1} , a partir da qual foram efetuadas diluições seriadas em escala geométrica de razão dez (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). A diluição de escolha para o desafio foi a 10^{-1} , que continha entre 20 e 30 leptospiros por campo microscópico no aumento de 200 vezes, adequada para a obtenção de 10 a 1000 DL50 em hamsters (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977).

3.4.1.1 Titulação do inóculo infectante do sorovar pomona empregado para desafio

Os hamsters em cada um dos cinco grupos foram inoculados pela via intraperitoneal com 200 μ L de uma das diluições do inóculo de desafio (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). Os animais foram observados diariamente, contabilizando-se o número total de mortes por leptospirose em cada grupo ao final de um período de 21 dias consecutivos (ANEXO 2, Fig. 1). Os valores obtidos foram utilizados para determinação da DL50, calculada pelo método de Reed & Muench (MANCUSO, 1974). Obtido o valor da DL50, foi determinado o número de doses letais efetivamente empregadas na diluição 10^{-1} utilizada para o desafio.

3.4.2 Microtécnica de soroaglutinação microscópica para diagnóstico sorológico de leptospirose

A microtécnica de soroaglutinação microscópica (GALTON et al., 1965) foi empregada para mensuração dos níveis de aglutininas dos *pools* de soros dos hamsters, tendo como antígenos os sorovares hardjo, wolffi, guaricura e pomona.

⁶ Esta variante sorológica foi utilizada por ser a única com patogenicidade regular em hamsters mantida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP.

3.4.2.1 Antígenos

As culturas vivas de leptospiros foram mantidas em meio líquido de EMJH modificado (ALVES, 1995), com 4 a 14 dias de crescimento e uma densidade aproximada 100 a 200 microrganismos por campo microscópico, com aumento de 400 vezes.

3.4.2.2 Reação

Inicialmente, os soros foram diluídos a 1:50 em solução salina tamponada de Sorensen. A reação foi efetuada em microplacas de poliestireno com 96 poços, utilizando-se um volume de 50 µL de soro diluído e adicionando-se 50 µL de antígeno, obtendo-se diluição inicial 1:100. Para a determinação do título de aglutininas antileptospiros em cada soro, foram efetuadas diluições seriadas em escala geométrica de razão dois em solução salina tamponada de Sorensen. As microplacas foram incubadas em estufa a 28-30°C por três horas.

3.4.2.3 Leitura e interpretação

A leitura foi realizada em microscópio óptico com condensador de campo escuro, no aumento de 100 vezes, observando-se a formação de aglutinações. O título do soro foi dado como a recíproca da maior diluição que apresentou 50% de leptospiros aglutinados (CORRÊA et al., 1965/67; MYERS, 1985).

3.4.3 Isolamento de leptospiros para controle de infecção renal

Aos 21 dias pós-infecção (d.p.i.) por leptospiros, os hamsters sobreviventes foram anestesiados por inalação de vapores de éter etílico e, após a sangria destinada à microtécnica de soroaglutinação microscópica, foram sacrificados com o aprofundamento da anestesia. Os animais foram necropsiados, e seus rins foram colhidos assepticamente em placas de Petri esterilizadas e pesados em balança analítica de precisão.

Os rins foram macerados em grals com pistilos esterilizados, e adicionou-se quantidade suficiente de solução salina tamponada de Sorensen para obtenção da diluição inicial a 10^{-1} , a partir da qual foram preparadas duas diluições seriadas em escala geométrica de razão dez (10^{-2} e 10^{-3}). Cem microlitros por diluição foram semeados em tubos com tampa de baquelite contendo 5,0 mL de meio semi-sólido de Fletcher (SANTA ROSA, 1970; MYERS, 1985), dois tubos por diluição, os quais foram incubados em estufa a 28-30°C por seis semanas, com observações semanais (FAVERO et al., 1997) destinadas à verificação da formação do anel de crescimento subsuperficial (zona de Dinger) de leptospiros no meio (MYERS, 1985), o qual sempre foi confirmado pela constatação efetiva de leptospiros em microscopia de campo escuro.

3.5 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS IN VITRO COM AS VARIANTES SOROLÓGICAS Hardjo, Wolffii, Guaricura E Pomona

O teste de inibição de crescimento de leptospiiras *in vitro* (ANEXO 2, Fig. 2), foi adaptado a partir da descrição de TRIPATHY et al. (1973), e destinou-se à mensuração dos níveis de anticorpos neutralizantes dos *pools* de soros de hamsters para as variantes sorológicas testadas no presente trabalho.

Os hamsters do grupo controle não vacinados, divididos em subgrupos com seis indivíduos, receberam duas doses de 1,0 mL de solução salina fisiológica a 0,85% da NaCl com intervalo de dez dias. Os hamsters dos três grupos vacinados, divididos em subgrupos com seis animais, receberam respectivamente as bacterinas A, B e C pela via subcutânea, em duas doses de 1,0 mL com intervalo de dez dias. Após dez dias da segunda dose, todos os animais (exceto os controles não vacinados, que receberam 200 µL solução salina tamponada de Sorensen pela via intraperitoneal) foram inoculados intraperitonealmente com 200 µL de culturas vivas diluídas, em solução salina tamponada de Sorensen, das respectivas variantes sorológicas do Sorogrupo Sejroe incluídas nas bacterinas, ou seja, os animais vacinados com bacterina A receberam *Leptospira interrogans* vs hardjo (estirpe Hardjoprajitno) na diluição 10^{-2} ; os animais vacinados com bacterina B, diluição 10^{-2} de *Leptospira interrogans* vs wolffii (estirpe 3705); e animais vacinados com bacterina C, diluição 10^{-1} de *Leptospira santarosai* vs guaricura (estirpe M-04). Essas diluições foram escolhidas porque continham entre 20 e 30 leptospiiras por campo microscópico, no aumento de 200 vezes.

3.5.1 Obtenção dos *pools* de soros

Aos 21 d.p.i., os animais foram anestesiados pela via inalatória com vapores de éter etílico e sangrados assepticamente através de punção intracardiaca. Algumas gotas dos soros obtidos foram semeadas em tubos contendo meio de TSB⁷, para prova de esterilidade (37°C por 24 horas). Constatada individualmente a esterilidade dos soros, foram constituídos os *pools* com os soros por subgrupo, colhendo-se quantidades iguais dos soros individuais (0,5 mL) e obtendo-se um volume final de 3,0 mL para cada subgrupo. Os *pools* de soros foram posteriormente inativados em banho-maria a 56°C por 30 minutos. O expediente da composição dos *pools* de soros foi adotado pois o volume máximo de soro sanguíneo obtido individualmente por hamster foi insuficiente para a realização da prova.

3.5.2 Reação

Os *pools* de soros foram diluídos em escala geométrica de razão dois (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) em solução salina tamponada de Sorensen, mantendo-se uma porção não diluída dos mesmos. Para cada uma das diluições foram efetuadas cinco repetições em tubos com tampa de baquelite contendo 2,50 mL de meio líquido de EMJH modificado (ALVES, 1995), 200 µL da diluição de soro a ser testado e 100

⁷ Tryptic Soy Broth (DIFCO – Detroit, EUA)

μ L de cultura viva de uma das variantes sorológicas de leptospira com 4 a 14 dias de cultivo em meio de EMJH modificado (ALVES, 1995). Portanto, cada *pool* de soro foi testado apenas com uma das quatro variantes sorológicas (hardjo, wolffi, guaricura ou pomona), o que garantiu a individualidade dos resultados obtidos e possibilitou a sua comparação com testes estatísticos que exigem populações independentes. Os tubos foram incubados em estufa a 28-30°C por dez dias.

3.5.3 Leitura e interpretação

Ao décimo dia do ensaio foram realizadas as leituras macroscópicas dos tubos, considerando-se a presença de turvação característica como crescimento positivo, confirmado pelo exame ao microscópio óptico de campo escuro para a constatação de leptospiras em cada uma das diluições positivas.

Foi empregada uma escala para leitura ao exame microscópico, considerando-se ausência de crescimento (-) e presença de algumas leptospiras (1+) como negativo, portanto havendo inibição de crescimento; e presença de muitas leptospiras (2+ e 3+) como positivo, ou seja, sem inibição de crescimento.

A diluição de soro que foi capaz de inibir o crescimento das leptospiras em 50% dos tubos trabalhados foi calculada pelo método de Reed & Muench (MANCUSO, 1974).

3.6 CONTROLE DAS VARIANTES SOROLÓGICAS Hardjo, Wolffí E Guaricura, NÃO INATIVADAS

Dezoito hamsters (ANEXO 2, Fig. 2) foram divididos em três grupos com seis animais. Cada grupo foi inoculado intraperitonealmente com 200 µL de culturas vivas de leptospiros diluídas em solução salina tamponada de Sorensen (as mesmas utilizadas no teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro*). Os animais do primeiro grupo receberam diluição 10^{-2} de *Leptospira interrogans* vs hardjo (estirpe Hardjoprajitno); do segundo grupo, diluição 10^{-2} de *Leptospira interrogans* vs wolffi (estirpe 3705); e do terceiro grupo, diluição 10^{-1} de *Leptospira santarosai* vs guaricura (estirpe M-04).

Aos 21 d.p.i., os animais foram sacrificados pela inalação de vapores de éter etílico e necropsiados para colheita dos rins. Os rins, assepticamente colhidos, foram macerados e foram preparadas suspensões do tecido em solução salina tamponada de Sorensen para obtenção da diluição 10^{-1} , a partir da qual foram efetuadas duas diluições seriadas em escala geométrica de razão dez (10^{-2} e 10^{-3}). Foram semeados 100 µL por diluição em dois tubos com tampa de baquelite contendo 5,0 mL de meio semi-sólido de Fletcher, que foram incubados por seis semanas em estufa a 28-30°C, e observados semanalmente para verificar formação da zona de Dinger nos tubos, posteriormente confirmada pela visualização de leptospiros no exame em microscopia de campo escuro.

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos no teste de potência de vacinas foram analisados conforme o preconizado pelo Ministério da Agricultura dos EUA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977).

As comparações das médias geométricas dos títulos de aglutininas antileptospiras (SAM) nos *pools* de soros dos hamsters vacinados foram realizadas empregando-se o programa SPSS 10.07 for Windows. Os resultados foram triados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney U.

Os intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras nos *pools* de soros dos hamsters, obtidos no teste de crescimento de leptospiras *in vitro*, foram calculados conforme PIZZI (1950).

As comparações do número de portadores renais para a variante sorológica pomona, segundo o tipo de vacina, foram realizadas utilizando-se o teste de Fisher do programa GRAPHPAD INSTAT 3.01 for Windows 95/NT.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DO TESTE DE POTÊNCIA DE VACINAS E DA TITULAÇÃO DO INÓCULO INFECTANTE DE DESAFIO COM A VARIANTE SOROLÓGICA Pomona

Na Tab. 1, os resultados observados referem-se à proporção de hamsters mortos por leptospirose segundo o tipo de tratamento. No grupo controle do inóculo infectante de desafio houve sete mortes por leptospirose em dez animais (7/10), enquanto nos grupos vacinados, as proporções foram de 1/10, 0/10 e 3/10, respectivamente para as bacterinas A, B e C.

Na Tab. 2, é apresentada a titulação do inóculo do desafio efetuado com a variante sorológica pomona, onde se observa a diluição 10^{-3} para DL50. Como a diluição utilizada para desafio foi a 10^{-1} , constata-se que o número de doses letais efetivamente empregadas foi 100.

Tabela 1 - Proporção de hamsters mortos por leptospirose, segundo o tipo de tratamento adotado – São Paulo – 2001

TIPO DE TRATAMENTO	P
Controle negativo	0/10
Controle do inóculo infectante de desafio ^a	7/10
Bacterina A	1/10
Bacterina B	0/10
Bacterina C	3/10

P: número de mortes por leptospirose por número de animais inoculados

Controle negativo: animais não vacinados e não desafiados

^a: animais não vacinados e desafiados com vs pomona

Bacterina A: bacterina bivalente vs hardjo + vs pomona

Bacterina B: bacterina bivalente vs wolffi + vs pomona

Bacterina C: bacterina bivalente vs guaricura + vs pomona

Tabela 2 - Número de hamsters desafiados com a variante sorológica pomona, ao término do período de observação de 21 dias, segundo a diluição do inóculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL50 de acordo com o método de Reed & Muench – São Paulo – 2001

D	S	M	FREQUÊNCIAS ACUMULADAS			c / (b + c)
			S (b)	M (c)	TOTAL (b + c)	(% cumulativa de mortes)
10^{-1}	0	5	0	13	13	13/13 (100%)
10^{-2}	0	5	0	8	8	8/8 (100%)
10^{-3}	3	2	3	3	6	3/6 (50%)
10^{-4}	4	1	7	1	8	1/8 (12,5%)
10^{-5}	5	0	12	0	12	0/12 (0%)

D: diluição do inóculo infectante de desafio com vs pomona

S: número de animais sobreviventes à infecção por leptospiras

M: número de mortes ocorridas em decorrência de leptospirose

4.2 RESULTADOS DA PESQUISA DE ANTICORPOS AGLUTINANTES E NEUTRALIZANTES PARA AS VARIANTES SOROLÓGICAS Hardjo, Wolffi, Guaricura E Pomona, NOS POOLS DE SOROS DOS HAMSTERS VACINADOS

Na Tab. 3, são observados os intervalos de confiança (95%) das médias geométricas dos títulos de aglutininas antileptospiras dos *pools* de soro dos hamsters vacinados, segundo o tipo de vacina e a variante sorológica reatora na microtécnica de soroaglutinação microscópica (SAM). Houve diferença significativa entre as três bacterinas bivalentes na indução de resposta de aglutininas contra os sorovares hardjo e wolffi (KRUSKAL-WALLIS: $p=0,038$ e $p=0,021$, respectivamente); entre as bacterinas A e C na indução de resposta de aglutininas contra o sorovar guaricura (MANN-WHITNEY U: $p=0,025$), e entre as bacterinas B e C contra os sorovares hardjo e wolffi (MANN-WHITNEY U: $p=0,008$ e $p=0,013$, respectivamente). Não houve diferença significativa entre as bacterinas A e B na indução de resposta de aglutininas contra os sorovares hardjo e wolffi (MANN-WHITNEY U: $p=0,435$ e $p=0,064$, respectivamente), e entre as bacterinas B e C contra o sorovar guaricura (MANN-WHITNEY U: $p=0,222$).

Na Tab. 4, são apresentadas as médias geométricas e desvios padrões dos títulos de anticorpos neutralizantes dos *pools* de soro dos hamsters vacinados expressos segundo o tipo de vacina e a variante sorológica reatora. A comparação desses intervalos, bem como o desempenho das bacterinas em relação a cada uma das variantes sorológicas, são apresentadas no Gráf. 1.

Tabela 3 - Intervalos de confiança (95%) dos títulos de aglutininas antileptospiras pós-vacinais dos *pools* de soros de hamsters, expressos em valores logarítmicos de base dez, segundo o tipo de vacina utilizado e a variante sorológica reatora empregada na reação de SAM – São Paulo – 2001

TIPO DE VACINA	VARIANTE SOROLÓGICA REATORA - SAM			
	hardjo	wolffi	guaricura	pomona
Bacterina A	1,636 ± 1,486	0,668 ± 1,157	0 ± 0	0,668 ± 1,157
Bacterina B	2,603 ± 0	2,229 ± 0,287	1,077 ± 1,249	0,501 ± 1,002
Bacterina C	0 ± 0	0 ± 0	2,154 ± 0,173	0 ± 0

Intervalo de confiança = média ± desvio padrão

SAM: soroaglutinação microscópica

Bacterina A: bacterina bivalente vs hardjo + vs pomona

Bacterina B: bacterina bivalente vs wolffi + vs pomona

Bacterina C: bacterina bivalente vs guaricura + vs pomona

Tabela 4 - Intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes em *pools* de soros de hamsters, expressos em valores logarítmicos de base dois, segundo o tipo de vacina adotado e a variante sorológica reatora empregada no teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* – São Paulo – 2001

TIPO DE VACINA	VARIANTE SOROLÓGICA REATORA			
	hardjo	wolffi	guaricura	pomona
Bacterina A	0 ± 0	0,833 ± 0,763	0 ± 0	0,625 ± 0,616
Bacterina B	2,692 ± 0,786	1,500 ± 0,551	1,218 ± 1,044	0,625 ± 0,616
Bacterina C	0,500 ± 0,551	0,500 ± 0,551	1,577 ± 1,119	0 ± 0,476

Intervalo de confiança = média ± desvio padrão

Bacterina A: bacterina bivalente vs hardjo + vs pomona

Bacterina B: bacterina bivalente vs wolffi + vs pomona

Bacterina C: bacterina bivalente vs guaricura + vs pomona

Gráfico 1 - Médias geométricas e intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes, expressos em valores antilogarítmicos de base dez, dos *pools* de soros dos hamsters vacinados, segundo o tipo de vacina adotado e a variante sorológica reatora do Sorogrupo Sejroe empregada no teste de inibição do crescimento de leptospiros *in vitro* – São Paulo – 2001

Bacterina A: bacterina bivalente sv hardjo + sv pomona

Bacterina B: bacterina bivalente sv wolffi + sv pomona

Bacterina C: bacterina bivalente sv guaricura + sv pomona

Gráfico 2 - Médias geométricas e intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes, expressos em valores antilogarítmicos de base dez, dos *pools* de soros dos hamsters vacinados, segundo o tipo de vacina adotado e a variante sorológica pomona empregada como antígeno no teste de inibição do crescimento de leptospiros *in vitro* – São Paulo – 2001

Bacterina A: bacterina bivalente sv hardjo + sv pomona

Bacterina B: bacterina bivalente sv wolffi + sv pomona

Bacterina C: bacterina bivalente sv guaricura + sv pomona

4.3 RESULTADOS DA PESQUISA DO ESTADO DE PORTADOR RENAL NOS ANIMAIS VACINADOS E SOBREVIVENTES À LEPTOSPIROSE APÓS O DESAFIO COM O SOROVAR Pomona

Na Tab. 5, são observadas as proporções de hamsters vacinados que sobreviveram à leptospirose, mas que apresentaram estado de portador renal, confirmado pelo isolamento de leptospiras nos cultivos de tecido renal. São observadas as proporções de 2/9, 1/10 e 2/7 respectivamente para as bacterinas A, B e C. Houve diferença significativa do número de portadores renais entre os animais sobreviventes ao desafio vacinados com as bacterinas A ou B e os animais controles não vacinados (FISHER: $p < 0,0455$), mas a diferença entre o número de portadores renais entre os sobreviventes vacinados com a bacterina C e o grupo controle foi destituída de significância estatística (FISHER: $p = 0,1667$).

4.3.1 RESULTADOS DA EVOLUÇÃO DO GRUPO CONTROLE DE ANIMAIS INOCULADOS COM OS SOROVARES Hardjo, Wolffii E Guaricura, NÃO INATIVADOS

Na Tab. 6, os hamsters controles não vacinados não apresentaram infecção renal por leptospiras pelas variantes sorológicas hardjo e wolffii, porém foram encontrados seis portadores renais para a variante sorológica guaricura.

Tabela 5 - Proporção de hamsters vacinados e sobreviventes ao desafio com a variante sorológica pomona, caracterizados como portadores renais de leptospiras, aos 21 dias pós-infecção, segundo o tipo de tratamento adotado – São Paulo – 2001

TIPO DE TRATAMENTO	P
Controle negativo	0/10
Controle do inóculo infectante de desafio^a	3/3
Bacterina A	2/9
Bacterina B	1/10
Bacterina C	2/7

P: número de portadores renais por número de animais sobreviventes ao desafio

Controle negativo: animais não vacinados e não desafiados

^a: animais não vacinados e desafiados com vs pomona

Bacterina A: bacterina bivalente vs hardjo + vs pomona

Bacterina B: bacterina bivalente vs wolffi + vs pomona

Bacterina C: bacterina bivalente vs guaricura + vs pomona

Tabela 6 - Proporção de hamsters não vacinados e inoculados com culturas não inativadas de leptospiras que apresentaram estado de portador renal, segundo a variante sorológica inoculada – São Paulo – 2001

VARIANTE SOROLÓGICA INOCULADA	P
hardjo ^d	0/6
wolffi ^e	0/6
guaricura ^f	6/6

P: proporção de portadores renais por animais inoculados

^d: cultura não inativada de *L. interrogans* vs hardjo

^e: cultura não inativada de *L. interrogans* vs wolffi

^f: cultura não inativada de *L. santarosai* vs guaricura

5 DISCUSSÃO

5.1 Teste de potência de vacinas

No teste de potência de vacinas empregado para avaliar a proteção conferida pelas bacterinas utilizadas, só foi efetuado o desafio com a variante sorológica pomona, por ser a única estirpe com patogenicidade regular para hamsters disponível no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP. Como as condições de cultivo, preparo das bacterinas e esquema de imunização com as demais variantes sorológicas foram idênticas às adotadas com a vs pomona, foi admitido que os resultados obtidos com esta variante sorológica poderiam ser extrapolados para as variantes sorológicas hardjo, wolffi e guaricura.

O teste de potência de vacina antileptospira, em hamsters, descrito pelo Ministério da Agricultura dos EUA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977) preconiza o emprego de uma dose de vacina equivalente a 1/800 da dose recomendada para bovinos, injetando-se o volume de 0,25 mL da bacterina pela via subcutânea no abdômen (se a recomendação for apenas pela via subcutânea ou pelas vias intramuscular e subcutânea) ou intramuscularmente na região caudal da coxa (se a recomendação for apenas pela via intramuscular). O desafio é efetuado aos 14-18 dias pós-vacinação, injetando-se um volume de 0,20 mL pela via intraperitoneal, e os animais são mantidos em observação por mais 14 dias.

No entanto, no presente trabalho, a partir de resultados obtidos em ensaios pilotos, o esquema empregado consistiu em duas doses de 1,0 mL de vacina não diluída pela via subcutânea no abdômen, com intervalo de dez dias, o inóculo de desafio foi efetuado após dez dias da segunda dose de vacina, pela via e volume recomendados (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977), e os animais foram observados por mais 21 dias.

O teste de potência de vacina antileptospira preconizado pelo Ministério da Agricultura dos EUA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977) considera a vacina aprovada quando a proporção de mortes por leptospirose, com inóculo de desafio, contendo entre 10 e 1000 DL50, no grupo controle não vacinado for igual ou superior a 8/10 e, no grupo vacinado, essa proporção não deve ser superior a 2/10 ou 5/20.

Na titulação do inóculo de desafio (Tab. 2), observou-se o título de 1000 como sendo o valor da DL50 do inóculo infectante da *vs pomona*. Como a diluição de desafio inoculada nos hamsters foi 10^{-1} , o número de doses letais efetivamente empregadas foi 100, encontrando-se dentro dos parâmetros exigidos de 10 a 1000 DL50.

Na Tab. 1, a proporção de animais mortos por leptospirose no grupo controle não vacinado e inoculado com *vs pomona* foi de 7/10, portanto faltando um indivíduo para atingir o valor recomendado. Contudo, apesar de não ter sido atingida a proporção de mortes desejada, o resultado foi considerado satisfatório, pois os três animais sobreviventes aos 21 dias pós-desafio apresentaram, à necropsia, sinais

característicos de leptospirose, quais sejam icterícia, lesões hemorrágicas pontuais no fígado e pulmões, congestão e aumento de volume renais, e colonização renal por leptospiras (Tab. 5).

As proporções de mortes ocorridas nos grupos vacinados (Tab. 1) com as bacterinas A (1/10) e B (0/10) estão dentro dos parâmetros exigidos e, portanto, as mesmas foram aprovadas segundo os critérios preconizados, mas para a bacterina C, apesar da proporção de mortes no grupo vacinado ter sido 3/10, e portanto ter ocorrido um óbito além do permitido, esse resultado ainda poderia ser considerado válido se, ao serem vacinados e desafiados outros dez animais, fosse atingida a proporção máxima de 5/20.

5.2 Pesquisa de aglutininas ANTILEPTOSPIRAS nos pools de soros dos hamsters vacinados

Através da microtécnica de soroaglutinação microscópica (GALTON et al., 1965), foram determinadas as médias geométricas dos títulos de aglutininas antileptospiras dos *pools* de soro dos hamsters vacinados. A bacterina B induziu resposta de aglutininas contra as variantes sorológicas hardjo e wolffi maior do que a bacterina A, mas induziu uma resposta para a variante sorológica guaricura menor do que a induzida pela bacterina C (Tab. 3). Pelas análises estatísticas realizadas, foi observada resposta cruzada de aglutininas entre hardjo e wolffi, e entre wolffi e guaricura.

O motivo da bacterina A ter induzido uma resposta de aglutininas para a variante sorológica hardjo menor do que a induzida pela bacterina B pode ser explicado pelo pobre poder imunogênico da estirpe dessa variante sorológica empregada no presente trabalho (BOLIN et al., 1989b; BOLIN et al., 1991), evidenciado pelos baixos títulos de anticorpos aglutinantes (SIDDIQUE e SHAH, 1990) em relação às outras variantes sorológicas. De fato, BOLIN et al. (1991) referem que o aumento da massa antigênica da estirpe Hardjoprajtino em uma vacina pode aumentar a antigenicidade e, conseqüentemente, a proteção conferida pela mesma.

5.3 PESQUISA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES NOS POOLS DE SOROS DOS HAMSTERS VACINADOS

Os intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes (Tab. 4) indicam que a bacterina A ofereceu proteção apenas contra a variante sorológica wolffi, e não ofereceu contra a variante sorológica homóloga correspondente hardjo; as bacterinas B e C induziram resposta de anticorpos neutralizantes para as três variantes sorológicas do Sorogrupo Sejroe (hardjo, wolffi e guaricura) com superposição de valores nos respectivos intervalos de confiança (Gráf. 1).

Apesar da superposição de valores dos intervalos de confiança para a bacterina B ter sido menor que a da bacterina C (Gráf. 1), pode-se constatar que

ambas induziram, em hamsters, proteção cruzada para as três variantes sorológicas empregadas.

5.4 Pesquisa do estado de portador renal de leptospiras

As bacterinas A, B e C induziram expressiva proteção contra a colonização renal pela vs pomona, considerando-se que todos os animais não vacinados e inoculados com essa variante sorológica apresentaram estado de portador renal e, nos vacinados, estas proporções foram de 22,22%, 10% e 28,57%, respectivamente para as bacterinas A, B e C (Tab. 5).

Verificou-se que, nos hamsters não vacinados e infectados com as variantes sorológicas hardjo e wolffi não inativadas, não houve colonização nos rins destes animais por estas variantes sorológicas, porém, em todos os indivíduos inoculados com a variante sorológica guaricura não inativada houve confirmação do estado de portadores renais (Tab. 6). Isso pode ser explicado pelos sorovares hardjo e wolffi, utilizados neste trabalho, estarem sendo mantidos há muito tempo em subpassagens *in vitro* e, com isso, perderam a capacidade de colonização renal; enquanto que o sorovar guaricura estirpe M-04 foi isolado de campo há pouco tempo, e ainda preserva essa característica de infectividade.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e analisados, segundo a metodologia empregada, possibilitaram as seguintes conclusões:

- Houve proteção cruzada entre bacterinas formuladas com as variantes sorológicas wolffi e guaricura contra as variantes sorológicas hardjo, wolffi e guaricura.
- Houve reações aglutinantes cruzadas entre as variantes sorológicas hardjo e wolffi, e entre wolffi e guaricura.

7 REFERÊNCIAS⁸

ABUCHAIM, D. M.; DUTRA, N. L. F. Prevalência da leptospirose em bovinos da bacia leiteira de Porto Alegre, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 13, p. 55-60, 1985.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. 989 p.

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.

ANDRADE, J.; BRANDÃO, A. P. Contribuição ao conhecimento da epidemiologia da leptospirose humana, com especial referência ao Grande Rio, Brasil, no período de 1970 a 1982. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 1, p. 91-100, 1987.

BINDER, W. D.; MERMEL, L. A. Leptospirosis in an urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 16, n. 6, p. 851-856, 1998.

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

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

⁸ Conforme as diretrizes para a apresentação de dissertações e teses, 3. ed. São Paulo: FMVZ – USP, 2001. 56 p.

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**, v. 52, n. 10, p. 1639-1643, 1991.

BROUGHTON, E. S.; MARSHALL, R. B.; LITTLE, T. W. A.; HATHAWAY, S. C.; MACKINTOSH, C. G.; HELLSTROM, J. S. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* vaccines in cattle: immunogenicity of vaccines prepared from cultures grown in a protein-free medium. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 423-433, 1984.

CALDAS, E. M.; VIEGAS, E. A.; VIEGAS, S. A. R. A.; REIS, R. S. Aglutininas anti-leptospira em hemossoro de animais domésticos no Estado da Bahia, 1994/96 - II. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA**, v. 18, n. 1, p. 268-280, 1995/96.

COLEMAN, T. J. The Public Health Laboratory Service (PHLS) and its role in the control of zoonotic disease. **Acta Tropica**, v. 76, p. 71-75, 2000.

CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; GALVÃO, P. A.; AGUIAR, H. A. Estudos sobre a *Leptospira wolffii* em São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 25/27, p. 11-25, 1965/67.

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

COSTA, M. C. R.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; MARTINS, N. R. S. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 1, p. 11-17, 1998.

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

FAINE, S. ***Leptospira* and Leptospirosis**. Boca Raton: CRC, 1994. 353 p.

FAVERO, A. C. M.; MANGERONA, A. C. S.; ALESSI, L. J.; MORAIS, Z. M.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA NETO, J. S.; VASCONCELLOS, S. A. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra a leptospirose. Influência de reações pré-vacinais, homólogas e heterólogas. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 45-55, 1997.

FAVERO, A. C. M. **Estudo retrospectivo dos exames sorológicos de leptospirose realizados pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período de 1984 a 1997.** 2000. 115 f. Tese (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

GALTON, M. M.; SULZER, C. S.; SANTA ROSA, C. A.; FIELDS, M. J. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 81-85, 1965.

GIORGI, W.; TERUYA, J. M.; SILVA, A. S.; GENOVEZ, M. E. Leptospirose: resultados das soro-aglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1974/1980. **O Biológico, São Paulo**, v. 47, n. 11, p. 299-309, 1981.

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

GIRIO, R. J. S.; HERREIRA, R. C. P.; PEREIRA, F. J. G.; MATHIAS, L. A. Pesquisa de infecção por *Leptospira interrogans* em animais da região de Nhecolândia, no Pantanal do Mato Grosso do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 65, p. 87, 1998. Suplemento.

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

HEATH, S. E.; JOHNSON, R. Leptospirosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1518-1523, 1994.

LANGONI, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, p. 52-58, 1999.

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 Ciência Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1995.

MANCUSO, P. C. Titulagens: Kärber ou Reed Muench? **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 2, p. 59-71, 1974. Volume especial.

MICHNA, S. W. Leptospirosis. **Veterinary Record**, v. 86, n. 17, p. 484-496, 1970.

MOREIRA, E. C.; SILVA, J. S.; VIANA, F. C.; SANTOS, W. L. M.; ANSELMO, F. P.; LEITE, R. C. Leptospirose bovina I. Aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 31, n. 3, p. 375-388, 1979.

MOREIRA, E. C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros**. 1994. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

MYERS, D. M. **Manual de métodos, para el diagnostico de laboratorio de la leptospirosis**. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985. Nota técnica n. 30.

PIZZI, M. Sampling variation of the fifty per cent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) method. **Human Biology**, v. 22, n. 3, p. 151-190, 1950.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1265-1276, 2000.

PRESCOTT, J. Treatment of leptospirosis. **Cornell Veterinarian**, v.81, p.7-12, 1991.

RIBEIRO, S. C. A.; SILVA, P. C.; BARBOSA, F. C.; GOUVEIA, M. A. V.; OLIVEIRA, P. R.; MAMEDE, D. O. Levantamento sorológico em dois surtos de leptospirose bovina, em Uberlândia, Triângulo Mineiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 415-423, 1988.

SAMINA, I.; BRENNER, J.; MOALEM, U.; BERENSTEIN, M.; COHEN, A.; PELEB, B. A. Enhanced antibody response in cattle against *Leptospira hardjo* by intradermal vaccination. **Vaccine**, v. 15, n. 12/13, p. 1434-1436, 1997.

SANTA ROSA, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; SILVA, A. S.; TERUYA, J. M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 29/30, p. 19-27, 1969/70.

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

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

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

SULLIVAN, N. D.; CALLAN, D. P. Isolation of *Leptospira hardjo* from cows with mastitis. **Australian Veterinary Journal**, v. 46, n. 11, p. 537-539, 1970.

SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, p. 216-223, 1974.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.184, n.6, p.722-725, 1984.

TRIPATHY, D. N.; HANSON, L. E.; KRUMREY, W. A. An *in vitro* growth inhibition test for leptospiral neutralization. In: ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 1971. **Proceedings...**, v. 75, p. 138-143.

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE. **Supplemental assay method for potency assay of *Leptospira interrogans* serotype *pomona* bacterins**, 11 p., 1977. SAM608-9CFR 113.86.

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINI JUNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FAVERO, 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.; KORVER, H. Isolamento de leptospiros de búfalos (*Bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 1999. **Anais...**, v. 12, p. 36.

VENUGOPAL, K.; RATNAM, S. Preparation and standardisation of trivalent leptospiral vaccine. **Indian Veterinary Journal**, v. 68, p. 108-111, 1991.

YANAGUITA, R. M. **Contribuição ao estudo da leptospirose bovina, isolamento de dois novos sorotipos no sorogrupo Hebdomadis: sorotipos *guaicurus* e *goiano***. 1972. 71 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ZEMJANIS, R. Vaccination for reproductive efficiency in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 8, p. 689-692, 1974.

ANEXOS

ANEXO 1

Quadro 1 - Coleção de antígenos empregada na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, segundo o sorogrupo e a variante sorológica reatora – São Paulo – 2001

CÓDIGO	SOROGRUPO	VARIANTE SOROLÓGICA
1A	Australis	australis
1B	Australis	bratislava
2A	Autumnalis	autumnalis
2B	Autumnalis	butembo
3	Ballum	castellonis
4A	Bataviae	bataviae
5	Canicola	canicola
6	Celedoni	whitcombi
7	Cynopteri	cynopteri
8	Grippotyphosa	grippotyphosa
9	Hebdomadis	hebdomadis
10A	Icterohaemorrhagiae	copenhageni
10B	Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae
11	Javanica	javanica
12	Panama	panama
13A	Pomona	pomona
13B	Pomona	pomona (estirpe Fromm)
14	Pyrogenes	pyrogenes
15A	Sejroe	hardjo (estirpe Hardjoprajitno)
15B	Sejroe	wolffi (estirpe 3705)
16	Shermani	shermani
17	Tarassovi	tarassovi
18	Andamana	andamana
20	Seramanga	patoc
ST	Djasiman	sentot
...	Sejroe	guaricura (estirpe M-04)

...: sem código de identificação

FONTE: Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP – São Paulo – 2001

ANEXO 2

Figura 1 - Fluxograma experimental do teste de potência de vacinas, da titulação do inóculo infectante de desafio com a variante sorológica pomona e da pesquisa do estado de portador renal de leptospiros – São Paulo – 2001

Figura 2 - Fluxograma experimental do teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* e da pesquisa do estado de portador renal de leptospiros – São Paulo – 2001

ANEXO 3

Títulos de aglutininas antileptospiras dos *pools* de soros dos hamsters vacinados, expressos em escala de valores logarítmicos de base dez, segundo o tipo de vacina utilizado e a variante sorológica reatora empregada na reação de soroaglutinação microscópica – São Paulo – 2001

TIPO DE VACINA	POOL	VARIANTE SOROLÓGICA REATORA		
		hardjo	wolffi	guaricura
Bacterina A	<i>Pool 1</i>	0	0	0
	<i>Pool 2</i>	...	...	...
	<i>Pool 3</i>	2,004	0	0
	<i>Pool 4</i>	2,903	2,004	0
Bacterina B	<i>Pool 1</i>	2,603	2,004	0
	<i>Pool 2</i>	2,603	2,303	0
	<i>Pool 3</i>	2,603	2,603	2,303
	<i>Pool 4</i>	2,603	2,004	2,004
Bacterina C	<i>Pool 1</i>	0	0	2,303
	<i>Pool 2</i>	0	0	2,004
	<i>Pool 3</i>	0	0	2,303
	<i>Pool 4</i>	0	0	2,004

...: não determinado (quantidade insuficiente de soro)

Tabela 2 - Resultados obtidos nas leituras macro e microscópicas do teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* dos *pools* de soros dos hamsters vacinados com a bacterina A (sorovar hardjo e sorovar pomona), segundo a variante sorológica reatora empregada como antígeno e a diluição do *pool* de soro – São Paulo – 2001

VARIANTE SOROLÓGICA REATORA	POOL DE SORO	DILUIÇÃO DO POOL	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
hardjo	Pool 1	Pura	2+	2+	2+	2+	2+
		1:2	3+	3+	3+	3+	3+
		1:4	3+	3+	3+	3+	3+
		1:8	3+	3+	3+	3+	3+
		1:16	3+	3+	3+	3+	3+
wolffi	Pool 2	Pura	1+	1+	1+	NR	NR
		1:2	2+	2+	2+	1+	1+
		1:4	3+	3+	3+	3+	2+
		1:8	3+	3+	3+	3+	3+
		1:16	3+	3+	3+	3+	3+
guaricura	Pool 3	Pura	2+	2+	2+	2+	1+
		1:2	2+	2+	2+	2+	2+
		1:4	3+	3+	2+	2+	2+
		1:8	3+	3+	3+	3+	2+
		1:16	3+	3+	3+	3+	3+
pomona	Pool 4	Pura	1+	1+	-	-	-
		1:2	2+	2+	2+	2+	1+
		1:4	3+	2+	2+	2+	2+
		1:8	3+	3+	2+	2+	2+
		1:16	3+	3+	2+	2+	2+

NR: não realizado, devido quantidade insuficiente de soro

-: ausência de leptospiros (inibição de crescimento)

1+: presença de algumas leptospiros (inibição de crescimento)

2+: presença de muitas leptospiros (sem inibição de crescimento)

3+: crescimento intenso de leptospiros (sem inibição de crescimento)

Tabela 3 - Resultados obtidos nas leituras macro e microscópicas do teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* dos *pools* de soros dos hamsters vacinados com a bacterina B (sorovar wolffi e sorovar pomona), segundo a variante sorológica reatora empregada como antígeno e a diluição do *pool* de soro – São Paulo – 2001

VARIANTE SOROLÓGICA REATORA	POOL DE SORO	DILUIÇÃO DO POOL	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
hardjo	<i>Pool 1</i>	Pura	-	-	-	-	-
		1:2	3+	-	-	-	-
		1:4	1+	1+	1+	-	-
		1:8	3+	3+	2+	1+	1+
		1:16	3+	3+	3+	3+	3+
wolffi	<i>Pool 2</i>	Pura	-	-	-	-	-
		1:2	1+	1+	1+	1+	1+
		1:4	2+	2+	2+	2+	2+
		1:8	3+	3+	3+	3+	3+
		1:16	3+	3+	3+	3+	3+
guaricura	<i>Pool 3</i>	Pura	2+	1+	1+	1+	1+
		1:2	2+	2+	2+	1+	1+
		1:4	2+	2+	2+	1+	1+
		1:8	3+	2+	2+	2+	1+
		1:16	3+	3+	3+	3+	3+
pomona	<i>Pool 4</i>	Pura	1+	1+	1+	1+	1+
		1:2	3+	2+	2+	2+	1+
		1:4	3+	3+	2+	2+	2+
		1:8	3+	3+	3+	2+	2+
		1:16	3+	3+	3+	2+	2+

-: ausência de leptospiros (inibição de crescimento)

1+: presença de algumas leptospiros (inibição de crescimento)

2+: presença de muitas leptospiros (sem inibição de crescimento)

3+: crescimento intenso de leptospiros (sem inibição de crescimento)

Tabela 4 - Resultados obtidos nas leituras macro e microscópicas do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* dos *pools* de soros dos hamsters vacinados com a bacterina C (sorovar guaricura e sorovar pomona), segundo a variante sorológica reatora empregada como antígeno e a diluição do *pool* de soro – São Paulo – 2001

VARIANTE SOROLÓGICA REATORA	POOL DE SORO	DILUIÇÃO DO POOL	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
hardjo	Pool 1	Pura	-	-	-	-	-
		1:2	3+	3+	3+	3+	3+
		1:4	3+	3+	3+	3+	3+
		1:8	3+	3+	3+	3+	3+
		1:16	3+	3+	3+	3+	3+
wolffi	Pool 2	Pura	1+	1+	-	-	-
		1:2	3+	3+	3+	3+	3+
		1:4	3+	3+	3+	3+	3+
		1:8	3+	3+	3+	3+	3+
		1:16	3+	3+	3+	3+	3+
guaricura	Pool 3	Pura	2+	2+	1+	1+	1+
		1:2	2+	2+	1+	1+	1+
		1:4	2+	2+	1+	1+	1+
		1:8	3+	2+	2+	2+	1+
		1:16	3+	3+	3+	3+	2+
pomona	Pool 4	Pura	2+	2+	2+	1+	1+
		1:2	3+	3+	2+	2+	2+
		1:4	3+	3+	3+	2+	2+
		1:8	3+	3+	3+	3+	2+
		1:16	3+	3+	3+	3+	2+

-: ausência de leptospiras (inibição de crescimento)

1+: presença de algumas leptospiras (inibição de crescimento)

2+: presença de muitas leptospiras (sem inibição de crescimento)

3+: crescimento intenso de leptospiras (sem inibição de crescimento)