AMANE PALDÊS GONÇALES

**Avaliação da eficácia de bacterina antileptospirose suína:
relação entre o resultado do teste de inibição de crescimento
de leptospiras *in vitro* aplicado ao soro de suínos com o obtido
no teste de potência *in vivo* em hamsters**

SÃO PAULO

2012

AMANE PALDÊS GONÇALES

Avaliação da eficácia de bacterina antileptospirose suína: relação entre o resultado do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* aplicado ao soro de suínos com o obtido no teste de potência *in vivo* em hamsters

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos

SÃO PAULO

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2549
FMVZ

Gonçales, Amane Paldês

Avaliação da eficácia de bacterina antileptospirose suína: relação entre o resultado do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* aplicado ao soro de suínos com o obtido no teste de potência *in vivo* em hamsters / Amane Paldês Gonçalves. -- 2012.
109 p.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos.

1. Leptospirose. 2. Suínos. 3. Vacinas. 4. Imunidade ativa. 5. Teste de inibição de crescimento *in vitro*. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Emprego do limiar de anticorpos neutrolizantes em suínos para a avaliação da eficiência de bacterianas antileptospirose", protocolado sob o nº1408/2008, utilizando 110 (cento e dez) hamsters, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, 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 na reunião do dia 18 de junho de 2008.

São Paulo, 19 de junho de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GONÇALES, Amane Paldês

Título: **Avaliação da eficácia de bacterina antileptospirose suína: relação entre o resultado do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* aplicado ao soro de suínos com o obtido no teste de potência *in vivo* em hamsters**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____

*“O teu trabalho é o cântico
De tua própria vida.
Imprime nele onde estiveres
A nota azul de teu amor.
Não busques a tarefa que te cabe.
Com a tristeza do escravo.
O teu trabalho é a oficina
Em que podes forjar a tua própria luz.”*
Chico Xavier

*“- Por favor, cativa-me! – disse a raposa.
- Bem quisera – disse o príncipe – mas eu não tenho tempo.
Tenho amigos a descobrir e mundos a conhecer.
- A gente só conhece bem as coisas que cativou – disse a raposa.
- Os homens não têm tempo de conhecer coisa alguma.
Compram tudo prontinho nas lojas.
Mas como não existem lojas de amigos, os homens não têm mais amigos.
Se tu queres uma amiga, cativa-me!
- Os homens esqueceram a verdade- disse a raposa. – Mas tu não deves esquecer.
Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”*
Antoine de Saint-Exupéry
“O pequeno Príncipe”.

Procuro entre palavras aquela que gostaria que seus corações ouvissem do meu, mas nunca conseguirei expressar meu real agradecimento e a imensidão do meu amor por vocês. A vocês dedico:

Aos meus pais que me deram a Vida. Já por isso eu seria infinitamente grata, mas não se contentaram apenas em me presentear-me com ela, me deram também, amor, carinho e dedicação. Abriram as portas do meu futuro, iluminando o caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o conhecimento. Obrigado, meus pais, por toda a compreensão, dedicação e apoio, por tudo que fizeram por mim, sem que eu ao menos soubesse. Obrigado pelo sonho que realizo neste dia. E, sobretudo pela lição de amor que me ensinaram durante toda a minha vida. Saibam que eu penso em vocês todos os dias e que a distância me fortaleceu ainda mais;

Ao meu irmão, o grande responsável pelo o meu amor pela pesquisa e ingresso na pós-graduação e, a Márcia minha cunhadinha de coração. Vocês são os meus exemplos de amor e união;

À minha irmã Neni, exemplo de dedicação aos estudos e inteligência que sempre procurei seguir, por sempre estar disposta a parar sua vida para fazer o que quer que seja por mim (por todos nós). Obrigado por cuidar dos nossos pais com tanto amor e dedicação;

Aos Sons do meu coração, minha irmã Cissa e meu cunhado João, pela convivência feliz e unida durante todos esses anos, por alegrarem nosso lar com notas musicais;

Ao companheiro da minha vida, Ricardo. A suprema coragem da vida é sorrir, quando se tem vontade de chorar. Foram tantos os momentos em que tu me ajudaste a sorrir e continuar. Muito obrigada por acreditar, por sonhar comigo, por enriquecer a minha mente, enchendo-a de amor e ternura para eu prosseguir nesta jornada. Minhas vitórias e alegrias também são tuas.

Quero tanto agradecer como oferecer os resultados e dar o crédito aos esforços de tanta gente. Espero fazer destas linhas um verdadeiro espaço de agradecimentos, pois nunca caminhei sozinha.

Agradeço, de forma especial, ao meu orientador e amigo Prof. Silvio Arruda Vasconcellos. Gostaria de deixar registrado o grande prazer e privilégio de ter sido sua orientada. Digo com orgulho que isto foi muito mais que orientação: foi doação. Com o Sr. aprendi amar ainda mais o “conhecer e aprender”. Nunca vou esquecer o dia que o Sr. me chamou em sua sala e me disse: – sim eu aceito ser o seu orientador, mesmo querendo diminuir o ritmo para a tão esperada aposentadoria. Neste dia o Sr. ajudou a realizar o meu sonho, o de continuar, mas na verdade começar, a aprender sobre Leptospirose e de me tornar doutora. Agradeço por todos os momentos firmes e trêmulos em que o Sr esteve ao meu lado, transmitindo-me confiança e a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e em especial ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal na figura de seus docentes e funcionários, pelos os ensinamentos e experiências necessários para o meu crescimento intelectual, profissional e humano;

À diretoria, coordenadores e funcionários da Pós-Graduação da FMVZ, que estiveram sempre prontos a me ajudar quando requisitados;

Ao Prof. Manoel Renato Telles Badke, pelo incentivo ao trabalho científico no início da minha vida acadêmica, com quem tudo começou;

À Dra. Patrícia A. E. Abreu do Instituto Butantan, pelo conforto e amizade, pelas ajudas tão valiosas e precisas na elaboração desta pesquisa, pelo apoio ao projeto e pelos conselhos sempre muito bem colocados e oportunos, principalmente nos momentos em que parecia não haver saída;

À Dra. Ângela Silva Barbosa do Instituto Butantan, que ao longo destes anos sempre me incentivando, ouvindo minhas dúvidas e sempre tentando ajudar no que fosse preciso. Obrigado pela amizade e atenção;

À Prof. Dra. Sônia Regina Pinheiro, pelas palavras de otimismo e incentivo; pelo carinho e amizade;

À Prof. Dra. Andrea Moreno, pela disponibilização do laboratório, imprescindível no preparo da bacterina e pelos valiosos ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Fumio Hanma Ito, pela ajuda com os suínos e na revisão do abstract;

Ao Dr Paulo Lee Ho, pelo apoio e pelas discussões científicas;

Aos secretários: Danival, Virgínia, Cristina e Tânia, tão solícitos, sempre me auxiliando em tudo que foi preciso e, principalmente, pela amizade;

Aos funcionários e amigos do VPS, Bispo, Carol, Hilda, Jucélia, Paula, Pedrinho, Priscilla, Renato, Rosana, Sandra, Sheila e Washington, que sempre me ajudaram e me acolheram tão bem durante estes 7 anos;

Ao Alexandre pela ajuda com a centrifugação dos litros e mais litros de cultura, pela de dedicação e amizade;

Aos funcionários de Biblioteca da FMVZ/USP, em especial Elza Maria Faquim, a quem, com muita gratidão, devo a revisão desta Tese;

Aos funcionários do setor de transporte da FMVZ/USP; por todo o auxílio prestado;

À “Família” da Granja Ouro Preto –Ibiúna – SP, que sempre me acolheu de braços abertos que me ajudou, me incentivou com muita amizade e carinho: Sr. Luiz Soto Garcia a Sra. Maria Madalena Martins Soto e Francisco Rafael Martins Soto, e ainda a todos os funcionários: Jonas Vieira de Souza, José Inácio Pinto da Silva, Rodrigo Domingues Garcia, Valdirene Rodrigues Duarte e em especial ao Lindioberto Rodrigues Duarte (Totó), uma pessoa maravilhosa, que tem o dom para com os animais;

Aos queridos amigos do LZB, Cristina, Érica, Flávia Carolina, Giancarlo, Léia, Pancho, Vanessa, Wilsilene e a todos os estagiários que passaram pelo LZB contribuindo para a execução deste trabalho;

À Zenáide pelos ensinamentos e toda ajuda oferecida no decorrer de todos estes anos. Meu muitíssimo obrigado;

À Flávia (FAU) minha irmã de coração que mesmo à distância foi igualmente fundamental na construção e sustentação desta etapa da minha vida. “I miss you”;

À Gisele um anjo presente em todos os momentos, desde o início dessa caminhada, sempre me dando suporte e sendo companheira para tudo que foi preciso;

À Vivianne sem a qual tudo teria sido muito árduo e quem levarei em meu coração para sempre;

À Cássia por ser minha companheira de laboratório, de experimentos, de momentos difíceis, cansativos, mas principalmente dos felizes e de vitórias. Obrigado por todas as ajudas, principalmente com o inglês e por ser uma amiga tão dedicada;

Às amigas do laboratório nove do Instituto Butantan, Dani, Demetria, Denize, Lídia, Lígia, Ludmila, Tatiana e Vanessa, pelos momentos prazerosos de descontração e apoio nas horas difíceis. Denize, muito obrigado pela ajuda com as milhares de placas de Elisa;

Às amigas do laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas Adriana, Mônica, em especial à Tatiana minha amiga e incentivadora, obrigado por todos os helps e pelos maravilhosos momentos compartilhados;

À amiga Alessandra M. M. G de Castro, pela amizade e carinho, pelos momentos de convívio, aprendizado e enriquecedoras trocas de experiência;

Aos amigos conquistados durante esses 7 anos de VPS que compartilham as ansiedades e ajudam moralmente, a cada dia, nas situações mais difíceis de se enfrentar;

À família Pinho Gomez Lopez, em especial à Lucila e ao Juan pelo apoio em todos os momentos, por me acolherem como filha e por tornarem meus finais de semanas mais alegres;

A Deus, por ter guiado meus passos, aliviado minhas angústias e fortalecido minhas esperanças;

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos de doutorado (2008/53835-4) e pela bolsa de auxílio à pesquisa (2009/52925-2).

A todos que estiveram comigo nos mais anônimos dias, nas horas mais simples e mesmo assim contribuíram para a construção deste projeto. A todos aqueles que não estão comigo fisicamente, mas que levam a vida em outros cantos ou que repousam a minha saudade. A todos aqueles que indistintamente, foram meu caminho, regato de descanso, meus agradecimentos.

RESUMO

GONÇALES, A. P. **Avaliação da eficácia de bacterina antileptospirose suína: relação entre o resultado do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* aplicado ao soro de suínos com o obtido no teste de potência *in vivo* em hamsters.** [Evaluation of the efficacy of a swine antileptospiral bacterin: relationship between the results of *in vitro* leptospira growth inhibition test applied to swine sera with the ones *in vivo* potency test in hamsters]. 2012. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O controle da eficiência de bacterinas antileptospirose de uso animal é o teste de potência com desafio em hamsters, contudo, na atualidade, tem sido estimulada a busca de alternativas que dispensem o uso de animais de laboratório. O teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* (ICLIV) tem sido proposto como possível alternativa. O presente trabalho empregou os testes de ICLIV, soroaglutinação microscópica (SAM) e ELISA anti IgG para avaliar a intensidade e a duração da imunidade passiva em leitões em aleitamento e ativa em matrizes suínas e leitões desmamados imunizados com bacterina experimental antileptospirose aprovada no teste de potência em hamster. Foi produzida uma bacterina experimental antileptospirose com estirpe patogênica de *Leptospira interrogans*, sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm (LPF), padronizada para conter 10^9 leptospiras por mL e associada ao adjuvante de hidróxido de alumínio na proporção de 10% do volume da dose final. Para a avaliação da eficácia da concentração mínima de leptospiras a ser utilizada na bacterina, diluições seriadas de razão dez de cultivo de leptospiras variando de 10^5 a 10^9 leptospiras/mL, foram submetidas ao teste de potência com desafio em hamsters (Experimento A), apenas a bacterina produzida na concentração de 10^9 leptospiras/mL foi capaz de proteger os hamsters contra a infecção induzida pela estirpe LPF, quando a vacina foi testada na diluição de 1:800, critério internacional de aprovação. A bacterina na concentração de 10^9 leptospiras/mL foi submetida ao teste de potência em hamsters (Experimento B), imunizados com a vacina pura e em diluições seriadas de razão dois (200 a 25600). A bacterina foi aprovada no teste de desafio em hamster até a diluição de 1:6400. O controle do inóculo de desafio foi constituído por 100 DL₅₀. Fêmeas suínas que nunca haviam sido vacinadas contra a leptospirose e que foram não reagentes no teste de soroaglutinação microscópica aplicado a leptospirose efetuado com 24 estirpes de referência e no teste ICLIV com a estirpe LPF (Experimento 1), receberam duas aplicações intervaladas de 30 dias e um reforço aos 210 da primeira dose da bacterina pura e em diluições seriadas de razão dois (400 a 3200). Estes animais foram

monitorados com colheitas de sangue efetuadas a cada 30 dias. Os picos máximos de anticorpos avaliados pelos testes de SAM e de ICLIV foram observados aos 30 dias da segunda aplicação da vacina, com maior magnitude para a vacina pura, contudo aos 120 dias da segunda aplicação da vacina houve um declínio acentuado nos níveis de anticorpos. Para encontrar um melhor intervalo entre as imunizações (Experimento 2), fêmeas suínas receberam duas aplicações da bactéria pura intervaladas de 30 dias e o reforço aos 150 da primeira dose. A redução do intervalo de revacinação após as duas doses iniciais determinou a persistência dos títulos de aglutininas e de anticorpos neutralizantes com níveis sempre superiores a 0,4 log. Nos leitões em aleitamento filhos das matrizes imunizadas com bactéria na concentração de 10^9 leptospiras/mL foi constatada a transferência de imunidade passiva, confirmada pelos títulos de anticorpos aglutinantes detectáveis no quinto dia de vida e de neutralizantes no quinto e décimo dia de vida. Nos ensaios realizados em leitões desmamados imunizados com uma série de diluições de razão dez variando de a 10^9 leptospiras/mL os picos máximos de anticorpos foram observados aos 30 dias da segunda imunização, com maior magnitude para a bactéria testada na concentração de 10^9 leptospiras/mL. Os parâmetros finalmente obtidos foram que matrizes suínas e leitões desmamados, primovacinados com duas aplicações intervaladas de 30 dias da bactéria aprovada no teste de potência com desafio em hamster, apresentaram no teste de ICLIV efetuado aos 60 dias da primovacinação, intervalos de títulos de anticorpos (95%) expressos em log variando, respectivamente de (0,87 a 1,35) e de (1,22 a 1,58). Os valores máximos (12.800) para o teste de ELISA anti IgG das matrizes suínas foram obtidos após o reforço efetuado aos 210 dias.

Palavras-chave: Leptospirose, Suínos, Vacinas, Imunidade ativa, Teste de inibição de crescimento *in vitro*.

ABSTRACT

GONÇALES, A. P. **Evaluation of the efficacy of a swine antileptospirosis bacterin: relationship between the results of *in vitro* leptospiral growth inhibition test applied to swine sera with the ones *in vivo* potency test in hamsters.** [Avaliação da eficácia de bacterina antileptospirose suína: relação entre o resultado do teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* aplicado ao soro de suínos com o obtido no teste de potência *in vivo* em hamsters]. 2012. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The potency of antileptospirosis bacterins is controlled by *in vivo* experimental assay performed in hamsters; however, nowadays the search for *in vitro* methodologies that could replace the use of laboratory animals has been stimulated. For this purpose, the *In vitro* leptospiral growth inhibition test (IVLGIT) has been proposed as an alternative test. In this work, the intensity and duration of the passive immunity in suckling piglets and active immunity in weaned piglets and adult sows were evaluated, after vaccination with an experimental leptospirosis bacterin, which had been approved previously on the potency test in hamsters. The *in vitro* tests applied to swine sera were the growth inhibition test (IVLGIT), microscopic agglutination (MAT) and anti-IgG ELISA. The bacterin was produced with a pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki strain identified as Pomona Fromm (LPF), and added with aluminum hydroxide as adjuvant at a concentration of 10% of the final volume dose. In order to evaluate the efficacy of the minimum concentration of the leptospires to be used in the bacterin, ten-fold serial dilutions of a culture of leptospira varying from 10^5 to 10^9 leptospires/mL were submitted to potency-challenge test in hamsters (Trial A). Only the bacterin produced at the concentration of 10^9 leptospires/mL protected the hamsters against the infection by LPF strain, when the vaccine was tested at the dilution of 1:800, which is the international criterion for the approval. The bacterin at the concentration of 10^9 leptospires/mL was submitted to the potency test in hamsters (Trial B), which had been immunized with an undiluted and with two-fold serially diluted bacterin (from 1:200 to 1:25,600). In the challenge test in hamsters, the bacterin has passed till the dilution of 1:6,400. The control of the challenge inoculum presented a titer of 100 LD₅₀. Adult sows, never been vaccinated against leptospirosis, and that showed negative MAT results using 24 reference serovars and with negative IVLGIT with the LPF strain (Trial 1) had administered two doses of bacterin with 30 day interval and a booster dose at 210th day after the first application of the undiluted bacterin and the two-fold diluted ones (1:400 to 1:3,200). The animals were

monitored with bleeding performed each 30 days. The levels of antibodies evaluated by MAT and IVLGIT showed the maximum peak at the 30th day after the second vaccination of the bacterin, with high magnitude found with the undiluted bacterin, however, at the 120th day after the second vaccination there were found a marked decline in antibodies levels. To find a better immunization scheme (Trial 2), the sows received two doses of undiluted bacterin with 30 day interval and the booster dose at the 150th day after the first dose. The reduction on the interval of revaccination after the two initial doses determined the persistence of a higher levels agglutinins and neutralizing antibodies with titers ≥ 0.4 log. In suckling piglets born from sows immunized with the bacterin at the concentration of 10^9 leptospires/mL, the passive transference of antibodies was confirmed by MAT titers detected on the fifth day, and by IVLGIT titers, at the fifth and tenth days after birth. In the study of weaned piglets immunized with the bacterin at the concentrations of 10^6 , 10^7 , 10^8 and 10^9 leptospires/mL (Trial 3), the highest antibodies levels were observed at the 30th day after the second immunization, with greater magnitude for the bacterin tested at the concentration of 10^9 leptospires/mL. The final results indicate that sows and weaned piglets, primo-vaccinated and revaccinated with 30 day interval with bacterin that had passed in the potency-challenge test in hamsters, presented the IVLGIT results varying (95% CI) from 0.87 log to 1.35 log for sows and 1.22 to 1.58 log for weaned piglets, at the 60th day after the first vaccination. In adult sows the highest anti-IgG ELISA titer reached 12,800, obtained after the booster vaccine dose performed at 210th day from the first vaccination.

Keywords: Leptospirosis, Swine, Bacterin, Vaccine, Active immunity, *In vitro* growth inhibition test.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Média geométrica dos títulos de aglutininas antileptospiras (log), reação de SAM efetuada com o antígeno LPF em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012.....	69
Gráfico 2-	Média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes (log), para o teste de inibição de crescimento de leptospiras in vitro para o antígeno LPF em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012.....	70
Gráfico 3-	Valores médios das densidades ópticas obtidas para as diluições dos soros de matrizes suínas imunizadas com a bacterina pura no teste de ELISA IgG contra a bacterina experimental, - São Paulo – 2012.....	72
Gráfico 4-	Títulos dos soros de matrizes suínas imunizadas com a bacterina pura obtidos por ELISA IgG contra a bacterina experimental. As médias dos títulos foram calculadas a partir da média dos valores da maior diluição do soro capaz de resultar em uma leitura de absorbância igual a 0,1 - São Paulo - 2012.....	73
Gráfico 5-	Média geométrica dos títulos de aglutininas antileptospiras (log), reação de SAM efetuada com o antígeno LPF em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012.....	74
Gráfico 6-	Média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes (log), para o teste de inibição de crescimento de leptospiras in vitro para o antígeno LPF em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012.....	75
Gráfico 7-	Média geométrica dos títulos de aglutininas antileptospiras (log), reação de SAM efetuada com a estirpe LPF em soros de leitões segundo as concentrações de 10 ⁵ , 10 ⁶ , 10 ⁷ , 10 ⁸ e 10 ⁹ leptospiras/mL da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012.....	77

Gráfico 8-	Média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes (log), para o teste de inibição de crescimento de leptospiros <i>in vitro</i> com a estirpe LPF em soros de leitões segundo as concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiros/mL da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012.....	78
Gráfico 9-	Média geométrica dos títulos de aglutininas antileptospiros (log), reação de SAM efetuada com a estirpe LPF em soros de leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina pura, segundo a idade dos animais expressa em dias – São Paulo – 2012.....	79
Gráfico 10-	Média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes (log), para o teste de inibição de crescimento de leptospiros <i>in vitro</i> com a estirpe LPF em soros de leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina pura, segundo a idade dos animais expressa em dias – São Paulo – 2012.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Número de hamsters desafiados com a estirpe LPF, ao término de observação de 21 dias, segundo a diluição do inóculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL ₅₀ de acordo com o método de Reed e Muench – São Paulo - 2012.....	61
Tabela 2-	Número de hamsters desafiados com a estirpe LPF, ao término de observação de 21 dias, segundo a diluição do inóculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL ₅₀ de acordo com o método de Reed e Muench – São Paulo – 2012.....	62
Tabela 3-	Hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina experimental nas concentrações de 10 ⁵ , 10 ⁶ , 10 ⁷ , 10 ⁸ e 10 ⁹ leptospiras/ mL, sobreviventes ao desafio com a estirpe LPF segundo a proporção de sobreviventes ao desafio e os resultados dos ensaios efetuados para investigar a condição de portador renal de leptospiras – São Paulo – 2012.....	63
Tabela 4-	Hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina experimental (10 ⁹ leptospiras/mL) pura e suas diluições, sobreviventes ao desafio com a estirpe LPF, segundo a diluição da bacterina empregada, proporção de sobreviventes ao desafio e os resultados dos ensaios efetuados para investigar a condição de portador renal de leptospiras – São Paulo – 2012.....	65
Tabela 5-	Análise da porcentagem de sobrevivência dos grupos de hamsters imunizados com bacterina experimental antileptospirose nas concentrações de 10 ⁵ , 10 ⁶ , 10 ⁷ , 10 ⁸ e 10 ⁹ e desafiados com 631 DL ₅₀ de <i>L. interrogans</i> estirpe LPF ao longo de 21 dias de observação – São Paulo – 2012.....	66
Tabela 6-	Análise da porcentagem de sobrevivência dos grupos de hamsters imunizados com bacterina experimental antileptospirose (10 ⁹ leptospiras/mL) pura e suas diluições e desafiados com 100 DL ₅₀ de <i>L. interrogans</i> estirpe LPF ao longo de 21 dias de observação – São Paulo – 2012.....	67
Tabela 7-	Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para a estirpe LPF, em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada - São Paulo – 2012.....	71

Tabela 8-	Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para a estirpe LPF, em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada - São Paulo - 2012.....	76
Tabela 9-	Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para a estirpe LPF, em soros de leitões segundo as concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiras/mL da bacterina antileptospirose empregada - São Paulo - 2012.....	76
Tabela 10-	Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para a estirpe LPF, em soros de leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina antileptospirose pura - São Paulo - 2012.....	81

FIGURA

Figura 1- Gel de agarose a 1,5%. Visualização de banda de 330pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostra de suspensão de tecido renal de animais sobreviventes ao desafio com a estirpe LPF – São Paulo - 2012..... 68

LISTA DE ABREVIATURAS

%	- porcentagem
°C	- graus Celsius
µg	- micrograma
µl	- microlitro
µmol	- micromol
AL(OH) ₃	- hidróxido de alumínio
BSA	- soroalbuminabovina
CFR	- Code of Federal Regulation
CO ₂	- gás carbônico
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DL ₅₀	- dose letal para 50% dos animais
DNA	- ácido desoxiribonucleico
dNTP	- desoxirribonucleotídeo trifosfatado
d.p.i	- dias pós-infecção
EDTA	- ácido dietilenodiaminotetracético
EMJH	- Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris
EUA	- Estados Unidos da América
FMVZ	- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g	- gravidade
g	- grama
IC	- intervalo de confiança
ICLIV	- teste de inibição de crescimento de leptospiros <i>in vitro</i>
IgG	- imunoglobulina G
IgM	- imunoglobulina M
IP	- via intraperitoneal
kDa	- kilodalton
kg	- kilograma
kV	- kilovolts
<i>L.</i>	- gênero <i>Leptospira</i>
LPF	- <i>Leptospira interrogans</i> sorogrupo Pomona sorovar Kennewicki
LPS	-lipopolissacarídeo
M	- molar
M	- metanol
mg	- miligrama
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
mL	- mililitro
mM	- milimolar
MPLA	- monofosforilipídio A
M _r	- massa molecular relativa

NaCl	- cloreto de sódio
N	- normalidade
nm	- nanômetros
nmol	- nanomol
pH	- potencial hidrogênico
PBS	- salina salina fosfatada tamponada
PCR	- Reação da polimerase em cadeia
p/v	- peso/volume
SAM	- soroaglutinação microscópica
SP	- São Paulo
TBE	- solução tampão tris-borato
TSB	-Tryptic Soy Broth
USP	- Universidade de São Paulo
v	- volume
V	- volts
W	- água
w	- peso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	33
2	OBJETIVOS.....	45
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1	LOCAL.....	47
3.2	PREPARAÇÃO DA BACTERINA.....	48
3.3	HAMSTERS.....	49
3.3.1	Teste de potência da bacterina com desafio em hamsters.....	49
3.3.1.1	Estabelecimento da concentração de leptospiras da bacterina experimental – Experimento A.....	49
3.3.1.2	Avaliação da eficácia da bacterina na concentração de 10^9 leptospiras/mL e suas diluições – Experimento B.....	50
3.3.1.3	Preparação do inóculo de desafio.....	51
3.3.1.4	Titulação do inóculo infectante de desafio.....	51
3.3.1.5	Isolamento de leptospiras para o controle de infecção renal.....	51
3.3.1.6	Pesquisa do DNA de leptospiras pela técnica de PCR aplicada a suspensões de tecido renal.....	52
3.4	SUÍNOS	53
3.4.1	Avaliação da imunidade induzida pela bacterina experimental em suínos	54
3.4.1.1	Avaliação da imunidade ativa em matrizes suínas adultas – Experimento 1 (APÊNDICE B).....	54
3.4.1.2	Avaliação da imunidade ativa em matrizes suínas adultas – Experimento 2.	54
3.4.1.3	Avaliação da imunidade ativa em leitões desmamados – Experimento 3.....	55

3.4.1.4	Avaliação da imunidade passiva em leitões em aleitamento – Experimento 4.....	55
3.4.1.5	Cronograma para colheitas de sangue.....	55
3.4.2	Teste de inibição de crescimento de leptospiros <i>in vitro</i> com a estirpe LPF.....	56
3.4.2.1	Reação.....	56
3.4.2.2	Leitura e interpretação.....	57
3.4.3	Teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos.....	25
3.4.4	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) dos níveis de IgG séricos nas matrizes suínas imunizadas com a bacterina pura.....	58
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4	RESULTADOS.....	61
4.1	CÁLCULO DO NÚMERO DE DOSES INFECTANTES EFETIVAMENTE EMPREGADAS NO DESAFIO EM HAMSTERS.....	61
4.2	RESULTADOS DO TESTE DE POTÊNCIA DA VACINA ANTILEPTOSPIROSE EM HAMSTERS.....	63
4.3	TÍTULOS DE ANTICORPOS AGLUTINANTES E INIBIDORES DO CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS IN VITRO EM MATRIZES SUÍNAS.....	68
4.3.1	Avaliação da imunidade ativa em matrizes suínas adultas – Experimento 1.....	69
4.3.2	Avaliação da imunidade ativa em matrizes suínas adultas – Experimento 2.....	73
4.3.3	Avaliação da imunidade ativa em leitões desmamados – Experimento 3.....	76

4.3.4	Avaliação da imunidade passiva em leitões em aleitamento – Experimento 4.....	78
5	DISCUSSÃO.....	83
6	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICES.....	103

1 INTRODUÇÃO

A carne suína, na atualidade, a mais produzida e consumida no mundo, responde por cerca de 50% do consumo global de carnes. No ano de 2010, no Brasil, a produção de carne suína apresentou um crescimento médio de 1,5 % em relação a 2009, passando de 3,19 para 3,24 milhões de toneladas (ABIEPCS, 2011).

Em função da abertura de alguns mercados internacionais a suinocultura brasileira tem aumentado o nível tecnológico de produção e isto tem determinado o incremento de pesquisas relacionadas à interação entre: nutrição, profilaxia, higiene, genética, manejo e bem estar animal. Os animais passaram a ser criados de forma intensiva, os rebanhos aumentaram e isto determinou uma maior predisposição à instalação e disseminação de doenças cuja transmissão é favorecida pela aglomeração de um grande contingente de animais. Dentre tais doenças, as que comprometem a esfera reprodutiva assumem uma grande relevância, pois são responsáveis por elevados prejuízos econômicos.

A ocorrência de doenças em rebanhos de suínos diminui a lucratividade da atividade, pois ocasiona despesas adicionais e reduz o desempenho dos animais de reprodução e de engorda. Além disso, a presença de determinados patógenos pode ter um importante significado em termos de saúde pública (SESTI; SOBESTIANSKY, 1999).

Dentre as doenças infecciosas que afetam a sanidade do rebanho suíno e comprometem o desempenho reprodutivo dos plantéis, a leptospirose é uma das mais importantes (OLIVEIRA, 1985; SOBESTIANSKY et al., 1999).

A leptospirose causada por bactérias, da ordem Spirochaetales família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* (NOGUCHI 1917) é uma doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem (CORTES, 1993; COLEMEN, 2000) que pode apresentar curso de agudo a crônico (HAAKE, 2000).

As leptospirosas, bactérias móveis, aeróbias, com 0,1 a 0,2 µm de diâmetro por seis a 20 µm de comprimento, espiraladas com curvatura em forma de gancho em uma ou nas duas extremidades (MYERS, 1985), são altamente sensíveis a ambientes secos, pH ácido e temperaturas extremas (FAINE et al., 1999).

A organização e a constituição da estrutura celular das espiroquetas são muito semelhantes à apresentada pelas bactérias gram-negativas. A membrana externa das leptospirosas contém diversas lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS) (KOIZUMI; WATANABE 2004). O LPS das leptospirosas difere do encontrado nas enterobactérias, pois

apresenta uma alteração na composição do lipídio A, que resulta em uma atividade imune específica que inclui menor endotoxicidade e ativação do *tool like receptor* (TLR) tipo 2 ao invés do tipo 4 (SCHRODER et al, 2008).

Com base nas características fenotípicas (BARANTON et al., 1995; FAINE et al., 1999), as leptospiros foram primeiramente classificadas em duas espécies, *Leptospira interrogans* (senso lato), compreendendo todas as estirpes patogênicas; e *Leptospira biflexa* (senso lato), reunindo as estirpes saprófitas, isoladas de água doce de superfície (BARANTON et al., 1995; BROWN; LEVETT, 1997; FAINE et al., 1999). A diferenciação destas duas espécies foi determinada pela capacidade da espécie saprófita crescer na temperatura de 13°C na presença de 8-azaguanina (225 µg/mL) e pela incapacidade de formar células esféricas na presença de NaCl 1M (LEVETT, 2001). Nesta classificação, com base na heterogeneidade estrutural dos carboidratos dos lipopolissacarídeos do envelope externo da bactéria, foi consolidada a diferenciação antigênica e estabelecidos os sorogrupos e sorovares de leptospiros patogênicos e saprófitas (FAINE et al., 1994; LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003).

O advento das técnicas moleculares e os estudos de homologia do DNA possibilitaram o estabelecimento da classificação genotípica das leptospiros (YASUDA, et al, 1987). Atualmente existem 17 espécies genômicas (genomoespécies): *Leptospira interrogans* (senso estrito), *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira weilli*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira fainei*, *Leptospira inadai*, *Leptospira meyeiri*, *Leptospira biflexa* (senso estrito), *Leptospira wolbachii*, *Leptospira alexanderi* (RAMADASS et al., 1990, 1992; BRENNER et al., 1999; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001), *Leptospira broomii* (LEVETT, 2006) e as genomoespécies 1, 2, 3 e 4, ainda sem denominação (BHARTI et al., 2003). Nesta classificação, duas estirpes são consideradas como pertencentes à mesma espécie genômica se os ácidos desoxirribonucléicos apresentarem 70% ou mais de relação entre si, a uma temperatura ótima de reassociação de 55°C, e de 60% ou mais se os ácidos desoxirribonucléicos forem relacionados entre si a uma temperatura estrigente de reassociação de 70°C. Ou então, se os ácidos desoxirribonucléicos relacionados entre si apresentarem 5% ou menos de bases não pareadas (RAMADASS et al., 1992; WOO et al., 1997).

A leptospirose é uma zoonose amplamente difundida que acarreta elevados prejuízos econômicos. O seu principal impacto é o comprometimento do desempenho reprodutivo dos animais de produção (VASCONCELLOS, 1997). Em suínos, a leptospirose é caracterizada pela ocorrência de abortamento no terço final da gestação, podendo causar repetições de cio,

mumificação fetal, natimortalidade, nascimentos de leitões fracos e redução no número de leitões por leitegada (ELLIS, 1989; SOTO et al., 2007).

A leptospirose suína é uma importante causa de prejuízos econômicos em rebanhos de reprodução e ocorre em suínos de todas as partes do mundo (CLARK, 1996; MAILLOUX, 2001). No Brasil, a leptospirose em suínos tem sido uma das principais causas de falhas reprodutivas em vários estados, principalmente naqueles localizados nas regiões sul e sudeste do país (LANGONI et al., 1995).

A infecção dos suínos por leptospiras ocorre usualmente pelo contato com água ou alimentos contaminados, por urina, fetos abortados e descargas uterinas de animais portadores (SANTA ROSA et al., 1980). Os portadores eliminam leptospiras intermitentemente por vários meses ou anos após a infecção e isto determina a persistência e a disseminação do microrganismo na granja (SOBESTIANSKY, 1999).

As matrizes primíparas ou marrãs infectadas por leptospiras apresentam maior probabilidade de abortar e os leitões lactentes infectados pelo agente são debilitados e improdutivos (SOTO et al., 2007).

Os sorovares de leptospiras mais comumente encontrados, infectando e causando doença em suínos no mundo são: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Canicola, Gryppotypbosa, Bratislava e Muenchen. Os quatro primeiros já foram isolados de suínos no Brasil (SOBESTIANSKY et al., 1999).

No Brasil, um dos primeiros estudos de isolamento de leptospiras em tecido renal de suínos foi efetuado por Guida (1947), que isolou três estirpes de leptospiras de seis animais procedentes do Município de Rio Claro, Estado de São Paulo.

Guida (1958), no município de Rio Claro em São Paulo, isolou o sorovar Hyos, proveniente de rins de suínos aparentemente normais com reação sorológica para os sorovares: Canicola, Ballum, Icterohaemorrhagiae, Gryppotypbosa, Australis e Tarassovi

Santa Rosa et al. (1962) isolaram o sorovar Pomona da urina de uma fêmea suína que havia abortado e subsequentemente Santa Rosa et al. (1973) isolaram o mesmo sorovar de fetos suínos abortados em criações localizadas nos Estados do Paraná e de São Paulo.

Oliveira et al. (1980) isolaram uma estirpe de leptospira do sorovar Pomona em fetos abortados de granjas de suínos no Estado do Rio Grande do Sul.

Shimabukuro (2003) examinando 88 amostras de rins de suínos abatidos em frigorífico localizado na região de Botucatu, Estado de São Paulo isolou uma estirpe de leptospira e apesar de não ter sido efetuada a tipificação da mesma, houve a suspeita, por sorologia, de que o isolamento pudesse ser dos sorovares Icterohaemorrhagiae ou Autumnalis.

Freitas et al. (2004) em Londrina, Estado do Paraná, isolaram uma estirpe de leptospira do sorovar Canicola em duas amostras de fígado, colhidos em abatedouro, de 36 fêmeas suínas naturalmente infectadas.

Miraglia et al. (2008) examinando, no momento do abate, 137 fêmeas suínas, oriundas de granjas do Estado de São Paulo, isolaram cinco estirpes de leptospiros do fígado, órgãos reprodutivos e rins as quais foram tipificadas pela técnica de VNTR como pertencentes ao sorovar Pomona.

O controle da leptospirose suína assenta-se na aplicação de medidas que incluem a identificação das fontes de infecção, obtida por exames laboratoriais, o tratamento, dos reprodutores e reprodutoras infectados (antibioticoterapia), o manejo da água dentro das granjas e a imunização sistemática dos susceptíveis, com vacinas inativadas que contenham os sorovares de leptospiros presentes na região (GUIMARÃES et al., 1983; FAINE et al., 1999; DELBEM, 2004a).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser efetuado com o emprego de métodos que detectem o agente ou o seu material genético, métodos diretos, bem como pela detecção dos anticorpos produzidos pelo sistema imune dos animais infectados, métodos indiretos (SANTA ROSA, 1970; FAINE et al., 1999).

O teste de referência preconizado pela Organização Mundial da Saúde, para o diagnóstico sorológico da leptospirose em seres humanos e nos animais é o teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos (SAM) (FAINE et al., 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003;). A prova de SAM baseia-se na composição dos LPS do envelope externo das leptospiros e na reatividade dos anticorpos circulantes com tais antígenos (BHARTI et al., 2003). Na evolução da infecção a detecção de anticorpos séricos só pode ser efetuada entre oito a dez dias da infecção o que é considerado uma limitação (LEVETT, 2003). Além do diagnóstico tardio, a SAM também pode apresentar inespecificidades geradas por reações cruzadas entre sorovares. Os antígenos vivos utilizados nessa reação são provenientes de culturas de estirpes padrão, mantidas em meio líquido de Stuart, Ellinghausen ou similares. Estas culturas devem estar livres de contaminantes e de auto-aglutinação. As coleções de antígenos utilizadas devem conter pelo menos um representante por sorogrupo e se possível deve incluir algumas estirpes locais (FAINE et al., 1982, 1999).

O método que permite o diagnóstico definitivo da leptospirose é o isolamento do microrganismo, único procedimento que propicia a identificação do sorovar infectante com possibilidades de estudos epidemiológicos e profiláticos (VASCONCELLOS, 1987; FAINE

et al., 1999). Entretanto, as técnicas de isolamento são demoradas, trabalhosas e ficam restritas a poucos laboratórios. O rápido processamento das amostras clínicas, a utilização de meios de cultura que atendam as exigências nutricionais das leptospiros, o uso de antibióticos para o controle de bactérias contaminantes e a técnica de diluições seriadas aumentam as chances de sucesso no isolamento de leptospiros em cultivos *in vitro* (THIERMANN, 1984a).

No que concerne às vias de transmissão, no caso da leptospirose, especial cuidado deve ser tomado para a eliminação do excesso de água livre, o que pode ser obtido com o emprego de técnicas de drenagem e de canalização dos cursos de água. O destino adequado de esgotos e das águas servidas também é de grande importância para a redução do nível de contaminação ambiental (MANUAL DE LEPTOSPIROSE, 1995).

Nos dias atuais a imunoprofilaxia é uma das práticas mais relevantes no manejo sanitário dos suínos, pois determina reflexos imediatos e diretos no retorno econômico da atividade, e tem sido considerada uma das principais garantias do padrão sanitário do plantel, o que é extremamente necessário para a abertura e manutenção de mercados (DELBEM et al., 2004b).

A imunoprofilaxia da leptospirose animal é realizada com bacterinas, constituídas por suspensões de células bacterianas inativadas, polivalentes que incluem os sorovares mais frequentes em determinada região ou país, pois a proteção conferida por este tipo de imunógeno tem sido considerada sorovar específica (THIERMANN, 1984b; SIDDIQUE; SHAH, 1990; FREUDENSTEIN; HEIN, 1991). Embora estas vacinas tenham sido utilizadas há anos, ainda há relatos conflitantes quanto a sua eficácia (FAINE et al., 1999).

As vacinas contra leptospirose comercializadas no Brasil para uso em animais de produção (bovinos e suínos) são bacterinas que podem conter até sete sorovares: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Canicola, Wolffii, Grippothyphosa e Bratislava. Algumas incluem adjuvantes, variáveis com o fabricante, entre os quais o hidróxido de alumínio têm sido o mais frequente (SINDAN, 1997). Microorganismos causadores de outras doenças ou mesmo o toxóide de *Clostridium tetani* também podem estar incluídos na formulação da bacterina. Devido a esta múltipla composição, pouco se conhece sobre os componentes imunogênicos realmente efetivos e responsáveis pela determinação da resposta imune protetora (NUNES-EDWARDS et al., 1985).

As vacinas antileptospirose atualmente em uso ou estudo podem ser de vários tipos (KOIZUMI; WATANABE, 2005): (1) leptospiros inativadas ou atenuadas, que conferem proteção homóloga, ou seja, geram proteção contra os sorovares utilizados na composição da vacina, porém geralmente não são capazes de produzir proteção cruzada contra outros

sorovares (proteção heteróloga). Outra desvantagem destas preparações vacinais é a proteção por curto período de tempo; (2) preparações com a membrana externa de leptospiras, que determinam títulos de anticorpos mais altos que as bacterinas totais, contudo também possuem as desvantagens da ausência de proteção heteróloga e a curta duração da proteção; (3) preparações com LPS, que a despeito de serem os antígenos majoritários são específicos por sorovar, portanto geralmente só produzem proteção homóloga; (4) proteínas recombinantes, que apresentam composição bem definida e capacidade para induzir proteção homóloga; (5) vacinas de DNA, que foram recentemente testadas contra alguns antígenos e exibiram proteção (FAISAL et al., 2008). Os dois últimos procedimentos referidos ainda estão em fase experimental e até o presente não apresentaram resultados efetivos que permitam a sua aplicação em condições de campo.

Como as bacterinas antileptospirose determinam proteção sorovar específica (FAINE, 1999; KOIZUMI; WATANABE 2004) ou no máximo sorogrupo específica (TABATA et al., 2002) elas não são efetivas quando um novo sorovar é introduzido em uma dada população animal (MCBRIDE et al., 2005).

O desenvolvimento de vacinas antileptospirose é um processo árduo que consome tempo. Ao contrário das outras bactérias, as espiroquetas apresentam condições de crescimento fastidiosas. Os cultivos de leptospiras em escala industrial, em grandes volumes em tanques podem não apresentar resultados regulares e satisfatórios e o uso de biofermentadores pode não aumentar o crescimento dos microrganismos (SRIVASTAVA, 2006).

Um dos primeiros passos para a produção de uma vacina antileptospirose é a correta seleção e caracterização das estirpes empregadas na sua formulação (FAINE, 1999; LEVETT, 2001). De fato, a identificação das leptospiras que infectam um rebanho torna possível o desenvolvimento de vacinas específicas (FAINE et al., 1999), contudo, outros fatores que também têm sido relacionados ao sucesso da imunoprofilaxia desta zoonose incluem os programas de vacinação adotados; a qualidade e a quantidade de microrganismos imunizantes (BEY; JOHNSON, 1986) o tipo de adjuvante utilizado; a temperatura de conservação e também as condições empregadas no transporte da vacina até a propriedade (ARDUINO, 2005).

A concentração antigênica, o adjuvante, a formulação vacinal ou todo processo adotado para a preparação do antígeno pode influenciar a efetividade das bacterinas antileptospirose, todavia, outro aspecto controverso é o intervalo entre as revacinações, (BRIHUEGA; HUTTER, 1995). Andrews et al. (1996) referiram que um bom esquema de

primo-vacinação consiste em duas aplicações com intervalo de pelo menos quatro e não mais do que seis semanas.

Nos suínos, o esquema de vacinação antileptospirose, que tem sido mais preconizado consiste na aplicação de duas doses de bacterina nas marrãs ou primíparas, sendo a primeira aos 28 dias e a segunda aos 14 dias da cobertura. Para matrizes acima de um parto, a vacinação deve ser efetuada durante a lactação, aproximadamente 14 dias antes da cobertura ou na primeira semana de lactação. Para os machos, a vacinação deve ser semestral após a aplicação das duas doses iniciais da vacina intervaladas de 30 dias (CARVALHO, 2005; SOTO et al., 2007).

Os adjuvantes são substâncias que aumentam a resposta imune humoral e/ou celular para um dado antígeno (GUPTA; SIBER, 1995). Os adjuvantes de alumínio atuam principalmente com a formação de uma resposta inflamatória no ponto de aplicação da vacina, seguida da liberação lenta do antígeno e com isto promovem um tempo maior de interação do antígeno com as células que os apresentam, principalmente os macrófagos e os linfócitos. Sabe-se também, que o hidróxido de alumínio pode induzir o aumento da permeabilidade vascular associado ao efeito tóxico sobre macrófagos e que, estimula, principalmente, a imunidade humoral (RAPPUOLI, 2010). Pelo seu baixo custo, ampla faixa de segurança de toxicidade e facilidade de formulação o hidróxido de alumínio tem sido muito utilizado em medicina veterinária desde 1930, (MARSHALL et al., 1980; COX; COULTER, 1997).

O LPS das leptospirosas, caracterizado como antígeno imunodominante, induz a resposta imune contra os seus epítomos e promove proteção sorovar específica, fator limitante para a sua eficiência (ISOGAI et al., 1990; BOLIN et al., 1991; LEVETT, 2001; MATSUNAGA et al., 2003; KOIZUME; WATANABE, 2005), por essa razão, é necessário que as vacinas antileptospirose sejam produzidas com os sorovares grassantes na região. No entanto, já foi observada a existência de proteção cruzada entre representantes de um mesmo sorogrupo (COSTA et al., 1998; TABATA et al., 2002).

Uma bacterina antileptospirose ideal além de prevenir o acesso das leptospirosas na luz dos túbulos renais também deverá promover um estímulo imunológico adequado, para que o organismo produza níveis de anticorpos humorais protetores capazes de bloquear o processo infeccioso (FAINE et al., 1999). No entanto, tem sido demonstrado que algumas bacterinas empregadas para a imunização de animais de interesse econômico ou de estimação constituídas por cultivos totais inativados, protegem contra a doença clínica, mas não contra a infecção renal (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991). Assim, animais vacinados e expostos ao

agente infeccioso podem vir a apresentar uma infecção renal inaparente e leptospirúria (BEY; JOHNSON, 1982; BOLIN et al., 1989).

A resposta imune na leptospirose é mediada principalmente por anticorpos (FAINE et al., 1999), porém como as leptospiras são patógenos altamente invasivos, a ativação dos componentes celulares da resposta imunológica também deve ser considerada (PALANIAPPAN, 2006). Na defesa do hospedeiro contra a leptospirose a imunidade mediada por células, é ainda pouco compreendida, mas estudos *in vitro* têm apontado a importância das citocinas no mecanismo pelo qual as leptospiras ativam o sistema imune (VERNEL-PAUILLAC, 2006).

A imunidade transferida passivamente nas primeiras horas de vida por meio da ingestão do colostro apresenta grande importância nos suínos, pois a placenta desta espécie animal é do tipo epitélio-corial o que impede a transferência de anticorpos aglutinantes e neutralizantes da mãe para os fetos. A permeabilidade intestinal nos leitões recém-nascidos é de curta duração e, portanto, a imunidade passiva só é adquirida nas primeiras horas de vida e, a eficiência da absorção de imunoglobulinas da classe G pelo intestino delgado decresce rapidamente, apresentando uma meia vida de três horas após o nascimento (DUNNE; LEMANN, 1994).

A imunidade passiva é uma proteção transitória, confere proteção imediata, mas com curto período de duração (BARRAL, 2005). Nas primeiras semanas de vida a lâmina própria do intestino delgado dos leitões é o sítio de maior produção de imunoglobulinas. Com o amadurecimento deste sistema imune é só ao redor de um mês de vida que os leitões estão habilitados para produzir os seus próprios anticorpos (BOURNE, 1976).

Os anticorpos contra leptospiras podem ser detectados no soro sanguíneo dos animais entre cinco a oito dias da infecção e mais tardiamente no caso das vacinações. A concentração dos anticorpos aumenta à medida que a infecção evolui ou ainda com o desenvolvimento da resposta induzida pelos antígenos vacinais (FRANCIS et al., 1983; THEVENON et al., 1987). Em vista destes aspectos, a interferência de anticorpos vacinais nos resultados dos testes de diagnóstico sorológico tem sido relatada, pois de fato a diferenciação das imunoglobulinas vacinais das oriundas de infecção natural pode ser complexa (HANSON, 1977; FREUDENSTEIN; HEIN, 1991). No entanto, esses critérios não são totalmente esclarecidos (BRIHUEGA; HUTTER, 1995; FAVERO et al., 1997) e é possível que a exposição a antígenos homólogos ou heterólogos antes da vacinação ocasionem interferência na resposta vacinal.

As investigações já realizadas têm demonstrado que, as vacinas antileptospirose estimulam a produção de baixos títulos de aglutininas detectáveis pela SAM, que surgem rapidamente e declinam após algumas semanas, e as proteções contra a doença e infecção renal têm sido demonstradas em bovinos por pelo menos 12 meses (BLOOD; RADOSTITS, 1989). Em suínos vacinados com vacinas comerciais foram detectados títulos de aglutininas para o sorovar Hardjo por seis meses da primo-vacinação (SOTO, 2008b).

Burnstein et al. (1957) vacinaram suínos com uma bacterina contendo 1×10^9 leptospiras/mL produzida com sorovar Pomona e observaram que os animais apresentaram títulos de anticorpos antileptospiras, aos 48 dias da imunização.

Philips et al. (1958) avaliaram o comportamento de três bacterinas para a imunização de suínos e bovinos e constataram que independentemente da massa antigênica ou da presença de adjuvante os suínos não desenvolvem títulos aglutinantes como bovinos, contudo, todos os suínos e bovinos foram protegidos contra o desafio.

Dobson e Davos (1975) avaliando os títulos pós-vacinais de suínos imunizados contra a leptospirose constataram a ausência de títulos de aglutininas após a primeira aplicação da vacinação e que a partir da segunda dose o título de aglutininas limitou-se a 300. Observaram ainda que a persistência destes títulos foi variável de acordo com o sorovar e não ultrapassou a duração de oito semanas.

François et al. (1995) testando três vacinas comerciais normalmente utilizadas para o controle da leptospirose suína, constataram que aos 15 dias da primeira aplicação da vacina. 96% dos animais não produziram anticorpos aglutinantes, detectáveis no ponto de corte adotado para SAM (1:100).

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

Soto et al.(2008b) compararam a intensidade e duração dos níveis de anticorpos neutralizantes e aglutinantes para o sorovar Hardjo em fêmeas suínas vacinadas com duas bacterinas comerciais antileptospirose e constataram a ausência de correlação entre os níveis de anticorpos neutralizantes e aglutinantes pós-vacinais. Conclusão semelhante também foi obtida por Nardi Júnior et al. (2010) em búfalos.

O grau de proteção conferido por vacinas antileptospirose pode ser avaliado em animais de laboratório ou por métodos sorológicos. Por ser suscetível às leptospiras

patogênicas e por apresentar sinais clínicos semelhantes aos humanos o hamster (*Mesocricetus auratus*) (LANGONI, 2001; MACEDO et al., 2004) tem sido o modelo biológico de escolha para a avaliação da eficácia de vacinas antileptospirose em testes de potência com desafio (UNITED STATES OF AMERICA, 2006). Algumas das maiores desvantagens para a realização deste teste são: o grande número de animais utilizados, a dificuldade para manutenção da virulência das amostras de desafio e o alto risco de infecção acidental dos pesquisadores (MARBEHANT, 1999). Por isso, têm sido propostos métodos alternativos (TRIPATHY, 1973; VARNEY, 1999, TABATA et al., 2002; DELBEM, 2004a; SOTO, 2008b; NARDI, 2010), pois tem sido observado que os ensaios leptospiricidas apresentam correlação com os resultados do teste de potência em hamster (BEY; JOHNSON, 1978).

A avaliação da eficácia das vacinas antileptospirose é muito complexa e discutível. O *Code Federal Regulation* – CFR 113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) e a OIE (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2004) recomendam o emprego do teste de desafio em hamsters ou cobaias jovens com os sorovares incluídos na vacina. Esses protocolos estabelecem que nos hamsters a vacina seja testada na diluição de 1/800 da dose estipulada para o uso em bovinos ou suínos. Um limitante para este tipo de teste é que a eficácia da vacina é avaliada pelo índice de sobrevivência dos hamster à infecção aguda e não no que tange ao combate às infecções crônicas e ao estabelecimento da condição de animais portadores de leptospiras nos túbulos renais ou nos órgãos genitais. Outra grande limitação destes testes é a necessidade da manutenção de estirpes de leptospiras virulentas para hamsters de diversos sorovares, e o que se observa, na prática, é que esta característica é usualmente perdida quando as estirpes de desafio são submetidas a repiques sucessivos *in vitro* (SANGER et al., 1961; STALHEIM, 1966; GONZÁLEZ; DÍAZ; MATOS, 1999).

O teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* (ICLIV) (TRIPATHY et al., 1971, 1973), avalia a concentração de anticorpos neutralizantes (protetores) presentes no soro sanguíneo de animais vacinados que usualmente não apresenta relação direta com a concentração de anticorpos aglutinantes revelados pelo teste clássico de soroaglutinação microscópica (HANSON, 1977). Hanson (1977) relatou que em tais procedimentos as classes de anticorpos predominantes diferem, com participação prioritária de IgM ou IgG, respectivamente para SAM e ICLIV.

A despeito do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* já ter sido empregado em diversos experimentos delineados para a avaliação da qualidade de bacterinas antileptospirose (TABATA, 2002; DELBEM, 2004a; SOTO, 2008b; NARDI et al., 2010;),

ainda não foi averiguada em profundidade a correspondência entre os resultados deste procedimento e os do teste padrão com desafio em hamsters.

Atualmente muitos estudos buscam o desenvolvimento de novas vacinas antileptospirose com componentes bem definidos, como as vacinas de proteínas recombinantes, de LPS e de DNA. Entretanto, poucos estudos tem se dedicado à busca de métodos alternativos para avaliação da eficácia de vacinas que adotassem os procedimentos realizados *in vitro*.

Levantando a hipótese de que se fosse estabelecida a relação entre o resultado do teste de ICLIV com o dos ensaios com desafio de bacterinas antileptospirose em hamster o ICLIV pudesse vir a substituir o teste *in vivo*, Gonçalves (2007) comparou os resultados do teste oficial de potência de bacterinas antileptospirose com os do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* para os sorovares Canicola e Pomona em hamsters vacinados com bacterinas comerciais antileptospirose. Este estudo demonstrou que os títulos obtidos no teste de ICLIV iguais ou superiores a 1,0 log para os sorovares Canicola e Pomona corresponderam ao nível de aprovação da bacterina no teste de potência em hamsters. Estes resultados sugeriram a realização de novos estudos com a investigação desta hipótese na própria espécie animal para a qual a vacina é destinada, pois não havendo a necessidade de desafio, o ensaio pode ser efetuado naturalmente nos rebanhos de animais durante o seu ciclo regular de produção o que se constitui no objetivo do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

Acompanhar a intensidade e a duração da imunidade ativa em suínos, primo imunizados com diluições seriadas de uma bacterina experimental contra a leptospirose, de modo a ser estabelecido um nível de anticorpos neutralizantes que corresponda ao limite para aprovação da bacterina no teste padrão de potência com desafio em hamsters.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a menor concentração de leptospirosas por volume de bacterina que passe no teste de potência em hamsters.
- Imunizar matrizes suínas com a bacterina antileptospirose produzida com a menor concentração de leptospirosas por volume e em diluições seriadas para a avaliação das curvas de anticorpos aglutinantes e neutralizantes no decurso do tempo de modo a propor uma estratégia de vacinações que confira proteção efetiva em suínos por maior período de tempo possível.
- Avaliar a intensidade da imunidade passiva transferida pelas matrizes vacinadas para as suas leitegadas, utilizando-se a vacina na menor concentração de leptospirosas por volume aprovada no teste de potência em hamsters.
- Determinar os níveis de anticorpos aglutinantes e neutralizantes induzidos em leitões primo vacinados com a bacterina produzida na menor concentração de leptospirosas por volume aprovada no teste de potência em hamsters.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada para a realização dos ensaios é descrita nos tópicos abaixo.

3.1 LOCAL

Os trabalhos realizados com os suínos adultos e com os leitões foram desenvolvidos em uma granja comercial de suínos, ciclo completo, inseminação artificial em 100% das reprodutoras localizada no Município de Ibiúna, SP. Os suínos adultos foram mantidos no esquema de manejo usual da granja em baias coletivas de alvenaria, recebendo água à vontade e ração balanceada em média de 2,5 Kg/dia. O tratamento preventivo das doenças reprodutivas adotado pela granja consistiu na vacinação regular contra a parvovirose suína das marrãs, matrizes e reprodutores. Os leitões foram mantidos no esquema usual da granja: até os 21 dias de vida, as leitegadas permaneceram em celas parideiras individuais e micro ambiente com aquecimento e aleitamento materno. Aos 21 dias de vida os leitões foram desmamados e encaminhados para o setor de creche em baias coletivas, onde permaneceram até os 60 dias com aquecimento, ração balanceada e água à vontade. Após os 60 dias de idade, foram transferidos para o setor de engorda, onde permaneceram até o abate, que ocorreu por volta dos 160 dias de vida. Dos 60 aos 120 dias os animais receberam ração de crescimento, e de 121 até o abate ração terminação.

O teste de desafio em hamsters foi realizado no infectório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Os exames laboratoriais foram executados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP.

3.2 PREPARAÇÃO DA BACTERINA

A primeira etapa do experimento consistiu na produção de uma bacterina experimental com a *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (LPF).

A bacterina experimental foi produzida com o cultivo da estirpe LPF virulenta efetuado em meio líquido EMJH¹. A concentração, número de leptospiras (células bacterianas) por mililitro foi determinada pela contagem direta em câmara de Petroff-Hausser. Após a contagem a cultura foi centrifugada a 12.800g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o meio EMJH foi avaliado por microscopia de campo escuro quanto à presença de leptospiras e, constatando-se a ausência de células, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado em solução salina tamponada de Sorensen² (mesmo volume de cultivo) e em seguida a suspensão foi centrifugada. Ao final das três lavagens o sedimento foi ressuspensionado em solução salina tamponada de Sorensen em um volume correspondente a 10% do volume de cultivo original, resultando na concentração de 10⁹ leptospiras por mililitro da vacina. A seguir a suspensão foi inativada em banho maria a 56°C por 20 minutos, alíquotada e congelada a -20°C.

O controle de esterilidade da vacina foi efetuado no meio Tryptic Soy Broth³ (TSB), 24 horas de cultivo a 28°C e o controle do processo de inativação em meio de EMJH por sete dias a 28°C e em meio semi-sólido de Fletcher, por seis semanas a 28°C. Observou-se também uma alíquota em microscópio de campo escuro para a verificação da possível motilidade, pureza e rompimento celular. A cada dose foi adicionada solução de hidróxido de alumínio (10,16mg Al³⁺/mL) na proporção de 10 % do volume da dose final.

O ensaio de inocuidade da vacina foi efetuado em suínos como preconizado pela CFR 113.44 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) onde dois leitões recém-desmamados, receberam duas aplicações 10mL, sendo o dobro da dose recomendada para os animais adultos para testar a segurança contra reações adversas. Os animais foram observados durante 21 dias após a vacinação.

¹Ellinghausen & McCullough, 1965 (Difco Laboratories - Detroit Michigan 48238 EUA)

² Solução salina tamponada de Sorensen: Solução salina fisiológica 0,85%=1,840m + Solução tamponada de Sorensen=160mL. pH final=7,5

Solução tamponada de Sorensen: KH₂PO₄=1,09g; Na₂HPO₄=8,33g; água destilada=1000mL. pH final=7,6

³ Difco Laboratories – Detroit Michigan 48238 EUA

3.3 HAMSTERS

Foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos jovens, com 60 a 100 gramas de peso vivo distribuídos em caixas de polipropileno, equilibrando-se os pesos nos grupos de modo a torná-los homogêneos. As caixas foram forradas com maravalha e os animais receberam água de rede pública e ração comercial peletizada balanceada à vontade.

3.3.1 Teste de potência da bacterina com desafio em hamsters

A bacterina em diferentes concentrações foi submetida ao teste de potência em hamsters preconizado pela Organização Internacional de Epizootias e pela CFR 113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006).

3.3.1.1 Estabelecimento da concentração de leptospiras da bacterina experimental – Experimento A

Com a finalidade de determinar a concentração de leptospiras adequadas para a produção da bacterina antileptospirose, foram preparadas diferentes concentrações de suspensões celulares 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiras/mL, as quais, foram submetidas ao teste de potência com desafio em hamsters.

Foram utilizados 60 hamsters distribuídos em quatro grupos de dez animais: (1) grupo controle não vacinado, tratado com uma aplicação de 0,25 mL de solução salina tamponada de Sorensen estéril via subcutânea (SC); (2) grupo vacinado com a bacterina diluída 1:800 na concentração de 10^5 por dose; (3) grupo vacinado com a bacterina diluída 1:800 na concentração de 10^6 por dose; (4) grupo vacinado com a bacterina diluída 1:800 na concentração de 10^7 por dose; (5) grupo vacinado com a bacterina diluída 1:800 na concentração de 10^8 por dose e (6) grupo vacinado com a bacterina diluída 1:800 na concentração de 10^9 por dose. Cada grupo, exceto o grupo controle (1), recebeu uma dose de 0,25 mL de bacterina pela via subcutânea e aos 15 dias da imunização, todos os animais

foram desafiados com a cultura viva da estirpe LPF no volume de 0,2mL por hamster pela via intraperitoneal (IP).

3.3.1.2 Avaliação da eficácia da bacterina experimental na concentração de 10^9 leptospiros/mL e suas diluições - Experimento B

Os hamsters foram distribuídos em dez grupos de dez animais: (1) grupo controle não vacinado, tratado com uma aplicação de 0,25 mL de solução salina tamponada de Sorensen estéril via subcutânea; (2) grupo vacinado com bacterina pura; (3) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:200; (4) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:400; (5) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:800; (6) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:1600; (7) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:3200; (8) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:6400; (9) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:12800; (10) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:25600. Cada grupo, exceto o grupo controle (1), recebeu uma dose de 0,25 mL de bacterina pela via subcutânea e após 15 dias da imunização, todos os animais foram desafiados com a estirpe LPF pela via intraperitoneal (Apêndice A).

3.3.1.3 Preparação do inóculo de desafio

Os desafios dos testes de potência foram efetuados com suspensão de tecido hepático colhido de hamsters experimentalmente infectados com a estirpe LPF, comprovadamente patogênica para estes animais (TABATA et al., 2002; SOTO, 2006) a eutanásia foi realizada na fase agônica da doença. Este tecido foi macerado na proporção 1,0 g de tecido para 9,0 mL de meio líquido de EMJH, resultando na diluição 10^{-1} , a partir da qual foram efetuadas diluições seriadas em escala geométrica de razão dez (10^{-5} até 10^{-12}). A diluição escolhida para o desafio foi a 10^{-6} esta diluição foi a correspondente a três diluições superiores a maior diluição onde foi possível a contagem de 10 a 20 leptospiras por campo microscópico em microscopia de campo escuro.

3.3.1.4 Titulação do inóculo infectante de desafio

Este ensaio foi utilizado como controle da potência do inóculo de desafio.

O cálculo do número de doses letais (DL_{50}) efetivamente empregadas nos desafios foi efetuado com uma curva de titulação de dose em paralelo aos ensaios de desafio. Grupos de cinco animais foram inoculados com 0,2 mL/hamster via intraperitoneal das diluições em escala geométrica de razão dez (10^{-5} a 10^{-12}) do inóculo infeccioso. Os animais foram observados diariamente durante 21 dias com retirada dos mortos por leptospirose. O cálculo da DL_{50} empregou o método de Reed e Muench (1938).

3.3.1.5 Isolamento de leptospiras para o controle de infecção renal

Aos 21 dias da infecção por leptospiras, os hamsters sobreviventes foram submetidos à eutanásia em câmara de CO_2 . Os animais foram necropsiados e seus rins foram colhidos assepticamente em placas de Petri estéreis e pesados em balança analítica de precisão.

Os rins foram macerados em um homogeneizador de órgãos (Stomacher 80⁴), adicionando-se quantidade suficiente de solução salina tamponada de Sorensen para a 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, dois tubos por diluição, os quais foram incubados em estufa 28-30°C por seis semanas, com observações semanais (FAVERO et al., 1997). As leituras consistiram na verificação da formação do anel de crescimento sub-superficial (Zona de Dinger) de leptospiras (MYERS, 1985), o qual foi confirmado pela constatação efetiva da presença de leptospiras por exame em microscopia de campo escuro.

3.3.1.6. Pesquisa do DNA de leptospiras pela técnica de PCR aplicada as suspensões de tecido renal

Decorridos 21 dias do desafio os hamsters sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO₂ e a seguir, em condições assépticas, foram colhidos os seus rins os quais foram macerados em homogeneizador de órgãos em 20% (p/v) em TE (10mM de Tris HCl, 1mM de EDTA, pH 8,0) aliqüotadas em microtubos de 2000µL e armazenadas à -20°C até o momento da extração do ácido nucléico.

A extração do DNA bacteriano foi efetuada com a suspensão de renal utilizando-se isotiocionato de guanidina onde, 200µL da amostra foram adicionados a 450µL de isotiocianato de guanidina em um microtubo de 1500µL. As amostras foram homogeneizadas em agitador do tipo vórtex e incubadas a temperatura ambiente por dez minutos, após esse período foi adicionado 100µL de clorofórmio. Cada amostra foi centrifugada a 4°C a 12.000g durante cinco minutos. A fase aquosa, resultante da etapa anterior, foi transferida para um microtubo de 1500µL, misturada com 200µL de propanol, homogeneizada por inversão e incubada por um período mínimo de duas horas a -20°C. Após esse período, o material foi centrifugado a 4°C a 12.000g durante 30 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. O sedimento resultante foi lavado com 900 µL de etanol 70%, centrifugado a 4°C a 12.000g durante dez minutos e o sobrenadante foi novamente descartado por inversão. O

⁴ Biomaster –SEWARD, Lab System

sedimento foi seco em placa aquecida sem agitação a 56°C por dez minutos, suspensos em 30 µL de TE e novamente incubado em placa aquecida a 56°C por dez minutos. O DNA bacteriano foi mantido a -20°C até o momento do uso.

A amplificação do DNA para *Leptospira* spp foi realizada utilizando-se os dois pares de *primers* descritos por Mérien et al. (1992), Lep1 (5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e Lep2 (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') que amplificam a região de 330pb do gene 16S rDNA. As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial de cinco minutos a 94°C, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final 72°C por cinco minutos foi realizada em termociclador⁵.

O protocolo de amplificação do DNA foi empregado em volume final de 25µL, 4 µL da mistura de dNTPs, dATP, dTTP, dCTP, dGTP (1,25mM), 2,5µL do tampão de reação 10X (20mM Tris-HCl, 500mMKCl, pH8,4), 0,75µL de MgCl₂ (50mM), 2,5µL do primer Lep1 (10pmol), 2,5µL do primer Lep2 (10pmol) 0,125µL de *Platium Taq* DNA polimerase⁶ (1,25U), 2,5µL da amostra de DNA amplificado na reação de PCR e água ultra pura. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045M Tris-Borato e 1 mM de EDTA pH 8,0) . O gel foi corado com banho de solução de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL por 15 a 30 minutos e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta com o emprego de transiluminador.

3.4 SUÍNOS

Foram utilizadas 82 matrizes suínas (*Sus scrofa*), mestiças Landrace (LD) x Large White (LW), reprodutoras adultas que tinham tido até no máximo duas crias, 55 leitões recém desmamados e oito leitegadas, provenientes de oito matrizes suínas vacinadas. Por ocasião da escolha dos animais todos exceto os que compuseram os leitões recém nascidos foram confirmados como não reagentes aos testes de ICLIV, efetuado com a estirpe LPF e no teste de SAM aplicado à leptospirose, efetuados com uma coleção de antígenos vivos constituída por 25 estirpes de leptospiros (Apêndice B). Estes animais nunca haviam sido imunizados contra a leptospirose.

⁵Biometra's T-Personal Thermal Cycler – Goettingen, Alemanha

⁶ Invitrogen - California, EUA

3.4.1 Avaliação da imunidade induzida pela bacterina experimental em suínos

3.4.1.1 Avaliação da imunidade ativa em matrizes suínas adultas – Experimento 1 (Apêndice C)

Durante o Experimento 1, foram utilizadas 60 matrizes suínas distribuídas em seis grupos de dez animais: (1) grupo controle, não vacinados, tratado com uma aplicação de 5,0 mL de solução salina tamponada de Sorensen estéril via subcutânea; (2) grupo vacinado com bacterina pura, ou seja, 10^9 leptospiras por mililitro; (3) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:400; (4) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:800; (5) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:1600; (6) grupo vacinado com bacterina na diluição 1:3200. Todos os animais exceto o controle receberam as diluições da bacterina pela via subcutânea na base da orelha, em duas doses de 5,0 mL com intervalo de 30 dias. Os animais foram revacinados aos 210 dias da primeira dose da bacterina experimental.

3.4.1.2 Avaliação da imunidade ativa em matrizes suínas adultas – Experimento 2

Foram utilizados 22 matrizes suínas distribuídas em dois grupos de onze animais: (1) grupo controle, não vacinados, tratado com uma aplicação de 5,0 mL de solução salina tamponada de Sorensen estéril via subcutânea; (2) grupo vacinado com bacterina pura. Todos os animais exceto o controle receberam as diferentes diluições da bacterina pela via subcutânea na base da orelha, em duas doses de 5,0 mL com intervalo de 30 dias. Os animais foram revacinados 150 dias após a primeira dose da bacterina experimental.

3.4.1.3 Avaliação da imunidade ativa em leitões desmamados – Experimento 3

Foram utilizados 55 leitões recém desmamados distribuídos em cinco grupos de onze animais: (1) grupo controle, não vacinados, tratado com uma aplicação de 5,0 mL de solução salina tamponada de Sorensen estéril via subcutânea; (2) grupo vacinado com a bacterina na concentração de 10^9 por dose; (3) grupo vacinado com a bacterina na concentração de 10^8 por dose; (4) grupo vacinado com a bacterina na concentração de 10^7 por dose e (5) grupo vacinado com a bacterina na concentração de 10^6 por dose. Todos os animais exceto o grupo controle (1), receberam duas doses de 5,0 mL das diferentes concentrações da bacterina pela via subcutânea na base da orelha, em com intervalo de 30 dias.

3.4.1.4 Avaliação da imunidade passiva em leitões em aleitamento – Experimento 4

Foram utilizados soros de leitões em aleitamento, nascidos de oito matrizes suínas vacinadas com a bacterina pura pertencentes ao Experimento 2.

3.4.1.5 Cronograma para colheitas de sangue

As colheitas de sangue das matrizes foram efetuadas concomitantemente às três aplicações das bacterinas e sucessivamente com intervalos de aproximadamente 30 dias. No Experimento 1 foram realizadas colheitas de sangue nos dias zero, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 após a primo-vacinação, enquanto que no Experimento 2 foram realizadas colheitas de sangue nos dias zero, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 após a primo-vacinação. Para os leitões desmamados do Experimento 3 as colheitas foram efetuadas concomitantemente às duas aplicações das bacterinas, sucessivamente com intervalos de aproximadamente 30 dias, nos dias zero, 30 e 60 após a primo-vacinação.

As colheitas de sangue dos leitões, nascidos das matrizes imunizadas com a vacina pura do Experimento 4 foram efetuadas no quinto e décimo dia de vida.

Todas as colheitas de sangue foram efetuadas assepticamente por punção da veia cava cranial, utilizando-se seringas de 10mL, agulhas 40x12mm e tubos com gel separador de 8,5ml, exceto nos leitões do Experimento 4, no qual, foram empregadas seringas de 5mL e agulhas 30x7mm. As amostras de sangue coagularam em temperatura ambiente e posteriormente foram centrifugadas a 2500g por dez minutos para a obtenção do soro. Todas as amostras foram acondicionadas em frascos estéreis e estocadas à temperatura de -20°C, até o momento da realização dos testes.

3.4.2 Teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* com a estirpe LPF

A mensuração dos níveis de anticorpos neutralizantes foi efetuada pelo teste de inibição do crescimento de leptospiros *in vitro* adaptado da descrição de Triphaty et al. (1973).

No teste de ICLIV dos suínos pertencentes aos Experimentos 1, 2 e 3, cada animal foi testado individualmente; no entanto, nos leitões pertencentes ao Experimento 4 as amostras examinadas foram constituídas por *pools*, mistura de volumes iguais dos soros de três leitões, ou seja, três *pools* por leitegada. A composição dos *pools* de soros foi adotada, pois o volume máximo de soro sanguíneo obtido individualmente por leitão foi insuficiente para a realização da prova.

3.4.2.1 Reação

Após as colheitas de sangue, 100µL de soro por animal foram submetidos ao teste de esterilidade em meio TSB incubados a 37°C por 24 horas. Constatada a esterilidade, os soros foram inativados a 56°C por 40 minutos e diluídos em escala geométrica de razão dois (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) em solução salina tamponada de Sorensen. Para cada diluição de soro foram utilizadas cinco repetições em tubos de ensaio⁷ (12x75mm) contendo 2,5 mL de meio EMJH, 0,2 mL do soro a ser testado e 0,1 mL de cultura de leptospiros vivas, estirpe LPF com

⁷ Becton Drive - Franklin Lakes, EUA

dez dias de cultivo em meio de EMJH. Os tubos foram incubados em estufa a 28-30°C por dez dias. Além das amostras de soro dos animais imunizados foram adicionados três grupos controles: grupo controle do antígeno, contendo 2,5 mL de meio EMJH e 0,1 mL de cultura de leptospiros vivas, estirpe LPF; grupo controle da solução salina tamponada de Sorensen, contendo 2,5 mL de meio EMJH, 0,2 mL de solução salina tamponada de Sorensen e 0,1 mL de cultura de leptospiros vivas, estirpe LPF e grupo controle do meio, contendo somente 2,5 mL de meio EMJH. Cada grupo controle foi composto por 25 tubos de ensaios incubados juntamente com os soros testados.

3.4.2.2 Leitura e interpretação

Ao décimo dia do ensaio os tubos foram examinados para a observação de presença ou ausência de crescimento de leptospiros pela turvação macroscópica sub-superficial, indicativa de crescimento de leptospiros. A avaliação do crescimento foi realizada pela escala de turbidez que variou de 0 a 4. Os tubos que não apresentaram nenhum crescimento ou atingiram no máximo o valor 2 na escala de turvação foram considerados positivos para anticorpos neutralizantes, responsáveis pela inibição de crescimento das leptospiros. Os tubos que apresentaram turbidez ou crescimento na escala variando de 3 a 4 foram considerados negativos para anticorpos inibidores de crescimento.

3.4.3 Teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos

A microtécnica de soroaglutinação microscópica (GALTON et al., 1965; COLE et al., 1973) foi empregada para a mensuração dos níveis de anticorpos aglutinantes tendo como antígeno a estirpe LPF. As culturas vivas de leptospiros foram mantidas em meio líquido de EMJH com quatro a 14 dias de crescimento.

Os soros foram diluídos a 1:50 em solução salina tamponada de Sorensen. A reação foi efetuada em microplacas de poliestireno com 96 poços, com 50 µL de antígeno, a diluição final da mistura soro/antígeno 1:100, sendo considerado o ponto de corte da reação. Os soros positivos na triagem foram titulados em uma série de diluições geométricas de razão dois. A

recíproca da maior diluição do soro que apresentou 50% de leptospiras aglutinadas foi considerada como o título do soro (MYERS, 1985). As placas foram incubadas em estufa a 28-30°C por três horas. As leituras foram realizadas em microscópio de campo escuro, no aumento de 100 vezes, observando-se a relação entre grumos de aglutinação e a presença de leptospiras soltas.

3.4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) dos níveis de IgG séricos nas matrizes suínas imunizadas com a bactéria pura

O ELISA IgG foi realizado com os soros das matrizes imunizadas com a bactéria pura, pertencentes ao Experimento 1. Para cada soro foram realizados três ensaios de ELISA e os gráficos resultaram das médias das absorbâncias dos três ensaios. As microplacas de poliestireno⁸ de alta afinidade com 96 poços de fundo chato, foram sensibilizadas utilizando-se 1 µg/mL da bactéria previamente diluído em tampão carbonato de sódio 0,1 M e incubadas a 4°C até o uso. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio (10% de leite desnatado liofilizado em PBS com 0,05% Tween 20), por uma hora a 37°C. Após o bloqueio as placas foram lavadas uma vez com PBS-T. Os microtubos contendo os soros das matrizes foram descongelados, homogeneizados por inversão e diluídos 1:25 em tampão de diluição (1% de leite desnatado liofilizado em PBS com 0,05% Tween 20). Os soros foram aplicados em diluição seriada (1:25 a 1:25600). As placas foram incubadas por uma hora a 37°C e posteriormente lavadas três vezes com PBS-T. O segundo anticorpo anti-IgG de suíno conjugado a peroxidase⁹ foi adicionado na diluição 1:10000 em tampão de diluição (1% de desnatado liofilizado em PBS com 0,01% Tween 20), e incubado por uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. A reação foi revelada durante dez minutos após a adição da solução contendo o substrato ortofenilenodiamina (OPD), em tampão citrato-fosfato na presença de traços de H₂O₂ e interrompida pela adição de 2N de H₂SO₄. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em 492 nm em aparelho leitor de ELISA¹⁰. O título de anticorpos foi considerado como a

⁸ Corning – Lowell, EUA

⁹ KPL - Gaithersburg, EUA

¹⁰ Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA

maior diluição do soro capaz de resultar em uma leitura de absorbância a 492 nm superior a 0,1 (MONARIS, 2010).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos hamsters foram analisados pelo critério preconizado pelo teste de potência para bacterinas de *Leptospira interrogans*, proposto pelo CFR 113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006).

Os títulos dos anticorpos neutralizantes foram calculados pelo método de Reed e Muench (MANCUSO, 1974). Os intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes antileptospirose nos soros das matrizes suínas, obtidos no teste de crescimento de leptospiros *in vitro*, foram calculados conforme Pizzi (1950).

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos segundo a metodologia empregada são descritos nos tópicos abaixo:

4.1 CÁLCULO DO NÚMERO DE DOSES INFECTANTES EFETIVAMENTE EMPREGADAS NOS DESAFIOS EM HAMSTERS

As tabelas 1 e 2 apresentam o número de hamsters desafiados com a estirpe LPF, respectivamente obtidos nos Experimentos A e B, ao término de observação de 21 dias, segundo a diluição do inóculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL_{50} de acordo com o método de Reed e Muench (1938).

Tabela 1 – Número de hamsters desafiados com a estirpe LPF, ao término de observação de 21 dias, segundo a diluição do inóculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL_{50} de acordo com o método de Reed e Muench – São Paulo - 2012

D*	S**	M***	FREQUÊNCIAS ACUMULADAS			c/(b+c)
			S (b)	M(c)	Total (b+c)	(% cumulativa de mortes)
10^{-5}	0	5	0	21	2	21/21 (100%)
10^{-6}	1	4	1	16	17	16/17 (94,1%)
10^{-7}	1	4	2	12	14	12/14 (85,7%)
10^{-8}	1	4	3	8	11	8/11 (72,7%)
10^{-9}	2	3	5	4	9	4/9 (44,4%)
10^{-10}	4	1	9	1	10	1/10 (10%)
10^{-11}	5	0	14	0	14	0/14(0%)
10^{-12}	5	0	19	0	19	0/19 (0%)

*D: diluição do inóculo de desafio

**S: número de animais sobreviventes à infecção por leptospiros

***M: número de mortes ocorridas em decorrência de leptospirose

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

Tabela 2 – Número de hamsters desafiados com a estirpe LPF, ao término de observação de 21 dias, segundo a diluição do inóculo infectante, a condição de vida e os parâmetros necessários para o cálculo de DL_{50} de acordo com o método de Reed e Muench – São Paulo - 2012

D*	S**	M***	FREQUÊNCIAS ACUMULADAS			c/(b+c)
			S (b)	M(c)	Total (b+c)	(% cumulativa de mortes)
10^{-5}	2	3	2	15	17	15/17 (88,23%)
10^{-6}	1	4	3	12	15	12/15 (80%)
10^{-7}	2	3	5	8	13	8/13 (61,53%)
10^{-8}	0	5	5	5	10	5/10 (50%)
10^{-9}	5	0	10	0	10	0/10 (0%)
10^{-10}	5	0	15	0	15	0/15 (0%)
10^{-11}	5	0	20	0	20	0/20(0%)
10^{-12}	5	0	25	0	25	0/25 (0%)

*D: diluição do inóculo de desafio

**S: número de animais sobreviventes à infecção por leptospiros

***M: número de mortes ocorridas em decorrência de leptospirose

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

Os resultados apresentados na tabela 1 revelaram que a diluição $10^{-8,8}$ apresentou uma proporção acumulada de mortes de 5/10 o que corresponde, portanto, ao valor de uma DL_{50} . Como a diluição empregada para o desafio foi a 10^{-6} o número de DL_{50} efetivamente empregado corresponde a 631 ($10^{-8,8}/10^{-6} = 10^{-2,8}$; antilog $10^{-2,8} = 631$). Na tabela 2 a diluição 10^{-8} apresentou uma proporção acumulada de mortes de 5/10 o que corresponde, portanto, ao valor de uma DL_{50} . Como a diluição empregada para o desafio foi a 10^{-6} o número de DL_{50} efetivamente empregado corresponde a 100 ($10^{-8}/10^{-6} = 10^{-2}$; antilog $10^{-2} = 100$). As DL_{50} empregadas nos experimentos A e B atenderam as exigências do CFR 113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006) (10 a 10.000 DL_{50}).

4.2 RESULTADOS DOS TESTES DE POTÊNCIA DA VACINA ANTILEPTOSPIROSE EM HAMSTERS

A bactéria experimental avaliada, pura e nas diluições ensaiadas, foi inócua para os hamsters não induziu reações locais ou sistêmicas, como perda de apetite, prostração ou choque anafilático e a sua inativação pelo calor foi eficaz.

Na tabela 3 são apresentados os resultados da padronização do número de leptospiros no preparo do inóculo da bactéria experimental para as diferentes concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiros/ mL por meio do teste de potência de vacina antileptospirose.

Tabela 3 - Hamsters vacinados contra a leptospirose com bactéria experimental nas concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiros/ mL, sobreviventes ao desafio com a estirpe LPF segundo a proporção de sobreviventes ao desafio e os resultados dos ensaios efetuados para investigar a condição de portador renal de leptospiros – São Paulo – 2012

Concentração da bactéria	Proporção de sobreviventes ao desafio	Proporção de cultivos renais positivos para leptospirose nos sobreviventes ao desafio	Proporção de PCR do tecido renal positivos para leptospirose nos sobreviventes ao desafio
1:800 [10^5]	01/10*	01/01***	0/01***
1:800 [10^6]	03/10	03/03	0/03
1:800 [10^7]	0/10	...	...
1:800 [10^8]	03/10	0/03	01/03
1:800 [10^9]	10/10	0/10	0/10
Controle do inóculo	02/10	02/02	01/02

*Número de sobreviventes/ número de animais desafiados

** Diluição considerada como padrão para a aprovação de bactéria do sorovar Pomona para uso em suínos e bovinos CFR 113.101(UNITED STATES OF AMERICA, 2006)

*** Número de animais reagentes/ número de animais infectados

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

Na avaliação da eficácia da bactéria experimental para as diferentes concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiros/ mL (Tabela 3), observou-se que no grupo controle do inóculo infectante de desafio com a estirpe LPF houve dois animais sobreviventes em 10 (2/10), enquanto nos grupos imunizados com a bactéria experimental, as proporções foram

de 10/10 para a concentração da bacterina 10^9 leptospiras/ mL, 3/10 para a concentração da bacterina 10^8 leptospiras/ mL, zero sobreviventes em 10 (0/10) para a concentração da bacterina 10^7 leptospiras/ mL, 3/10 para a concentração da bacterina 10^6 leptospiras/ mL, 1/10 para a concentração da bacterina 10^5 leptospiras/ mL, ou seja, apresentaram na média 100%, 30%, 0%, 30% e 10% de sobrevivência nos grupos imunizados, respectivamente.

Todos os animais imunizados com as concentrações da bacterina experimental de 10^5 , 10^6 , leptospiras/ mL que sobreviveram ao desafio apresentaram estado de portador renal, confirmados pelo isolamento em meio semi-sólido de Fletcher, o mesmo foi observado no grupo controle do inóculo de desafio.

Na tabela 4 são apresentados os resultados do teste de potência da vacina experimental antileptospirose padronizada para a concentração de 10^9 leptospiras/ mL segundo a diluição da vacina utilizada na imunização.

Tabela 4 - Hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina experimental (10^9 leptospiras/mL) pura e suas diluições, sobreviventes ao desafio com a estirpe LPF, segundo a diluição da bacterina empregada, proporção de sobreviventes ao desafio e os resultados dos ensaios efetuados para investigar a condição de portador renal de leptospiras – São Paulo – 2012

Diluição da bacterina	Proporção de sobreviventes ao desafio	Proporção de cultivos renais positivos para leptospirose nos sobreviventes ao desafio	Proporção de PCR do tecido renal positivos para leptospirose nos sobreviventes ao desafio
Pura	10/10*	0/10***	0/10***
1:200	10/10	0/10	0/10
1:400	10/10	0/10	01/10
1:800**	10/10	0/10	0/10
1:1600	08/10	0/08	01/08
1:3200	09/10	0/09	0/09
1:6400	09/10	0/09	01/09
1:12800	06/10	0/06	02/06
1:25600	06/10	0/06	0/06
Controle do inóculo	02/10	0/02	0/02

*Número de sobreviventes/ número de animais desafiados

** Diluição considerada como padrão para a aprovação de bacterina do sorovar Pomona para uso em suínos e bovinos CFR 113.101(UNITED STATES OF AMERICA, 2006)

*** Número de animais reagentes/ número de animais infectados

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

A bacterina experimental na concentração de 10^9 leptospiras por mL (Tabela 4) impediu a ocorrência da leptospirose em 100% dos grupos de hamsters imunizados com a vacina pura e nas diluições de 1:200 a 1:800. No grupo controle do inóculo de desafio houve a morte por leptospirose de oito dentre dez animais desafiados. Com estes parâmetros a vacina foi aprovada segundo os critérios internacionais de controle de qualidade de vacinas antileptospirose. Destaque-se ainda que mesmo nas diluições de 1:1600 a 1:6400, o número de sobreviventes ainda esteve dentro dos critérios mínimos exigidos para aprovação 80% (8/10). Foi só a partir da diluição de 1:12800 que o número de sobreviventes passou a ser inferior ao limiar estabelecido de 80% (8/10).

Todos os animais imunizados e sobreviventes no 21º dia após desafio apresentados na tabela 4 apresentaram cultivos renais negativos para leptospirose confirmados pelo isolamento em meio semi-sólido de Fletcher.

As tabelas 5 e 6 apresentam a proteção alcançada no período de 21 dias de observação após o desafio com 631 DL₅₀ e 100 DL₅₀ de *L. interrogans* estirpe LPF respectivamente obtidos nos Experimentos A e B.

Tabela 5 - Análise da porcentagem de sobrevivência dos grupos de hamsters imunizados com bacterina experimental antileptospirose nas concentrações de 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ e 10⁹ e desafiados com 631 DL₅₀ de *L. interrogans* estirpe LPF ao longo de 21 dias de observação – São Paulo – 2012

Concentração da bacterina	Nº sobreviventes/ total	Dias das mortes após o desafio com 631 DL ₅₀
1:800 [10 ⁵]	01/10*	7,7,7,8,8,8,8,9,21
1:800 [10 ⁶]	03/10	7,7,7,8,8,8,10, 21,21,21
1:800 [10 ⁷]	0/10	7,7,7,8,8,8,8,9,10,11
1:800 [10 ⁸]	03/10	7,7,8,8,8,8,10,21,21,21
1:800 [10 ⁹]	10/10	21,21,21,21,21,21,21,21,21,21
Controle do inóculo	02/10	7,7,7,7,7,8,9,9, 21,21

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

Tabela 6 - Análise da porcentagem de sobrevivência dos grupos de hamsters imunizados com bacterina experimental antileptospirose (10^9 leptospiras/mL) pura e suas diluições e desafiados com 100 DL₅₀ de *L. interrogans* estirpe LPF ao longo de 21 dias de observação – São Paulo – 2012

Diluição da bacterina	Nº sobreviventes/ total	Dias das mortes após o desafio com 100 DL₅₀
Pura	10/10	21,21,21,21,21,21,21,21,21,21
1:200	10/10	21,21,21,21,21,21,21,21,21,21
1:400	10/10	21,21,21,21,21,21,21,21,21,21
1:800**	10/10	21,21,21,21,21,21,21,21,21,21
1:1600	08/10	8,9,21,21,21,21,21,21,21,21
1:3200	09/10	8,21,21,21,21,21,21,21,21,21
1:6400	09/10	8,21,21,21,21,21,21,21,21,21
1:12800	06/10	9,9,9,10,21,21,21,21,21,21
1:25600	06/10	8,9,9,13,21,21,21,21,21,21
Controle do inóculo	02/10	8,8,8,8,8,8,8,9,21,21

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

Nas tabelas 5 e 6 pode-se observar que as mortes dos hamsters infectados com a estirpe LPF, tanto nos grupos imunizados quanto no grupo controle do inóculo, ocorreram a partir do sétimo dia após o desafio. Enquanto nos grupos imunizados com as preparações vacinais com 10^9 leptospiras/mL e nas diluições de 1:200 a 1:800 as mortes somente ocorreram por meio da eutanásia após o período de observação de 21 dias.

A figura 1 é a representação fotográfica da detecção do DNA de leptospiras pela técnica de PCR em amostras de tecido renal de hamsters sobreviventes ao desafio com a estirpe LPF.

Figura 1- Gel de agarose a 1,5%. Visualização de banda de 330pb, amplificado de segmento de DNA de leptospira, de amostra de suspensão de tecido renal de animais sobreviventes ao desafio com a estirpe LPF – São Paulo – 2012

Os resultados apresentados na figura 1 indicaram que os animais sobreviventes ao desafio não apresentavam infecção renal por leptospirosas vivas, por ocasião da eutanásia, contudo tiveram uma infecção renal que foi eliminada por seus sistemas imunes, persistindo, no entanto o DNA da leptospira em alguns indivíduos sem que houvesse uma relação direta com a diluição da vacina empregada.

4.3 TÍTULOS DE ANTICORPOS AGLUTINANTES E INIBIDORES DO CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS IN VITRO EM SUÍNOS

Ao final dos 360 dias e dos 60 dias de acompanhamentos, das matrizes suínas e dos leitões imunizados com a bacterina experimental respectivamente, não foi observada qualquer reação vacinal indesejável de natureza local ou sistêmica. O ensaio de inocuidade foi efetuado em suínos jovens com a vacina pura, como preconizado pelo CFR 113.44 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006), e não foi registrada a ocorrência de qualquer reação vacinal indesejável.

4.3.1 Avaliação da imunidade ativa em matrizes suínas adultas– Experimento 1

No gráfico 1 são apresentados os títulos de anticorpos aglutinantes para o antígeno LPF das matrizes suínas imunizadas com bacterina experimental produzida com a estirpe LPF, segundo a diluição da vacina empregada na imunização.

Gráfico 1 - Média geométrica dos títulos de aglutininas antileptospiras (log), reação de SAM efetuada com o antígeno LPF em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012

A partir do dia 30 após a primo-vacinação foi constatada a soroconversão em todos os grupos imunizados com as preparações vacinais com 10^9 leptospiras/mL e em suas diluições de 1:400 a 1:3200, o que persistiu por até 180 dias, para as diluições da bacterina de 1:400 a 1:3200 e até 210 dias para a bacterina pura. Após o reforço vacinal efetuado aos 210 dias da primeira dose da vacina houve uma nova ascensão nos níveis de aglutininas. Os animais do grupo controle negativo permaneceram como não reagentes aos testes de SAM para a estirpe LPF durante todo o período de execução do experimento. Pela avaliação da curva de aglutininas apresentada no gráfico 1, pode-se observar o aumento do título dos anticorpos aglutinantes

após a segunda e terceira imunizações com valores máximos aos 60 e 300 dias da primo-vacinação.

No gráfico 2 são apresentadas as médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores do crescimento de leptospiras *in vitro* para o antígeno LPF das fêmeas suínas imunizadas com a bacterina experimental produzida com a estirpe LPF, segundo a diluição da vacina empregada na imunização

Gráfico 2 - Média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes (log), para o teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* para o antígeno LPF em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012

A bacterina experimental foi capaz de induzir títulos de anticorpos neutralizantes em todos os grupos imunizados com a vacina ajustada para 10^9 leptospiras/mL e em suas diluições de 1:400 a 1:3200 a partir do dia 30 após a primo-vacinação. Estes títulos persistiram por até 180 dias, para as diluições da bacterina de 1:400 a 1:3200 e até o final do experimento (360 dias) para a bacterina pura, sendo novamente produzidos após o reforço aos 210 dias para as diluições da bacterina. Os soros das matrizes suínas pertencentes ao grupo controle (não vacinados) foram não reagentes ao teste de ICLIV para a estirpe LPF, durante toda a duração do experimento, o que confirmou a especificidade do teste. Pela avaliação da curva de anticorpos

neutralizantes apresentada no gráfico 2, pode-se observar o aumento do título dos anticorpos neutralizantes após a segunda e terceira imunizações, com valores mais elevados aos 60 e 300 dias após a primo-vacinação.

Na tabela 7 são apresentados os intervalos de confiança 95% (PIZZI, 1950) das médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes dos soros das matrizes suínas imunizadas com bacterina experimental produzida com a estirpe LPF, segundo a diluição da vacina empregada na imunização empregando-se como antígeno a estirpe LPF.

Tabela 7 - Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para a estirpe LPF, em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada - São Paulo - 2012

Dia	Média Anticorpos neutralizantes $\pm$ IC (95%)				
	Pura	1:400	1:800	1:1600	1:3200
0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
30	0,33 $\pm$ 0,13	0,23 $\pm$ 0,07	0,09 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,1
60	1,11 $\pm$ 0,24	0,51 $\pm$ 0,18	0,29 $\pm$ 0,19	0,24 $\pm$ 0,16	0,20 $\pm$ 0,09
90	0,96 $\pm$ 0,21	0,42 $\pm$ 0,12	0,31 $\pm$ 0,12	0,19 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,13
120	0,81 $\pm$ 0,19	0,35 $\pm$ 0,1	0,18 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,09
150	0,48 $\pm$ 0,14	0,09 $\pm$ 0,06	0,09 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,02
180	0,28 $\pm$ 0,17	0,08 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0 $\pm$ 0
210	0,16 $\pm$ 0,07	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
240	0,78 $\pm$ 0,16	0,44 $\pm$ 0,1	0,05 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02	0 $\pm$ 0
270	0,97 $\pm$ 0,16	0,26 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,09	0,2 $\pm$ 0,09	0 $\pm$ 0
300	0,81 $\pm$ 0,16	0,17 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,02	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
330	0,55 $\pm$ 0,16	0,17 $\pm$ 0,1	0,05 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,02	0 $\pm$ 0
360	0,67 $\pm$ 0,17	0,11 $\pm$ 0,07	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

O gráfico 3 apresenta a curva de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando soros de matrizes suínas imunizadas com a bacterina experimental pura produzida com a estirpe LPF, empregando-se como antígeno do teste a própria bacterina experimental.

Gráfico 3 - Valores médios das densidades ópticas obtidas para as diluições dos soros de matrizes suínas imunizadas com a bacterina pura no teste de ELISA IgG contra a bacterina experimental - São Paulo – 2012

O gráfico 4 apresenta os títulos dos soros obtidos pela técnica de ELISA aplicada nos soros de matrizes suínas imunizadas com a bacterina experimental pura (Experimento 1) produzida com a estirpe LPF, empregando-se como antígeno do teste a própria bacterina experimental. Os desvios-padrões foram omitidos para não comprometerem a visualização do gráfico e estão listados no Apêndice D.

Gráfico 4 - Títulos dos soros de matrizes suínas imunizadas com a bacterina pura obtidos por ELISA IgG contra a bacterina experimental. As médias dos títulos foram calculadas a partir da média dos valores da maior diluição do soro capaz de resultar em uma leitura de absorbância igual a 0,1 - São Paulo – 2012

Os soros dos animais imunizados com a bacterina experimental na preparação pura, foram capazes de reconhecer a bacterina com altos títulos de anticorpos IgG após a terceira imunização, dia 240 (Gráfico 4). A curva de titulação de IgG total dos soros dos animais do grupo controle negativos foram próximas a zero com títulos baixos (Gráfico 3).

4.3.2 Avaliação da imunidade ativa em matrizes suínas adultas – Experimento 2

No gráfico 5 são apresentados os títulos de anticorpos aglutinantes das matrizes suínas imunizadas com bacterina experimental produzida com a estirpe LPF, segundo a diluição da vacina empregada na imunização, empregando-se como antígeno a estirpe LPF.

Gráfico 5 - Média geométrica dos títulos de aglutininas antileptospiras (log), reação de SAM efetuada com a estirpe LPF em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012

Os resultados apresentados no gráfico 5 indicam que os níveis de aglutininas pós-vacinais foram registrados para a bacterina pura a partir de 30 dias após a primo-vacinação, mantendo-se até o fim do estudo (180 dias) e o monitoramento sorológico ao longo dos 180 dias revelou títulos médios máximos após a segunda e terceira imunizações, 60 e 180 dias respectivamente, para a estirpe LPF empregada como antígenos no teste de SAM. Enquanto os animais pertencentes ao grupo controle negativo, permaneceram como não reagentes aos testes de SAM para a estirpe LPF durante todo o período de execução do experimento.

No gráfico 6 são apresentados as médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores do crescimento de leptospiras *in vitro* das fêmeas suínas imunizadas com a bacterina experimental produzida com a estirpe LPF, segundo a diluição da vacina adotada na imunização empregando-se a estirpe LPF como antígeno.

Gráfico 6 - Média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes (log), para o teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* para a estirpe LPF em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012

Os resultados apresentados no Gráfico 6 revelam que a partir de 30 dias após a primo-vacinação a bacterina experimental, pura com 10^9 leptospiras/mL foi capaz de induzir títulos de anticorpos neutralizantes que persistiram até o final da observação (180 dias) em todo os grupos e o monitoramento sorológico ao longo dos 180 dias revelou títulos médios máximos após a segunda e terceira imunizações, 60 e 180 dias respectivamente, para a estirpe empregada como antígenos no teste de ICLIV. Os animais do grupo controle não, vacinados permaneceram como não reagentes ao testes de ICLIV durante todo o período de execução do experimento.

Na tabela 8 são apresentados os intervalos de confiança 95% (PIZZI, 1950) das médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes para o antígeno, estirpe LPF, dos soros das matrizes suínas imunizadas com bacterina experimental produzida com a estirpe LPF, segundo a diluição da vacina empregada na imunização.

Tabela 8 - Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para o antígeno LPF, em soros de matrizes suínas segundo a diluição da bacterina antileptospirose empregada - São Paulo - 2012

Dia	Média Anticorpos neutralizantes $\pm$ IC (95%)
	Pura
0	0 $\pm$ 0
30	0,30 $\pm$ 0,15
60	0,82 $\pm$ 0,18
90	0,78 $\pm$ 0,16
120	0,55 $\pm$ 0,16
150	0,46 $\pm$ 0,15
180	0,91 $\pm$ 0,14

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

4.3.3 Avaliação da imunidade ativa em leitões desmamados – Experimento 3

Na tabela 9 são apresentados os intervalos de confiança 95% (PIZZI, 1950) das médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes para a estirpe LPF dos soros de leitões imunizados com bacterina experimental produzida com a estirpe LPF, segundo as concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiras/mL da bacterina antileptospirose empregada na imunização.

Tabela 9 - Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para a estirpe LPF, em soros de leitões segundo as concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiras/mL da bacterina antileptospirose empregada - São Paulo - 2012

Dia	Média Anticorpos neutralizantes $\pm$ IC (95%)			
	10^6	10^7	10^8	10^9
0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
30	0,04 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,04	1,054 $\pm$ 0,15
60	0,04 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,14	1,40 $\pm$ 0,18

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

No gráfico 7 são apresentados os títulos de anticorpos aglutinantes para a estirpe LPF dos soros de leitões imunizados com bacterina experimental produzida a estirpe LPF, segundo as concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiras/mL da bacterina antileptospirose empregada na imunização.

Gráfico 7 - Média geométrica dos títulos de aglutininas antileptospiras (log), reação de SAM efetuada com a estirpe LPF em soros de leitões segundo as concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiras/mL da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012

Os leitões imunizados com as bacterinas nas concentrações de 10^8 e 10^9 leptospiras/mL foram os primeiros a produzir títulos médios de aglutininas detectáveis pela SAM (Gráfico 7), cujos valores persistiram em níveis crescentes até o final da observação (60 dias). Os animais do grupo controle não vacinados, permaneceram como não reagentes aos testes de SAM para a estirpe LPF durante todo o período de execução do experimento.

No gráfico 8 são apresentados as médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes para a estirpe LPF dos leitões imunizados com bacterina experimental produzida com a estirpe LPF, segundo as concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiras/mL da bacterina antileptospirose empregada na imunização.

Gráfico 8 - Média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes (log), para o teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* com a estirpe LPF em soros de leitões segundo as concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiros/mL da bacterina antileptospirose empregada e o tempo expresso em dias após primo-vacinação – São Paulo – 2012

Todas as concentrações da bacterina experimental testadas em leitões desmamados produziram títulos de anticorpos neutralizantes detectáveis pelo teste de ICLIV (Gráfico 8) aos 30 e 60 dias após a primo-vacinação. Todavia quanto menor foi a concentração da bacterina menores foram os títulos de anticorpos inibidores produzidos contra o antígeno vacinal. Os animais do grupo controle não vacinados, permaneceram como não reagentes aos testes de ICLIV para a estirpe LPF durante todo o período de execução do experimento.

4.3.4 Avaliação da imunidade passiva em leitões em aleitamento – Experimento 4

O gráfico 9 apresenta a curva de títulos de aglutininas, passivamente transferidos para os leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina experimental pura produzida com a estirpe LPF, empregando-se como antígeno do teste de ICLIV a estirpe LPF.

Gráfico 9 - Média geométrica dos títulos de aglutininas antileptospiras (log), reação de SAM efetuada com a estirpe LPF em soros de leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina pura, segundo a idade dos animais expressa em dias – São Paulo – 2012

O gráfico 10 apresenta a curva de títulos de anticorpos neutralizantes, passivamente transferidos para os leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina experimental pura produzida com a estirpe LPF, empregando-se como antígeno do teste de ICLIV a estirpe LPF.

Gráfico 10 - Média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes (log), para o teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* com a estirpe LPF em soros de leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina pura, segundo a idade dos animais expressa em dias – São Paulo – 2012

Os títulos de anticorpos aglutinantes, transferidos passivamente para os leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina experimental pura, foram de curta duração, sendo detectados apenas no quinto dia de vida (Gráfico 9), o mesmo não ocorreu com os anticorpos neutralizantes transferidos passivamente, detectáveis no quinto e décimo dia de vida, porém com títulos menores que os aglutinantes (Gráfico 10).

Na tabela 10 são apresentados os intervalos de confiança 95% (PIZZI, 1950) das médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes dos soros de nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina antileptospirose pura produzida com a estirpe LPF, empregando-se como antígeno a estirpe LPF.

Tabela 10 - Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para a estirpe LPF, em soros de leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas com a bacterina antileptospirose pura - São Paulo - 2012

Dia	Média Anticorpos neutralizantes $\pm$ IC (95%)
	Pura
5	0,40 $\pm$ 0,13
10	0,37 $\pm$ 0,14

LPF - *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki, estirpe Pomona Fromm

5 DISCUSSÃO

Nos ensaios realizados em hamsters para a padronização da concentração mínima de leptospiras a ser empregada na bacterina antileptospirose (Tabela 3) apenas a preparação ajustada para concentração de 10^9 leptospiras/mL, diluída na proporção de 1:800, protegeu os hamsters contra a infecção provocada pela estirpe LPF e, portanto foi aprovada segundo os critérios internacionais CFR 113.101 (UNITED STATES OF AMERICA, 2006). De fato, no presente ensaio não houve mortes no grupo de hamsters vacinados, no grupo controle morreram oito animais e o número de doses infectantes realmente empregadas no desafio foi de 631 DL_{50} . Os resultados do presente trabalho concordam com os obtidos por Freudenstein e Hein (1991) que obtiveram 100% de proteção contra a letalidade quando imunizaram hamsters com bacterinas produzidas com os sorovares Canicola, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, contendo $1,2 \times 10^9$ leptospiras/mL por sorovar.

Apesar de não estar previsto no protocolo internacional de avaliação de bacterinas comerciais antileptospirose, o Experimento B (Tabela 4), avaliou diferentes diluições da bacterina, para que fosse possível o estabelecimento do menor nível de anticorpos neutralizantes em suínos vacinados com uma bacterina antileptospirose que correspondesse a aprovação no teste de potência. Os resultados obtidos no teste de potência em hamsters atenderam as exigências internacionais e a bacterina experimental foi aprovada destacando-se que mesmo nas diluições de 1:1600 a 1:6400, o número de sobreviventes ainda esteve dentro dos critérios mínimos exigidos para aprovação (8/10) ultrapassando assim em oito vezes a diluição mínima para bacterina antileptospirose suína (800) e foi apenas a partir da diluição de 1:12800 que o número de sobreviventes passou a ser inferior ao limite estabelecido (8/10).

Os valores apresentados na tabela 4 revelaram que as menores diluições da bacterina apresentaram os melhores resultados tanto no teste de desafio quanto no teste de ICLIV para a estirpe LPF. Estes resultados indicaram que uma maior massa antigênica poderia induzir maior produção de anticorpos e em consequência melhor proteção. Bolin et al. (1991) referiram que o aumento da massa antigênica da amostra Hardjoprajitno em uma vacina pode aumentar a sua antigenicidade e, consequentemente, a proteção conferida pela mesma. Resultados semelhantes foram obtidos por Favero et al. (1997) quando vacinaram três grupos de bovinos com bacterinas antileptospirose contendo os sorovares Pomona, Hardjo Icterohaemorrhagiae e Wolffi com concentrações de leptospiras variando de $9,8 \times 10^5$ a $13,2 \times 10^7$ por mililitro.

As proporções de hamsters imunizados e sobreviventes ao desafio durante 21 dias, eutanasiados nesta data e caracterizados como portadores renais de leptospiros apresentadas nas tabelas 3 e 4, demonstraram que a bacterina experimental na concentração de 10^9 leptospiros/mL e diluída 1:800 conferiu proteção para o estado de portador renal, sendo aprovada pelas normas internacionais. Bey e Johnson (1982) e Bolin et al. (1989) relataram que bacterinas antileptospirose podem proteger contra o desenvolvimento da doença, porém alguma vezes não conseguem impedir a infecção e o estabelecimento do estado de portador renal.

De fato as principais dificuldades observadas para a comparação das técnicas de PCR e de isolamento por cultivo em meio de cultura são a baixa sensibilidade do isolamento devido ao fastidioso crescimento das leptospiros (MÉRIEN et al., 1995) e a presença de microrganismos contaminantes que podem inibir o crescimento das leptospiros (SCHONBERG, 1981). Além disso, a técnica de PCR detecta apenas material genético do microrganismo não necessitando de leptospiros viáveis, como ocorre no isolamento (BAL et al., 1994).

Vanasco et al. (2003) comparou a relação entre os resultados dos testes sorológicos com os dos ensaios empregados para a detecção de leptospiros por isolamento em meio de cultura ou pela PCR e observou uma baixa concordância, atribuindo tal fato ao curto período de eliminação de leptospiros na urina, principalmente por sorovares não adaptados ao hospedeiro.

Marchiori Filho (2007) avaliou a eficácia de vacinas experimentais formuladas com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola com adjuvantes de saponina ou hidróxido de alumínio em hamsters, e obteve 100% de proteção contra a letalidade por leptospirose. Entretanto as vacinas testadas não protegeram os animais contra a condição de portadores renais e genitais independente do tipo de adjuvante utilizado na sua preparação. Tabata et al. (2002) também relatou a incapacidade da bacterina antileptospirose proteger contra o estabelecimento da condição de portador renal de leptospiros.

Em ensaios efetuados a campo a proteção conferida por bacterinas antileptospirose, não foi capaz de eliminar a condição de portador renal e a consequente leptospiúria. De fato, o poder imunogênico destas bacterinas é baixo e gera títulos de anticorpos aglutinantes pós-vacinas de baixa intensidade e de curta duração (LEVETT, 2001; ARDUINO et al., 2004).

A reação de SAM é o método de referência para o diagnóstico sorológico da leptospirose recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e vem sendo utilizada para monitorar a resposta imune humoral pós-vacinal (KLAASEN et al., 2003). Contudo esta

técnica detecta predominantemente imunoglobulinas da classe IgM, não relacionadas com o grau de proteção vacinal (COYNE et al., 2001), que são conferidos pelos anticorpos neutralizantes, os quais são predominantemente IgG (HANSON, 1976), sendo detectados pela técnica de ICLIV (TRIPATHY et al., 1973). Os resultados do presente trabalho concordam com os obtidos por Soto et al. (2008b) em suínos e por Nardi Júnior et al. (2010) em búfalos, que observaram a redução nos títulos de anticorpos aglutinantes e neutralizantes aos 90 dias da primo-vacinação com vacinas de subunidades e de membrana externa, respectivamente, e com bacterinas comerciais multivalentes, sendo observada a tendência de persistência dos anticorpos neutralizantes, o que não ocorreu com os aglutinantes.

O aumento dos títulos dos anticorpos aglutinantes e neutralizantes constatado no presente trabalho, após segunda e a terceira imunização apresentados nos gráficos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, demonstrou que a vacina experimental foi capaz de produzir uma resposta com memória imunológica o que ressalta a importância das doses de reforço em um programa de imunoprofilaxia da leptospirose suína (BARRAL, 2005).

Os valores ilustrados nos gráficos 1 e 2 indicaram que a partir do dia 30 após a primo-vacinação houve a soroconversão em todos os grupos de matrizes suínas imunizadas com a bactéria ajustada para conter 10^9 leptospiplas/mL e nas diluições seriadas de razão dois da mesma nas proporções de 1:400 a 1:3200. Este comportamento permaneceu por até 180 dias nas preparações da bactéria diluídas e por 210 dias na bactéria pura. Entretanto entre 150 a 210 dias após a primo-vacinação houve uma queda nos títulos de aglutininas e de anticorpos neutralizantes, período que poderia representar uma fase propícia para o estabelecimento da infecção em um rebanho caso uma estirpe patogênica fosse introduzida no mesmo. Esta constatação indicou a revisão do protocolo de imunização adotado de modo a possibilitar que a revacinação fosse revista em intervalos de tempo inferiores há seis meses. Com base nestes resultados foi realizado o Experimento 2, onde as matrizes receberam a terceira dose da bactéria aos 150 dias da primo-vacinação (Gráficos 5 e 6) ficando demonstrado que com a diminuição do intervalo entre as doses houve a da persistência dos títulos de aglutininas e de anticorpos neutralizantes, detectáveis, respectivamente, pela SAM e pelo teste de ICLIV até o final do experimento (180 dias).

Tripathy et al. (1975), selecionaram soros de animais vacinados não reagentes no teste de SAM que possuíam atividade de inibição de crescimento, demonstrando que esta propriedade é principalmente decorrente da presença de anticorpos da classe G, o que pode ser constatado nos gráficos 3 e 4 em soros de matrizes imunizadas com a bactéria pura por

meio da análise dos níveis de IgG no teste de ELISA. As análises efetuadas mostraram que todos os soros dos animais foram capazes de reconhecer a bacterina durante todo o período do experimento, com títulos médios máximos após a segunda e a terceira imunização (Gráfico 4). Também, foi possível a constatação da ocorrência de um fraco reconhecimento inespecífico destes soros com a bacterina nas diluições iniciais, provavelmente devido à presença de contaminantes oriundos do processo de produção da bacterina, como componentes do meio e/ou devido ao reconhecimento de estruturas semelhantes, como o LPS de outras bactérias gram-negativas, pois não foi realizada a adsorção dos soros com lisados de *E. coli* e *S. enteritidis* (MONARIS, 2010).

Os títulos de anticorpos aglutinantes, passivamente transferidos para os leitões em aleitamento por meio da ingestão do colostro, foram de curta duração, sendo detectados apenas no quinto dia de vida com médias de 1,752 log (Gráfico 9), o mesmo não ocorreu com os anticorpos neutralizantes passivamente transferidos que apesar de serem de menor intensidade, foram detectáveis no quinto e décimo dia de vida, com médias de 0,403 log e de 0,373 log, respectivamente (Gráfico 10). Soto et al. (2008a) avaliaram a imunidade passiva em soros de leitões filhos de porcas imunizadas com bacterina antileptospirose comercial, aos três, oito, 12 e 19 dias constatando a presença de aglutininas, apenas aos três e oito dias de vida após o nascimento. Os resultados obtidos em tal estudo indicaram títulos de anticorpos aglutinantes para o sorovar Hardjo, com médias de 0,912 log e para o sorovar Bratislava, com médias de 0,357 log aos três dias de vida. Aos oito dias de vida houve queda significativa nos títulos de anticorpos aglutinantes, sendo apenas detectadas médias de 0,472 log para o sorovar Hardjo. Contudo, o mesmo não ocorreu em relação aos anticorpos neutralizantes, que não foram detectados nas diversas faixas etárias investigadas. A discrepância de tais resultados com os obtidos no presente experimento podem ser atribuídas ao fato de que a maioria das bacterinas comerciais disponíveis no mercado não confere proteção em hamsters contra a infecção e/ou contra o estabelecimento do estado de portador renal de leptospiras (SOTO, 2006; MUCCILO, 2010).

Apesar de no presente trabalho ter sido constatada a presença de anticorpos neutralizantes nos leitões em aleitamento aos cinco e dez dias de vida, o mesmo não ocorreu em relação aos anticorpos aglutinantes passivamente transferidos. De fato estes resultados podem ser explicados por estudos imuno-químicos pós-absorção colostrar pelos leitões que demonstraram que a IgG representa 80% do total das imunoglobulinas absorvidas pelos suínos e é a mais importante nesta espécie com persistência entre sete e 22 dias e com uma

meia vida de 15,5 dias (PORTER; ALLEN, 1972). Tripathy et al. (1975) demonstrou que a atividade de inibição de crescimento é principalmente em função de IgG.

Os ensaios realizados em leitões desmamados para avaliação das respostas às diferentes concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 leptospiras/mL revelaram que, os leitões imunizados com as concentrações de 10^8 e 10^9 leptospiras/mL produziram títulos médios de aglutininas detectáveis pela SAM a partir de 30 dias após a primo-vacinação (Gráfico 7), mantendo-se até o fim do experimento (60 dias). O mesmo não ocorreu com as concentrações de 10^6 e 10^7 , que induziram títulos de aglutininas detectáveis, no ponto de corte empregado, (1:100) apenas a partir de 60 dias após a primo-vacinação e em menor intensidade. Já os anticorpos neutralizantes, foram detectados em todas as concentrações de leptospiras avaliadas a partir dos 30 dias após a primo-vacinação, mantendo-se até o final do experimento. A média máxima dos títulos de anticorpos neutralizantes foi obtida aos 60 dias da segunda dose de vacina e em maior magnitude para a bacterina empregada na concentração de 10^9 leptospiras/mL (Gráfico 8).

Os dados observados nos gráficos 7 e 8 e na tabela 9 para a bacterina na concentração de 10^9 leptospiras/mL, indicam que a avaliação de uma vacina em uma granja suína poderia ser realizada em leitões recém desmamados. O emprego desta metodologia facilitaria as avaliações da eficácia de bacterinas antileptospirose, uma vez que, não compromete o manejo da granja, pois os leitões são regularmente enviados para o abate por volta dos 160 dias de vida. Esta observação tem grande valia para as indústrias produtoras de vacinas, uma vez que elimina a necessidade da utilização de suínos em fase de reprodução para testes de eficácia de vacinas o que apresenta algumas restrições tais como: o tempo de permanência destes animais em uma granja, a fase reprodutiva na qual se encontra o animal e a possível presença de anticorpos residuais referentes a imunizações passadas.

Com os resultados deste estudo infere-se que bacterina experimental produzida com a estirpe LPF virulenta na concentração de 10^9 leptospira/mL contendo hidróxido de alumínio como adjuvante na proporção de 10 % do volume da dose final, pode ser indicada para ser utilizada em um programa de vacinação antileptospirose em suínos de acordo com as condições ensaiadas. Para a imunização das matrizes o programa de vacinação deve ser realizado por meio de três aplicações de 5mL por animal da bacterina, sendo a primeira aos 60 dias da cobertura, a segunda aos 30 dias após a primo-vacinação e a terceira aos 150 dias da primo-vacinação.

Para a avaliação da resposta conferida pela bacterina antileptospirose em leitões desmamados, uma estratégia para o controle da eficácia da vacina, é a sua avaliação em animais recém-desmamados por meio de duas aplicações de 5mL por animal da bacterina com intervalo de 30 dias, esperando-se que uma vacina que seria aprovada no teste de potência em hamsters deverá induzir títulos de anticorpos neutralizantes nos leitões situados na faixa de 1,05 log e 1,4 log, respectivamente aos 30 dias da primeira dose e da segunda dose.

Os resultados apresentados nos gráficos 9 e 10 e na tabela 10, referentes a imunidade passiva, também indicam uma possível estratégia para o monitoramento do poder imunogênico das bacterinas antileptospirose com o emprego dos ensaios efetuados no soro de leitões em aleitamento, filhos de matrizes imunizadas, permitindo detecção de anticorpos aglutinantes pela técnica de SAM, no quinto dia de vida ou de neutralizantes pela técnica de ICLIV no quinto ou décimo dia de vida.

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 3 e 4, a bacterina experimental na concentração de 10^9 leptospiras/mL e diluída 1:800 da dose recomendada para suínos foi aprovada no teste de potência com desafio em hamsters. Ressalta-se que faixa de variação do título de anticorpos neutralizantes obtido nas matrizes imunizadas, com a vacina 10^9 bactérias por mL e diluída a 1:800, aos 30 dias da primo-vacinação, foram encontrados os valores de 0,20 a 0,46 log e de 0,6 a 0,12 log e aos 60 dias da primo-vacinação, foram de 0,87 a 1,35 log, respectivamente. Enquanto que para os leitões imunizados com a vacina na concentração de 10^9 bactérias por mL a faixa de variação do título de anticorpos neutralizantes aos 30 dias da primo-vacinação foi de 0,9 a 1,06 log e aos 60 dias foi de 1,22 a 1,58 log.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente trabalho, os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- A bacterina experimental na concentração de 10^9 leptospiras/mL, diluída 1:800 conferiu proteção quanto à doença clínica, óbito e estabelecimento do estado de portador renal em hamsters.
- Os resultados dos testes de ICLIV e SAM demonstraram que a partir de 30 dias da primo-vacinação houve soroconversão em todos os grupos de matrizes suínas imunizadas com as diferentes diluições da vacina testada
- Em matrizes suínas imunizadas com a bacterina antileptospirose, a constatação de títulos de anticorpos neutralizantes aos 60 dias da primo-vacinação com duas doses de vacina intervaladas de 30 dias no teste de ICLIV, iguais ou superiores a 0,87log, correspondem a uma vacina que é aprovada no teste de potência com desafio em hamster
- A diminuição do intervalo de revacinação após as duas doses da primo-vacinação determinou um incremento na persistência dos títulos de aglutininas e de anticorpos neutralizantes de matrizes suínas.
- A imunidade passiva induzida pela bacterina experimental na concentração de 10^9 leptospiras/mL foi de curta duração
- Em leitões desmamados imunizadas com bacterinas antileptospirose, a constatação de títulos de anticorpos neutralizantes aos 60 dias da primo-vacinação com duas doses de vacina intervaladas de 30 dias no teste de ICLIV, iguais ou superiores a 1,22log, correspondem a uma vacina que é aprovada no teste de potência com desafio em hamsters.
- O teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* pode ser empregado para a avaliação da qualidade de bacterinas contra a estirpe LPF como alternativa para o teste de potência de bacterinas.

REFERÊNCIAS

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora De Carne Suína. **Estatística**. Disponível em: <http://www.abiceps.org.br> Acesso em: 20 maio, 2011.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle**. Cambrigge: Blackwell Science. 1999. p.569-571.

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**, v. 34, n. 3, p. 865-871, 2004.

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

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

BARANTON, G. The spirochetes: a different way of life. **Bulletin Institute Pasteur**, v. 93, p. 63-95, 1995.

BARRAL, A. **Imunização passiva e ativa**. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina Veterinária da Bahia, 2005. Disponível em < www.ufba.com.br, > Acesso em: 18 jul. 2009.

BEY, R. F.; JOHNSON, R. C. Immunogenicity and humoral and cell-mediated immune response to leptospiral whole cell, outer envelope, and protoplasmic cylinder vaccines in hamsters and dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 43, p. 835-840, 1982.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTTUZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 575-771, 2003.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Veterinary medicine**. 7. ed. London: Baillière Tindall, 1989. p. 758-769.

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

BOLIN, C. A.; CASSELLS, J. A. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar bratislava from stillborn and weak pigs in Iowa. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 196, n. 10, p. 1601-1604, 1990.

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

BOURNE, F. J. Humoral immunity in pig. *The Veterinary Record*, v. 98, n. 22, p. 499-501, 1976.

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. And four new leptospira genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 839-858, 1999.

BRIHUEGA, B.; HUTTER, E. Efficacy of *Leptospira* vaccine in dogs. *Veterinaria Argentina*, v. 12, p. 118-192, 1995.

BROWN, P. D.; LEVETT, P. N. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *Journal Medical Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 173-181, 1997.

BURNSTEIN, T.; BRAMEL, R. G.; JENSEN, J. Vaccination of swine with a leptospira Pomona bacterin. *Veterinary Medicine*, Prague, v. 50, p. 167-171, 1995.

CARVALHO, L. F. O. S. Vacinas e vacinações em suinocultura intensiva. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS – AVESUI, SUINOCULTURA: SAÚDE E MEIO AMBIENTE, 4., 2005, Florianópolis, SC. Anais. Florianópolis: 2005. 14p.

CLARK, L. K. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. *Animal Reproduction Science*, v. 42, n. 1-4, p. 447-454, 1996.

COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PULSSELY, P. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. *Journal of Applied Microbiology*, v. 5, n. 6, p. 976-980, 1973.

COLEMAN, T. J. The Public Health Laboratory Service (PHLS) and its role in the control of zoonotic disease. *Acta Tropical*, v. 76, n. 1, p. 71-75, 2000.

CORTES, 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. wolffi*. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 50, n. 1, 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.

COYNE, M. J.; BURR, J. H.; YULE, T. D.; HARDING, M. J.; TRESNAN, D. B.; MCGAVIN, D. Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. **Veterinary Record**, v. 149, n. 17, p. 509-515, 2001.

DELBEM, A. C. B. **Purificação, caracterização e avaliação da capacidade imunogênica do lipopolissacarídeo (LPS) de Leptospira spp isolada no Brasil associado ao hidróxido de alumínio ou monofosforil lipídio A como adjuvantes**. 2004. 117 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004a.

DELBEM, A. C. B. F.; SILVA, R. L. F.; SILVA, C. A.; MÜLLER, E. E.; DIAS, R. A.; NETO, J. S. F.; FREITAS, J. C. Fatores de risco associados a soropositividade para leptospirose em matrizes suínas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 847-852, 2004 b.

DOBSON, K. J.; DAVOS, D. E. Leptospiral titers in pigs after vaccination. **Australian Veterinary Journal**, v.51, n. 9, p. 443-444, 1975.

DUNNE, H. W.; LEMAN, A. D. **Diseases of swine**. 4th ed. Ames, Iowa, USA: The Iowa State University Press, 1994. Chap. 3, p. 122- 137.

ELLINGHAUSEN, H.C.; McCULLOUGH, W.G. Nutrition of Leptospira Pomona and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex. **American Journal Veterinary Research**, v.26, p. 39-44, 1965.

ELLIS, W. A. Leptospirosis. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J.; LEMAN, A. D. **Diseases of swine**. 7. ed. Ames: Iowa State Univ., 1989. p. 483-493.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982. 171 p. (WHO off set publication, 67).

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

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

LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; STEIGERWALT, A. G. Leptospira broomii sp. isolated from humans with leptospirosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 671-673, 2006.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n. 1, p. 59-65, 2004.

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**, v. 64, n. 2, p. 45-55, 1997.

- FRANCIS, M. J.; OULDRIDGE, E. J.; BLACK, L. The antibody response in bovine pharyngeal fluid following foot-and-mouth disease vaccination and exposure to live virus. **Research in Veterinary Science**, v. 35, p. 206-210, 1983.
- FRANÇOIS, S.; GUALTIERI, C.; CARAB, S.; CREIXELL, B.; CAPELLETTI, G.; ANTHONY, L. Estudio serologico posterior a la vacunación contra leptospirosis em porcines. **Veterinaria Argentina**, v. 12, n. 118, p. 530-533, 1995.
- FREITAS, J. C.; SILVA, F. G.; OLIVEIRA, R. C.; DELBEM, A. C. B.; MÜLLER, E. E.; ALVES, L. A.; TELES, P. S. Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciência Rural**, 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 Diseases**, v. 14, n. 3, p. 229-234, 1991.
- GALTON, M. M.; SULZER, C. R.; SANTA ROSA, C. A.; FIELDS, M. J. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 81-85, 1965.
- GREENE, C. E.; SCHULTZ, R. D. Immunoprophylaxis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Elsevier, 2006.
- GONÇALES, A. M. **Avaliação de vacinas antileptospirose. Relação entre o teste de inibição de crescimento de leptospiros in vitro e o teste de desafio em hamsters**. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- GONZALEZ, Y. H.; DÍAZ, E. M. F.; MATOS, B. O. Método para revitalizar lãs cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en los ensayos de potencia de la vacuna antileptospirósica. **Health Is Good News**. Buenos Aires, v. 3, n. 4, 1999.
- GUIDA, V. O. Identificação sorológica de amostras de leptospiros (*L. hyos*), isoladas de suínos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 25, p. 73-75, 1958.
- GUIDA, V. O. Sobre a presença de leptospira em suínos no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 18, p. 285-287, 1947
- GUIAMARAES, M. C.; CORTES, J.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H. Epidemiologia e controle da leptospirose bovina. Importância do portador renal e do seu controle terapêutico. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 6/7, n. 1/4, p. 21-34, 1983.
- GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, n. 14, p. 1263-1276, 1995.
- HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein Lip32 is a lipoprotein expresse during mammalian infection. **Infection Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HANSON, L. E. Bovine Leptospirosis. **Journal of Dairy Science**, 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**, v. 170, n. 9, p. 991-994, 1977.

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

KLAASEN, H. L.; MOLKENBOER, M. J.; VRIJENHOEK, M. P.; KAASHOEK, M. J. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 1-2, p. 121-132, 2003.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like protein elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 29, p. 1545-1552, 2004.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present and future. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, p. 210-214, 2005.

LANGONI, H.; CABRAL, K. S. M.; JACOB, H. Inquérito soroepidemiológico para leptospirose suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1995, Blumenau, Anais Blumenau, 1995. p. 153

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

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

LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infection Disease**, v. 36, p. 447-452, 2003.

LEVETT, P. N., MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; STEIGERWALT, A. G. *Leptospira broomii* sp. novel isolated from humans with leptospirosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 671-673, 2006.

LILENBAUM, W.; VARGES, R. A.; RISTOW, R.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 16-19, 2009

MACEDO, N. A.; MORAIS, Z. M.; CAMARGO, C. R. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; NÜMBERGER 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 *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 194-200, 2004.

MAILLOUX, M. Leptospiroses=Zoonoses. **International Journal of Zoonoses**, v. 78, n. 12, p. 1158-1159, 2001.

- MALYAVIN, A. G.; SOLOVEVA, V. S.; SHUPLIKO, A. H.; POBEGAEV, V. S.; GLUSHKOV, A. A. Immunogenicity of leptospirosis vaccines. **Veterinary**, Moscow, n. 3, p. 56-57, 1971.
- MANCUSO, P. C. Titulagens: Kärber ou Reed_Muench? **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 2, p. 59-71, 1974.
- MANUAL DE CONTROLE DA LEPTOSPIROSE. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 1995. p. 98.
- MARBEHANT, P. Leptospiral vaccines batch potency testing. European monograph status review. **Pharmeuropa**, v. 99, n.2, p. 11-16, 1999.
- MARCHIORI FILHO, M. Indução do estado de portador renal e genital pela *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe, da via de inoculação e da vacinação. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MARSHALL, R. B.; BASKERVILLE, A.; HAMBLETON, P.; ADAMS, G. D. J. Benign leptospirosis: the pathology of experimental infections of monkeys with *Leptospira interrogans* serovars balcanica and tarassovi. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 61, n. 2, p. 124-131, 1980.
- MATSUNGA, 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**, Marborough house, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.
- MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRON, I. Polymerase Chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2219-2224, 1992.
- MÉRIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **Journal Infection Disease**, v. 172, n. 1, p. 281-285, 1995.
- MILLAR, B.D.; CHAPPEL, R.J.; ADLER, B.; DRIESEN, S.J.; JONES, R.T. Effect of maternal vaccination on the susceptibility of growing pigs to leptospiral infection. **Veterinary Microbiology**, v. 15, p. 79-87, 1987.
- MIRAGLIA, F.; MORENO, A. M.; GOMES, C. R.; PAIXÃO R.; LIUSON, E.; MORAIS, Z. M.; MAIORKA, P.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; VASCONCELLOS, S. A. Isolamento e caracterização de *Leptospira interrogans* de suínos abatidos no Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 39, n. 3 p. 501-507, 2008.
- MONARIS, D. Avaliação do potencial adjuvante da flagelina FliCi de *Salmonella enterica* sorovar *Thyphimurium* no desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose.

2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MORSI, H. M.; SHIBLEY, G. P. Cellular and whole culture bivalent leptospiral bacterins: safety and potency in guinea pigs and hamsters. **American. Journal of Veerinary Research**, v. 34, n. 1, p. 115-117, 1973.

MUCCIOLO, G.B. **Poder imunogênico de bacterina experimental antileptospirose canina: ensaio em hamsters desafiados com estirpes de leptospiros dos sorovares Copenhageni e Canicola isolados no Brasil.** 2010. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MYERS, D. M. **Manual de métodos, para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis.** Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985.

NARDI JUNIOR, G.; GENOVEZ, M. E.; RIBEIRO, M. G.; CASTRO, V.; JORGE, A. M. An in vitro growth inhibition test for measuring the potency of *Leptospira* spp. Sejroe group vaccine in buffaloes. **Biologicals**, v. 38, p. 474-478, 2010.

NUNES-EDWARDS, P. L.; THIERMANN, A. B.; BASSFORD JR, P. J.; STAMM, L. V. Identification and characterization of the protein antigens of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Infection Immunology**, v.48, n. 2, p. 492 - 497, 1985

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). World Organisation for Animal Health. Leptospirosis, **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.** 2006

OLIVEIRA, S. J.; PIANTA, C.; SITYA, J. Abortos em suínos causados por leptospira Pomona no Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, n. 7, p. 47-49, 1980.

OLIVEIRA, S. J. Causas infecciosas de transtornos reprodutivos em suínos. **A Hora Veterinária**, v. 4, n. 24, p. 13-20, 1985.

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.

PHILLIPS, C.E. Leptospiral vaccine evaluation. **Veterinary Medicine**, v. 53, p. 301-307, 1958.

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

PORTER, P.; ALLEN, W. D. Classes of imunoglobulins related to immunity in the pig. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 160, n. 4, p. 511-520, 1972.

RAMADASS, P.; JARVIS, B. D.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. DNA relatedness among strains of leptospira biflexa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, p. 231-235, 1990.

RAMADASS, P.; JARVIS, B. D.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Genetic characterization of pathogenic Leptospira species by DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 215-219, 1992.

RAPPUOLI, R.; MEDINI, D.; SIENA, E.; BUDRONI, S.; DORMITZER, P. R.; DEL GIUDICE, G. Building an insurance against modern pandemics. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 11, n. 2, p. 126-130, 2010.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal Hygiene**, n. 27, p. 493-497, 1938.

SAMBASIVA, R. R.; NAVEEN, G.; BHALLA, P.; AGARWAL, S. K. Leptospirosis in India and the Rest of World. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.7, p. 178-193, 2003

SANTA ROSA, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; TROISE, C. Isolamento de leptospira Icterohaemorrhagiae e leptospira hyos de suínos abatidos em matadouro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 29, p. 285-291, 1962.

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

SANTA ROSA, C. A.; CAMPEDELI, O.; CASTRO, A. F. P. Suínos como reservatórios de leptospiroses no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 3, n. 40, p. 243-246, 1973.

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; YANAGUITA, R. M.; SILVA, A. S. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of sorovars canicola, pyrogenes and grippotyphosa. **International journal of zoonoses**, v. 7, p. 40-43, 1980.

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.

SCHONBERG, A. Studies on the effect of antibiotic substances on leptospiroses and their cultivation from material with a high bacterial count. **Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology**, v. 249, n. 3, p. 400-406, 1981.

SCHRODER, W. N.; ECKERT, J.; STUBS, G.; SCHUMANN, R. R. Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 329-340, 2008.

SESTI, L.; SOBESTIANSKY, J. **A função da medicina veterinária na suinocultura moderna**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1999. 24 p.

SHIMABUKURO, F. H.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Searching for swine leptospiral carrier by microbial isolation and polymerase chain reaction in kidney samples

from serologically positive and negative animals. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 4, p. 243-253, 2003.

SIDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. **Manual de Produtos Veterinários**. 1. ed. São Paulo: SINDAN, 1997.

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

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, S. **Clínica patológica suína**. 2. ed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1999. 464 p.

SOBESTIANSKY, J. **Sistema intensivo de produção de suínos – Programa de Biossegurança**, Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2002. 50 p. Impressos especiais.

SOTO, F. R. M. **Imunidade ativa e passiva em suínos vacinados contra a leptospirose. Emprego de vacina experimental de subunidades e duas vacinas comerciais de bactérias íntegras**. 2006. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SOTO, F. R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; PINHEIRO, S. R.; BERNARSI, S.R.; CAMARGO, S. R. Leptospirose suína. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 4, p. 379-395, 2007

SOTO, F. M.; PINHEIRO, S. R.; ITO, F. H.; MORAES, Z. M.; GONÇALES, 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-bacteria vaccine. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 327-335, 2008a.

SOTO, F. R. M.; PINHEIRO, S. R.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; AZEVEDO, S. S.; BERNARDI, F.; CAMARGO, S. R.; VASCONCELLOS, S.A. Comparison of agglutinating and neutralizing antibodies to serovar hardjo in sows immunized with two commercial whole culture polivalent anti-leptospira bacterins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 484-488, 2008b.

SRIVASTAVA, S. K. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. **Indian Journal Medicine Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 331-336, 2006.

STALHEIM, O. H. Leptospiral selection, growth, and virulence in synthetic médium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 92, p.946-951, 1996.

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**, v.33, p. 267-270, 2002.

THEVENON, J.; MORLET, B.; COSTA, R.; LAMBERT, C. Kinetics of leptospirosis and antibody rates. A study conducted on cattle at the Port Laguerre Livestock Research Centre. *Rev Elev Med Vet Nouv*, n. 10, p. 7-12, 1987.

THIERMANN, A. B. Isolation of leptospire in diagnosis of Leptospirosis. **Modern Veterinary Practice**, v. 5, n. 10, p. 758-759, 1984a.

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

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, 75., 1971, St. Louis. [**Proceedings...**] St. Louis: Animal Health Association, 1971. p. 138-143.

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

TRIPATHY, D.N.; SMITH, A.R.; HANSON, L.E. Immunoglobulins in cattle vaccinated with Leptospiral bacterins. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n.12, p. 1735-1736, 1975.

UNITED STATES OF AMERICA. Department of Agriculture. CFR 113.101 *Leptospira Pomona* bacterin. **Code Federal Regulation**. Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, sec 113.101 , Washington: Government Printing Office via GPO Access, 2006, p. 685.

UNITED STATES OF AMERICA. Department of Agriculture. CFR 113.44 Swine safety test. **Code Federal Regulation**. Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, sec 113.44 , Washington: Government Printing Office via GPO Access, 2006, p. 668.

VANASCO, N. B.; SEQUEIRA, M. D.; SEQUEIRA, G.; TARABLA, H. D. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 60, n. 3, p. 227-235, 2003.

VARNEY, C. The development of a monoclonal antibody based ELISA for measuring antibodies to canine leptospiral vaccine. **Pharmeuropa**, Special Issue bio, v. 99, n. 2, p. 81-84, 1999.

VASCONCELLOS, S. A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 1, p. 17-24, 1987.

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINI JUNIOR.; O. U.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A. C. M.; FERREIRA, J. S. N. 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.

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

WOO, T. H. S.; PATEL, B. K. C.; SMYTHE, D. L.; SYMONDS, M. I.; NORRIS, M. A.; DOHNT, M. F. Comparison of two PCR methods for rapid identification of *Leptospira* genospecies *interrogans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 155, p. 169-177, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis**: guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO, 2003. p. 107.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 407-415, 1987.

ApêndiceB - Relação dos sorovares de leptospiros utilizadas como antígenos na reação de Soroaglutinação Microscópica aplicada ao diagnóstico de leptopirose – São Paulo – 2012

Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Estirpe
<i>L.interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
		Bratislava	Jez Bratislava
	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
		Butembo	Butembo
	Ballum	Castellonis	Castellon 3
	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
	Celledoni	Whitcombi	Whitcombi
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskova V
<i>L.interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M-20
		Icterohaemorrhagiae	RGA
	Javanica	Javanica	Veldrat Bat 46
	Panama	Panama	CZ 214K
	Pomona	Pomona	Pomona
		Kennewicki	Fromm
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
		Wolffi	3705
	Shermani	Shermani	LT 821
	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin
	Djasiman	Sentot	Sentot
<i>L.biflexa</i>	Andamana	Andamana	CH 11
	Seramanga	Patoc	Patoc-1

Apêndice C - Fluxograma experimental do Teste de inibição de crescimento de leptospiRAS *in vitro* para a estirpe Pomona Fromm de *L. interrogans*, sorovar Kennewicki em soros de suínos - São Paulo - 2012.

Apêndice D - Desvios-padrões das médias das curvas de titulação

Dias após 1ºdose	Diluição										
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600
0*	0,151	0,155	0,132	0,099	0,064	0,049	0,021	0,012	0,007	0,001	0,000
30**	0,084	0,072	0,073	0,053	0,042	0,030	0,019	0,009	0,007	0,003	0,003
60	0,063	0,040	0,049	0,062	0,064	0,063	0,045	0,031	0,030	0,010	0,006
90	0,068	0,068	0,066	0,057	0,061	0,051	0,042	0,025	0,015	0,010	0,006
120	0,117	0,081	0,059	0,073	0,052	0,046	0,028	0,018	0,013	0,007	0,005
150	0,109	0,081	0,107	0,099	0,075	0,058	0,035	0,019	0,010	0,006	0,004
180	0,102	0,072	0,067	0,050	0,039	0,033	0,024	0,015	0,008	0,006	0,004
210** *	0,151	0,141	0,150	0,127	0,104	0,081	0,054	0,041	0,016	0,008	0,006
240	0,079	0,064	0,069	0,049	0,040	0,087	0,085	0,070	0,044	0,025	0,015
270	0,119	0,143	0,144	0,189	0,155	0,109	0,081	0,057	0,034	0,021	0,015
300	0,069	0,080	0,083	0,094	0,095	0,072	0,052	0,032	0,017	0,010	0,007
330	0,085	0,083	0,052	0,069	0,064	0,039	0,030	0,020	0,012	0,007	0,006