GIANCARLO BALOTIM MUCCIOLO

Poder imunogênico de bacterina experimental anti leptospirose
canina: ensaio em hamster desafiados com estirpes de leptospiras
dos sorovares Copenhageni e Canicola isoladas no Brasil

São Paulo

2010

GIANCARLO BALOTIM MUCCIOLO

Poder imunogênico de bacterina experimental anti leptospirose canina: ensaio em hamsters desafiados com estirpes de leptospiras dos sorovares Copenhageni e Canicola isoladas no Brasil

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos

São Paulo

2010

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.2333
FMVZ

Mucciolo, Giancarlo Balotim

Poder imunogênico de bacterina experimental anti leptospirose canina: ensaio em hamsters desafiados com estirpes de leptospiros dos sorovares Copenhageni e Canicola isoladas no Brasil / Giancarlo Balotim Mucciolo. -- 2010.

43 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

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. Vacina. 3. Hamster. 4. Teste de potência. I. Título.

ERRATA

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

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Capa	2º	2ª	canina: ensaio em hamster	canina: ensaio em hamsters

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da proteção cruzada entre os sorovares copenhageni e icterohaemorrhagiae em bacterinas anti-leptospirose canina. Ensaio experimental em hamsters", protocolado sob o nº1824/2009, utilizando 210 (duzentos 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 Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/12/2009.

We certify that the Research "Crossed protection evaluation between bacterial sorovares copenhageni and icterohaemorrhagia on canine anti-leptospirose bacterine. Hamster experimental essay", protocol number 1824/2009, utilizing 210 (two hundred ten) hamsters, under the responsibility Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 12/09/2009.

São Paulo, 10 de dezembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MUCCILOLO, Giancarlo Balotim

Título: Poder imunogênico de bacterina experimental anti leptospirose canina: ensaio em hamsters desafiados com estirpes de leptospiras dos sorovares Copenhageni e Canicola isoladas no Brasil

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos tantos animais que perderam e ainda perdem a vida para que possamos realizar nossas pesquisas visando o bem estar deste outro animal que é o homem.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal por me proporcionar uma excelente base durante esses dois anos.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo espaço e oportunidade cedidos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, um excelente profissional que me acolheu em um momento de muita dificuldade, sempre se mostrando disponível para qualquer obstáculo que pudesse encontrar, e que tenho um profundo respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Fumio Honma Ito, pelo apoio na elaboração do texto na língua inglesa.

As técnicas Zenaide e Gisele, verdadeiras irmãs com espíritos maternos, e, sem as quais este trabalho nunca teria saído do papel.

A veterinária Jane Silveira Fraga por todo tempo dedicado ao auxílio deste projeto.

Aos colegas pós graduandos e estagiários do laboratório que me acolheram e sempre se mostraram disponíveis para me auxiliar.

A minha família por sempre me apoiar em minhas decisões, com um otimismo por vezes exagerado por parte da minha avó e minha mãe, e meu pai, que além de me dar todo incentivo e suporte paternos, ainda me amparou como profissional, e colaboraram, assim, com a realização deste trabalho.

Com carinho todo especial, agradeço a minha noiva, que mesmo após 11 anos ainda acredita e me ajuda com todo amor que sempre me dedicou, mesmo em momentos que nem mesmo eu acreditava que ia conseguir... Te amo muito!

RESUMO

MUCCIOLO, G. B. **Poder imunogênico de bacterina experimental anti leptospirose canina: ensaio em hamsters desafiados com estirpes de leptospiras dos sorovares Copenhageni e Canicola isoladas no Brasil.** [Immunogenic power of an experimental canine antileptospirosis bacterin: assay in hamsters challenged with strains of leptospiras serovars Copenhageni and Canicola isolated in Brazil]. 2010. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

A proteção induzida por uma vacina comercial anti-leptospirose importada, bivalente produzida com estirpes de referência dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola, foi comparada a promovida por uma bacterina experimental, bivalente produzida com as estirpes autóctones M64/06 e LO-4, respectivamente dos sorovares Copenhageni e Canicola, isoladas no Brasil e tipificadas com anticorpos monoclonais produzidos pelo Royal Tropical Institut, Laboratório de Referência da Organização Mundial de Saúde. O ensaio foi conduzido pelo teste de potência com desafio em hamsters. A vacina experimental, bivalente foi inativada com fenol a 37%, ajustada para concentração de 10^8 leptospiras por mL, por sorovar e produzida nas versões com e sem adjuvante hidróxido de alumínio a 0,15%. Os hamsters foram imunizados com 0,25 mL de vacina, via subcutânea em duas aplicações com 15 dias de intervalo. Os desafios foram efetuados com as estirpes LO4 (Canicola) ou L1-130 (Copenhageni) isoladas no Brasil, respectivamente nas diluições de 10^{-3} e 10^{-1} no volume de 0,5 mL via intraperitoneal por animal, 15 dias após a última dose da vacina. A estirpe de desafio do sorovar Copenhageni foi caracterizada, por anticorpos monoclonais, como idêntica a M64/06 e foi escolhida devido a apresentar melhor regularidade em termos de patogenicidade para os hamsters. Decorridos 20 dias do desafio os hamsters sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO₂, necropsiados e nos seus rins foi efetuada a pesquisa do estado de portador de leptospiras por cultivo em meio de Fletcher. Nos desafios efetuados com a estirpe autóctone, L1-130 do sorovar Copenhageni foi obtida a proteção contra a doença clínica em oito de dez animais, para as duas vacinas experimentais, no entanto, entre os sobreviventes, houve portadores renais de leptospiras, em maior número para a vacina sem adjuvante (n=5), quando comparado a vacina acrescida de Al(OH)₃, (n=3); para a vacina comercial a proteção foi total, tanto contra a doença como quanto a infecção não havendo qualquer morte por leptospirose e todos os cultivos renais dos sobreviventes foram negativos para leptospiras. Nos desafios efetuados com a estirpe autóctone, LO4 do sorovar Canicola, a

proteção conferida pelas três vacinas ensaiadas foi total, não havendo mortes por leptospirose e todos os sobreviventes apresentaram resultados negativos para leptospiras nos cultivos de tecido renal. Os números de DL₅₀ empregadas nos inóculos de desafio foram superiores a 10.000, para os dois sorovares ensaiados, pois na titulação dos inóculos morreram mais do que 50% dos animais até a última diluição testada. Foi, portanto, demonstrado a existência de proteção cruzada entre os sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae e que a bacterina importada foi capaz de induzir proteção contra a doença e contra a infecção para estirpes de leptospiras autóctones dos sorovares Canicola e Copenhageni isoladas no Brasil. Nos desafios efetuados com o sorovar Canicola a vacina experimental induziu proteção contra a doença e contra a infecção, mas nos que empregaram o sorovar Copenhageni houve proteção apenas contra a doença, constatando-se menor número de portadores renais de leptospiras entre os animais imunizados com a bacterina experimental acrescida do adjuvante de hidróxido de alumínio.

Palavras-chave: Leptospirose. Vacina. Hamster. Teste de potência.

ABSTRACT

MUCCIOLO, G. B. **Immunogenic power of an experimental canine antileptospirosis bacterin**: assay in hamsters challenged with strains of leptospiras serovars Copenhageni and Canicola isolated in Brazil. [Poder imunogênico de bacterina experimental anti leptospirose canina: ensaio em hamsters desafiados com estirpes de leptospiras dos sorovares Copenhageni e Canicola isoladas no Brasil]. 2010. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

The protection induced by an imported commercial bivalent anti-leptospirosis vaccine produced with the reference strain of the serovars Icterohaemorrhagiae and Canicola was compared to one promoted by an experimental, bivalent bacterial vaccine produced with the indigenous strains M64/06 and LO-4, respectively of the serovars Copenhageni and Canicola isolated in Brazil and typified with monoclonal antibodies produced by the Royal Tropical Institut, Reference Laboratory of the World Health Organization. The assay was conducted by using the potency test with challenge in hamsters. The experimental bivalent vaccine was inactivated with 37% phenol and adjusted at a concentration of 10^8 leptospores/mL, for each serovar and produced in the versions with and without adjuvant (0.15% aluminium hydroxide). The hamsters were immunized by 0.25 mL of vaccine, by subcutaneous route in two applications with 15 days of interval. Fifteen days after receiving the last dose of the vaccine, the challenges were performed by employing the strains LO4 (Canicola) or L1-130 (Copenhageni), which were isolated in Brazil, respectively at the dilution of 10^{-3} and 10^{-1} , in the volume of 0.5 mL/each animal by the intraperitoneal route. The challenge strain serovar Copenhageni has been characterized as identical to M64/06 strain by means of monoclonal antibodies and it was chosen due to its better regularity in terms of pathogenicity determined in hamsters. After 20 days of the challenge, the surviving hamsters were sacrificed in CO₂ chamber, submitted to necropsy and the kidneys were examined to test the carrier state of leptospores by cultivation in Fletcher's medium. In the challenges effectuated with the indigenous strain, L1-130 of the serovar Copenhageni the protection was obtained against the clinical disease in eight of ten animals, for two experimental vaccines, however, among the survivors, there were renal carriers of leptospores, in higher number for the vaccine without containing the adjuvant (n=5), when compared to the one added with Al (OH) (n=3). For the commercial vaccine, the protection was total both against the disease and as for infection, when no death was found in consequence of leptospirosis and all the renal

cultures of the survivors were negative for leptospires. In the challenges performed with the indigenous strain LO4 of the serovar Canicola, the protection conferred by the three vaccines tested was total, without observing any deaths due to leptospirosis and all the survivors presented negative culturing results for leptospires in the renal tissue. The challenge doses of the inocula were superior to 10,000 LD₅₀, for the two serovars tested, since in the titration of the inocula have died more than 50 % of the animals up to the last tested dilution. So, the crossed protection existing between the serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae was demonstrated and that the imported bacterial vaccine was able to induce protection against the disease and against the infection for the native strains of leptospires serovars Canicola and Copenhageni isolated in Brazil. In the challenges effectuated with the serovar Canicola, the experimental vaccine induced protection against the disease and against the infection, but in vaccine employing the serovar Copenhageni, protection was found only against the disease, when less number of renal carriers of leptospires was observed among the animals immunized with the experimental vaccine added with the aluminium hydroxide adjuvant.

Keywords: Leptospirosis. Vaccine. Hamster. Potency test.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Hamsters imunizados contra a leptospirose e desafiados com a estirpe L1-130, do sorovar Copenhageni, segundo o tipo de vacina utilizada, a proporção de mortos por leptospirose e a proporção de cultivos renais positivos para leptospiros entre os sobreviventes ao desafio - São Paulo – 2010	31
Tabela 2 - Hamsters imunizados contra a leptospirose e desafiados com a estirpe LO-4 do sorovar Canicola, segundo o tipo de vacina utilizada, a proporção de mortos por leptospirose e a proporção de cultivos renais positivos para leptospiros entre os sobreviventes ao desafio - São Paulo – 2010	32
Tabela 3 - Proporção de hamsters mortos por leptospirose segundo a diluição do inóculo e a estirpe de leptospira empregada para o desafio - São Paulo – 2010	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µm	Micrômetro
Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DL ₅₀	Dose letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMJH	Ellinghausen, McCullough, Jonhson e Harris
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kg	Kilograma
L.	Leptospira
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	CONCEITUAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	17
2.2	ETIOLOGIA.....	18
2.3	PATOLOGIA	19
2.4	DIAGNÓSTICO	20
2.5	TRATAMENTO.....	22
2.6	CADEIA EPIDEMIOLÓGICA	23
2.7	PREVENÇÃO	24
2.8	IMUNOLOGIA E IMUNOPROFILAXIA.....	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	ANIMAIS	28
4.2	ESTIRPES DE LEPTOSPIRAS AUTÓCTONES ISOLADAS NO BRASIL.....	28
4.3	VACINAS.....	28
4.4	PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS.....	29
5	RESULTADOS	31
5.1	DESAFIO COM A ESTIRPE L1-130 DO SOROVAR COPENHAGENI EM HAMSTERS IMUNIZADOS CONTRA LEPTOSPIROSE.....	31
5.2	DESAFIO COM A ESTIRPE LO-4 DO SOROVAR CANICOLA EM HAMSTERS IMUNIZADOS CONTRA LEPTOSPIROSE.....	32
5.3	TITULAÇÃO DOS INÓCULOS INFECTANTES DAS ESTIRPES DE LEPTOSPIRAS L1-130 E LO-4	33
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose canina, usualmente provocada pelos sorovares Canicola ou Icterohaemorrhagiae, ocorre mundialmente, afetando cães de ambos os sexos, de todas as raças, independentemente de idade, clima e estação do ano.

A imunidade ativa induzida pela imunização com bacterinas anti-leptospirose é sorovar específica, contudo já foi demonstrada a existência de uma parcela de proteção cruzada entre sorovares distintos pertencentes a um mesmo sorogrupo

As vacinas disponíveis para o controle da leptospirose animal são constituídas por bactérias completas inativadas (bacterinas) ou por preparados da membrana externa do microrganismo. Estas vacinas conferem resposta protetora por indução de anticorpos, contra os lipopolissacarídeos LPS, estruturas da membrana externa das bactérias gram-negativas, altamente imunogênicas. Estes imunógenos podem prevenir o desenvolvimento da doença clínica, mas nem sempre previnem a infecção renal e conseqüente leptospirose

Os sorovares de leptospirose já isolados de cães no Brasil foram Canicola Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Pomona, contudo em inquéritos sorológicos realizados nos últimos anos em populações caninas de diversos estados do país os sorovares predominantes tem sido Canicola e Copenhageni. O sorovar Copenhageni, é mantido no Brasil pelos roedores sinantrópicos e destes pode vir a atingir outras espécies com destaque, nas áreas urbanas, para os seres humanos e cães.

O sorovar Copenhageni ainda não faz parte da maioria das bacterinas anti leptospirose canina comercializadas no Brasil e tem sido aventada a existência de proteção cruzada entre os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, pois ambos estão incluídos no mesmo sorogrupo.

As bacterinas antileptospirose canina são produzidas com estirpes de leptospirose de referência, isoladas no exterior que podem apresentar diferenças antigênicas das que circulam no campo.

O poder imunogênico das bacterinas anti-leptospirose é avaliado por testes de potência com desafio em hamsters, nos quais são empregadas estirpes de leptospirose patogênicas capazes de induzir infecção letal nestes animais. Com a disponibilidade de estirpes de leptospirose dos sorovares Canicola e Copenhageni, autóctones isoladas no Brasil patogênicas para hamster o presente trabalho foi delineado para comparar, neste sistema biológico, o poder imunogênico de uma bacterina experimental constituída por cultivos de estirpes

nacionais dos sorovares Canicola e Copenhageni ao de uma bacterina comercial preparada com estirpes de referência dos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae, isoladas no exterior. As estirpes utilizadas para desafio foram as autóctones, nacionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCEITUAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

A leptospirose é uma antropozoonose endêmica de distribuição geográfica cosmopolita, provocada por um microrganismo que apresenta um grande número de variantes sorológicas. Nos reservatórios naturais a infecção apresenta alta morbidade com baixa letalidade, o que a torna insidiosa com tendência a endemicidade. Outro fator que dificulta o seu controle é a grande variedade de animais suscetíveis, com destaque para os mamíferos domésticos (especialmente suínos, bovinos, caninos, eqüinos, ovinos e caprinos) e ainda muitos animais silvestres, sinantrópicos e peri-domiciliares (FAINE, 1999).

Embora o primeiro relato científico da leptospirose em humanos tenha sido efetuado em 1800 por Larrey no Cairo, Egito, foram necessários mais 50 anos, para que Hofer (1850), em um surto canino, relatasse um quadro similar denominado de doença de Stuttgart, contudo, a descrição oficial da leptospirose clínica em humanos foi estabelecida por Weil em 1884 na Alemanha em um surto de uma síndrome caracterizada por febre, icterícia e hemorragias. O agente etiológico desta patologia só foi isolado em 1916 no Japão por Inada et al. 1916.

A infecção dos animais domésticos e do homem por leptospirosas se estabelece, usualmente, pela exposição a coleções de água contaminada pela urina dos reservatórios. As manifestações clínicas são variáveis; de acordo com as relações intrínsecas hospedeiro/parasita que incluem tanto os quadros agudos graves como também infecções inaparentes (LEVETT, 2001). Se o sorovar de leptospirosas for adaptado a espécie animal, como é o caso do Canicola para os cães, os animais geralmente apresentam a forma crônica da doença e passam a ser disseminadores das leptospirosas, porém alguns indivíduos mais suscetíveis podem apresentar o quadro clássico da Doença de Stuttgart (GREENE, 1998).

A forma usual de ocorrência da leptospirose é a endêmica, porém podem ser observados surtos epidêmicos associados, principalmente, aos períodos em que os índices pluviométricos são elevados, e propiciam enchentes e inundações que favorecem a transmissão da zoonose (MASCOLLI, 2002).

2.2 ETIOLOGIA

Diversas bactérias do gênero *Leptospira* causam doenças em seres humanos e animais, porém algumas são saprófitas de vida livre, não patogênicas. Isto levou o subcomitê de taxonomia de leptospiros do comitê internacional de nomenclatura bacteriana a criar duas espécies: *L. interrogans* (patogênicas) e *L. biflexa* (saprófitas) (CORRÊA; CORRÊA, 1992; LEVET, 2001). Entretanto com base na variação dos antígenos de natureza lipopolissacarídica do envelope externo as leptospiros é estabelecida a classificação antigênica que inclui 260 sorovariedades (sorovares ou variantes sorológicas) distribuídas em 25 sorogrupos. Destes 260 sorovares 60 são saprófitas e 200 patogênicos (LEVETT, 2001). Contudo com o advento das técnicas de biologia molecular e com base na homologia do DNA as leptospiros passaram a ser classificadas em 16 espécies genômicas de acordo com o perfil obtido por hibridização de DNA e confirmado pela técnica de *multilocus enzyme electrophoresis* (LEVETT, 2001).

As leptospiros são bactérias móveis, que se deslocam por movimentos de rotação e translação, conferidos pelo filamento axial conhecido como flagelo periplasmático ou endoflagelo localizado no interior do periplasma (FAINE, 1999; QUINN et al., 2005).

As leptospiros não possuem cápsula, não são esporuladas, seu formato é delgado e espiralado, com dimensões de 0,1 a 0,2 μm por 6 a 20 μm , formando ganchos em uma ou nas duas extremidades (CORRÊA; CORRÊA, 1992; LEVETT, 2001). Seu envelope superficial é constituído por três a cinco camadas. Entre tais camadas e a membrana citoplasmática há dois filamentos axiais independentes denominados de endoflagelos, fixados junto a uma das extremidades da bactéria, nos poros de inserção (CORRÊA; CORRÊA, 1992; GREENE, 1998).

A multiplicação das leptospiros é efetuada por fissão transversa, e ocorre de maneira satisfatória em pH 7,2 a 7,4, e em temperaturas de 10 a 34°C. São facilmente destruídas pela dessecação, aquecimento a 60°C, pequenas variações do pH neutro e pela ação dos desinfetantes comuns, porém podem, persistir viáveis por semanas a meses em ambiente com água e pH neutro ou levemente alcalino (CORRÊA; CORRÊA, 1992; FAINE, 1999).

2.3 PATOLOGIA

Quando um animal suscetível entra em contato com as leptospiplas, ocorre à penetração dos microorganismos via pele lesada e, a seguir, a sua disseminação pela corrente sangüínea (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Surgem então pequenas lesões do endotélio vascular provocadas pela própria ação das bactérias, que redundam em hemorragias e na formação de pequenos trombos, que promovem áreas de infarto por bloqueio do afluxo de sangue (FAINE, 1982).

No período de leptospiremia, as leptospiplas disseminam-se por vários órgãos, como sistema nervoso central, olhos e trato genital, mas há uma predileção pelo fígado, baço e rins (GREENE, 1998). Este período com duração variável de dois dias a uma semana é caracterizado por discreta febre. A seguir ocorre a resposta humoral, com produção de anticorpos que passam a combater as leptospiplas circulantes. Contudo tais anticorpos não atingem concentrações elevadas nos túbulos contornados renais, onde os microorganismos podem permanecer por períodos de tempo prolongados (FAINE, 1999).

As leptospiplas replicam-se nos rins, e são eliminadas pela urina (leptospiruria). Nos animais de produção também ocorre à eliminação das leptospiplas no sêmen e em corrimentos vaginais (ELLIS, 1994).

As lesões de uveítes e nefrites intersticiais podem ocorrer na fase crônica da leptospirose devido à deposição de imunocomplexos, *in vivo*, que provocam reações de hipersensibilidade do tipo III (TURNER, 1967).

Nos cães, os sintomas da leptospirose durante a leptospiremia são: febre, mucosas hipocoradas, anorexia, letargia, fraqueza muscular, vômitos, desidratação, dores musculares e diarreia (RENTKO et al., 1992; WOHL, 1996; GREENE et al., 1998; DZIEZYC, 2000; MCDONOUGH, 2001).

As duas formas clínicas da leptospirose mais observadas nos cães são:

1. **Hepatonefrítica:** Com comprometimento hepático e renal, causada pelo sorovar *Icterohaemorrhagiae* – Doença hemorrágica aguda que pode levar a óbito em 24 a 48 horas por falência hepática e renal severas, caracterizadas, respectivamente, por icterícia e uremia, no entanto também pode ocorrer a forma anictérica (KOGIKA et al., 1992) com grave comprometimento renal;

2. **Nefrítica:** Comprometimento renal, causada pela soravarietade Canicola – Desenvolvimento nos casos mais graves de insuficiência hepática e uremia, que se traduz em gastroenterite urêmica, estomatite e glossite (MASCOLLI, 2002); porém nos casos mais “benignos” ocorre nefrite intersticial crônica com eliminação de leptospiras por longos períodos de tempo.

Os sorovares Grippotyphosa, Pomona, Autumnalis, Bataviae, também podem provocar manifestações clínicas em cães, semelhantes às determinadas pelos sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola, porém o mais comum são as formas anictéricas (PRESCOTT et al., 1991; BROWN et al., 1996; HARKIN et al., 1996; WARD et al., 2002). Na maioria das vezes, o diagnóstico é estabelecido em animais que apresentam quadro mórbido de comprometimento renal.

A leptospirose canina, usualmente provocada pelos sorovares Canicola ou Icterohaemorrhagiae, ocorre mundialmente, afetando cães de ambos os sexos, de todas as raças, independente de idade, clima e da estação do ano (HAGIWARA et al., 1975; THIERMANN, 1980; VENKATARAMAN et al., 1993; WEEKS, et al., 1997; FAVERO et al., 2002; BROD et al., 2005; MODOLO et al., 2006).

2.4 DIAGNÓSTICO

A despeito da análise clínica e epidemiológica de um indivíduo usualmente conduzir a suspeita da leptospirose, a confirmação só será possível com o isolamento do agente ou a detecção de anticorpos específicos. Nos exames laboratoriais diretos os materiais colhidos podem ser sangue e líquido, fase aguda (pico febril) e urina durante a leptospirose. No caso de necrópsias é recomendado o exame de amostras de fígado e rim (SANTA ROSA, 1970).

Os métodos mais utilizados são:

- Microscopia de campo escuro: Aplicada ao exame de sangue ou urina (mais de uma semana de infecção) a fresco. Exige experiência profissional da pessoa que irá realizar o exame e possui baixa sensibilidade e especificidade (BOLIN, 1996; MCDONOUGH, 2001; LEVETT, 2001);
- Imunofluorescência direta: também muito dependente de técnicos treinados, é efetuada com sangue, sedimento urinário e tecidos (BOLIN, 1996);
- Colorações pela prata: aplicadas em esfregaços de sangue ou macerado de órgãos, que permitem a visualização das leptospiros em campo claro, mas possuem baixa sensibilidade (principalmente em animais com infecção crônica que apresentam poucas bactérias) (BOLIN, 1996);
- Inoculação em animais de laboratório: são efetuadas pela via intraperitoneal, o hamster é o animal de escolha devido a sua alta sensibilidade a bactéria, normalmente com evolução fatal em menos de dez dias (CORRÊA; CORRÊA, 1992; LANGONI, 2006);
- Métodos de cultivo: o sangue deve ser utilizado quando colhido durante a bacteremia, já a urina tem seu período ideal após 15 dias da infecção. O período de crescimento é longo e os meios de cultura são específicos, como o meio sintético de Fletcher, que exige, no mínimo, seis semanas de incubação (CORRÊA; CORRÊA, 1992);
- Reação de polimerase em cadeia (PCR): nesse método a detecção da bactéria é efetuada pelos elementos do seu DNA, possui sensibilidade e especificidade elevadas (HARKIN, 2003), porém pode apresentar reações cruzadas com leptospiros saprófitas e não possibilita a identificação dos sorovares ou sorogrupos (BOLIN, 1996).

Os métodos de laboratório indiretos são os que revelam os anticorpos produzidos pelo hospedeiro devido à infecção pelas leptospiros. Existem vários testes: provas de soroaglutinação (macroscópica, microscópica, aglutinação em látex, hemaglutinação), fixação de complemento, imunofluorescência indireta e ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), porém, dos citados, o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos

vivos, considerado pela Organização Mundial de Saúde como “padrão ouro” é um procedimento complexo e limitado a laboratórios especializados (VASCONCELLOS, 1979).

Na SAM, o soro suspeito é colocado em contato com uma coleção de antígenos mantidos no laboratório que deve conter pelo menos um sorovar por sorogrupo além das estirpes isoladas na região (FAINE, 1982). Nos soros positivos ocorre a reação de aglutinação, que é observada em microscópio óptico com condensador de campo escuro. O título de anticorpos para um sorovar é a recíproca da maior diluição do soro do animal em que ocorre a aglutinação de 50% das leptospiros do controle do antígeno. (BOLIN, 1996; LEVETT, 2001).

O principal problema na SAM são as reações cruzadas, registradas durante a fase aguda da doença (PRESCOTT, 1991), porém, nesse caso, aceita-se como infectante o sorovar que apresenta o maior título de anticorpos, a não ser que esse valor seja igual para sorovares distintos. Esse problema, de maneira geral, não ocorre na fase crônica da leptospirose, onde predominam as reações para o sorovar infectante (BOLIN, 1996; MCDONOUGH, 2001).

Uma limitação da SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose é o fato da resposta humoral não ser acionada em intensidade suficiente para ser detectada no exame na primeira semana da infecção, de modo que uma doença aguda seguida de morte pode ser negativa ao teste sorológico (BOLIN, 1996).

2.5 TRATAMENTO

As leptospiros são sensíveis a diversos antibióticos: penicilinas, cefalosporinas, estreptomicina, dihidroestreptomicina e tetraciclina (WOHL, 1996; DZIEZYC, 2000). Na fase aguda o tratamento indicado é: Penicilina G potássica e penicilina benzatina, 40.000U/Kg, associada à estreptomicina. Administrar novamente após cinco dias, continuando o tratamento posteriormente com ampicilina 20 mg/Kg/12 horas por 10 dias. Caso o animal apresente uremia, não se deve utilizar estreptomicina, e sim penicilina potássica (40.000 U/Kg intravenosa a cada 12 horas) e ampicilina (20 mg/Kg a cada 12 horas por 10 dias) (WOHL, 1996; DZIEZYC, 2000).

O tratamento inespecífico da leptospirose consiste na manutenção e reposição de líquidos e eletrólitos, que pode ser feito com solução de Ringer com glicose 2,5% a cada 12 horas. Caso apareçam sintomas referentes a desordens de coagulação (manifestação

hemorrágica – quadros mais graves podem apresentar enterorragia e púrpura cutânea), devem ser utilizadas medidas para deter e, se necessário, repor a perda sanguínea: Vitamina K (1 mg/Kg a cada 24 horas); vitamina C (10 a 20 mg/Kg a cada 24 horas – fator fibroblático); gluconato de cálcio 20 a 25% (1 mL/Kg a cada 12 horas – complementação dos fatores de coagulação) e até transfusão sanguínea (WOHL, 1996; DZIEZYC, 2000).

A dieta nos casos clínicos de leptospirose canina deve ser sempre energética, evitando-se ao máximo possível as gorduras que só fariam sobrecarregar e agravar o funcionamento do fígado, e as proteínas que aumentam a albuminúria comprometendo a função renal (CORRÊA; CORRÊA, 1992; LANGONI, 2006).

2.6 CADEIA EPIDEMIOLÓGICA

As principais fontes de infecção são os animais infectados, no período de leptospirúria. Os reservatórios naturais mais freqüentes são suínos, bovinos, cães e alguns animais silvestres dependendo da sorovariedade (WOHL, 1996); bem como o *Rattus norvegicus* (ratazana de esgoto), considerado como o portador são universal (HARTSKEERL, 1996).

As vias de eliminação das leptospiras são urina (durante o período de leptospirúria), sêmen, material de aborto e as secreções vaginais (CORDEIRO et al., 1981).

Entre os animais, os suínos, bovinos e os cães são mais afetados que os eqüinos, caprinos e ovinos. Não há especial predileção por sexo ou faixa etária (FAINE, 1982).

A infecção por leptospiras é direta quando há superposição de superfícies corpóreas entre a fonte de infecção e os suscetíveis, como na cópula e indireta quando o suscetível entra em contato com as leptospiras presentes em elementos do ambiente tais como solo, água, alimentos ou fômites contaminado pela urina ou secreções de um animal infectado (ELLIS, 1984; CORRÊA; CORRÊA, 1992).

A penetração das leptospiras pode ocorrer de maneira ativa, pelas mucosas oral, nasal, conjuntival, pele lesada ou até íntegra. A infecção via pele íntegra é possível quando o indivíduo permanece por um longo período de tempo em contato com a água, o que acarreta uma dilatação dos poros da derme e facilita a entrada das bactérias (BLENDEN, 1976).

2.7 PREVENÇÃO

As medidas de profilaxia e controle da leptospirose podem ser aplicadas nos três elos da cadeia epidemiológica: fontes de infecção, vias de transmissão e susceptíveis.

As fontes de infecção representadas por animais domésticos e de produção devem ser tratadas para sustar a eliminação de leptospiras e a contaminação ambiental. No caso dos roedores sinantrópicos, o que deve ser feito é o controle de suas populações, tanto no meio rural, como no urbano (FURTADO et al., 1997; JOUGLARD et al., 2000; HOMEM et al., 2001; MASCOLLI et al., 2002).

No combate aos roedores sinantrópicos, são destacadas medidas de anti-ratização (conjunto de medidas com a finalidade de evitar a instalação e proliferação desses animais impedindo o seu acesso a água, alimento e abrigo) e a desratização (eliminação os roedores já existentes em determinada propriedade ou zona urbana). A desratização é efetuada por três formas: métodos mecânicos (ratoeiras); químicos (raticidas) e biológicos (gatos, bactérias específicas). No relativo aos métodos químicos já foi confirmada a resistência aos anticoagulantes, como a warfarina em diversos países do mundo e inclusive no Brasil (CARVALHO NETO, 1986; BRASIL, 2002);

Com relação às vias de transmissão, o que mais se destaca é a questão do saneamento básico, tanto nas grandes cidades quanto no campo; nesse último um cuidado especial deve ser tomado com o destino dos restos de abortamento dos animais de produção, evitando-se que cães tenham contato com esses materiais ou que ocorra a sua interação com animais silvestres. Outros pontos importantes vão desde a eficiência da colheita de lixo até a implantação de estratégias de engenharia sanitária que controlem a ocorrência de enchentes e inundações (BRASIL, 2005).

No caso dos seres humanos o controle da leptospirose ocupacional apóia-se no uso de botas, luvas e de vestimentas adequadas, bem como no esclarecimento dos praticantes de esportes sobre o risco e das formas de contágio da doença. Lembrar que a leptospirose humana é conhecida como doença dos plantadores de arroz ou doença dos criadores de suínos, e nesses casos a orientação para o uso de botas já ajudará em muito na proteção individual; melhor ainda, se pudessem usar luvas apropriadas e adequadas para as atividades que desempenham (BRASIL, 2005).

A profilaxia aplicada aos bovinos, suínos e caninos suscetíveis apoiá-se na imunização regular e sistemática de preferência com vacinas produzidas com as sorovariedades de leptospiros de ocorrência regional (CORRÊA; CORRÊA, 1992; FAINE, 1999).

2.8 IMUNOLOGIA E IMUNOPROFILAXIA

A resposta imunológica contra a leptospirose é tanto celular quanto humoral. Após a entrada da espiroqueta no hospedeiro as células T e células B dependentes são estimuladas. A eliminação do microrganismo é efetuada inicialmente por fagócitos e a maioria das leptospiros é digerida nos vacúolos de macrófagos e neutrófilos. A atividade fagocítica das células polimorfonucleadas é iniciada por anticorpos opsonizantes (SAMBASIVA et al., 2003). Embora a resposta imune celular seja considerada importante, a supressão das células mediadoras costuma ocorrer durante a infecção, com redução no número de linfócitos CD_4^+ , bem como, de sua capacidade de resposta a antígenos (LEVETT, 2001). A resposta de anticorpos contra a leptospirose é clássica, onde aparece primeiro um pico no nível de IgM, rapidamente seguido por produção de IgG, que persiste por mais tempo (SAMBASIVA et al., 2003).

O desenvolvimento e aprimoramento de vacinas multivalentes, protetoras e de amplo espectro contra a leptospirose tem sido continuamente pesquisado. Neste sentido, as proteínas de membrana externa das leptospiros têm sido os maiores alvos para o desenvolvimento de imunógenos (FAINE, 1999).

As práticas convencionais de desenvolvimento de vacinas têm sido, substituídas por uma nova metodologia que otimiza as pesquisas e a sua produção, tendo como base a identificação de alvos potenciais, formas mais eficazes de administração dos antígenos e da sua apresentação às células do sistema imune.

As vacinas convencionais, de leptospiros completas inativadas, podem provocar algumas reações indesejáveis que incluem o choque anafilático (KOIZUMI; WATANABE, 2005). A duração da imunidade obtida com tais vacinas é curta, requerendo novas imunizações, sendo dirigida, principalmente, para frações celulares do patógeno, como por exemplo, proteínas de membrana externa e não contra a célula inteira. A imunidade conferida por estas vacinas é sorovar específica e a existência de proteção cruzada entre sorovares

distintos ou entre diferentes estirpes de um mesmo sorovar é um ponto ainda discutido (TABATA, 2002; MCBRIDE et al., 2005).

A engenharia genética tem despontando como uma alternativa para o melhoramento das vacinas já existentes e para o desenvolvimento de novas vacinas, as chamadas vacinas recombinantes. Estas vacinas podem ser desenvolvidas de diversas maneiras, dependendo do antígeno em questão e do tipo de resposta imune que se busca desencadear contra ele. Dentre os tipos de vacinas recombinantes atualmente disponíveis são referidas: vacinas de DNA, vacinas vetorizadas e vacinas de subunidades (KREUZER; MASSEY, 2002).

Nas vacinas contra a leptospirose os antígenos mais efetivos são as proteínas da membrana externa das leptospiras patogênicas (KOIZUMI; WATANABE, 2005) e já foi comprovado que no soro de pacientes com leptospirose há anticorpos contra diversos antígenos protéicos (GUERREIRO et al., 2001).

Embora o sorovar Copenhageni já tenha sido isolado de cães do Brasil e, na atualidade, seja um dos sorovares predominantes nos inquéritos sorológicos efetuados em populações caninas de áreas urbanas, o mesmo ainda não faz parte da formulação da maioria das bacterinas anti leptospirose canina comercializadas no Brasil (AVILA, 1998; JOUGLARD, 2000; MASCOLLI, 2002; FAVERO, 2002; BROD, 2005).

O teste de inibição do crescimento da leptospira *in vitro* tem por objetivo a avaliação dos níveis séricos de anticorpos neutralizantes (IgG) presentes em animais vacinados, utilizando-se apenas um meio de cultura líquido com o sorovar a ser pesquisado (TRIPATHY et al., 1971; TRIPATHY et al., 1973). Embora este teste tenha sido idealizado em 1971, apenas recentemente foram realizados ensaios comparativos com o procedimento padrão que adota o desafio em hamsters (TABATA, 2002; GONÇALES, 2007). Rodrigues (2008) utilizou esse teste e constatou que a proteção conferida por uma bacterina produzida com a o sorovar Icterohaemorrhagiae não foi capaz de elicitar resposta protetora contra o sorovar heterólogo Copenhageni, e com isto colocou em dúvida se as vacinas atualmente comercializadas no Brasil e produzidas com sorovar Icterohaemorrhagiae seriam capazes de conferir proteção a cães expostos à infecção pelo sorovar Copenhageni questão esta que o presente trabalho pretende investigar empregando hamsters como modelo biológico.

3 OBJETIVOS

Empregar o teste de potência com desafio em hamsters para comparar a eficiência de uma bacterina anti-leptospirose canina comercial bivalente, importada produzida com os sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola de referência, com a conferida por uma bacterina experimental, bivalente produzida com estirpes autóctones, isoladas no Brasil, dos sorovares Copenhageni e Canicola. Desafio efetuado com as estirpes autóctones, nacionais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se uma vacina comercial, importada, bivalente, produzida com leptospiras dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola, confere proteção ao desafio com, estirpes autóctones, dos sorovares Copenhageni e Canicola isoladas no Brasil. Analisando-se a proteção contra a doença e contra a infecção.
- Verificar se uma vacina experimental, bivalente produzida com estirpes de leptospiras dos sorovares Copenhageni e Canicola, isoladas no Brasil confere proteção ao desafio com as próprias estirpes utilizadas na produção da bacterina. Analisando-se a proteção contra a doença e contra a infecção.
- Verificar o possível efeito imunoestimulante conferido pela incorporação do adjuvante de hidróxido de alumínio na bacterina experimental. Analisando-se a proteção contra a doença e contra a infecção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 180 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, com 40 a 60 gramas de peso vivo, em grupos de, no máximo, dez animais mantidos em caixas de polipropileno com tampas de grade de alumínio nas dimensões de 30x45x15 cm (largura, comprimento, profundidade), forradas com maravalha autoclavada, trocada diariamente.

A alimentação dos hamsters consistiu em ração específica para animais de laboratório e água da rede pública fornecidas a vontade.

4.2 ESTIRPES DE LEPTOSPIRAS AUTÓCTONES ISOLADAS NO BRASIL

No preparo da vacina experimental foram utilizadas estirpes de leptospiiras isoladas no Brasil, M64/06 do sorovar Copenhageni – (RODRIGUES, 2008) e LO-4 do sorovar, Canicola, (FREITAS et al., 2004). O desafio dos hamsters foi efetuado com as estirpes L1-130 do sorovar Copenhageni, (KO et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2004) e LO-4 do sorovar Canicola, (FREITAS et al., 2004). As três estirpes foram tipificadas com conjuntos de anticorpos monoclonais produzidos pelo Laboratório de Referência Internacional da Organização Mundial de Saúde - Royal Tropical Institut de Amsterdã, Holanda.

4.3 VACINAS

Foram utilizadas três bacterinas designadas pelas letras A, B e C. A bacterina A foi uma vacina comercial bivalente, importada, preparada com estirpes de referência dos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae. As vacinas B e C foram a bacterinas experimentais bivalentes, produzidas com as estirpes autóctones LO-4 do sorovar Canicola e M64/06 do sorovar Copenhageni. Embora a estirpe do sorovar Copenhageni utilizada para a produção da

vacina experimental (M64/06) seja diferente da empregada no desafio (L1-130), ambas foram consideradas idênticas com os conjuntos de anticorpos monoclonais (RODRIGUES, 2008), porém apenas a estirpe L1-130 apresentou patogenicidade regular para os hamsters.

As bacterinas experimentais foram produzidas pelo cultivo das leptospiros durante sete dias a 28°C em meio EMJH enriquecido com 15% de soro de coelho. A inativação foi efetuada com a adição de 0,5% (volume/volume) de fenol 37% Merk diretamente no cultivo bacteriano e posterior incubação a 37°C por dois dias. A vacina B foi acrescida do adjuvante de hidróxido de alumínio, $\text{Al}(\text{OH})_3$ na concentração final de 0,15%. A vacina C não recebeu qualquer adjuvante. As contagens de células foram efetuadas em câmara de Petroff-Hausser e as concentrações por dose (1 mL) foram de 10^8 leptospiros da estirpe LO-4 do sorovar Canicola e 10^8 leptospiros da estirpe M64/6 do sorovar Copenhageni.

4.4 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

Cada bacterina foi aplicada, pura, na dose de 0,25 mL pela via subcutânea, por animal, em grupos de vinte hamsters, duas doses com 15 dias de intervalo. Vinte animais permaneceram como controles não vacinados, totalizando 80 animais em quatro grupos de vinte.

O desafio foi efetuado com a inoculação de 0,5 mL da cultura do respectivo sorovar de leptospiros vivos, por animal, pela via intraperitoneal, quinze dias após a última dose da vacina. A diluição escolhida para o desafio com a estirpe L1-130 foi a 10^{-1} e com a LO-4 foi a 10^{-3} . Após o desafio os animais foram mantidos sob observação diária, anotando-se os que morreram por leptospirose, confirmada pela presença de hemorragias, icterícia, congestão e hepatoesplenomegalia, bem como de petéquias e sufusões pulmonares.

Decorridos 20 dias do desafio os hamsters sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO_2 , necropsiados e dos seus rins foi preparada uma suspensão a 10% (peso/volume) em solução salina de Sorensen a qual foi semeada em tubos com meio de cultivo de Fletcher. Os cultivos foram incubados a temperatura de 28 a 30°C com observação semanal durante oito semanas. Nos tubos em que houve o aparecimento do anel de crescimento sub-superficial a presença de leptospiros foi confirmada pelo exame em microscopia de campo escuro.

A titulação dos inóculos empregados no desafio foi efetuada em uma série de nove diluições geométricas de razão dez, por sorovar iniciadas pela diluição 10^{-1} em grupos de cinco animais por diluição. Os animais foram mantidos em observação durante 21 dias, anotando-se os que morreram com os sinais clínicos de leptospirose.

5 RESULTADOS

5.1 DESAFIO COM A ESTIRPE L1-130 DO SOROVAR COPENHAGENI EM HAMSTERS IMUNIZADOS CONTRA LEPTOSPIROSE

Tabela 1 – Hamsters imunizados contra a leptospirose e desafiados com a estirpe L1-130, do sorovar Copenhageni, segundo o tipo de vacina utilizada, a proporção de mortos por leptospirose e a proporção de cultivos renais positivos para leptospiras entre os sobreviventes ao desafio - São Paulo - 2010

Tipo de vacina	Proporção de mortos	Cultivos renais positivos
Vacina experimental sem adjuvante bivalente, Copenhageni e Canicola	2/10*	5/8**
Vacina experimental com adjuvante Al (OH)₃ bivalente Copenhageni e Canicola	2/10	3/8
Vacina comercial bivalente Icterohaemorrhagiae e Canicola	0/10	0/10
Controle (não vacinados)	10/10	...

*Número de animais mortos por leptospirose/total de animais imunizados; ... = não disponível; ** número de animais com cultivo renal positivo para leptospirose/ número de sobreviventes ao desafio.

A tabela 1 apresenta a proporção de hamsters mortos por leptospirose dentre os animais imunizados com diferentes vacinas anti-leptospirose e desafiados com a estirpe L1-130 do sorovar Copenhageni. A diluição do inóculo empregada para o desafio foi a de 10^{-1} , e o cálculo do número de doses letais 50% efetivamente empregadas para o desafio é apresentado na tabela 3. A vacina experimental protegeu oito de dez animais ensaiados. Não houve influência da inclusão do adjuvante de hidróxido de alumínio na proporção de animais que sobreviveram ao desafio. No grupo de animais imunizados com a vacina comercial, produzida com o sorovar Icterohaemorrhagiae, todos os hamsters sobreviveram ao desafio com o sorovar Copenhageni. No grupo controle não vacinado todos os animais morreram por leptospirose. Os cultivos do tecido renal dos animais que sobreviveram ao desafio demonstraram que entre os animais imunizados com a vacina experimental houve uma parcela mais elevada de portadores renais entre os animais imunizados com a vacina que não

continha o adjuvante de hidróxido de alumínio. Não houve portadores renais entre os animais imunizados com a vacina comercial produzida com o sorovar Icterohaemorrhagiae e desafiados com o sorovar Copenhageni.

5.2 DESAFIO COM A ESTIRPE LO-4 DO SOROVAR CANICOLA EM HAMSTERS IMUNIZADOS CONTRA LEPTOSPIROSE

Tabela 2 – Hamsters imunizados contra a leptospirose e desafiados com a estirpe LO-4 do sorovar Canicola, segundo o tipo de vacina utilizada, a proporção de mortos por leptospirose e a proporção de cultivos renais positivos para leptospiros entre os sobreviventes ao desafio - São Paulo – 2010

Tipo de vacina	Proporção de mortos	Cultivos renais positivos
Vacina experimental sem adjuvante (sorovares Copenhageni e Canicola)	0/10*	0/10**
Vacina experimental com adjuvante Al (OH)₃ (sorovares Copenhageni e Canicola)	0/10	0/10
Vacina comercial (sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola)	0/10	0/10
Controle (não vacinados)	10/10	...

*Número de animais mortos por leptospirose/total de animais imunizados; ... = não disponível; ** número de animais com cultivo renal positivo para leptospirose/ número de sobreviventes ao desafio.

A tabela 2 apresenta a proporção de hamsters mortos por leptospirose dentre os animais imunizados com diferentes vacinas anti-leptospirose e desafiados com a estirpe LO-4 do sorovar Canicola. A diluição do inóculo empregado para o desafio foi a de 10^{-3} , e o cálculo do número de doses letais 50% efetivamente empregadas para o desafio é apresentado na tabela 3. O resultado obtido demonstrou que as três vacinas testadas conferiram a proteção contra a leptospirose, pelo sorovar Canicola, em todos os hamsters desafiados. Não houve crescimento de leptospiros nos cultivos renais dos animais que sobreviveram ao desafio.

5.3 TITULAÇÃO DOS INÓCULOS INFECTANTES DAS ESTIRPES DE LEPTOSPIRAS L1-130 E LO-4

Tabela 3 – Proporção de hamsters mortos por leptospirose segundo a diluição do inóculo e a estirpe de leptospira empregada para o desafio. São Paulo, 2010

Diluição inóculo desafio	Proporção de mortes por leptospirose	
	Estirpe L1-130 – sorovar Copenhageni	Estirpe LO-4 – sorovar Canicola
10^{-1}	10/10*	5/5
10^{-2}	5/5	5/5
10^{-3}	5/5	10/10
10^{-4}	4/5	5/5
10^{-5}	4/5	5/5
10^{-6}	5/5	5/5
10^{-7}	5/5	5/5
10^{-8}	3/5	5/5
10^{-9}	5/5	5/5

*Número de animais mortos por leptospirose/total de animais desafiados

Os resultados apresentados na tabela 3 revelam que para as duas estirpes de leptospiros empregadas nos inóculos de desafio não foi possível a determinação da dose letal 50% (DL₅₀), pois até a maior diluição testada a proporção de animais mortos por leptospirose foi superior a 50% e, portanto as vacinas foram desafiadas com uma concentração de leptospiros superior ao máximo recomendado pela CFR 113.103 (USDAC, 2006), 10.000 DL₅₀.

6 DISCUSSÃO

O desafio efetuado com a estirpe LO-4 do sorovar Canicola demonstrou que todas as vacinas testadas, tanto a comercial produzida com estirpe importada como as experimentais produzidas com o próprio sorovar de desafio foram capazes de proteger os hamsters tanto da doença quanto da condição de portadores renais (Tabela 2).

Com relação à estirpe M64/06 do sorovar Copenhageni utilizada para a produção das vacinas experimentais e idêntica, pela técnica de anticorpos monoclonais, a estirpe L1-130 do mesmo sorovar, empregada no desafio, embora tenha havido proteção contra a doença clínica em 16 de 20 animais para as duas vacinas experimentais, o mesmo não ocorreu para os resultados da pesquisa de infecção confirmada pela positividade dos cultivos do tecido renal, (Tabela 1). De fato, no caso da vacina experimental sem o adjuvante de $\text{Al}(\text{OH})_3$, cinco dos oito hamsters sobreviventes foram caracterizados como portadores renais de leptospiros e para a vacina experimental com adjuvante três dos oito sobreviventes foram caracterizados como portadores renais. A existência de animais imunizados e caracterizados como portadores renais após o desafio é uma grande limitação para uma vacina, pois, mesmo protegendo o animal individualmente contra a manifestação clínica da doença não consegue impedir a infecção, e com isto pode propiciar a disseminação da doença (WEBSTER et al., 1995). A despeito da inclusão do adjuvante ter promovido uma melhoria do poder imunogênico da bacterina, nas condições do presente estudo, não foi eliminada a possibilidade de que animais vacinados pudessem vir a se constituir em portadores de leptospiros.

O $\text{Al}(\text{OH})_3$ tem sido amplamente utilizado como adjuvante em vacinas de uso veterinário devido a sua capacidade de reter os antígenos no ponto de inoculação e com isto propiciar um melhor reconhecimento do mesmo pelas células do sistema imune o que redundaria no incremento da resposta imunológica humoral (RESENDE, 2004). Contudo em contrapartida também pode induzir ao aumento na migração macrofágica e neutrofílica para o sítio de inoculação, o que pode desencadear efeitos colaterais como eritema, nódulos subcutâneos, hipersensibilidade de contato e inflamação granulomatosa, (REZENDE, 2003), bem como no aumento da permeabilidade vascular associado a efeitos tóxicos sobre macrófagos e a neurotoxicidade de componentes de alumínio relacionada com doenças como encefalopatias (GOTO et al., 1993). Deste modo a decisão pela utilização deste tipo de adjuvante deverá apoiar-se em novos estudos com maior número de animais e particularmente em animais da própria espécie para qual a vacina é produzida.

Embora a vacina comercial tivesse sido produzida com uma estirpe internacional do sorovar *Icterohaemorrhagiae*, distinta da estirpe L1-130 do sorovar *Copenhageni*, isolada no Brasil e empregada no desafio, a mesma foi muito eficaz na proteção dos hamsters (Tabela 1), pois não houve nenhuma morte dentre os dez animais desafiados e nenhum portador renal entre os sobreviventes. Deste modo ficou patente a existência de proteção cruzada entre os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni* o que discorda dos resultados obtidos por (RODRIGUES, 2008) com o emprego do teste de inibição do crescimento de leptospiros *in vitro*. Uma das hipóteses que pode ser levantada para justificar a discordância de resultados, é que a estirpe do sorovar *Icterohaemorrhagiae* utilizada na produção da bacterina comercial avaliada por Rodrigues (2008) pudesse ser distinta da empregada na vacina comercial empregada no presente estudo ou de que as concentrações de leptospiros do sorovar *Icterohaemorrhagiae* das vacinas comerciais testadas nos dois experimentos fossem distintas. De fato em ensaio com vacinas experimentais indicadas para bovinos, Favero et al. (1997) constataram que podem ocorrer variações no poder imunogênico de uma bacterina de acordo com a concentração da massa antigênica de leptospiros utilizadas no seu preparo.

Suepaul et al. (2010), constataram que uma vacina experimental produzida com os sorovares *Copenhageni* e *Mankarso* isolados em Trinidad, foi muito mais eficiente do que duas vacinas comerciais, comuns do local, no teste de desafio com as mesmas estirpes regionais. Isso levanta a hipótese de que, no presente trabalho, possa ter ocorrido algum fator que acabou por comprometer a eficiência da bacterina experimental, já que, apesar de possuir os sorovares autóctones idênticos aos do desafio em sua formulação, os resultados foram insatisfatórios em relação à vacina importada.

A despeito das vacinas experimentais utilizadas no presente experimento terem sido preparadas com concentração da estirpe M64/06 do sorovar *Copenhageni*, de 10^8 leptospiros por mL, a proteção conferida para o desafio com a estirpe L1-130, do mesmo sorovar e idêntica, pelo teste de anticorpos monoclonais, não foi efetiva e inclusive foi inferior a observada com a vacina comercial, produzida com estirpe de referência do sorovar *Icterohaemorrhagiae*. Uma das hipóteses levantadas para explicar este tipo de comportamento é a de que o processo de inativação utilizado no preparo das vacinas experimentais (0,5% v/v de fenol 37%) pudesse ter interferido com as características antigênicas da bacterina, pois, embora o LPS, que é o principal responsável pela resposta imune no animal vacinado, seja insolúvel em fenol, o contato com essa substância causa a desnaturação de várias proteínas bacterianas (SANTOS, 2009), o que, talvez, poderia levar a uma falha no reconhecimento da estirpe de desafio.

A despeito dos ensaios terem sido efetuados com vacinas puras e não na diluição de 1:80, de terem sido efetuadas duas imunizações e dos desafios terem sido efetuados com concentrações de leptospiras superiores aos critérios, previstos na norma internacional para teste de potência de bacterinas anti-leptospirose (CFR 113.103, USDAC, 2006) a análise comparativa dos resultados obtidos é possível, pois os inóculos de desafio foram idênticos para as três vacinas avaliadas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente projeto possibilitaram a obtenção das seguintes conclusões:

- A bacterina comercial importada produzida com estirpe de leptospiras de referência do sorovar Icterohaemorrhagiae conferiu proteção aos animais desafiados com uma estirpe autóctone do sorovar Copenhageni isolada no Brasil.
- As vacinas experimentais produzidas com sorovar Copenhageni isolado no Brasil, apesar de terem conferido proteção contra a doença causada pelo sorovar homólogo, não impediram a infecção e o estabelecimento da condição de portador renal em uma parcela dos hamsters sobreviventes.
- A inclusão do adjuvante de hidróxido de alumínio na vacina experimental produzida com estirpe do sorovar Copenhageni isolada no Brasil reduziu mas não eliminou a presença de portadores renais de leptospiras entre os animais vacinados.
- Todas as vacinas testadas, tanto as experimentais produzidas com a estirpe Canicola autóctone isolada no Brasil, quanto a comercial, importada produzida com estirpe internacional da mesma sorovariante, conferiram proteção total contra a doença e contra a infecção ao desafio efetuado com a estirpe autóctone do sorovar Canicola isolada no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I.; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S. Aglutininas anti-leptospíricas em cães na área de influência do centro de controle de zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 107-110, 1998.
- BLENDEN, D.C. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. In: REUNION INTERAMERICANA SOBRE EL CONTROLE DE LA FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ZOONOSIS, 8., 1975, Guatemala, Washington. [**Proceedings...**] Washington: Organizacion Panamericana de La Salud, 1976. p. 160-168. (Publicacion Científica, 316).
- BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância Epidemiológica. **Manual de controle de roedores**. Brasília: MS, 2002. 132 p.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Leptospirose. Brasília: MS, 2005.
- BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLARD, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 4, p. 294-300, 2005.
- BROWN, C. A.; ROBERTS, W.; MILLER, M. A.; DAVIS, D. A.; BROWN, S. A.; BOLIN, C. A.; BLACK, J. J.; GREENE, C. E.; LIEBL, D. M. *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa infection in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 7, p. 1265-1267, 1996.
- CARVALHO NETO, C. **Estudos sobre a resistência a warfarina em roedores da cidade de São Paulo, SP. São Paulo. 1986**. 74 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.
- CORDEIRO, F.; SULZER, C. R.; RAMOS, A. A. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in southeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 19-29, 1981.
- CORRÊA, W. M.; CORRÊA C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed.. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. cap. 21, p. 219-231.
- DZIEZYC, J. Canine systemic bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 1103-1117, 2000.
- ELLIS, W. A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 411-421, 1984.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n. 3, p. 463-478, 1994.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva; World Health Organization, 1982.

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

FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; NETO, J. S. F. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

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

FREITAS, J. C. D.; SILVA, F. G. D.; OLIVEIRA, R. C. D.; DELBEM, Á. C. B.; MULLER, E. E.; ALVES, L. A.; TELES, P. S. Isolamento de Leptospirosas spp de cães, bovinos e suínos naturalmente infectados. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 3, p. 853-856, 2004.

FURTADO, L. R. I.; FEHLBERG, M. F. B.; AVILA, M. O.; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S. Prevalência e avaliação de fatores de risco à leptospirose canina, no município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 64, n. 1, p. 57-61, 1997.

GONÇALES, A. P. **Avaliação de vacinas antileptospirose. Relação entre o teste de inibição de crescimento de leptospirosas *in vitro* e o teste de desafio em hamsters**. 2007. 96 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GOTO, N.; KATO, H.; MAEYAMA, J.; ETO, K.; YOSHIHARA, S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. **Vaccine**, v. 11, p. 914 - 918, 1993.

GREENE, C. E.; MILLER, M. A.; BROWN, C. A. Leptospirosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 273-281.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral Proteins Recognized During the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 4958-4968, 2001.

HAGIWARA, M. K.; SANTA ROSA, C. A. Leptospirose canina em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 42, p. 111-118, 1975.

HARKIN, K. R.; GARTRELL, C. L. Canine Leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, p. 495-501, 1996.

HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1224-1229, 2003.

HARTSKEERL, R. A.; TERPSTRA, W. J. Leptospirosis in wild animals. **The Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 3, p. S149-S150, 1996.

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

INADA, R. C.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R.; ITO, H. The etiology, mode of infection and specific therapy of Weil's disease (Spirochoetosis icterohaemorrhagica). **Journal of Experimental Medicine**, v. 23, p. 377-402, 1916.

KO, A. I.; REIS, M. G.; DOURADO, C. M. R.; JOHNSON, JR., W. D.; RILEY, L. W.; Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

JOUGLARD, S. D. D.; BROD, C. S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico S. Paulo**, v. 67, n. 2, p. 181-185, 2000.

KOGIKA, M. M.; HAGIWARA, M. K.; BACCARO, M. R. Metastatic calcification in a dog with leptospirosis. **Canine Practice**, v. 17, n. 4, p. 35-38, 1992.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis Vaccines: Past, Present, and Future. **Journal of Postgraduate Medical**, v. 51, p. 210-214, 2005.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, 434 p.

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

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

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; MORAIS, Z. M.; PINTO, C. O.; SUCUPIRA, M. C. A.; DIAS, R. A.; MIRAGLIA, F.; CORTEZ, A.; COSTA, S. S.; TABATA, R. Inquérito sorológico para leptospirose, em cães do Município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica de 1999. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 25-32, 2002.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion Infectious Disease**, v. 18, p. 376-386, 2005.

MCDONOUGH, P. L. Leptospirosis in dogs – Current status. In: CARMICHAEL, L. **Recent advances in canine infectious diseases**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em:
<www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/mcdonough/ivis.pdf>. Acesso em: jul 2008.

MODOLO, J. R.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; SHIMABUKURO, F. H.; MENDONÇA, A. O.; VICTÓRIA, C.; SILVA, W. B. Investigação soroepidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil **Brazilian journal of Veterinary Research and Animal Acience**, v. 43, n. 5, p. 598-604, 2006.

NASCIMENTO, A. L. T.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A. Comparative genomics of two *Leptospira* interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004.

PRESCOTT, J. F.; FERRIER, R. L.; NICHOLSON, V. M.; JOHNSTON, K. M.; HOFF, B. Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report an serological survey. **Canadian Veterinary Journal**, v. 32, p. 481-486, 1991.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 31, p. 179-183

RENTKO, V. T.; CLARK, N.; ROSS, L. A.; SCHELLING, S. H. Canine leptospirosis – A retrospective study of 17 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 6, n. 4, p. 235-244, 1992.

RESENDE, F. C. B.; PASSOLD, J.; FERREIRA I. A. C.; ZANETTI, C. R.; LIMA, H. C. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia**, v. 27, n. 3, p. 116-124, 2004.

REZENDE, F. C. B. **Estudo da cinética do infiltrado celular inflamatório induzido por adjuvantes de vacinas em bolhas de ar formadas no subcutâneo de camundongos**. 2003. 82 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

RODRIGUES, A. M. A. **Leptospirose canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni**. 2008. 50 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.1, n. 2, p. 97-109, 1970.

SANTOS, R. R. **Desenvolvimento e estudo *in vivo* de uma vacina conjugada contra *Pseudomonas aeruginosa***. 2009. 50 p. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

SUEPAUL, S. M.; CARRINGTON, C. V.; CAMPBELL, M.; BORDE, G.; ADESIYUN, A. A. Study on the efficacy of *Leptospira* vaccines developed from serovars isolated from Trinidad and comparison with commercial vaccines using a hamster model. **Vaccine**, v. 28, n. 33, p. 5421-5426, 2010.

TABATA, R.; SCANAVINI NETO, H.; ZUANAZE, M. A. F.; OLIVEIRA, E. M. D.; DIAS, R. A.; MORAIS, Z. M.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup Sejroe. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 267-270, 2002.

THIERMANN, A. B. Canine Leptospirosis in Detroit. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 10, p. 1659-1661, 1980.

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.

TURNER, L. H. Special article. Leptospirosis I. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 6, p. 842-855, 1967.

U. S. D. A. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS TESTING PROTOCOL SAM 609 **Supplemental Assay Method for Potency Assay of *Leptospira interrogans* Serovar Canicola Bacterins**. CFR 113.103 (SAM 609, 03 de agosto, 2006).

VASCONCELLOS, S. A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 3, n. 3/4, p. 189-195, 1979.

VENKATARAMAN, K. S.; NEDUNCHELLIAN, S. Seroepidemiology of canine leptospirosis in Madras city. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 63, n. 2, p. 150-152, 1993.

WARD, M. P.; GLICKMAN, L. T.; GUPTILL, L. F. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 1, p. 53-58, 2002.

WEBSTER, J. P.; ELLIS, W. A.; MACDONALD, D. W. Prevalence of *Leptospira* spp. in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. **Epidemiology and Infection**, v. 114, n. 1, p. 195-201, 1995.

WEEKS, C. C.; EVERARD, C. O.; LEVETT, P. N. Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n. 2-3, p. 215-222, 1997.

WOHL, J. S. Canine Leptospirosis. **Compendium in Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 18, n. 11, p. 1215-1225, 1996.