AMANE PALDÊS GONÇALES

**AVALIAÇÃO DE VACINAS ANTILEPTOSPIROSE. RELAÇÃO ENTRE O
TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS *IN VITRO* E
O TESTE DE DESAFIO EM HAMSTERS**

SÃO PAULO

2007

AMANE PALDÊS GONÇALES

Avaliação de vacinas antileptospirose. Relação entre o teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* e o teste de desafio em hamsters

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos

SÃO PAULO

2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1937
FMVZ

Gonçales, Amane Paldês

Avaliação de vacinas antileptospirose. Relação entre o teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* e o teste de desafio em hamsters / Amane Paldês Gonçalves. – São Paulo: A. P. Gonçalves, 2007.
96 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos.

1. Leptospirose animal. 2. Hamsters. 3. Vacinas. 4. Teste de potência. 5. Teste de inibição de crescimento *in vitro*. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Teste de potência de vacinas anti-leptospirose. Avaliação do teste de inibição de crescimento de leptospira in vitro, como alternativa para o teste de desafio em hamsters", protocolo nº765/2005, utilizando 525 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 "ad referendun".

(We certify that the Research "Potency assay for leptospirosis vaccine. Evaluation of in vitro growth inhibition test as an alternative for challenge tests in hamsters", protocol number 765/2005, utilizing 525 hamsters, under the responsibility of Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting).

São Paulo, 18 de outubro de 2005.

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GONÇALES, Amane Paldês

Título: Avaliação de vacinas antileptospirose. Relação entre o teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* e o teste de desafio em hamsters

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*A vocês dedico os resultados dos meus estudos, alegrias, tristezas e saudades
que enfrentei nessa caminhada. Palavras não traduzem o que sinto por vocês*

Dedicatória

Aos meus pais, que muitas vezes abdicaram dos seus próprios sonhos, só para poderem realizar os meus, pelos esforços ilimitados para minha formação pessoal e profissional, pelo apoio mesmo que sofrendo de saudades. Saibam que lembrei de vocês todos os dias e que à distância me fortaleceu ainda mais. Se nasci, cresci, aprendi e me tornei quem sou eu devo isso a vocês. Nunca conseguirei expressar meu real agradecimento e a imensidão do meu amor por vocês;

Ao meu irmão, importantíssimo na minha inspiração de vir a trabalhar com pesquisa e no meu crescimento pessoal. Tu e a Marcinha são muito especiais para mim;

À minha irmã Neni, uma das maiores responsáveis pelo que sou hoje e por essa conquista. Obrigado por doar, sem limites, todos os tipos de amor que existem. Todos sentimos seus cuidados diariamente mesmo à distância. Tu és essencial na minha vida;

A minha irmã Cissa, minha amiga, minha luz. Obrigado pela convivência feliz e unida, por transformar o simples em especial, tristezas em alegrias e dificuldades em aprendizado. Te amo com limon y sal;

Ao meu cunhado irmão, sempre decidido, corajoso e amigo. Obrigado pelo apoio, pelo incentivo, pela presença durante esses anos, meu exemplo de dedicação. Esse lar não teria a menor graça sem a tua cantoria. Obrigado por tudo;

Ao meu avô (in memoriam) que certamente ficaria orgulhosíssimo com mais essa vitória. Obrigado por estar sempre no meu lado iluminando meu caminho.

Agradecer me parece pouco neste momento. Quero tanto agradecer como oferecer o resultado e dar o crédito ao esforço de tanta gente. Vocês tiveram papel importante para a transformação desse desejo em realidade. Sozinha não teria êxito nessa caminhada. Muito obrigada.

Agradecimentos

A Deus, pela oportunidade de realizar meus sonhos e fazer minha história;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos meu exemplo para a vida e aprimoramento profissional, sempre exigindo além dos meus supostos limites para que eu aprendesse cada vez mais. Obrigado pela oportunidade, pela amizade por confiar em mim e no meu trabalho, por me ajudar a realizar esse sonho e me ensinar a construir um caminho. Não existem palavras que possam expressar minha gratidão;

Ao Prof. Maneco, a quem atribuo grande parte da responsabilidade em minha formação profissional, por ter me incentivado a ingressar no mestrado e a não desistir, apesar das dificuldades. Muito obrigado por toda ajuda, por me dar forças para alcançar os sonhos mais impossíveis e pelos anos de amizade;

A amiga Marilene (técnica do laboratório de Leptospirose-UFSM), pelos valiosos ensinamentos, por me iniciar na área de leptospirose e me fazer amar essas espiroquetas. Saudades;

A Zenáide minha mãezinha paulistana, pela ajuda permanente em todas as etapas desse trabalho, por não ter me deixado desistir apesar de tantas repetições, pelos ensinamentos, pela grande amizade. Meu exemplo de dedicação profissional, minha sincera gratidão e admiração;

A Gisele pelos conhecimentos transmitidos de forma sábia e divertida, pela paciência e serenidade, pelas tentativas de me acalmar e segurar minhas lágrimas a cada suspeita de nova repetição. Obrigado por tudo amiga;

A Universidade de São Paulo, a FMVZ e em especial ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, na figura de seus docentes e funcionários, pelos ensinamentos e experiências vitais, para a boa formação do profissional e pessoa;

Ao Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo, pelas orientações prestadas, pela colaboração na análise estatística, pela paciência em me ensinar e pela amizade;

A Profa. Dra. Sônia Regina Pinheiro, pelas palavras de otimismo e incentivo constantes. Obrigado por transmitir seus valiosos ensinamentos, frutos de grande experiência acumulada, com simplicidade e entusiasmo;

Ao Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, obrigado pelas oportunidades, pela confiança no meu trabalho e pela luta constante para formar profissionais completos;

Ao Prof. Dr. Jerez, obrigado pelo carinho, por me mostrar que a arte de ensinar deve ser realizada com muita seriedade e dedicação;

A amiga Flávia Morato (Fau), e sua família (minha família paulistana), cuja amizade foi um presente que o mestrado me deu, pois sua companhia é o bálsamo para as dificuldades e saudades. Obrigado pelo apoio e carinho durante esses anos, pelas sessões de terapia desde o início desta jornada e também pela gentileza em traduzir o resumo deste trabalho.

A amiga Vivianne, com sua amizade os dias em São Paulo ficaram mais prazerosos e menos vazios. A qualidade da nossa amizade é que a torna única;

Ao Ricardo, pela ajuda na conclusão deste trabalho, pelo seu carinho e por tornar meus dias mais alegres;

Aos amigos do Laboratório de Zoonoses bacterianas: Marianna, Flávia Carolina, Pilar, Pancho, Carlos, Cássia, Daniela, Paty, Dona Odete e aos estagiários, pelo espírito de grupo, pela grande amizade, carinho e ajuda nos momentos difíceis;

A Antônio e Rosana, meus anjos da guarda e dos animais do biotério. Obrigado pela grande ajuda, amizade, carinho e confiança. A força que vocês me deram foi imprescindível na realização desse trabalho;

A Carol, pela atenção, carinho e amizade. Obrigado pelos chás de abacaxi e mel nos dias que eu estava resfriada e pelos cafezinhos que nos dias frios me aqueciam também o coração;

A todos os amigos da pós-graduação, especialmente, Lara, Caroline Américo, Alessandra Ragozo, Alessandra Maldonado, Clarice, Gisele, Vanessa, Tânia, Sérgio, Mônica, Cris, Adriana Cortez, Francisco Soto e as residentes Leandra e Camila, pelo companheirismo, aprendizagem, auxílio e amizade;

Aos amigos do VPS: Sheila, Sandra, Orlando Bispo, Danival, Cristina, Virgínia Alê, Jucélia, Renatinho, Sônia, Priscila, pela força diária, pela disposição em ajudar e amizade. Vocês me fizeram, literalmente, me sentir acolhida.

Ao Pedrinho, pela sua alegria contagiante, pela ajuda com tantos sacos de rações;

Aos amigos do Instituto Butantan, especialmente a Priscila, Ângela e ao Enéias

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ/USP, pela atenção, colaboração na verificação das normas de publicação e produção da ficha catalográfica;

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado, e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos hamsters, personagens principais desta etapa da minha vida, pois sem eles nada disso seria possível. Deixo aqui expresso o profundo amor, carinho e respeito que sinto por vocês.

“A vitória sobre as dificuldades, é a grande descoberta do homem a respeito de si mesmo. A felicidade não foi prometida ao homem como uma dádiva. Ela é, essencialmente, uma conquista. Mas para chegar a ela é necessário lutar, transpor muitos obstáculos, ter paciência, esperar. A felicidade é como uma obra de artesanato: fio por fio, fibra por fibra. Ela não nasce feita, ela se faz, minuto a minuto na prática do bem, na paz da consciência. Mas quando ela chega, é para ficar, é sua, definitivamente sua”

(J.S.

Nobre)

RESUMO

GONÇALES, A. P. **Avaliação de vacinas antileptospirose. Relação entre o teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* e o teste de desafio em hamsters.** [Evaluation for leptospirosis vaccine. Relation between *in vitro* growth inhibition test and potency tests in hamsters]. 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Foi investigada a existência da correlação entre o teste padrão de potência de bacterinas antileptospirose e o teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro*. Os ensaios foram realizados, em hamsters machos, isoladamente segundo a bacterina comercial (A ou B) antileptospirose empregada. Foram comparados a proteção conferida pelas bacterinas e os níveis de anticorpos neutralizantes, respectivamente obtidos nos teste de desafio e inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* (ICL). O protocolo de imunização adotou duas aplicações de 0,25 mL das bacterinas, puras e suas diluições, pela via subcutânea com o intervalo de 15 dias. Os desafios foram realizados após 15 dias da segunda dose com 0,2 mL de culturas vivas dos sorovares Canicola (bacterina A e B) ou Pomona (somente bacterina A), os óbitos por leptospirose foram registrados e, os animais sobreviventes foram submetidos a eutanásia no 21º dia de observação e a condição de portador renal foi investigada por cultivos de tecido renal em meio de Fletcher. Os animais destinados ao teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* foram sacrificados no mesmo dia em que se realizou o desafio dos animais submetidos ao teste de potência. As colheitas de sangue foram efetuadas assepticamente por punção intracardíaca. Constatada individualmente a esterilidade dos soros foram constituídos os *pools* com quantidades iguais de soro por animal e subgrupo (n=5). No teste de potência de bacterinas para ambas as estirpes a DL50 foi superior a diluição 10^{-9} do controle do inóculo de desafio, os animais foram desafiados com a diluição 10^{-6} . O número de animais sobreviventes ao desafio e a proteção contra a infecção renal variou de acordo com a bacterina empregada e sua concentração. Os resultados do teste de desafio com as bacterinas antileptospirose A e B situaram-se dentro dos parâmetros exigidos, sendo as bacterinas aprovadas segundo o critério de avaliação internacional. A diluição 1:800 das duas bacterinas testadas

recomendada pelas normas internacionais não foi capaz de proteger contra o estado de portador renal de leptospiros. Os hamsters imunizados com as bacterinas apresentaram anticorpos neutralizantes em níveis superiores ao de aglutininas. A comparação do desempenho das bacterinas testadas para os sorovares Canicola e/ou Pomona, segundo sua concentração, por meio das proporções de animais sobreviventes ao teste de desafio e a média dos títulos de anticorpos neutralizantes, estabeleceu que o título de anticorpos neutralizantes igual ou superior a $1,0\log_{10}$ como correspondente ao nível de aprovação de bacterinas no teste de potência.

Palavras-chave: Leptospirose animal. Hamsters. Vacinas. Teste de potência. Teste de inibição de crescimento *in vitro*.

ABSTRACT

GONÇALES, A. P. **Evaluation for leptospirosis vaccine. Relation between *in vitro* growth inhibition test and potency test in hamsters.** [Avaliação de vacinas antileptospirose. Relação entre o teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* e o teste de desafio em hamsters]. 2008. 96 f Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

It was investigated the existence in hamsters of correlation between the standard potency test of bacterins antileptospires and the *in vitro* leptospires growth inhibition test. The assays were performed, in male hamsters, separately according to the commercial (A and B) animal antileptospirosis bacterin used. The quality of the bacterins and the level of neutralizing antibodies were compared, respectively obtained in the challenge test and the *in vitro* leptospires growth inhibition test (ICL). The potency test with challenge, performed with serovars Pomona and Canicola, was modified from the protocol of The United States Agriculture Department. The immunization schedule employed two 0,25 mL of bacterins, pure and with dilutions, by subcutaneous route with 15-day interval. The challenge was performed after 15 days from the second dose with 0,2 mL of alive cultures from serovars Canicola (bacterins A and B) or Pomona (only bacterin A), the deaths by leptospirosis were registered and on the 21st observation day the survivors were sacrificed and the condition of renal carrier was investigated by culture of renal tissue for leptospires isolation in Fletcher medium. The animals destined to the *in vitro* leptospire growth inhibition test were sacrificed on the same day the potency assay with challenge was performed on the other group of hamsters. The blood samples were collected aseptically by intracardiac puncture. Once the sterility of each serum was verified the pools were formed with equal amounts of serum per animal and subgroup (n=5). The bacterins potency tests, for both strains, resulted in a higher DL50 for the dilution 10⁻⁹ of the challenge inoculum control, the animals were challenged with the dilution 10⁻⁶. The number of surviving animals to the challenge and the protection against renal infection varied according to the bacterin used and its concentration. The results of the potency tests with challenge using the bacterins antileptospirosis A and B were within the required standards, being therefore approved according to the international

evaluation criteria. The dilution 1:800, for both bacterins tested, which is recommended by international criteria was not capable of protecting against the condition of leptospires renal carrier. Hamsters immunized with the bacterins showed neutralizing antibodies in higher titers in comparison to agglutinating antibodies. The comparison of the performance of the tested bacterins with the sorovars Canicola and/or Pomona, according to its concentration, by the proportions of surviving animals to the challenge assay and the average of the neutralizing antibodies titers, established a neutralizing antibodies titer equal or higher than $1,0\log_{10}$ corresponding with the bacterins level of approval in the potency assay.

Key words: Animal leptospirosis. Hamsters. Vaccines. *In vitro* growth inhibition test and potency test.

Lista de ilustrações

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Associação entre os resultados do teste de potência em hamsters da bacterina A antileptospirose para o sorovar Canicola e a proporção de portadores renais segundo a concentração da bacterina - São Paulo-2007.....	63
Gráfico 2-	Associação entre os resultados do teste de potência em hamsters da bacterina A antileptospirose para o sorovar Pomona e a proporção de portadores renais segundo a concentração da bacterina - São Paulo-2007.....	64
Gráfico 3-	Associação entre os resultados do teste de potência em hamsters da bacterina B antileptospirose para o sorovar Canicola e a proporção de portadores renais segundo a concentração da bacterina expressas em logaritmo de base 10 - São Paulo-2007.....	65
Gráfico 4-	Associação entre os títulos de anticorpos aglutinantes e os títulos de anticorpos neutralizantes expressos em logaritmo de base 10 para os sorovares Canicola e Pomona dos <i>pools</i> de soros dos hamsters imunizados com a bacterina A antileptospirose e suas concentrações - São Paulo-2007.....	69
Gráfico 5-	Associação entre os resultados para o sorovar Canicola do teste de potência em hamsters da bacterina A antileptospirose e os do teste de inibição de crescimento de leptospiros <i>in vitro</i> segundo a concentração da bacterina - São Paulo-2007.....	71
Gráfico 6-	Associação entre os resultados para o sorovar Pomona do teste de potência em hamsters da bacterina A antileptospirose e os do teste de inibição de crescimento de leptospiros <i>in vitro</i> segundo a concentração da bacterina - São Paulo-2007.....	74
Gráfico 7-	Associação entre os resultados para o sorovar Canicola do teste de potência em hamsters da bacterina B antileptospirose e os do teste de inibição de crescimento de leptospiros <i>in vitro</i> segundo a concentração da bacterina - São Paulo-2007.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Proporção de hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina comercial A, sobreviventes ao desafio segundo a concentração da bacterina e o sorovar de leptospira empregado para o desafio – São Paulo - 2007.....	59
Tabela 2-	Proporção de hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina comercial B, sobreviventes ao desafio segundo a concentração da bacterina e o sorovar de leptospira empregado para o desafio – São Paulo - 2007.....	61
Tabela 3-	Proporção de hamsters vacinados contra a leptospirose com a bacterina A e B, sobreviventes ao desafio e caracterizados como portadores renais de leptospiros. Segundo a concentração da bacterina e sorovar de leptospira empregado para o desafio - São Paulo -2007.....	62
Tabela 4-	Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospira e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para o sorovar Canicola, em <i>pools</i> dos soros dos hamsters imunizados com bacterina A antileptospirose, segundo a concentração da bacterina -São Paulo – 2007.....	66
Tabela 5 -	Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospira e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para o sorovar Pomona, em <i>pools</i> dos soros dos hamsters imunizados com bacterina A antileptospirose, segundo a concentração da bacterina -São Paulo- 2007.....	66
Tabela 6 -	Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospira e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para o sorovar Canicola, em <i>pools</i> dos soros dos hamsters imunizados com bacterina B antileptospirose, segundo a concentração da bacterina -São Paulo- 2007.....	67

Lista de abreviaturas e símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	- porcentagem
°C	- graus Celsius
µL	- microlitro
µm	- micrômetro
CO ₂	- gás carbônico
DI50	- dose capaz de inibir 50% do crescimento de leptospiros
DL50	- dose letal capaz de matar 50% dos animais
DNA	- ácido desoxirribonucleico
d.p.i	- dias pós-infecção
ELISA	- Enzyme- Linked Immunosorbent Assay quimioluminescente
EMJH	- Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris
EUA	- Estados Unidos da América
FMVZ	- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	- grama
IC	- intervalo de confiança
ICL	- inibição de crescimento de leptospiros <i>in vitro</i>
IgG	- imunoglobulina G
IgM	- imunoglobulina M
Kg	- kilograma
<i>L.</i>	- <i>Leptospira</i>
LO4	- <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola
LPF	- <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Pomona (estirpe Fromm)
M	- molar

mL	- mililitro
SAM	-soroaglutinação microscópica
SC	- subcutânea
TSB	- Tryptic Soy Broth
USP	- Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	27
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1	ANIMAIS.....	46
4.2	BACTERINAS.....	47
4.3	TESTE DE POTÊNCIA DA BACTERINA A ANTILEPTOSPIROSE.....	47
4.4	TESTE DE POTÊNCIA DA BACTERINA B ANTILEPTOSPIROSE.....	48
4.5	ESTIRPES VIRULENTAS EMPREGADAS NO DESAFIO.....	50
4.5.1	Estirpe LO4.....	50
4.5.2	Estirpe Pomona Fromm.....	50
4.6	PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS INFECTANTES DOS SOROVARES CANICOLA E POMONA.....	51
4.7	TITULAÇÃO DOS INÓCULOS INFECTANTES DE DESAFIO COM O SOROVAR CANICOLA E POMONA.....	51
4.8	ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RENAL.....	52
4.9	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS <i>IN</i> <i>VITRO</i> COM OS SOROVARES CANICOLA E POMONA.....	5
4.9.1	Obtenção dos <i>pools</i> de soro dos hamsters.....	54
4.9.2	Reação.....	55

4.9.3	Leitura e interpretação.....	56
4.10	SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM).....	56
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
5	RESULTADOS	58
5.1	TITULAÇÃO DO INÓCULO DE DESAFIO COM OS SOROVARES CANICOLA E POMONA.....	58
5.2	TESTE DE POTÊNCIA DE BACTERINAS COMERCIAIS ANTILEPTOSPIROSE EM HAMSTERS – BACTERINA A.....	59
5.3	TESTE DE POTÊNCIA DE BACTERINAS COMERCIAIS ANTILEPTOSPIROSE EM HAMSTERS – BACTERINA B.....	61
5.4	ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RENAL.....	62
5.5	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> (ICL).....	65
5.6	TÍTULOS DE ANTICORPOS AGLUTINANTES DE HAMSTERS VACINADOS COM BACTERINAS COMERCIAIS POLIVALENTES.....	67
5.7	ASSOCIAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO TESTE DE POTÊNCIA EM HAMSTERS DE BACTERINAS ANTILEPTOSPIROSE E OS DO TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS <i>IN VITRO</i> SEGUNDO A CONCENTRAÇÃO DA BACTERINA.....	70
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE	93

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem, mundialmente distribuída, causada por espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira*.

Nos bovinos e suínos a leptospirose é considerada uma das principais doenças da esfera reprodutiva, causando principalmente abortamentos, infertilidade, esterilidade ou nascimentos de produtos fracos, debilitados e queda na produção de leite.

A vacinação é o método mais comumente utilizado para a prevenção da leptospirose animal, pois estimula a imunidade humoral de forma a impedir a manifestação dos sinais clínicos e a reduzir impacto econômico da doença.

Os distúrbios reprodutivos provocados pela leptospirose nas espécies produtoras de alimentos de origem animal como bovinos, suínos e bubalinos, indicam que medidas preventivas devem ser tomadas com vistas a proteção dos rebanhos contra a leptospirose, dentre elas deve ser analisada a intensificação do uso da utilização de bacterinas que contenham estirpes isoladas no País.

As bacterinas antileptospirose atualmente disponíveis no mercado brasileiro são culturas de leptospiros inativadas associadas a adjuvantes, compostas por até sete sorovares escolhidos entre os mais freqüentes de

determinada região. A intensidade e duração da imunidade conferida por estas bacterinas são variáveis e pouco conhecidas. Algumas observações constataram proteção contra a doença, mas não contra o estado de portador renal.

O teste de potência de bacterinas antileptospiras preconizado pelo United States Department of Agriculture (1997), consiste em um ensaio realizado em hamsters com desafio praticado com estirpes de leptospiras dotadas de patogenicidade para estes animais, o que, no entanto, não ocorre com todas as estirpes isoladas, mesmo quando são realizadas passagens sucessivas nestes animais. Uma alternativa para que esse impasse venha a ser contornado é a realização de ensaios *in vitro* que dispensem o uso de estirpes de leptospiras virulentas e também os animais de laboratório (hamsters).

O teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* avalia os níveis de anticorpos neutralizantes protetores presentes no soro sanguíneo de animais vacinados, os quais não apresentam relação direta com os de anticorpos aglutinantes revelados pelo teste clássico de soroaglutinação microscópica.

A despeito do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* ter sido empregado em diversos experimentos, ainda não foi realizado o estudo da correlação entre os resultados obtidos com procedimento e o teste oficial de potência de vacinas antileptospiras, de modo a ser estabelecido um limiar de

anticorpos neutralizantes que permita validar a qualidade da bacterina antileptospiras, o que constitui objeto do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar a possibilidade do teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* ser empregado como alternativa para o teste padrão de potência de vacinas efetuado com desafio em hamsters (*Mesocricetus auratus*).

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Verificar o nível de proteção de bacterinas comerciais empregando-se o teste de potência de vacinas e o teste de inibição de crescimento *in vitro*.

- Determinar o nível de aglutininas séricas antileptospiros contra os sorovares Canicola e Pomona em hamsters vacinados com bacterinas comerciais antileptospirose.

- Determinar o nível de anticorpos inibidores do crescimento de leptospiros *in vitro* no soro de hamsters vacinados com bacterinas comerciais antileptospirose.

- Avaliar o nível de proteção das bacterinas comerciais antileptospirose contra o estabelecimento da condição de portador renal.

- Estabelecer o limiar de anticorpos neutralizantes em hamsters vacinados com bacterinas antileptospirose que corresponda ao nível de aprovação no teste de potência com desafio nestes animais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose é uma zoonose, doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem (CÔRTEZ, 1993; COLEMEN, 2000), de curso agudo a crônico que afeta diversas espécies de animais domésticos, silvestres e os seres humanos. É causada por bactérias, espiroquetas pertencentes à Ordem Spirochetales, família *Leptospiraceae* (JONSON; FAINE, 1984). As leptospiras são móveis, aeróbias, com 0,1 a 0,2 µm de diâmetro por seis a 20 µm de comprimento, com curvatura em forma de gancho em uma ou nas duas extremidades (MYERS, 1985), altamente sensíveis a ambientes secos, pH ácido e temperaturas extremas (FAINE et al., 1999).

A importância da leptospirose em animais de produção está principalmente relacionada à queda da fertilidade e produtividade dos rebanhos acometidos. No caso de animais domésticos, de companhia, o prejuízo se dá principalmente devido a se manifestar como uma doença aguda com óbitos por insuficiência hepática e renal (FAINE, 1982; ALVES et al., 1996).

O critério de classificação das leptospiras até o ano de 1989 denominado *sensu lato* (BARANTON et al., 1995; BROWN; LEVETT, 1997; FAINE et al., 1999), dividiu o gênero leptospira em duas espécies, *Leptospira interrogans*, compreendendo todas as estirpes patogênicas; e *Leptospira biflexa*, reunindo as estirpes saprófitas isoladas do meio ambiente. A

diferenciação era feita 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 nas características dos antígenos do envelope externo de natureza lipopolissacarídea foram estabelecidos os sorogrupos e sorovares de leptospiros patogênicos e saprófitas, sendo estes a unidade taxonômica do gênero (FAINE et al., 1994; LEVETT, 2001).

Com o advento dos métodos que comparam a homologia do DNA a classificação antigênica das leptospiros tem sido substituída pela genômica, também denominada *sensu stricto*, onde espécies incluem todos os sorovares de *L. interrogans* e *L. biflexa*. A heterogenicidade genética foi demonstrada em 1987 por Yasuda, Steigerwalt e Sulzer (1987) por hibridização de DNA, conduziram a definição de 16 espécies (genomoespécies): *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira weilli*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira fainei*, *Leptospira inadai*, *Leptospira meyeiri*, *Leptospira biflexa*, *Leptospira wolbachii*, *Leptospira alexandri* (RAMADASS et al., 1990, 1992; BRENNER et al., 1999; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Nesta classificação, duas estirpes são consideradas como pertencentes à mesma espécie genômica se (1) os ácidos desoxirribonucléicos forem 70% ou mais relacionados entre si, a uma temperatura ótima de reassociação de 55°C; (2) se os ácidos desoxirribonucléicos forem 60% ou mais relacionados entre si a uma temperatura estrigente de reassociação de 70°C; e (3) se os ácidos

desoxirribonucleicos relacionados entre si apresentarem 5% ou menos de bases não pareadas (RAMADASS et al., 1992; WOO et al., 1997).

A leptospirose está mundialmente distribuída, mas a sua ocorrência é maior nos países de clima quente que temperado, devido principalmente à maior sobrevivência das leptospirosas em ambientes quentes e úmidos. A doença é sazonal, com incidência de pico ocorrendo no verão ou no outono nas regiões de clima temperado ou durante as estações de chuva nas regiões quentes. Esta infecção considerada como reemergente em alguns países, ocorre na forma de surtos em seres humanos e animais e está associada a períodos de alta pluviosidade, presença de roedores, mamíferos silvestres e domésticos, bem como águas represadas em ambientes com altas concentrações de animais (PLANK; DEAN, 2000). Embora o homem seja susceptível a um grande número de variantes sorológicas de leptospirosas, a leptospirose humana é dita como acidental (SULLIVAN, 1974; ACHA; SZYFRES, 2003), mas em situações particulares também são observados surtos epidêmicos (ACHA; SZYFRES, 2003). Muitos surtos de leptospirose humana resultam do contato com águas, solos, pastos e gêneros alimentícios contaminados pela urina de reservatórios (MICHNA, 1969).

A ocorrência de leptospirose animal está diretamente relacionada às condições epidemiológicas, dependendo, principalmente, da população de reservatórios silvestres e da população de animais susceptíveis, ou seja, animais não vacinados e expostos a um meio ambiente contaminado (BOLIN, 2003; ELLIS, 1984).

A epidemiologia da leptospirose para uma região específica pode ser resumizada como alta frequência de infecção por sorovares adaptados a determinadas espécies domésticas e baixa frequência de infecção por sorovares adaptados a outras espécies, dando origem a infecções acidentais (HATHAWAY, 1981). Radostis et al. (2000), referem que usualmente os sorovares são adaptados aos hospedeiros naturais que favorecem a sua persistência no meio ambiente. Os hospedeiros de manutenção dos sorovares Hardjo, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola e Grippotyphosa são, respectivamente, bovinos e bubalinos, suínos, roedores sinantrópicos, caninos e roedores silvestres e marsupiais.

As portas de entrada para as leptospiros invadirem o organismo dos hospedeiros vertebrados são a pele lesada ou íntegra e membranas mucosas (SULLIVAN, 1974; MYERS, 1985; FAINE et al., 1999). A capacidade de sobreviverem e se multiplicarem nos tecidos são os maiores componentes de virulência (FAINE et al., 1999). Após a invasão, percorrem as vias linfáticas e sanguíneas atingindo o fígado, onde se multiplicam por aproximadamente uma semana. Em seguida ocorre a fase de leptospiremia com estágio febril e subsequente produção de anticorpos, facilitando a eliminação de leptospiros do tecido por fagocitose (MYERS, 1985).

Nos animais que sobrevivem à fase aguda da leptospirose, os microrganismos persistem em pequenas quantidades em certos locais de privilégio imunológico sequestrados do sistema imune: túbulos contornados

renais, sistema nervoso central, câmara anterior dos olhos e trato reprodutivo (FAINE et al., 1999; O'KEEF, 2002; SARAZÁ; VAZCAÍNO, 2002). A ausência de fagócitos na urina permite a multiplicação das leptospiros nos túbulos contornados renais formando microcolônias, que podem ser eliminadas (leptospirúria) por dias a anos. Tal fato explica a existência de portadores renais, fator primordial na epidemiologia da leptospirose, onde a transmissão ocorre por exposição a urina dos animais infectados ou ambiente contaminado (PLANK; DEAN, 2000; ACHA; SZYFRES, 2003; KOIZUMI; WATANABE, 2005). A forma direta freqüentemente acontece, entre os animais, por transmissão venérea ou transplacentariamente. Provavelmente, o contágio direto é o mecanismo mais importante para a manutenção da leptospirose em um rebanho (ELLIS, 1984).

O contágio indireto da leptospirose ocorre pela exposição do animal susceptível a um ambiente contaminado. As leptospiros permanecem viáveis no meio ambiente, principalmente quando este oferece condições favoráveis, tais como temperatura, a umidade excessiva e o pH próximo à neutralidade. A sobrevivência das leptospiros na urina bovina diluída em água fresca foi de 35 dias e em solo úmido saturado com urina por seis meses (SMITH et al., 1994).

A leptospirose acarreta elevados prejuízos econômicos para a pecuária, pois o seu principal impacto é o comprometimento reprodutivo dos animais de interesse econômico como bovinos, ovinos e suínos (VASCONCELLOS et al., 1997). Esta importância foi ressaltada por Faine et al. (1999), pois a presença

de leptospiros nos rebanhos redundam na queda dos níveis de produção e produtividade.

Os sinais clínicos apresentados por bovinos infectados por leptospira são variados e dependem do sorovar infectante e da susceptibilidade do hospedeiro. Geralmente os animais jovens são mais gravemente afetados que os adultos (ELLIS, 1999; OLIVEIRA et al., 2000). Os problemas reprodutivos mais frequentes são abortamentos, que normalmente ocorrem no terço final da gestação (BOLIN et al., 1989a,b; LEONARD et al., 1992), infertilidade, ocorrência de natimortos e retenção placentária, participando como uma das grandes responsáveis pela baixa produtividade da pecuária nacional e mundial (GIVENS, 2006). Nas vacas o envolvimento das glândulas mamárias resulta na queda brusca da produção de leite e flacidez do úbere (LILENBAUM; SOUZA, 2003).

O controle da leptospirose envolve a aplicação de medidas que incluem a identificação das fontes de infecção, efetuada por meio de exames laboratoriais, o tratamento de animais infectados (antibioticoterapia), a drenagem do excesso de água no ambiente 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;).

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção direta ou indireta do agente ou do seu material genético (SANTA ROSA, 1970; FAINE et al., 1999). A soroaglutinação

microscópica com antígenos vivos (SAM) é o método de referência preconizado pela Organização Mundial da Saúde (FAINE et al., 1999), tanto para o diagnóstico sorológico humano quanto animal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Este teste é baseado principalmente na reação entre antígenos encontrados na superfície das leptospiros e anticorpos produzidos contra tais antígenos (BALDWIN et al., 1987). 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, estirpes locais (FAINE et al., 1982, 1999).

O método que permite o diagnóstico definitivo da leptospirose é o isolamento do microrganismo, proporcionando 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 e trabalhosas, sendo restritas a poucos laboratórios. O rápido processamento das amostras, a utilização de meios de cultura que satisfaçam as exigências nutricionais das leptospiros, o uso de antibióticos para o controle de bactérias contaminantes e as técnicas de diluição aumentam as chances de isolamento (THIERMANN, 1984a).

No que concerne às vias de transmissão, especial cuidado deve ser tomado no sentido de eliminar-se o excesso de água livre, com o do emprego de técnicas de drenagem e de canalização dos cursos de água. O destino

adequado de esgotos e das águas servidas é de grande importância para a redução do nível de contaminação ambiental (MANUAL DE LEPTOSPIROSE, 1995).

A vacinação com bacterinas comerciais antileptospiras, constitui-se num dos mais importantes meios de controle da leptospirose em animais de produção (TIZARD, 1998). A imunoprophylaxia da leptospirose animal é realizada com bacterinas, suspensões de células bacterianas íntegras, polivalentes, compostas pelos sorovares mais freqüentes em determinada região ou país (THIERMANN, 1984b; SIDDIQUE; SHAH, 1990).

Atualmente o mercado brasileiro dispõe de bacterinas contra leptospirose destinadas aos animais de produção (bovinos e suínos) contendo até sete sorovares: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Canicola, Wolffi, Grippothyphosa e Bratislava, incluindo ou não adjuvantes como o hidróxido de alumínio (SIDAN, 1997). Os adjuvantes são substâncias que aumentam a resposta imune humoral e/ou celular para o antígeno (GUPTA; SIBER, 1995). Para os animais de companhia (cães) há bacterinas bivalentes que contem os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae ou Canicola e Copenhageni e polivalentes, compostas pelos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Pomona e Grippothyphosa.

A imunidade na leptospirose referida por Inada et al. em 1916 foi confirmada pela demonstração da presença de anticorpos protetores no soro de pacientes que haviam se recuperado da doença. Os animais de laboratório

inoculados com estes soros resistiram à infecção pelo sorovar que havia acometido os seres humanos, mas continuavam susceptíveis à infecção para outras variantes antigenicamente distintas (ALEXANDER, 1964). Estudos posteriores de imunidade e patogenicidade demonstraram desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células B (STAVITSKY, 1945, 1948; FAINE et al., 1974; ALDER, 1980).

A imunidade conferida pelas bacterinas antileptospirose, específica para os determinantes antigênicos constituídos por lipopolissacarídeos da parede externa das leptospiros é essencialmente humoral. A opsonização e a fagocitose são mais rápidas e mais intensas na presença de anticorpos neutralizantes.. Os anticorpos neutralizantes são bastante ativos contra patógenos extracelulares, como a maioria das bactérias (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1985).

Dentre as imunoglobulinas das classes G e M (resposta imune humoral), presentes em maior concentração no sangue dos vertebrados infectados por leptospiros, especial destaque deve ser dado para as aglutininas responsáveis pela formação de imunocomplexos com os determinantes antigênicos, mecanismo da SAM, teste aceito como “padrão ouro” para o diagnóstico laboratorial da leptospirose (GUIMARÃES, 1981).

A vacinação contra a leptospirose deve ser capaz de promover um estímulo imunológico adequado, contribuindo para que o organismo produza

títulos de anticorpos efetivamente protetores com capacidade de controlar ou bloquear o processo infeccioso (FAINE et al., 1999).

Os anticorpos contra leptospiros podem ser detectados no soro sanguíneo dos animais no início das infecções e mais tardiamente no caso das vacinações. A concentração dos anticorpos aumenta à medida que a infecção evolui ou ainda no desenvolvimento da resposta induzida pelos antígenos vacinais (FRANCIS et al., 1983; THEVENON et al., 1987; TIZARD, 1998). Em vista destes aspectos a possível interferência de anticorpos vacinais no diagnóstico sorológico tem sido relatada, o que implica na dificuldade de diferenciar imunoglobulinas de origem vacinal das oriundas de infecção natural (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. Todavia, as vacinas estimulam a produção de baixos títulos de aglutininas detectáveis pela SAM, que surgem rapidamente e declinam após várias semanas, e as proteções contra a doença e a infecção renal têm sido demonstradas em bovinos por pelo menos 12 meses (BLOOD; RADOSTITS, 1989).

Existe um consenso de que a proteção conferida por bacterinas antileptospirose é sorovar específica, fator limitante para a sua eficiência (KOIZUMI; WATANABE, 2005), no entanto, já foi observada a existência de proteção cruzada entre representantes de um mesmo sorogrupo (COSTA et al., 1998; TABATA et al., 2002).

A primeira resposta imunológica dos bovinos à infecção por *Leptospira* spp, acontece logo após o término da fase de bacteremia, quando os anticorpos aglutinantes do tipo IgM são detectados no soro. Em animais infectados com o sorovar Hardjo essa fase passa rapidamente, sendo pouco provável a presença desses anticorpos circulantes após quatro semanas de infecção. Geralmente, dentro de uma a duas semanas após a infecção, surgem os anticorpos do tipo IgG e aos três meses eles já contabilizam mais de 80% dos anticorpos detectados na SAM. O título destes anticorpos declina gradualmente após 11 meses, mas o período de persistência é variável. Em vacas com histórico de abortamento ou em animais mantenedores do sorovar Hardjo, os títulos de anticorpos podem não ser detectados pela SAM (SMITH et al., 1994).

Em condições de campo o uso de bacterinas contra a leptospirose reduz a ocorrência da infecção e dos problemas reprodutivos; e em regiões endêmicas, a vacinação contribui substancialmente para a redução do impacto econômico da doença (SULLIVAN, 1974; BOLIN et al., 1989a). As bacterinas comerciais antileptospirose induzem a uma baixa produção de anticorpos IgM e uma resposta persistente de anticorpos IgG que pode durar até 12 meses (HOCKER; BAUER, 1965).

Títulos baixos na reação de SAM podem ser indicativos de uma infecção recente ou resposta imune vacinal, particularmente nos três meses subseqüentes a última aplicação da bacterina (VASCONCELLOS et al., 1997).

Assim, dependendo da fase de infecção, os animais podem ou não apresentar sorologia positiva na SAM e no ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Animais com sorologia negativa em ambos os testes não estariam necessariamente sem a leptospirose, uma vez que aproximadamente 50% dos animais com mais de dois anos de infecção não apresentam reação no teste de SAM (ELLIS, 1984; KEE et al., 1994; BOLIN; ALT, 1999).

Uma bacterina ideal contra leptospirose além de prevenir contra a infecção renal também deverá induzir a uma imunidade de longa duração, no entanto 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. Assim animais vacinados podem apresentar uma infecção renal inaparente e leptospiúria. (BEY; JOHNSON, 1982; BOLIN et al., 1989a).

As vacinas contra leptospirose têm sido testadas em bovinos por vários anos, e os relatos sobre sua eficácia são conflitantes. Faine et al. (1999) relataram que os resultados de triagens em bovinos têm diferido desde o completo sucesso, significando que todos os animais vacinados estavam protegidos e os controles não, até a completa falência, com diferenças não significativas entre os grupos de controle experimental e infecção de todos os animais, sendo observada a persistência das leptospiros nos rins e no útero.. Bolin et al. (1989a); Favero et al. (1997) e Samina et al. (1997) encontraram quase nenhuma resposta sorológica após a vacinação com bacterinas comerciais.

François et al. (1987) quando testaram três vacinas comerciais normalmente utilizadas para controle da leptospirose suína, observaram que 96% dos animais não produziram anticorpos aglutinantes, detectáveis no ponto de corte adotado (1:100) para SAM 15 dias após a primeira vacinação.

A correlação entre sorologia e a excreção de leptospiras pela via urinária em animais naturalmente infectados com o sorovar Hardjo foi estudada por Leonard et al. (1992) não sendo possível determinar uma correlação entre sorologia e excreção em bovinos naturalmente infectados.

Bey e Johnson (1978) vacinaram bovinos e cães com uma vacina pentavalente de envelope externo (1g de cada sorovar: Canicola, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Hardjo e Grippothyphosa) ou vacina de cultura total. A resposta humoral dos cães e bovinos a cada sorovar foi monitorada por dois anos. Os resultados obtidos indicaram que, nos testes de SAM e ICL, tanto a IgM como a IgG, estavam presentes durante os dois anos de estudos. Títulos de SAM tenderam a se relacionar com IgM, enquanto títulos de ICL tenderam a se correlacionar com IgG. A ICL foi mais sensível para detecção de anticorpos ao sorovar Hardjo que o teste de SAM.

Nos EUA o emprego de bacterinas contra a leptospirose reduziu a ocorrência da infecção e os problemas reprodutivos causados pela variante sorológica Hardjo (BOLIN et al., 1989a), em regiões endêmicas, a vacinação contribuiu para a redução do impacto econômico da doença (SULLIVAN, 1974).

Favero et al. (1997) vacinaram bovinos machos com bacterinas antileptospirose contendo os sorovares Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo e Wolff, os resultados obtidos revelaram que a presença de aglutininas pré-vacinais exerceu pequena influência no perfil de aglutininas pós-vacinais obtidas com as variantes Hardjo, Wolffi, Icterohaemorrhagiae. As aglutininas pré-vacinais heterólogas (Grippotyphosa), foram pouco afetadas pela vacinação.

Siddique e Shah (1990) afirmaram que as vacinas não induzem uma resposta sorológica contra todos os sorovares nelas contidos, podendo isso ocorrer devido a uma diferença na concentração antígeno. Tabata (2002) confirmou essa descrição quando determinou a proteção cruzada entre os sorovares Wolffi, Hardjo e Guaicura em hamsters. Nardi et al. (2005) também observaram a reação cruzada entre os sorovares Hardjo e Wolffi quando compararam uma vacina que não continha o sorovar Wolffi em sua composição. Os animais não apresentam uma mesma magnitude de resposta em anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM contra os sorovares utilizados como antígenos, quando considerados os logaritmos dos títulos de anticorpos aglutinantes.

Samina et al. (1997), verificaram que o uso de vacina inativada pode prevenir a agalaxia, mas não confere proteção contra a infecção ou contra as localizações renais e uterinas das leptospiros; embora o grau de leptospiúria possa estar relacionado aos níveis de anticorpos humorais específicos. No entanto, de acordo com a qualidade da bacterina, a vacinação pode conferir

proteção contra a doença clínica e a colonização renal (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991).

Costa et al. (1998) constataram que hamsters (*Mesocricetus auratus*) vacinados com bacterinas produzidas com as variantes sorológicas Hardjo ou Wolffi apresentaram proteção ao desafio com estirpe virulenta do sorovar Hardjo. No entanto, não foi possível a realização de desafio com o sorovar Wolffi por não ser disponível uma estirpe deste sorovar com patogenicidade regular para hamsters.

Alguns meios de cultura e métodos de produção empregados pela indústria farmacêutica são sigilosos e resultam em diferentes níveis de eficácia e potência os quais devem ser avaliados pelo teste de potência de bacterinas antileptospiras preconizado pelo United States Department of Agriculture (1997). Essas bacterinas são polivalentes, preparadas pela combinação de cultivos de diferentes sorovares, de acordo com a soroprevalência regional, atendendo as necessidades de proteção soro específica (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991).

Para a realização do teste de potência de bacterinas antileptospiras (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1997), é necessário à utilização de animais de laboratório (hamsters), e estirpes de leptospiras virulentas para tais animais. Este teste considera a vacina aprovada quando a proporção de mortes por leptospirose após o desafio, no grupo controle não vacinado, for igual ou superior a oito animais no total de dez e, no grupo

vacinado, essa proporção não deve ser superior a dois no total de dez. As desvantagens apresentadas para a realização do teste de potência de bacterinas antileptospiras conduziram alguns pesquisadores a tentar utilizar outros testes alternativos. O teste de ELISA é mais sensível que a reação de SAM, mas apresenta algumas limitações como o uso de antígenos sorovar específico e variações no modo de preparação do extrato antigênico (SMITH et al., 1994). Além disso, não existe uma correlação entre os níveis de anticorpos demonstrados por este teste e o estado imune de um animal vacinado, uma vez que os anticorpos protetores e não protetores são igualmente detectados no ELISA (YAN et al., 1999).

O teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* (TRIPATHY et al., 1971, 1973), avalia os níveis de anticorpos neutralizantes presentes no soro sanguíneo de animais vacinados, os quais não apresentam relação direta com os anticorpos aglutinantes revelados pelo teste clássico de soroaglutinação microscópica (HANSON, 1977).

A despeito do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* ter sido empregado em diversos experimentos (TABATA, 2002; DELBEM, 2004; NARDI, 2005; SOTO, 2006;), ainda não foi realizado o estudo da correlação entre os resultados deste procedimento e o teste oficial de potência de vacinas antileptospiras, de modo a ser estabelecido um limiar de anticorpos neutralizantes em hamsters vacinados com bacterinas antileptospirose que corresponda ao nível de aprovação no teste de potência que permita validar a

qualidade da bacterina antileptospiras, o que constitui objeto do presente trabalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos jovens, com 60 a 100 gramas de peso vivo, alojados no infectório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP. Durante o experimento os animais foram distribuídos e mantidos 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.

Devido ao número de animais necessário e instalações disponíveis os ensaios comparativos entre o teste de potência de bacterinas antileptospiras e o teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* (ICL) foram realizados isoladamente segundo a marca da bacterina empregada.

4.2 BACTERINAS

As bacterinas adotadas para o teste de potência de vacina e para o teste de inibição de crescimento *in vitro* foram bacterinas comerciais polivalentes designadas pelas letras A e B, produzidas para uso em bovinos e suínos, contendo os sorovares Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Hardjo, Grippothyphosa, Bratislava e Tarassovi (apenas a bacterina B).

4.3 TESTE DE POTÊNCIA DA BACTERINA A

Os hamsters utilizados no teste de potência da bacterina A (Apêndice A), foram distribuídos em 12 grupos de dez animais: (1) grupo controle não vacinado e não desafiado; tratado com duas aplicações de 0,25 mL de solução salina estéril 0,85% via subcutânea com intervalo de 15 dias (2) grupo vacinado com bacterina A pura; (3) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:200; (4) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:400; (5) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:800; (6) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:1600; (7) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:3200; (8) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:6400; (9) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:12800; (10) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:25600; (11) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:51200; (12) grupo não vacinado e desafiado. Cada grupo, exceto os grupos 1 e 12, receberam

duas doses de 0,25 mL de bacterina A com intervalo de 15 dias pela via subcutânea. Após 21 dias da segunda dose, todos os animais (exceto o grupo 1, que recebeu 0,2 mL de meio de EMJH¹ modificado pela via intraperitoneal), foram desafiados com cultura viva dos sorovares Pomona ou Canicola no volume individual de 0,2 mL pela via intraperitoneal.

Os animais foram observados por 21 dias consecutivos, contabilizando-se os que morreram por leptospirose. Ao final deste período, os animais sobreviventes ao desafio foram submetidos à eutanásia por inalação de gás carbônico (câmara de CO₂), e necropsiados para colheita dos rins e realização de cultivos destinados ao controle de infecção renal por leptospiras.

4.4 TESTE DE POTÊNCIA DA BACTERINA B

Os hamsters utilizados no teste de potência da bacterina B (Apêndice B), foram distribuídos em oito grupos de dez animais: (1) grupo controle não vacinado e não desafiado; tratado com duas aplicações de 0,25 mL de solução salina estéril 0,85% via subcutânea com intervalo de 15 dias (2) grupo vacinado com bacterina B pura; (3) grupo vacinado com bacterina B na diluição 1:200; (4) grupo vacinado com bacterina B na diluição 1:400; (5) grupo vacinado com bacterina B na diluição 1:800; (6) grupo vacinado com bacterina B na diluição 1:1600; (7) grupo vacinado com bacterina B na diluição 1:3200; (8) grupo não

¹ Ellinghausen-McCullough-Jonhson-Harris (DIFCO-Detroit, EUA)

vacinado e desafiado; tratado com duas aplicações de 0,25 mL de solução salina estéril 0,85% via subcutânea com intervalo de 15 dias. Cada grupo, exceto os grupos 1 e 8, receberam duas doses de 0,25 mL de bacterina B com intervalo de 15 dias pela via subcutânea. Após 21 dias da segunda dose, todos os animais (exceto o grupo 1, que recebeu 0,2 mL de meio de EMJH modificado pela via intraperitoneal), foram desafiados com cultura viva do sorovar Canicola no volume individual de 0,2 mL pela via intraperitoneal.

Os animais foram observados por 21 dias consecutivos, contabilizando-se os que morreram por leptospirose. Ao final deste período, os animais sobreviventes ao desafio foram submetidos à eutanásia por inalação de gás carbônico (câmara de CO₂), e necropsiados para colheita dos rins e realização de cultivos destinados ao controle de infecção renal por leptospirosas.

4.5 ESTIRPES VIRULENTAS EMPREGADAS NO DESAFIO

O teste de potência foi realizado com as estirpes virulentas LO4 e Pomona Fromm.

4.5.1 Estirpe LO4

Leptospira interrogans sorovar Canicola, isolada de suínos de abate pelo Prof. Dr. Júlio César Freitas, da Universidade Estadual de Londrina (FREITAS et al., 2004) e tipificada com anticorpos monoclonais pelo Royal Tropical Institute Amsterdam, Holanda.

4.5.2 Estirpe Pomona Fromm

Leptospira interrogans sorovar Pomona estirpe Fromm, fornecida pelo Salsbury Laboratórios Ltda (Paulínea, São Paulo, Brasil).

4.6 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS INFECTANTES DOS SOROVARES POMONA E CANICOLA

Este ensaio foi utilizado como controle da potência das bacterinas segundo o esquema de imunização adotado (Apêndices A e B).

O desafio do teste de potência foi efetuado com suspensão de tecido hepático de hamsters experimentalmente infectados com os sorovares Pomona ou Canicola, estirpes comprovadamente patogênicas para estes animais (TABATA, 2002; DELBEM, 2004; SOTO, 2006;) e sacrificados 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 modificado, resultando na diluição 10^{-1} , a partir da qual foram efetuadas diluições seriadas em escala geométrica de razão dez (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12}). A diluição de escolhida para o desafio foi a 10^{-6} .

4.7 TITULAÇÃO DOS INÓCULOS INFECTANTES DE DESAFIO COM O SOROVAR POMONA E CANICOLA

Para a titulação dos inóculos de desafio com os sorovares Canicola e Pomona (Apêndices A e B), foram utilizados 25 hamsters por sorovar, distribuídos em cinco grupos com cinco animais. Cada grupo foi inoculado com

uma das diluições em escala geométrica de razão dez (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) do inóculo infeccioso no volume de 0,2 mL/hamster via intraperitoneal. Os animais foram observados diariamente durante 21 dias e para o cálculo da dose letal (DL 50), foi empregado o método de Reed e Muench (1938).

4.8 ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RENAL

Aos 21 dias pós-infecção (d.p.i.) por leptospiros, os hamsters sobreviventes foram anestesiados em câmara de CO₂ e, após a sangria destinada a SAM, foram submetidos à eutanásia com o aprofundamento da anestesia. Os animais foram necropsiados e seus rins colhidos assepticamente em placas de Petri estéreis e pesados em balança analítica de precisão (Apêndices A e B).

Os rins foram macerados em Stomacher 80², e foi adicionado quantidade suficiente de solução salina tamponada de Sorensen³ 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} , 10^{-3}). Cem microlitros por diluição foram semeados em tubos com tampa de baquelite contendo 5,0 mL de meio semi-sólido de Fletcher (MYERS, 1985), dois tubos

² Biomaster –SEWARD, Lab System

³ 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

por diluição, os quais foram incubados em estufa 28-30°C por seis semanas, com observações semanais (FAVERO et al., 1997) para a verificação da formação do anel de crescimento subsuperficial (Zona de Dinger) de leptospiras no meio (MYERS, 1985), o qual foi confirmado pela constatação efetiva de leptospiras em microscopia de campo escuro.

4.9 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS *IN VITRO* COM OS SOROVARES CANICOLA E POMONA

A mensuração dos níveis de anticorpos neutralizantes foi efetuada pelo teste de inibição do crescimento de leptospiras *in vitro* adaptado da descrição de Tripathy et al. (1973). O procedimento foi ajustado para as condições do laboratório que emprega cultura em meio líquido de EMJH modificado (ALVES, 1995) com quatro a oito dias de cultivo (TABATA, 2002).

Foram utilizados 180 hamsters, distribuídos em grupos de dez animais: (1) grupo controle, animais não vacinados; (2) grupo vacinado com bacterina A pura; (3) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:200; (4) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:400; (5) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:800; (6) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:600. (7) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:3200 (8) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:6400; (9) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:12800; (10) grupo vacinado com bacterina A na diluição 1:25600; (11) grupo vacinado

com bacterina A na diluição 1:51200. Para a vacina B foi realizado o ensaio utilizando-se somente as concentrações pura, diluída 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200, e o grupo controle não vacinado. Todos os animais exceto os controles receberam as bacterinas a serem testadas pela via subcutânea, em duas doses de 2,5 mL com intervalo de 15 dias. Decorridos 15 dias após a última dose das vacinas testadas, os animais foram anestesiados por inalação de gás carbônico (câmara de CO₂), sangrados assepticamente por punção intracardiaca para a obtenção de soro destinado à ICL e SAM, e finalmente submetidos a eutanásia por inalação de gás carbônico. Cada grupo foi distribuído em dois subgrupos, destinados ao preparo dos *pools* de soros (Apêndice C),

4.9.1 Obtenção dos *pools* de soros

Decorridos 15 dias após a última dose das bacterinas testadas os animais foram anestesiados pela via inalatória com vapores de CO₂ e sangrados assepticamente por punção intracardiaca. As amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas para a obtenção do soro. Algumas gotas de soro (100 µL) foram submetidas ao teste de esterilidade em meio TSB⁴ (37°C por 24 horas). Constatada individualmente a esterilidade dos soros, foram constituídos os *pools* com quantidades iguais

⁴ Tryptic Soy Broth (DIFCO- Detroit, EUA)

de soro por animal e subgrupo. Posteriormente os *pools* de soros foram inativados a 56°C por 40 minutos. A composição dos *pools* de soros foi adotada, pois o volume máximo de soro sanguíneo obtido individualmente por hamster foi insuficiente para a realização da prova.

4.9.2 Reação

Os *pools* de soros obtidos 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 com tampa de baquelite contendo 2,5 mL de meio EMJH modificado (ALVES, 1995), 0,2 mL do soro a ser testado e 0,1 mL de cultura de leptospiros vivas, sorovares Canicola e Pomona com dez dias de cultivo em meio de EMJH modificado. Os tubos foram incubados em estufa a 28-30°C por dez dias.

4.9.3 Leitura e interpretação

Ao décimo dia do ensaio os tubos foram examinados para a observação de presença ou ausência de crescimento por meio da turvação macroscópica característica como crescimento positivo. Após esse período os tubos que não apresentaram turbidez foram considerados positivos para anticorpos neutralizantes.

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 *pools* de soros dos hamsters, obtidos no teste de crescimento de leptospiras *in vitro*, foram calculados conforme Pizzi (1950).

4.10. SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM)

A microtécnica de soroaglutinação microscópica (GALTON et al., 1965; COLE et al., 1973) foi empregada para a mensuração dos níveis de aglutininas dos *pools* de soros dos hamsters, tendo como antígenos os sorovares Canicola e Pomona. As culturas vivas de leptospiras foram mantidas em meio líquido de EMJH modificado (ALVES, 1995), com quatro a 14 dias de crescimento e uma densidade aproximada 100 a 200 microrganismos por campo microscópico, com aumento de 400 vezes.

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, 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 considerado 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 formação de aglutinação.

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O resultado obtido nos hamsters nas duas fases foi analisado pelo critério preconizado de teste de potência para bacterinas de *Leptospira interrogans*, proposto pelo Ministério da Agricultura dos EUA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977).

Os intervalos de confiança (95%) dos títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras nos *pools* dos soros dos hamsters foram calculados conforme Pizzi (1950).

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos segundo a metodologia empregada estão descritos nos tópicos abaixo.

5.1 TITULAÇÃO DO INÓCULO INFECTANTE DE DESAFIO COM OS SOROVARES CANICOLA E POMONA

No transcorrer do período de observação de 21 dias, todos os animais do grupo de titulação do inóculo de desafio para o sorovar Pomona morreram por leptospirose e para o sorovar Canicola houve um animal sobrevivente na diluição 10^{-8} , o que inviabilizou o cálculo da DL50. A DL 50 efetivamente empregada foi superior 10^{-9} para os dois sorovares empregados: Canicola e Pomona.

5.2 TESTE DE POTÊNCIA DE BACTERINAS COMERCIAIS

ANTILEPTOSPIROSE EM HAMSTERS – BACTERINA A

Tabela 1- Proporção de hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina comercial A, sobreviventes ao desafio segundo a concentração da bacterina e o sorovar de leptospira empregado para o desafio – São Paulo - 2007

Concentração da bacterina	Sorovar de desafio	
	Canicola	Pomona
Pura	10/10*	10/10*
1:200	10/10	10/10
1:400	10/10	10/10
1:800	10/10	10/10
1:1600	10/10	10/10
1:3200	09/10	07/10
1:6400	10/10	09/10
1:12800	08/10	06/10
1:25600	06/10	05/10
1:51200	03/10	04/10
Controle **	01/10	00/10

*Número de sobreviventes/ número de animais desafiados

**Solução salina 0,85%

A tabela 1 apresenta os resultados do teste de potência em hamsters para a bacterina A antileptospirose. Os resultados observados referem-se à proporção de hamsters sobreviventes ao desafio com os sorovares Canicola ou Pomona. No grupo controle do inóculo infectante de desafio houve um animal sobrevivente em dez animais para o desafio com o sorovar Canicola (1/10), zero sobreviventes em dez para o sorovar Pomona (0/10), enquanto nos grupos vacinados e desafiados com o sorovar Canicola, as proporções foram de 10/10 para as concentrações da bacterina pura, diluída 1:200, 1:400; 1:800, 1:1600 e 1:6400, 9/10 para a concentração da bacterina 1:3200, 08/10 para a

concentração da bacterina 1:12800, 6/10 para a concentração da bacterina 1:25600, 3/10 para a concentração da bacterina 1:51200.

Nos grupos vacinados e desafiados com o sorovar Pomona, as proporções foram de 10/10 para as concentrações da bacterina pura, diluída 1:200, 1:400; 1:800 e 1:1600, 7/10 para a concentração da bacterina 1:3200, 9/10 para a concentração da bacterina 1:6400, 06/10 para a concentração da bacterina 1:12800, 5/10 para a concentração da bacterina 1:25600, 4/10 para a concentração da bacterina 1:51200.

5.3 TESTE DE POTÊNCIA DE BACTERINAS COMERCIAIS

ANTILEPTOSPIROSE EM HAMSTERS – BACTERINA B

Tabela 2- Proporção de hamsters vacinados contra a leptospirose com bacterina comercial B, sobreviventes ao desafio segundo a concentração da bacterina e o sorovar de leptospira empregado para o desafio – São Paulo - 2007

Concentração da bacterina	Sorovar de desafio
	Canicola
Pura	10/10*
1:200	10/10
1:400	10/10
1:800	08/10
1:1600	04/10
1:3200	00/10
Controle **	01/10

*Número de sobreviventes/ número de animais desafiados

**Solução salina 0,85%

A tabela 2 apresenta os resultados do teste de potência em hamsters realizado com a bacterina B antileptospirose. Os resultados observados referem-se à proporção de hamsters sobreviventes ao desafio com o sorovar Canicola. No grupo controle do inóculo infectante de desafio houve um animal sobrevivente em dez animais (1/10), enquanto nos grupos vacinados e desafiados com o sorovar Canicola, as proporções foram de 10/10 para as concentrações da bacterina pura, diluída 1:200 e 1:400, 8/10 para a concentração da bacterina 1:800, 4/10 para a concentração da bacterina 1:1600, zero sobreviventes em dez (0/10) para a concentração da bacterina 1:3200.

5.4 ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RENAL

Tabela 3- Proporção de hamsters vacinados contra a leptospirose com a bacterina A e B, sobreviventes ao desafio e caracterizados como portadores renais de leptospiras. Segundo a concentração da bacterina e sorovar de leptospira empregado para o desafio - São Paulo -2007

Concentração da bacterina	Vacina A		Vacina B
	Sorovar de desafio		Canicola
	Canicola	Pomona	
Pura	0/10*	0/10*	0/10*
1:200	0/10	0/10	0/10
1:400	1/10	0/10	1/10
1:800	0/10	0/10	0/08
1:1600	0/10	0/10	0/04
1:3200	3/09	0/07	...
1:6400	2/10	0/09	...
1:12800	2/08	0/06	...
1:25600	1/06	1/05	...
1:51200	0/03	1/04	...

*Número de portadores renais/ número de animais sobreviventes ao desafio
... dados inexistentes

Na tabela 3 são observadas as proporções de hamsters sobreviventes ao desafio com os sorovares Canicola ou Pomona vacinados com a bacterina A, pura e suas diluições, que apresentaram estado de portador renal, confirmado pelo isolamento de leptospiras nos cultivos de tecido renal em meio semi-sólido de Fletcher. Nos hamsters vacinados contra a leptospirose com a bacterina B pura e suas diluições, um animal vacinado com a bacterina diluída 1:400 apresentou infecção renal por leptospiras pelo sorovar Canicola (1/10).

A seguir são apresentados nos gráficos 1, 2 e 3 os resultados das comparações entre o teste oficial de potência de bacterinas antileptospiras e a proteção contra o colonização renal nos hamsters vacinados com as bacterinas A e B antileptospirose puras e suas diluições e sobreviventes ao desafio com os sorovares Canicola e Pomona.

Gráfico 1- Associação entre os resultados do teste de potência em hamsters da bacterina A antileptospirose para o sorovar Canicola e a proporção de portadores renais segundo a concentração da bacterina expressas em logaritmo de base 10 - São Paulo-2007

Gráfico 2- Associação entre os resultados do teste de potência em hamsters da bacterina A antileptospirose para o sorovar Pomona e a proporção de portadores renais segundo a concentração da bacterina expressas em logaritmo de base 10 - São Paulo-2007

Gráfico 3- Associação entre os resultados do teste de potência em hamsters da bacterina B antileptospirose para o sorovar Canicola e a proporção de portadores renais segundo a concentração da bacterina expressas em logaritmo de base 10- São Paulo-2007

5.5 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO *IN VITRO* – BACTERINA A

Nas tabelas 4, 5 e 6, são apresentados os intervalos de confiança (95%) das médias geométricas dos títulos de anticorpos neutralizantes dos *pools* dos soros de hamsters vacinados com as bacterinas polivalentes antileptospirose A e B, segundo a concentração da bacterina e sorovar testado.

Os *pools* dos soros dos animais do grupo controle (não vacinados) foram não reagentes ao teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* para os sorovares Canicola e Pomona, o que confirmou a especificidade do teste.

Tabela 4- Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiros e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para o sorovar Canicola, em *pools* dos soros dos hamsters imunizados com bacterina A antileptospirose, segundo a concentração da bacterina -São Paulo - 2007

Concentração da bacterina	Anticorpos neutralizantes e IC (95%)
Pura	1,324±0,272
200	1,260±0,307
400	1,204±0,283
800	1,180±0,265
1600	1,204±0,286
3200	1,173±0,299
6400	1,030±0,293
12800	0,980±0,331
25600	0,839±0,344
51200	0,646±0,322

Tabela 5 - Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiros e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para o sorovar Pomona, em *pools* dos soros dos hamsters imunizados com bacterina A antileptospirose, segundo a concentração da bacterina -São Paulo- 2007

Concentração da bacterina	Anticorpos neutralizantes e IC (95%)
Pura	1,266±0,284
200	1,279±0,299
400	1,232±0,303
800	1,118±0,337
1600	1,212±0,260
3200	0,920±0,312
6400	1,168±0,336
12800	0,870±0,300
25600	0,903±0,307
51200	0,953±0,321

Tabela 6 - Títulos de anticorpos neutralizantes antileptospiras e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) expressos em logaritmo de base 10 para o sorovar Canicola, em *pools* dos soros dos hamsters imunizados com bacterina B antileptospirose, segundo a concentração da bacterina -São Paulo- 2007

Concentração da bacterina	Anticorpos neutralizantes e IC (95%)
Pura	1,108±0,323
200	1,036±0,305
400	1,016±0,281
800	1,096±0,326
1600	0,877±0,352
3200	0,738±0,314

5.6 TÍTULOS DE ANTICORPOS AGLUTINANTES DE HAMSTERS VACINADOS COM BACTERINAS COMERCIAIS POLIVALENTES

Na SAM realizada com os *pools* dos soros dos hamsters vacinados com a bacterina A pura e suas diluições, submetidos ao teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro*, efetuados com os sorovares Canicola e Pomona, dois *pools* de hamsters foram soro reagentes (2/20) para os sorovares Canicola e Pomona na concentração pura da bacterina, com títulos que variaram de 200 a 400.

Todos os *pools* dos hamsters vacinados com a bacterina B pura e suas diluições, submetidos ao teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* foram não reagentes ao teste de soroaglutinação microscópica em campo escuro para os sorovares de referência Canicola e Pomona

No gráfico 4, são apresentados as comparações entre os títulos de anticorpos aglutinantes na prova de SAM e os títulos de anticorpos neutralizantes no teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* expressos em logaritmo de base 10 para os sorovares Canicola e Pomona dos *pools* de soros dos hamsters vacinados com a bacterina A antileptospirose e suas concentrações.

Gráfico 4- Associação entre os títulos de anticorpos aglutinantes e os títulos de anticorpos neutralizantes expressos em logaritmo de base 10 para os sorovares Canicola e Pomona dos *pools* de soros dos hamsters imunizados com a bacterina A antileptospirose e suas concentrações - São Paulo-2007

5.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO TESTE DE POTÊNCIA EM HAMSTERS DE BACTERINAS ANTILEPTOSPIROSE E OS DO TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE LEPTOSPIRAS *IN VITRO* SEGUNDO A CONCENTRAÇÃO DA BACTERINA

A seguir são apresentados nos gráficos 5, 6 e 7 os resultados das comparações entre o teste oficial de potência de bacterinas antileptospiras e o teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro*, de modo a se estabelecer um limiar entre anticorpos neutralizantes em hamsters vacinados com bacterinas antileptospirose que corresponda ao nível de aprovação no teste de potência que permita validar a qualidade da bacterina antileptospirose.

Gráfico 5- Associação entre os resultados para o sorovar Canicola do teste de potência em hamsters da bacterina A antileptospirose e os do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* segundo a concentração da bacterina expressa em logaritmo de base 10 - São Paulo-2007

Gráfico 6- Associação entre os resultados para o sorovar Pomona do teste de potência em hamsters da bacterina A antileptospirose e os do teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* segundo a concentração da bacterina expressa em logaritmo de base 10 - São Paulo-2007

Gráfico 7- Associação entre os resultados para o sorovar Canicola do teste de potência em hamsters da bacterina B antileptospirose e os do teste de inibição de crescimento de leptospiiras *in vitro* segundo a concentração da bacterina expressa em logaritmo de base 10 - São Paulo-2007

6 DISCUSSÃO

Inicialmente pilotos do teste de potência de bacterinas antileptospirose foram efetuados para a escolha das bacterinas comerciais e respectivas concentrações a serem utilizadas no experimento. De seis bacterinas testadas duas (A e B) apresentaram resultados satisfatórios, sendo aprovadas segundo o critério de avaliação internacional (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977). A bactéria A nas concentrações pura e em diluições seriadas de razão dois, conferiu proteção aos animais até a diluição 1:3200, assim nova série de diluições foi ensaiada e a partir da diluição 1:12800 foram obtidos resultados abaixo do permitido e assim decidiu-se que no experimento seriam empregadas diluições de bacterinas até a diluição de 1:51200. Os testes de potência de desafio para a bactéria B, indicaram que só seria possível o ensaio com o sorovar Canicola, pois a bactéria não foi aprovada pelos critérios internacionais quando desafiada com o sorovar Pomona, para esta bactéria a faixa de diluições adotadas foi até 1:3200.

Os testes de potência de bacterinas foram efetuados apenas com os sorovares Canicola e Pomona, pois são os únicos com patogenicidade regular para hamsters disponíveis no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP.

O teste de potência antileptospirose preconizado pelo Ministério da Agricultura dos EUA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977) considera a vacina aprovada quando a proporção de mortes por leptospirose no grupo controle

não vacinado for igual ou superior a 8/10 e, no grupo vacinado, essa proporção não deve ser superior a 2/10 ou 5/20.

Os resultados do teste de desafio em hamsters com as bacterinas comerciais antileptospirose A e B, apresentados nas tabelas 1 e 2, estão dentro dos parâmetros exigidos, portanto as bacterinas foram aprovadas segundo o critério de avaliação internacional (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977) que é de 80% de animais sobreviventes na diluição da bacterina recomendada para hamsters, diluída 1:800 da dose recomendada para bovinos e suínos.

Na tabela 1, constata-se o resultado de uma morte a mais que o valor recomendado por leptospirose no grupo 7 (vacinado com a bacterina A diluída 1:3200), a proporção de mortos e inoculados com o sorovar Pomona foi de 3/10. Considera-se que apesar da proporção de mortes ter ultrapassado o valor permitido, esta variação pode estar relacionada às características individuais dos animais. Esse resultado ainda poderia ser considerado válido se, ao serem vacinados e desafiados outros dez animais, fosse atingida a proporção máxima de 5/20.

Apesar de não estar previsto no protocolo internacional de avaliação de bacterinas comerciais antileptospiras, neste experimento foram utilizadas diferentes diluições das bacterinas, para que fosse possível o estabelecimento do limiar de anticorpos neutralizantes em hamsters vacinados com vacinas antileptospirose que correspondesse ao nível de aprovação no teste de potência. Foi demonstrado que as

vacinas mais concentradas apresentaram melhores resultados tanto no teste de desafio quanto no teste de ICL, tanto para o sorovar Canicola como para o Pomona. Estes resultados indicaram que uma maior massa antigênica poderia induzir maior produção de anticorpos com conseqüente melhor proteção. Resultados semelhantes a esses também foram observados por Favero et al. (1997) quando vacinaram três grupos de bovinos com bacterinas antileptospirose contendo os sorovares Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo e Wolffi com concentrações de leptospiros variando de $9,8 \times 10^5$ a $13,2 \times 10^7$ por mililitro.

As proporções de hamsters vacinados sobreviventes ao desafio e caracterizados como portadores renais no 21º d. p.i. apresentados nos gráficos 1, 2 e 3, e na tabela 3, mostraram que as bacterinas antileptospirose foram aprovadas na diluição 1:800 recomendada pelas normas internacionais, mas essa diluição não foi capaz de proteger contra o estado de portador renal de leptospiros, pois a partir da diluição 1:400 houve a presença de portadores renais para as duas bacterinas usadas. Bey e Johnson (1982) e Bolin et al. (1989a) relataram que bacterinas antileptospirose podem proteger contra o estabelecimento da doença, porém algumas vezes não conseguem impedir a infecção e a caracterização do estado de portador renal.

A bacterina A antileptospirose induziu proteção parcial contra a colonização renal, pois em nove animais de 45 sobreviventes houve isolamento de leptospiros do tecido renal para o sorovar Canicola e em dois animais de nove sobreviventes para o

sorovar Pomona. No ensaio com a bacterina B houve um animal portador em dez sobreviventes. GUIMARÃES et al. (1983) descreveram que as bacterinas contra leptospirose bovina disponíveis no mercado protegem contra manifestações clínicas da doença, porém não asseguram garantia contra a colonização renal e eliminação de leptospiras pela urina. BOLIN et al. (1989a) relataram que a vacinação diminui a ocorrência de infecção e transtornos reprodutivos causados pelo sorovar Hardjo sob condições de campo, mesmo não induzindo níveis significativos de anticorpos aglutinantes.

A despeito do teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* ter sido empregado em diversos experimentos (TABATA, 2002; DELBEM, 2004; NARDI, 2005; SOTO, 2006), ainda não havia sido estabelecido um limiar de anticorpos neutralizantes em hamsters vacinados com bacterinas antileptospirose que correspondesse ao nível de aprovação no teste de potência. Os títulos de anticorpos neutralizantes dos *pools* dos soros dos hamsters apresentados nas tabelas 4, 5 e 6 confirmaram a proteção conferida pelo teste de desafio com os sorovares Canicola e Pomona (bacterina A) e Canicola para a bacterina B.

A soroaglutinação microscópica realizada nos *pools* de soros dos hamsters destinados ao teste de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro*, mostrou ausência de anticorpos aglutinantes para a bacterina B. A bacterina A foi capaz de induzir a produção de anticorpos aglutinantes contra os sorovares Canicola e Pomona, porém somente na concentração pura. Os níveis de anticorpos

neutralizantes pós-vacinais apresentados no gráfico 4 demonstraram a ausência da correlação entre anticorpos aglutinantes e neutralizantes, como também foi obtido por Nardi (2005) e Soto (2006).

Nos animais dos grupos controles não foram detectados anticorpos aglutinantes ou neutralizantes, de fato estes animais foram inoculados apenas com solução salina 0,85%. Assim os resultados obtidos confirmam a especificidade dos dois testes executados.

A comparação do desempenho da bacterina A para os sorovares Canicola e Pomona, segundo sua concentração, por meio das proporções de animais sobreviventes ao teste de desafio e a média dos títulos de anticorpos neutralizantes, apresentados nos gráficos 5 e 6, demonstra que o título de anticorpos neutralizantes igual ou superior a $1,0\log_{10}$ corresponde ao nível de aprovação de bacterinas no teste de potência. O mesmo título de anticorpos neutralizantes foi observado com a bacterina B, gráfico 7.

Os resultados das comparações entre o teste oficial de potência de bacterinas antileptospirose e o teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* para os sorovares Canicola e Pomona, permitiram o estabelecimento de um limiar de anticorpos neutralizantes que corresponde ao nível de aprovação no teste de potência e assim valida a qualidade das bacterinas antileptospirose, sem a necessidade do emprego do teste de desafio em hamsters. O emprego desta

metodologia com as próprias espécies animais a que se destinam as bacterinas poderá vir a oferecer uma nova proposta de avaliação de bacterinas que dispense o uso de animais de laboratório o que concorda com a tendência atual de reduzir o uso de animais em ensaios experimentais (PETROIANU, 1996; FAGUNDES; TAHA, 2004).

7 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo foram possíveis a obtenção das seguintes conclusões:

- Nas duas bacterinas comerciais antileptospirose testadas a diluição indicada para o teste de potência (1:800) conferiu proteção quanto à doença clínica e óbito, mas não contra a infecção renal.
- A bacterina comercial polivalente A só induziu baixos títulos de anticorpos aglutinantes (SAM) para os sorovares Canicola e Pomona quando testadas em sua concentração pura.
- A bacterina comercial polivalente B não induziu títulos de anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM para os sorovares Canicola e Pomona no ponto de corte empregado (1:100).
- As bacterinas comerciais A e B induziram em hamsters níveis de anticorpos neutralizantes superiores ao de aglutinantes.

- O teste de inibição de crescimento de leptospiros *in vitro* pode ser empregado para a avaliação da qualidade de bacterinas contendo os sorovares Canicola e Pomona como alternativa para o teste de potência de bacterinas.
- Em hamsters vacinados com bacterinas antileptospirose títulos de anticorpos neutralizantes no teste de ICL iguais ou superiores a $1,0\log_{10}$ indicam que a bacterina será aprovada no teste de potência com desafio em hamsters.

REFERÊNCIAS¹

ACHA, P. N. & SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. Organizacion Panamericana de La Salud. 3. ed. Washington, 2003. (Publicación Científica, 580).

ALDER, B.; FAINE, S.; MULLER, H. K.; GREEN, D. E. Maturation of humoral immune response determines the susceptibility of guinea-pigs to leptospirosis. **Pathology**, v. 12, p. 529-538, 1980.

ALEXANDER, A. D.; YAGER, R. H.; KEEFE, T. J. Lptospirosis in swine. **Bulletin de L'Office lternational des Epizooties**, v. 61, p. 273-304, 1964.

ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MORAIS, Z. M. Influência de fatores ambientais na proporção de caprinos soro-reagentes para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 11-18, 1996.

BALDWIN, C. J.; ATKINS, C. E. Leptospirosis in the dog. **Compêndio Continuado de Educação e Prática Veterinária**, v. 9, n. 5, p. 499-508, 1987.

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

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.

¹Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: FMVZ- USP, 2003. 84 p.

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

BOLIN, C. A. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. In: Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference. **[Proceedings...]** 2003. p. 12-14.

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

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

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. And four new leptospira genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 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**, Washington, v. 46, n. 2, p. 173-181, 1997.

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.

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, 2004.

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. **Ciencia Rural**, v. 34, n. 3, p. 847-852, 2004.

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. 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., 1999. p. 483-493.

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

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.

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

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.

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.

GIVENS M. D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 648-654, 2006.

GUIAMARAES, M. C. S. **Estabilidade das imunoglobulinas de classe G e M em amostras de sangue colhidas em papel filtro. Comparação com outros modos de preservação de amostras.** São Paulo, 1981, 103 p. Tese (Livre Docência). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1981.

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.

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.

HATHAWAY, S. C. Leptospirosis in New Zealand: an ecological view. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 29, p. 109-112, 1981.

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

JONSON, R. C.; FAINE, S. Family II *Leptospiraceae*. In: HOLT, J. G.; KRIEG, N. R. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1984. p. 62-67,

KEE, S. H.; KIM, I. S.; CHOI, M. S.; CHANG W. H. Detection of Leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.
KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: Past, present and future. **Journal Postgrad Medicine**, v. 51, p. 210-214, 2005.

LEONARD, F. C.; QUINN, P. J.; ELLIS, W. A.; FARRELL, K. O. Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. **Veterinary Record**, v. 131, n. 14, p. 435-439, 1992.

LILENBUAM, W.; SOUZA, G. N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 75, n. 3, p. 249-251, 2003.

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

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

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.

MICHNA, S. W.; CAMPBELL, R. S. F. Leptospirosis in pigs: epidemiology, microbiology and pathology. **The Veterinary Record**, n. 6, v. 84, p. 135-138, 1969.

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

NARDI, J. G. **Perfil sorológico de anticorpos anti- *Leptospira* spp em búfalas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com tipos de vacinas comerciais anti-leptospirose (Bacterina e Membrana externa)**. 2005. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

O'KEEF, J. S. A brief review on the laboratory diagnosis of leptospirosis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 50, p. 9-13, 2002.

OLIVEIRA, A. A. F.; MOTA, R. A.; SÁ, M. E. P. Leptospirose bovina: Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico. **CFMV – Suplemento. Técnico**. Brasília/DF, mai/jun/jul/ago, 2000.

PETROIANU, A. Aspectos éticos na pesquisa em animais. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 157-164, 1996.

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.

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

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine**, 9. ed. W.B. Saunders, p.1877, 2000.

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.

RAMADASS, P.; JARVIS, B. D.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Rapid diagnosis of leptospirosis by polymerase chain reaction. **Indian Veterinary Journal**, v. 74, n. 6, p. 457-460, 1997.

RAO, A. S.; KESHAVAMURTHY. B. S. Study of immune response of buffalo calves to heat-killed pentavalent leptospiral vaccine. **Indian Veterinary Journal**, v. 62, p. 357-361, 1985.

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

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. Edinburg, London: Churchill Livingstone, 1985. 490 p.

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

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

SARAZÁ, M. L.; VAZCAÍNO, J. M. Mecanismo de infección de las enfermedades animales. **Porcine**, n. 68, p. 13-26, 2002.

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.

SMITH, C. R.; KETTERER, P. J.; MCGOWAN, M. R.; CORNEY B.G. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, p. 290-294, 1994.

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.

SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 5, p. 216-223, 1974.

STAVITSKY, A. B. Studies on the mechanism of host resistance in experimental leptospirosis icterohaemorrhagica. **Journal of Immunology**, v. 51, p. 397-419, 1945.

TABATA, R. **Proteção cruzada entre bacterinas antileptospirose produzidas com três representantes do sorogrupo sejroe. Ensaio experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*).** 2002. 70 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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 leptospires in diagnosis of Leptospirosis. **Modern Veterinary Practice**, v. 5, n. 10, p. 758-759, 1984.

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

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária.** 5. ed. São Paulo: Rocca, 1998. cap. 21, p. 273-293.

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.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE VETERINARY SERVICES LABORATORIES **Supplemental assay method for potency assay of *Leptospira interrogans* serotype pomona bacterins**. Ames:1977. [11p.]. (SAM608-9CFR113.86).

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.; 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.

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**. 155, p169-177, 1997.

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

YAN, K. T.; ELLIS, W. A.; MACKIE, D. P.; TAYLOR, M. J.; MCDONNELL, S. W. J.; MONTGOMERY, J. M. Development of an ELISA to detect antibody to protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 173-187, 1999.

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.

Apêndice A - Fluxograma experimental do Teste de potência da bacterina A antileptospirose em hamsters, do inóculo infectante de desafio com os sorovares Canicola e Pomona e pesquisa de portador renal de leptospiros. São Paulo - 2007

CIR: controle de infecção renal
NaCl: cloreto de sódio
d.p.i: dias pós-infecção
SC: subcutânea
IP: intraperitoneal

Apêndice B - Fluxograma experimental do Teste de potência da bacterina B antileptospirose em hamsters, do inóculo infectante de desafio com o sorovar Canicola e pesquisa de portador renal de leptospiras

CIR: controle de infecção renal
NaCl: cloreto de sódio
d.p.i: dias pós-infecção
SC: subcutânea
IP: intraperitoneal

Apêndice C - Fluxograma experimental do Teste de inibição de crescimento de leptospiRAS *in vitro* para os sorovares Canicola e Pomona - Vacina

Apêndice D - Fluxograma experimental do Teste de inibição de crescimento de leptospira *in vitro* para o sorovar Canicola - Vacina B

NaCl: cloreto de sódio
d.p.i: dias pós-infecção
SC: subcutânea