CAROLINA DE SOUSA AMÉRICO BATISTA

Estabelecimento da Leptospirose *por* Infecção Experimental em Hamsters (*Mesocricetus auratus*) com *Leptospira interrogans* Sorovar Canicola, Estirpe Io4, pela Exposição Cutânea Íntegra e com Abrasões e seu Potencial de Transmissão Ambiental

São Paulo

2007

CAROLINA DE SOUSA AMÉRICO BATISTA

Estabelecimento da leptospirose por infecção experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela exposição cutânea íntegra e com abrasões e seu potencial de transmissão ambiental

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

Orientadora:

Dra. Margareth Élide Genovez

São Paulo

2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1932
FMVZ

Batista, Carolina de Sousa Américo

Estabelecimento da leptospirose por infecção experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela exposição cutânea íntegra e com abrasões e seu potencial de transmissão ambiental / Carolina de Sousa Américo Batista. – São Paulo: C. S. A. Batista, 2007.
90 f. : il.

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

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Dra. Margareth Élide Genovez.

1. Leptospirose animal. 2. Infecção experimental animal. 3. Hamsters.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da via de infecção na ocorrência do estado de portador renal e/ou genital na leptospirose experimental por *Leptospira interrogans* sorovares Grippotyphosa e Canicola em hamster (*Mesocricetus auratus*)", protocolado sob o nº950/2006, utilizando 115 (cento e quinze) 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 em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Influence of the route of inoculation on the occurrence of renal and/or genital carrier in experimental leptospirosis due to *Leptospira interrogans* serovars Grippotyphosa and Canicola in hamster (*Mesocricetus auratus*) ", protocol number 950/2006, utilizing 115 (one hundred and fifteen) hamsters, under the responsibility of Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BATISTA, Carolina de Sousa Américo

Título: Estabelecimento da leptospirose por infecção experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela exposição cutânea íntegra e com abrasões e seu potencial de transmissão ambiental

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: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho as pessoas que mais amo:

Aos meus pais, João Rafael Neto e Rita Sales de Sousa, que sempre lutaram muito para promover a educação dos seus filhos e pela força dada nos bons e maus momentos. Tudo que consegui na minha vida até agora foi através dos seus esforços.

Aos meus irmãos: Rodrigo, Juliana, Thiago e Rafael, pela força e confiança que depositam em mim.

A meu esposo Sérgio Santos, pessoa extraordinária que Deus colocou em minha vida. Por seu amor e companheirismo nos momentos mais importantes da minha caminhada pessoal e profissional, por sua compreensão, paciência e dedicação durante todo esse tempo. Todo o meu amor.

***...Se por algum motivo você estiver triste, se a vida te deu uma rasteira e a outra pessoa sofrer o seu sofrimento, chorar as suas lágrimas e enxugá-las com ternura, que coisa maravilhosa: você poderá contar com ela em qualquer momento de sua vida... Muitas pessoas apaixonam-se muitas vezes na vida, mas poucas amam
ou
encontram um amor verdadeiro...***

(Carlos Drummond de Andrade)

Agradecimientos

Agradecimentos

“Uma jornada de duzentos quilômetros começa com um simples passo.”

(Provérbio chinês)

» Agradeço primeiramente a Deus, Santo Expedito e Nossa Senhora, que nos momentos de aflição e desespero, guiou-me e encorajou-me, fazendo com que chegasse até aqui.

» Agradeço, de forma especial, a minha orientadora Dra. Margareth Élide Genovez, que me acolheu de uma forma tão carinhosa, agradeço por todos os seus ensinamentos, orientação, paciência, compreensão e pelos momentos de convivência agradável.

» Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, por seu apoio, incentivo e compreensão, sempre simpaticamente nos atendendo e pela doação da cepa.

» Às pesquisadoras do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico agradeço com todo carinho: Dra. Eliana Scarcelli Pinheiro, Dra. Lília Márcia Paulin, Dra. Maristela Vasconcelos Cardoso e Dra. Rosa Maria Piatti, pelos agradáveis momentos e pelo apoio.

» A pesquisadora Vanessa Castro, e sua família, exemplo de generosidade e compreensão; não teria palavras para descrever todo meu carinho por você, uma mãe nas horas difíceis, uma amiga presente em todos os momentos. Obrigada pelas palavras de conforto quando precisei, sempre conseguindo me acalmar e pela ajuda essencial na execução deste trabalho.

» A minha amiga Jéssica, uma amiga muito especial, por sua ajuda mútua, apoio indispensável para execução deste trabalho.

» As amigas do LDBR, do Instituto Biológico, Wanessinha, Fabiola, Solange, Aline, Cinthia, Thiago, Daniele, pelos momentos prazerosos de descontração e apoio nas horas difíceis, e a todos os estagiários que durante esse tempo esteve conosco, contribuindo para a execução desse trabalho.

» À Anterinha e Mariazinha, pela harmoniosa convivência, ensinamentos e amizade.

» Ao seu Ruí, pela gentil ajuda com os hamsters.

» A Moacir e Juliana, pela ajuda mutua, na execução do trabalho.

» À minha grande amiga Tatiana Gotti, seu esposo Daniel e toda sua família, que sempre me recebeu de uma forma carinhosa em sua casa, a qual tive muito prazer em conviver. Um exemplo de determinação e solidariedade, pessoal de um coração gigante. Obrigada por todas as horas em que não mediu esforços em me fazer esquecer um pouco a distância da minha família.

» Ao Laboratório de Zoonoses Bacteriana do VPS-USP, em especial à Zenaide e Gisele, pela colaboração, troca de experiências, amizades e socorro prestado, sempre que foi necessário.

» Aos colegas do VPS, especialmente aos amigos: Amane, Flávia, Flávia Carolina, Alexandra, Daniela, Franklin, Mariana, Vivi, Tatiana e aos demais não citados. Obrigada pela ajuda mútua, forma sincera e carinhosa com que nos tornamos amigos e por todos os bons momentos que passamos juntos durante o curso.

» A todos os professores e funcionários do VPS, por todos os ensinamentos e serviços prestados.

» À amiga Patrícia Viana, obrigada pelas longas conversas, pela amizade e pelos bons momentos vividos, sempre me incentivando e animando.

» Aos colegas da UFCG, Luanna Cristina e Salomão Moreira, pelo apoio indispensável na execução desse trabalho.

» A todos os amigos da academia Sport Vida, pelas horas prazerosas de descontração, no final das tardes.

» Às amigas de apartamento Julieta e Claudimar, sempre companheiras. Obrigada por me escutar nos momentos de desabafos, obrigada por compartilhar os bons e os maus momentos, sempre de uma forma tão carinhosa.

» Ao amigo Augusto pela amizade sincera e a disponibilidade de ajudar quando necessitei.

» A professora Dra. Lílian de Sá (VPT/USP), pelas leituras dos exames histopatológicos e esclarecimentos.

» Aos professores Dra. Antônio Flávio e Franklin Riet-Correia (DPV/UFCG), que tão gentilmente auxiliaram nos esclarecimentos e fotografias dos histopatológicos.

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

» Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

“O tempo e a distância jamais poderão apagar de nossos corações as lembranças dos que souberam conquistar a nossa amizade”.

“ Olhe para trás! Veja os obstáculos que já superou. Veja quanto você já aprendeu nesta vida e quanto já cresceu.

Olhe para frente! Não fique parado, levante-se quando tropeçar e cair. “Estabeleça metas, tenha planos e prossiga com firmeza.”

A todos muito obrigada!!!

RESUMO

BATISTA, C. S. A. **Estabelecimento da leptospirose por infecção experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela exposição cutânea íntegra e com abrasões e seu potencial de transmissão ambiental.** [Establishment of leptospirosis by experimental infection in hamsters (*Mesocricetus auratus*) with *Leptospira interrogans* serovar Canicola, strain LO4, by intact and scratched skin exposures and its potential for environmental transmission]. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamster (*Mesocricetus auratus*) pela infecção experimental com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela exposição cutânea íntegra e escarificada, tendo como controle a via intraperitoneal foram avaliados, bem como o efeito da frequência de exposições e da concentração do inóculo infectante quanto ao estabelecimento da doença e do portador renal e/ou genital, o potencial de transmissão e disseminação ambiental entre hamsters doentes e saudáveis com pele íntegra e escarificada e a resposta humoral induzida pela infecção experimental e exposição ambiental. O experimento foi conduzido em duas fases. No experimento 1, foram utilizados 130 hamsters fêmeas divididos em 12 grupos de acordo com a concentração do inóculo infectante (30 e 100 leptospiplas/campo), a frequência de exposição (uma, duas e quatro exposições) e a via de inoculação (pele escarificada e pele íntegra). No experimento 2, foram formados dois grupos de 10 animais, separados em caixas de polipropileno: animais saudáveis com escarificação cutânea (G1); e animais saudáveis com pele íntegra (G2). Nas caixas de ambos os grupos foi introduzido um hamster previamente infectado com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, por escarificação cutânea na dose de 100 leptospiplas/campo. As condições de umidade foram mantidas por borrifações diárias (duas vezes ao dia) com água, por um período de 21 dias. Em ambas as fases, os animais foram observados duas vezes ao dia, durante 21 dias. Os animais que vieram a óbito foram necropsiados e colhidos assepticamente rins, fígado, sistema genital (útero e ovário) e cérebro. Os animais sobreviventes foram eutanasiados após 21 dias. Foram ainda colhidas amostras de soro sanguíneo por punção cardíaca para a pesquisa de aglutininas antileptospiplas nos animais sobreviventes. Para a detecção de leptospiplas, foram utilizados microscopia direta a fresco, cultivo microbiológico e coloração pelo método de Whartin-Starry. Para a observação das alterações patológicas dos órgãos foi utilizada a coloração por Hematoxilina-Eosina. O teste de soroaglutinação microscópica (SAM) foi utilizado para a detecção de aglutininas anti-leptospiplas. As técnicas de microscopia direta e o cultivo microbiológico foram eficientes na identificação de leptospiplas nos órgãos de hamsters inoculados com o sorovar Canicola, estirpe LO4.

A via cutânea escarificada induziu maior letalidade quando comparada com a pele íntegra nas duas concentrações do inóculo infectante, com estabelecimento e evolução da leptospirose com lesões típicas da doença; por outro lado, a via cutânea íntegra induziu mais freqüentemente o estado de portador renal e/ou genital para leptospirose. A freqüência de exposição e a concentração do inóculo infectante não influenciaram no estado de portador renal e/ou genital ou mesmo na presença de leptospiras no tecido cerebral nas duas condições cutâneas empregadas na infecção experimental. A estirpe LO4 apresentou baixo poder imunogênico, não apresentando soroconversão na SAM, em ambas as condições de inoculação cutânea. Foi possível a transmissão da bactéria entre hamsters pela exposição ao ambiente contaminado.

Palavras-chave: Leptospirose animal. Infecção experimental animal. Hamster.

ABSTRACT

BATISTA, C. S. A. **Establishment of leptospirosis by experimental infection in hamsters (*Mesocricetus auratus*) with *Leptospira interrogans* serovar Canicola, strain LO4, by intact and scratched skin exposures and its potential for environmental transmission.** [Estabelecimento da leptospirose por infecção experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela exposição cutânea íntegra e com abrasões e seu potencial de transmissão ambiental]. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The establishment and evolution of leptospirosis in hamster (*Mesocricetus auratus*) by experimental infection with *Leptospira interrogans* serovar Canicola, strain LO4, by intact and scratched skin exposures, having as control the intraperitoneal route, were evaluated, as well as the effect of the frequency of exposures and concentration of the infectant inoculum regarding the establishment of the disease and the renal and/or genital carrier states, the potential of environmental transmission and spread among diseased and healthy hamsters with intact and scratched skin and the humoral response induced by experimental infection and environmental exposure. The experiment was conducted in two phases. In the experiment 1, 130 female hamsters were distributed in 12 groups according to concentration of the infectant inoculum (30 and 100 leptospire/microscopic field), frequency of exposure (one, two and four exposures) and inoculation route (intact and scratched skin). In the experiment 2, two groups of 10 animals were allocated in polypropylene boxes: healthy animals with scratched skin (G1); and healthy animals with intact skin (G2). A hamster previously infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola, strain LO4, by cutaneous scratch at a concentration of 100 leptospire/microscopic field was introduced inside the boxes. The humidity terms were kept by daily aspersions (twice in a day) with water, by a period of 21 days. In both phases, animals were observed twice in a day during 21 days. Animals that died were necropsied and kidneys, liver, genital tract (uterus and ovaries) and brain were aseptically collected. On the 21st post-inoculation day, surviving animals were euthanized. In these animals, serum samples were also collected by cardiac puncture to antileptospire agglutinins research. Fresh direct microscopy, microbiological culture and Whartin-Starry staining method were used for the detection of leptospire. For the observation of pathological changes in organs, Hematoxylin-Eosin staining method was used. Microscopic agglutination test (MAT) was carried out to the detection of anti-leptospire agglutinins. Direct microscopy and microbiological culture were efficient in the identification of leptospire in organs from hamsters inoculated with serovar Canicola, strain LO4. Scratched skin route induced larger lethality when compared to intact skin route at the two concentrations of the infectant inoculum, with establishment and evolution of leptospirosis with typical lesions of the disease; on the other hand, intact skin route induced renal

and/or genital carrier state more frequently. The frequency of exposure and the concentration of the infectant inoculums had no influence in the renal and/or genital carrier state, as well as in the presence of leptospires in brain tissue in the two cutaneous routes employed to experimental infection. LO4 strain presented low immunogenic power, characterized by no soroconversion at the MAT in both cutaneous routes. The transmission of the bacterium among hamsters by exposure to contaminated environment was possible.

Key words: Animal leptospirosis . Animal experimental infection. Hamster.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inoculação de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola estirpe LO4 por via cutânea íntegra em hamster.....	39
Figura 2 - Escarificação cutânea na região abdominal de hamster.....	39
Figura 3 - Inoculação de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola estirpe LO4 por via cutânea escarificada em hamster.....	39
Figura 4 - Simulação de ambiente adequado para a transmissão de leptospirose.....	40
Figura 5 - Corte histológico de rim de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando hemorragia glomerular e tubular e degeneração tubular (Coloração pela técnica de H.E.).....	46
Figura 6 - Corte histológico de útero de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando a presença de congestão e hemorragia (Coloração pela técnica de H.E.).....	46
Figura 7 - Corte histológico do encéfalo de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando áreas de hemorragia nas leptomeninges (Coloração pela técnica de H.E.).....	46
Figura 8 - Corte histológico do encéfalo de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando extensa área de hemorragia nas leptomeninges (Coloração pela técnica de H.E.).....	46
Figura 9 - Corte histológico de rim de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando a presença de leptospiros pela técnica de Warthin-Starry.....	47
Figura 10 - Corte histológico de útero de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando a presença de leptospiros pela técnica de Warthin-Starry.....	47
Figura 11 - Corte histológico do encéfalo de hamster eutanasiados, inoculado com o sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via cutânea pele íntegra, demonstrando áreas focais com discreto infiltrado inflamatório mononuclear na substância cinzenta do córtex cerebral e de hemorragia irregulares no córtex cerebral (Coloração pela técnica de H.E.).....	48

Figura 12 -Corte histológico de útero de hamster inoculado com o sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via cutânea pele íntegra, demonstrando área focal de infiltrado inflamatório de linfócitos e alguns macrófagos no córtex cerebral (Coloração pela técnica de H.E.)..... 48

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Grupos experimentais para avaliação da influência da via de inoculação no estabelecimento e evolução da leptospirose em hamsters, bem como do efeito da frequência de exposições e da concentração do inóculo infectante quanto ao estabelecimento da doença e do portador renal e/ou genital, formados pela inoculação de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola estirpe LO4, segundo a concentração do inóculo, o número de exposições, a via de inoculação e o número de animais. São Paulo, 2007.....	38
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) expostos pela pele escarificada e pele íntegra com relação ao óbito por leptospirose. São Paulo, 2007.....	49
Tabela 2 - Comparação entre a evolução e o resultado da detecção de positivos em órgãos para a leptospirose segundo o tipo de exposição. São Paulo, 2007	49
Tabela 3 - Comparação entre animais expostos por pele íntegra e pele escarificada em relação à detecção de leptospiros em órgãos, segundo o número de exposições/concentração do inoculo de 30 leptospiros/campo. São Paulo, 2007.....	50
Tabela 4 - Comparação entre animais expostos por pele íntegra e pele escarificada em relação à detecção de leptospiros em órgãos, segundo o número de exposições/concentração do inoculo de 100 leptospiros/campo. São Paulo, 2007.....	51
Tabela 5 - Comparação entre animais expostos ao sorovar Canicola, estirpe LO4, segundo a concentração do inoculo infectante e o resultado da detecção de leptospiros em órgãos. São Paulo, 2007.....	51
Tabela 6 - Comparação entre os números de exposições/concentração do inóculo infectante do sorovar Canicola, estirpe LO4, com relação à proporção de animais portadores, por órgão. São Paulo, 2007.....	52
Tabela 7 - Hamsters expostos a <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola, estirpe LO4, por pele íntegra, segundo a evolução da doença, os dias pós-inoculação, a detecção de leptospiros por microscopia direta e resultados da SAM. São Paulo, 2007.....	53
Tabela 8 - Hamsters expostos a <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola, estirpe LO4, por pele escarificada, segundo a evolução da doença, os dias pós-inoculação, a detecção de leptospiros por microscopia direta e resultados da SAM. São Paulo, 2007.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor do que
=	Igual a
>	Maior do que
μL	Microlitros
Cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Gás carbônico
d.p.i.	Dias pós-infecção
DL ₅₀	Dose letal de 50%
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
Exp	Exposição
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G	Gramma
H.E.	Hematoxilina-Eosina
IgG.	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IP	Intraperitonal
LDBR	Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução
lep	<i>Leptospira</i>
MCE	Microscópio com condensador de Campo Escuro
mg	Miligramas
mL	Mililitros

°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Probabilidade de ocorrência ao acaso
P- ESC	Pele Escarificada
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
Ph	Potencial hidrogeniônico
P-N-ESC	Pele não esscarificada
RPM	Rotações por minuto
SAM	Soroaglutinação microscópica
USP	Universidade de São Paulo
v/v	volume por volume
WS	Coloração pelo método de Warthin – Starry

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	ESTIRPES UTILIZADAS.....	35
3.2	ESTABILIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DA ESTIRPE LO4.....	35
3.3	ANIMAIS.....	36
3.4	PREPARAÇÃO DO INÓCULO INFECTANTE.....	37
3.5	INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR VIA CUTÂNEA (EXPERIMENTO 1).....	37
3.6	TRANSMISSÃO E DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL DA LEPTOSPIROSE ENTRE HAMSTERS DOENTES E SAUDÁVEIS COM PELE ESCARIFICADA E NÃO ESCARIFICADA (EXPERIMENTO 2).....	39
3.6.1	Teste de toxicidade da serragem (maravalha) utilizada como forração.....	39
3.6.2	Estabelecimento e evolução da leptospirose em relação ao potencial de transmissão e disseminação ambiental da <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola estirpe LO4 entre hamsters doentes e saudáveis com pele escarificada e não escarificada.....	40
3.7	IDENTIFICAÇÕES DE PORTADORES RENAI E/OU GENITAIS, E DA PRESENÇA DE LEPTOSPIRAS NO FÍGADO E CÉREBRO.....	41
3.7.1	Colheita de material.....	41
3.7.2	Visualização microscópica a fresco.....	41
3.7.3	Cultivo de leptospiplas.....	41
3.7.4	Histopatologia.....	42

3.7.4.1	Coloração pelo método de Whartin-Starry.....	42
3.7.4.2	Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E.).....	42
3.8	REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM).....	43
3.9	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	43
4	RESULTADOS.....	44
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICES.....	77

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença bacteriana infecto-contagiosa, de curso agudo ou crônico, de caráter zoonótico e cosmopolita, que acomete o homem e os animais domésticos e silvestres, assumindo considerável importância como problema econômico e de saúde pública (FAINE et al., 1999). Essa doença é causada por um grande número de espiroquetas morfologicamente e antigenicamente relacionadas do gênero *Leptospira* spp. e se encontra difundida em quase todos os países. A frequência de apresentação dos diversos sorovares depende da amplitude de deslocamento dos respectivos hospedeiros preferenciais e da intensidade e extensão da produção animal (BLAHA, 1995).

A doença vem se consolidando cada vez mais, quer como zoonose, quer como problema de saúde pública assumindo papel importante na patologia humana devido à taxa de letalidade que pode ser alta, principalmente em indivíduos acometidos pela forma ictérica (BRASIL, 1995). A partir da década de 1950, a leptospirose despertou grande interesse no meio veterinário, sendo reconhecida como uma das principais doenças dos bovinos; durante o período de 1960 a 1990, foi considerada como a principal zoonose de implicação veterinária no mundo (FAINE et al., 1999).

O agente etiológico da leptospirose foi cultivado com sucesso pela primeira vez em 1914 no Japão por Inada, Ido, Hoki, Kameko e Ito, que verificaram a presença de uma espiroqueta no fígado de uma cobaia (*Cavia porcellus*) inoculada com o sangue de paciente humano (minerador de carvão) acometido pela doença de Weil (INADA et al., 1916). No entanto, foi em 1886, na Alemanha, que Weil descreveu, minuciosamente, quatro casos clínicos em seres humanos que apresentavam casos de febre, icterícia, nefrite e hemorragias, passando a doença a ser aceita como entidade distinta (ALMEIDA et al., 1998).

A leptospirose é hoje identificada como uma doença infecciosa emergente que se manifesta em diversos países na forma de grandes surtos (SCHWARTZ, 1997). A Organização Mundial de Saúde considera a leptospirose como a única doença no mundo transmitida pela exposição à água contaminada que tem se manifestado sob a forma de surtos epidêmicos (KOLBER, 2006). O crescimento desordenado dos grandes centros urbanos, as migrações e as deficiências nas condições de saneamento básico são fatores que contribuem para a difusão da doença. Além disso, o acúmulo desordenado de lixo promove a expansão da população de roedores, que terão sua urina disseminada pelas enchentes, que são favorecidas, entre outras coisas, pela obstrução dos cursos d'água e canais, e pela impermeabilização das vias públicas (CÔRTEZ, 1993). Dessa forma, entende-se porque a doença assume grande importância em países subdesenvolvidos, onde são frequentemente encontradas condições precárias de trabalho e moradia, que maximizam a oportunidade de transmissão da doença (CORRÊA et al., 1982).

A ocorrência da leptospirose é variável em diferentes partes do mundo, incluindo o Brasil, acarretando elevados prejuízos econômicos para a pecuária nacional e mundial (VASCONCELLOS et al., 1997), podendo-se observar tanto a forma esporádica quanto a endêmica. Os mamíferos domésticos de produção, trabalho e companhia são susceptíveis e acometidos por leptospirosas tanto nas áreas rurais como urbanas (VASCONCELLOS, 1987; VASCONCELLOS, 1997). Nas espécies domésticas de interesse zootécnico (bovinos, ovinos, caprinos, suínos e eqüinos) a leptospirose está relacionada basicamente a distúrbios da esfera reprodutiva, causando abortamentos, natimortalidade, esterilidade e queda de fertilidade. Dependendo do sorovar envolvido e de fatores relativos ao hospedeiro, como espécies, grau de imunidade e estado fisiológico, pode ocasionar grandes prejuízos econômicos nos rebanhos com a mortalidade de animais jovens e a queda no ganho de peso e na produção de leite (FAINE et al., 1999; GUIMARÃES et al., 1982/83).

O agente etiológico da leptospirose pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira* spp. Até 1988, esse gênero era dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, que compreendia as cepas patogênicas, e a *Leptospira biflexa*, que englobava as cepas saprófitas do ambiente (LEVETT, 2001). Essa divisão baseava-se em critérios relacionados a reações sorológicas relativamente específicas que forneciam os sorogrupos e sorovares de leptospirosas patogênicas e saprófitas (QUINN et al., 1994). Com essa divisão, foi possível identificá-las pelas características fenotípicas (sorológicas) e virulência, subdividindo-as em sorogrupos e sorovares. Estima-se a existência de aproximadamente 300 sorovares de *L. interrogans* divididas em 25 sorogrupos (AHMED et al., 2006). Em 1987, o pesquisador brasileiro Paulo Hideki Yasuda propôs uma nova classificação baseada na hibridação por homologia de DNA. Após um extensivo estudo com centenas de estirpes foram definidas 17 genomoespécies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. kirshneri*, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *Turneria parva* (proposto), *Leptonema ilini*, *L. genomospecies 1*, *L. genomospecies 2*, *L. genomospecies 3*, *L. genomospecies 4* e *L. genomospecies 5* (LEPTOSPIRA MOLECULAR BIOLOGY HOME PAGE, 2007).

As leptospirosas são bactérias espiraladas, muito finas (0,1 µm de diâmetro) e comprimento variando de 6 a 20 µm, tendo as extremidades em forma de gancho. Apresenta dois filamentos axiais (flagelos periplásmico), que facilitam a motilidade da bactéria. Sua membrana externa, assim como outras espécies de espiroquetas, possui várias camadas que envolvem completamente os filamentos axiais e o cilindro protoplásmico helicoidal. Nesse cilindro se encontra o material nuclear, citoplasma, membrana citoplasmática e a porção de peptidoglicano da parede celular (QUINN et al., 1994; HAAKE, 2000). Os componentes lipopolissacarídeos (LPS) são similares aos de outras bactérias Gram negativas, porém com menor atividade endotoxigênica (SHIMIZU et al., 1987). São aeróbias estritas, crescem muito bem em temperaturas entre 28 e 30 °C (QUINN et al., 1994), possuem multiplicação e crescimento lentos, e

exigentes no que se refere a meios nutritivos (HANSON; TRIPATHY, 1988), com divisão celular em torno de sete a 12 horas. Uma cultura em meio líquido leva de cinco a sete dias para atingir crescimento para ser utilizada como antígeno (BEER, 1999; FAINE et al., 1999).

As leptospiros são pouco resistentes à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos anti-sépticos. As leptospiros patogênicas sobrevivem na água variando seu período conforme a temperatura, o pH, a salinidade e o grau de poluição (BRASIL, 1995). Todas as leptospiros são sensíveis em pH ácido de 6,8 ou menos, porém sobrevivem em condições alcalinas em pH entre 7,8 e 7,9. O armazenamento em nitrogênio líquido preserva a virulência e a antigenicidade do agente, sendo mais freqüentemente usado (FAINE et al., 1999). Apresentam afinidade tintorial por corantes a base de sais de prata, o que possibilita o emprego das técnicas de coloração de Fontana-Tribondeau para esfregaços e a de Levaditi em cortes de tecidos (BEHMER; TOLOSA; FREITAS, 1976; MC MANUS; MOWKY, 1965; SANTA ROSA, 1970), além do método de Warthym-Starry.

O perfil epidemiológico da leptospirose estreitamente associado à paisagem aponta para a história natural de uma doença de ocorrência endêmica, restrita a focos naturais bem definidos e com picos epidêmicos em circunstâncias que envolvem alterações desordenadas do sistema ecológico (MASCOLLI, 2001). As observações epidemiológicas têm indicado que as leptospiros se mantêm circulando na população de hospedeiros primários, usualmente roedores selvagens, a partir dos quais alcançam outras populações de animais sinantrópicos e/ou domésticos. Estes são os hospedeiros secundários, que ao invadir o ambiente silvestre entram em contato com espécies silvestres.

O ser humano é considerado um hospedeiro acidental, que se infecta quando em contato direto ou indireto com os animais. A doença tem forte associação com a atividade profissional. O trabalho diário em terrenos alagadiços freqüentados por populações de roedores é um fator importante na transmissão da doença para colhedores de arroz e cana de açúcar (CÔRTEZ, 1993). Em alguns países, a leptospirose é considerada doença ocupacional para magarefes, fazendeiros e veterinários (SALLES; LILENBAUM, 2000).

A concentração de grandes efetivos de animais domésticos, como os rebanhos bovinos, pode ter como conseqüência a criação de amplas cadeias infecciosas, que contribuem para a disseminação do agente no ambiente e atuam como fator de risco para o homem (CÔRTEZ, 1993). Dentre os animais domésticos que podem atuar como portadores da doença, disseminando o organismo no ambiente, destacam-se os bovinos, suínos, caprinos, ovinos, eqüinos e em especial os caninos, que mantêm um convívio muito próximo ao homem. Entre as espécies silvestres destacam-se carnívoros, roedores e marsupiais (CORREA et al., 1982).

Os roedores das espécies *Mus musculus*, *Rattus rattus* e principalmente o *Rattus norvegicus* estão envolvidos na epidemiologia da leptospirose por eliminarem leptospiros por períodos prolongados. Nas cidades, o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) é considerado o mais importante transmissor dessa zoonose aos seres humanos. Este roedor elimina pela urina, por períodos prolongados, principalmente o sorovar Icterohaemorrhagiae, causador da doença de Weil no ser humano (LANGONI, 1999).

Os vários sorovares de *Leptospira* spp. podem, teoricamente, infectar qualquer espécie animal, mas na prática existem sorovares endêmicos em uma determinada região ou país e adaptados aos hospedeiros naturais, favorecendo, assim, sua preservação no meio ambiente. Os sorovares Wolffi e Grippotyphosa podem estar presentes em alguns roedores silvestres e espécies marsupiais. Roedores sinantrópicos, suínos e cães são, respectivamente, considerados hospedeiros de manutenção dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Pomona e Canicola (ELLIS, 1984; FAINE et al., 1999; RADOSTITS et al., 2000).

Nem sempre estirpes virulentas expressam sua patogenicidade em condições experimentais. Leptospiros podem ser transmitidas entre os animais de forma direta e indireta. A direta ocorre quando fluidos ou sangue contendo leptospiros passam de forma aguda de um animal infectado a outro susceptível, destacando-se as vias transplacentária e hematogênica, genital e o ato de mamar. A indireta ocorre quando o animal adquire leptospirose do ambiente contaminado com leptospiros originárias da urina de animais infectados, doentes ou convalescentes. Animais transitórios em um ambiente contaminado podem carrear infecção para outros ambientes ou animais distantes do original. Enquanto a porta de entrada para a transmissão direta está claramente identificada, onde as leptospiros, através das mucosas, ganham a corrente circulatória, a indireta depende da sobrevivência e adaptação da estirpe na natureza. A via oral como porta de entrada ainda não está clara. Nos tratos respiratório e alimentar, é necessário distinguir entre inalação de aerossóis nasofaringeana e inalação de fluidos pelo trato respiratório inferior e ingestão. Em todos os casos, o papel de abrasões ou de reação inflamatória da mucosa local no desenvolvimento da infecção necessita de estudos. Numa epidemia de leptospirose devido à exposição às águas de enchentes, a ingestão da água contaminada ao invés da imersão é vista como mais importante via de transmissão, juntamente com a inalação, a qual é inevitável nesta condição (CÔRTEZ, 1993).

A porta de entrada mais usual é a penetração pelas mucosas conjuntivas, pele intacta ou com abrasões, expostas nestas condições. Entretanto, em observações com seres humanos, há evidências que a pele íntegra submetida a longo período de imersão torna-se anormalmente permeável (FAINE, 1999). Quando entram em contato com hospedeiros vertebrados susceptíveis aos microrganismos, as

leptospiras penetram através da pele e das mucosas (ocular, respiratória, digestiva e genito-urinária), multiplicam-se na corrente sanguínea ou linfática e difundem-se praticamente para todos os órgãos e tecidos, por aproximadamente uma semana, o que caracteriza a fase septicêmica (leptospiremia), ocorrendo o estado febril, na qual há comprometimento do fígado, rins, pulmões, adrenais, cérebro, útero, ovários, trompas e glândula mamária. As lesões primárias são atribuídas à ação mecânica do microrganismo nas células endoteliais de revestimento vascular. A consequência direta da lesão dos pequenos vasos são as hemorragias, seguidas da formação de trombos e do bloqueio de aporte sanguíneo nas áreas acometidas e enfartes (FAINE, 1982).

Em animais que sobrevivem à fase aguda, as leptospiras persistem em sítios imunologicamente protegidos, como os túbulos proximais dos rins, câmara anterior do olho e trato genital. Nos rins multiplicam-se ativamente, atingindo o pico máximo em 3-4 semanas, sendo excretadas pela urina. Essa fase determina a leptospirúria, que confere aos animais importante papel na epidemiologia da leptospirose: os portadores assintomáticos renais ou genitais (SULLIVAN, 1974). Nessa fase, os animais que resistem tornam-se fontes de infecção potenciais (portadores convalescentes); as fêmeas que abortam passam a eliminar leptospiras via envoltórios fetais, corrimentos vaginais e urina; os machos eliminam o microrganismo via urina e sêmen. A eliminação de leptospiras é intermitente, porém pode persistir durante meses ou anos (FAINE et al., 1999). No caso de bovinos infectados pode haver eliminação do agente pela urina por até um ano (HANSON, 1982; THIERMANN, 1984), com elevada excreção de leptospiras nas primeiras quatro semanas. A duração e intensidade da eliminação variam de animal para animal e dependem do sorovar infectante (LEONARD et al., 1993).

A habilidade em sobreviver e se multiplicar é o maior componente de virulência deste grupo de bactéria, entretanto, a partir do surgimento de imunoglobulinas específicas e outros mecanismos imunes, a multiplicação torna-se comprometida, o que não ocorre na primo-infecção (FAINE et al., 1999). O período de incubação é de sete a 14 dias, onde ocorre a septicemia com o aparecimento de imunoglobulinas da classe IgM, que têm atividade de poucos dias, surgindo tardiamente anticorpos da classe IgG. Apesar dos anticorpos ajudarem a combater a bacteremia, não eliminam por si só a infecção renal (REBHUN, 1995).

As complicações apresentadas no quadro clínico da leptospirose são características de uma doença de natureza multisistêmica, uma vez que variam na gravidade e, portanto, de acordo com a intensidade da infecção. A presença de falência renal aguda, pancreatite, meningite, trombocitopenia e sintomas pulmonares são sintomas comuns em humanos; em eqüinos, o sinal clínico mais comum é a uveíte recorrente, que pode ser considerada uma doença autoimune (PARMA et al., 1987; TANAKA, 2002 DAHER et al., 2003; HUTTENER; PEREIRA). Em bovinos e suínos o quadro reprodutivo inclui

abortamentos, retorno ao cio e infertilidade. A doença leva a perdas na produção de leite decorrentes do aumento do intervalo de partos (FAINE et al., 1999; KAZAMI et al., 2002; BOQVIST et al., 2003). Em bovinos, a infecção com o sorovar Hardjo causa abortamento, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos, mastite e agalaxia (GIORGI et al., 1981; BOLIN et al., 1989 a, b; BOLIN et al., 1991).

O diagnóstico clínico, por sinais e sintomas, é empírico, pois depende do sorovar infectante, havendo a necessidade da sua confirmação laboratorial (FAINE, 1982).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser realizado por diferentes técnicas laboratoriais baseadas na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético (SANTA ROSA, 1970; FAINE et al., 1999). Dentre os procedimentos de diagnóstico, a detecção de anticorpos séricos pela Reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM) ainda é a prova de referência, conforme preconiza a Organização Mundial da Saúde. Embora a SAM consiga estabelecer com certo grau de especificidade do sorogrupo/sorovar envolvido, apresenta como desvantagem ser pouco sensível quando considerados o tempo e a elevada concentração de anticorpos necessários para a emissão do sinal. Além disso, em alguns casos não é discriminatória de infecção progressiva, ativa ou reação vacinal (KEE et al., 1994; FAINE et al., 1999).

O isolamento bacteriano é o diagnóstico definitivo da doença, porém apresenta baixa sensibilidade, necessitando de amostras recém colhidas que devem ser observadas por um período mínimo de 30 dias (GENOVEZ et al., 1993; SCARCELLI et al., 2004).

A visualização direta de leptospirosas em microscópio de campo escuro tem sido utilizada principalmente em amostras de urina durante a fase de leptospiúria. Entretanto, essa técnica apresenta como limitações a baixa sensibilidade, experiência do observador, eliminação de forma intermitente de leptospirosas pela urina e lise pelo pH ácido da urina (BOLIN et al., 1989). Outros métodos de observação direta podem ser usados, como coloração por sais de prata, imunofluorescência ou imunohistoquímica (BOLIN; ZUERNER; TRUEBA, 1989).

Em vista da necessidade do desenvolvimento de métodos que ofereçam maior sensibilidade, especificidade e rapidez, técnicas de Biologia Molecular têm sido aplicadas para a detecção de leptospirosas (MAGAJEVSKI, 2002). A Reação em Cadeia pela Polimerase, conhecida pela sigla PCR (*Polymerase Chain Reaction*), vem sendo utilizada de forma crescente para o diagnóstico da leptospirose no ser humano e em várias espécies animais. A técnica de PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo amplificar quantidades mínimas de DNA do microrganismo em diversos tipos de amostras biológicas, tais como soro, líquido cerebrospinal, urina, fezes e tecidos (BAL et al., 1994). Uma das vantagens é a eliminação dos trabalhos árduos de isolamento e cultivo dos agentes e agilidade no diagnóstico de doenças agudas (SMYTHE et al., 2002). A PCR também é uma técnica alternativa para

identificação de leptospiros em materiais de difícil isolamento, tais como o sêmen nas centrais de inseminação artificial (GOTTI, 2006).

O controle da leptospirose é necessário para prevenir a doença clínica, as perdas econômicas e minimizar o risco de infecção humana. Uma das formas de controle da leptospirose depende da diminuição da prevalência da infecção com sorovares mantidos na população e na diminuição do grau de associação ecológica das leptospiros mantidas por animais de vida livre (HATHAWAY, 1981). A vacinação é uma importante ação preventiva contra a infecção dos animais por leptospiros. Para esse fim, vacinas inativadas são as mais utilizadas (HANSON, 1977; LANGONI, 1999). Muitas vacinas comerciais estão disponíveis no mercado nacional compostas por cinco a dez sorovares, que atendem as soroprevalências da maioria das regiões do país e sua eficácia é aumentada com a adição de adjuvantes, como o hidróxido de alumínio (HANSON, 1977). Em condições de campo, o uso de vacinas contra leptospirose reduz a ocorrência da infecção e contribui substancialmente para a redução do impacto econômico da doença (SULLIVAN, 1974). Tratamento de animais doentes com antibioticoterapia, controle dos roedores nas propriedades e eliminação de excesso de água do ambiente também faz parte do controle da doença (NARDI JR., 2005).

Dentre os animais de laboratório usualmente empregados para o estudo da leptospirose, o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) tem sido um dos mais utilizados (FAINE et al., 1999). Nesses animais, já foram efetuados estudos de leptospirose experimental (BRUNNER, 1948; BÜRKI, 1960; SANGER, 1961; SEMENOVICH et al., 1988), da patogênese da doença (FIZETTE, 1956; ARZUIMANIAN, 1967), do tipo de via empregada para a infecção experimental (MACEDO et al., 2004), pesquisa da virulência do agente (BURKI, 1962), do estado de portador (MILLER, 1972; KOLBER, 2006), da análise de alterações morfológicas em órgãos frente a doença (EZHKOVA et al., 1983), da avaliação histopatológica do fígado de hamsters gestantes infectadas por leptospiros (SAPP et al., 1981), do isolamento de leptospiros de tecido renal de hamsters experimentalmente infectados (PASSOS et al., 1988), da presença do agente nos ovários (CAMARGO et al., 1998) e do desenvolvimento da vacinas (BEY, 1974; HUHN, 1975; HUHN et al., 1975; DELBEM, 2005).

Kolber (2006) refere que trabalhos buscando a reprodução experimental da condição de portador renal de leptospiros em modelos biológicos têm empregado tipos distintos de vias de inoculação (MACEDO et al., 2004), concentrações decrescentes do inóculo do sorovar infectante (YUKAWA, 1991), infecções imunomoduladas (ALVES, 1992), imunização e infecção associadas a doses variáveis de imunógeno e do inóculo infectante (THOMÉ et al., 1998), bem como o controle da infecção experimental pelo uso estratégico de antimicrobianos que sustentam a leptospiremia, mas que não impedem a colonização dos túbulos renais (ALEXANDER; RULE, 1987; CAMARGO et al., 1998; PINTO et al., 1999).

Burnstein e Baker (1954) testaram as vias intranasal, subcutânea e oral, em suínos, com o sorovar Pomona, das quais a menos efetiva para o isolamento da bactéria foi a oral.

Anderson (1967) avaliou, em cães, as vias intravenosa, intra-arterial renal, intranasal e oral, para o sorvar Canicola, não tendo sido observada influência na patogenicidade do agente. Em nenhum animal inoculado houve nefrite intersticial severa, mas apenas focal subclínica; a menor mortalidade foi observada na via nasal.

Sullivan (1972) avaliou as vias nasal, oral, conjuntival e intramuscular em bovinos experimentalmente inoculados com o sorovar Hardjo, e observou que a leptospirúria foi mais prolongada na via intramuscular. Não houve leptospirúria na via oral e todos os animais inoculados apresentaram resultados negativos por esta via na sorologia. Nas vias nasal e conjuntival, a leptospirúria durou 59 e 51 dias, respectivamente, e não houve diferença significativa na resposta sorológica.

Woods et al. (1983) inocularam hamsters pela via subcutânea com o sorovar Hardjo, utilizando duas doses diferentes, 2×10^2 (dose menor) e 2×10^8 (dose maior) bactérias, e isolaram leptospiros dos rins de 22 dos 24 animais sobreviventes, demonstrando, dessa forma, a grande afinidade das bactérias pelos tecidos renais.

Camargo (1991) investigou a presença de leptospiros em ovários de hamsters experimentalmente infectados pela via intraperitoneal com *L. interrogans* sorovar Pomona, e observou a presença das bactérias em todos os ovários dos animais experimentalmente inoculados pela coloração de Levaditi, reação de imunofluorescência direta de campo escuro e também nos cultivos em meio de Fletcher.

Bielanski et al. (1998) estabeleceram infecção genital em novilhas pela inoculação da *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis pelas vias uterina, cervical, subconjuntival e intranasal com 5×10^4 microorganismos. A confirmação da infecção foi feita pelo teste de SAM e a infecção dos embriões e mórulas por isolamento e PCR, comprovando que a transferência de embriões pode ser uma via de transmissão da leptospirose em bovinos.

Pinto et al. (1999), utilizando hamsters machos experimentalmente infectados com uma estirpe de *L. interrogans* sorovar Pomona e tratados pela via oral, no segundo dia pós-infecção, com o estolato de eritromicina na dose de 25 mg/kg de peso vivo, encontraram 36,61% (27/71) de portadores renais com declínio na frequência da infecção renal durante o período de observação adotado, que foi de 15 a 120 dias pós-infecção.

Macedo et al. (2004) avaliou a influência de cinco vias de inoculação (intraperitoneal, subcutânea, oral, conjuntival e escarificação cutânea) no estabelecimento e evolução da leptospirose

em hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona, e referiram que a via oral foi a menos eficaz na indução de sintomas e a intraperitoneal a mais eficiente.

Kolber (2006) estudou o emprego de hamsters (*Mesocricetus auratus*) como modelos biológicos para a indução da condição de portador renal de leptospiros, utilizando uma estirpe patogênica do sorovar Pomona, e tratados no segundo dia pós-infecção com estolato de eritromicina em quatro concentrações (10, 20, 40 e 80 mg/kg de peso vivo), e concluiu que as concentrações do antibiótico que possibilitaram a indução do estado de portador renal de leptospirose foram as de 40 e 80 mg/kg de peso vivo.

Estirpes autóctones devem ser estudadas de maneira minuciosa, pois sua condição infectante está diretamente relacionada a fatores ambientais, climáticos e densidade populacional de hospedeiros. Apesar da existência de diversos sorovares e do potencial para estabelecer infecção em uma variedade de hospedeiros, na realidade apenas um pequeno número de sorovares são efetivamente infectantes e causadores de doença na natureza. A estirpe LO4 foi isolada de fígado de dois suínos abatidos em Londrina, Estado do Paraná, Brasil (FREITAS et al., 2004) e tipificada por *kit* de anticorpos monoclonais (*Royal Tropical Institute*, Amsterdã, Holanda) como *Leptospira interrogans* sorovar Canicola.

Soto (2006) avaliou o desempenho de uma vacina experimental monovalente de subunidade-lipopolissacarídeo associada ao monofosforil lipídeo, produzida com a estirpe LO4, em matrizes suínas, e concluiu que a referida vacina apresenta perspectivas para a prevenção da leptospirose em suínos, uma vez que o número de animais reagentes e a produção de anticorpos aglutinantes com a utilização da vacina foi superior ao da bacterina experimental de bactéria completa, produzida com a estirpe homóloga; os anticorpos neutralizantes induzidos pelas duas doses intervaladas de 30 dias persistiram por até 123 dias da primo-vacinação; aos 30 dias de vida, os leitões nascidos de matrizes suínas imunizadas apresentaram anticorpos neutralizantes em níveis superiores ao de aglutininas; e a vacina não diluída foi aprovada no teste de potência em hamsters.

Em decorrência da grande importância da leptospirose nas criações zootécnicas pelos possíveis prejuízos econômicos, principalmente pelas infecções crônicas, relacionadas aos aspectos reprodutivos e também pela sua importância para a saúde pública, esse projeto pretendeu estudar a influência da via cutânea com e sem abrasões no estabelecimento da doença e no estabelecimento do portador renal e/ou genital na leptospirose experimental por *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, utilizando o Golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo biológico.

Objetivos

2 OBJETIVOS

- ▶ Estudar o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamster (*Mesocricetus auratus*) pela infecção experimental com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, pela exposição cutânea íntegra e escarificada, tendo como controle a via intraperitoneal.
- ▶ Avaliar o efeito da frequência de exposições e da concentração do inóculo infectante de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4 quanto ao estabelecimento da doença e do portador renal e/ou genital por esta estirpe.
- ▶ Avaliar o potencial de transmissão e disseminação ambiental da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4 entre hamsters doentes e saudáveis com pele íntegra e escarificada.
- ▶ Avaliar a resposta humoral induzida pela infecção experimental e exposição ambiental de hamsters à *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4, pelo teste de soroaglutinação microscópica (SAM).

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTIRPES UTILIZADAS

Foi utilizada uma estirpe do sorovar Canicola, autóctone e virulenta, isolada do fígado de um suíno de abatedouro em Londrina, Estado do Paraná (FREITAS et al., 2004) e tipificada pela técnica de adsorção de aglutininas com o *kit* de anticorpos monoclonais no *Royal Tropical Institute*, Amsterdã, Holanda. Desde então, a estirpe foi denominada como LO4. Uma amostra dessa estirpe foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos (FMVZ/USP) ao Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução (LDBR) do Instituto Biológico de São Paulo e cultivada em meio EMJH¹ modificado e enriquecido com 8% de soro de coelho inativado (ALVES, 1995).

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

A estirpe Hond Utrecht IV do LDBR proveniente da Organização Mundial da Saúde (OMS) foi utilizada como estirpe padrão. Essa estirpe é originária da Holanda, pertencente ao sorovar Canicola, sendo reconhecida como não virulenta por estar adaptada aos meios de cultivo EMJH e Fletcher.

3.2 ESTABILIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DA ESTIRPE LO4

Para a estabilização e manutenção da virulência da estirpe LO4, utilizou-se a metodologia clássica de passagens sucessivas em hamsters (GONZÁLEZ; DÍAZ; MATOS, 1999). Serviu de inóculo para as passagens em hamsters a suspensão preparada com 1 g de órgãos (fígado e rins) de um hamster agônico e com lesões características de leptospirose, diluído em 9 mL de solução salina

¹ Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (Difco, Detroit, EUA).

estéril. Essa suspensão foi obtida com o uso do *Stomacher 80* (Biomarter) por 60 segundos na potência média. O volume de 1 mL dessa suspensão foi diluído seqüencialmente de 10^{-1} a 10^{-5} , e 10 μ L de cada suspensão foi examinado no microscópio óptico Jena Zeiss com condensador de campo escuro (MCE), com objetiva Epiplan 20x/0,2 e ocular de 10 (200 vezes). Um mililitro da diluição contendo de 20 a 30 leptospiros por campo microscópico foi inoculado por via intraperitoneal em hamsters sadios. Essas passagens foram realizadas até a estabilização da virulência da estirpe, ou seja, morte entre três a seis dias.

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

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 152 hamsters (*Mesocricetus auratus*), todos do sexo feminino, com peso corpóreo situado entre 80 e 100 gramas, mantidos durante todo o período experimental no infectório do LDBR do Instituto Biológico. Os animais possuíam estado geral de saúde bom e foram mantidos em gaiolas de 10 animais, de acordo com cada grupo, forrados com serragem esterilizada e alimentados com ração comercial peletizada balanceada e água à vontade.

Antes do início dos experimentos, alguns hamsters dos grupos experimentais foram escolhidos aleatoriamente e eutanasiados. Foram colhidos rins e fígado, e examinados por microscopia direta, cultivo e PCR; o soro sanguíneo foi submetido à técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), para assegurar que os animais não tiveram contato prévio com leptospiros. O método adotado em todas as eutanásias foi a câmara de CO_2 de acordo com o que é estabelecido pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O projeto foi aprovado no dia 16 de agosto de 2006 sob o protocolo de n° 950/2006.

3.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO INFECTANTE

O inóculo infectante foi constituído de uma suspensão contendo 1 g de órgãos (fígado e rins) de um hamster agônico e com lesões características de leptospirose, previamente inoculado pela via intraperitoneal, e diluído em 9 mL de solução salina estéril. A concentração de leptospiros foi determinada pela contagem de bactérias viáveis em 10 μ L da suspensão de órgãos (rins e fígado), conforme descrita no item 3.2., e em seguida ajustada por diluição seriada de base dez da suspensão em solução salina estéril até obter a quantidade desejada por campo microscópico.

A diluição de uso foi a que apresentou 30 leptospiros/campo, sendo essa a concentração baixa, e 100 leptospiros/campo a concentração elevada.

3.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR VIA CUTÂNEA (EXPERIMENTO 1)

Para a avaliação da influência da via de inoculação no estabelecimento e evolução da leptospirose, bem como do efeito da frequência de exposições e da concentração do inóculo infectante quanto ao estabelecimento da doença e do portador renal e/ou genital, os animais foram divididos em 12 grupos de acordo com a concentração do inóculo infectante, a frequência de exposição e a via de inoculação, como demonstrado no quadro 1. Nesta fase foram utilizados 130 animais.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
I	30 leptospiiras/campo	uma exposição	P-ESC	10
II	30 leptospiiras/campo	uma exposição	P-N-ESC	10
III	30 leptospiiras/campo	duas exposições	P-ESC	10
IV	30 leptospiiras/campo	duas exposições	P-N-ESC	10
V	30 leptospiiras/campo	quatro exposições	P-ESC	10
VI	30 leptospiiras/campo	quatro exposições	P-N-ESC	10
VII	100 leptospiiras/campo	uma exposição	P-ESC	10
VIII	100 leptospiiras/campo	uma exposição	P-N-ESC	10
IX	100 leptospiiras/campo	duas exposições	P-ESC	10
X	100 leptospiiras/campo	duas exposições	P-N-ESC	10
XI	100 leptospiiras/campo	quatro exposições	P-ESC	10
XII	100 leptospiiras/campo	quatro exposições	P-N-ESC	10
Controle	30 leptospiiras/campo	...	IP	5
Controle	100 leptospiiras/campo	...	IP	5

P-ESC = pele escarificado; P- N-ESC = pele não escarificado; IP = intraperitoneal

Quadro 1 – Grupos experimentais para avaliação da influência da via de inoculação no estabelecimento e evolução da leptospirose em hamsters, bem como do efeito da frequência de exposições e da concentração do inóculo infectante quanto ao estabelecimento da doença e do portador renal e/ou genital, formados pela inoculação de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4, segundo a concentração do inóculo, o número de exposições, a via de inoculação e o número de animais - São Paulo - 2007.

A infecção experimental foi realizada pela deposição de 250 µL de cada suspensão (30 e 100 leptospiiras/campo) da estirpe LO4 na região abdominal não escarificada e na região abdominal previamente escarificada com lâmina de bisturi estéril, em uma área de 2X2 cm². Os animais foram submetidos a uma, duas e quatro exposições, sendo o intervalo entre exposições de 48-72 horas. As figuras 1, 2 e 3 ilustram os procedimentos de inoculação pelas diferentes vias.

Como grupo controle, foram utilizados 10 animais inoculados pela via intraperitoneal com 250 µL, sendo cinco animais com 30 leptospiiras/campo e cinco com 100 leptospiiras/campo.

Figura 1 – Inoculação de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estipe LO4 por via cutânea íntegra em hamster

Figura 2 – Escarificação cutânea na região abdominal de hamster

Figura 3 – Inoculação de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estipe LO4 por via cutânea escarificada em hamster

3.6 TRANSMISSÃO E DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL DA LEPTOSPIROSE ENTRE HAMSTERS DOENTES E SAUDÁVEIS COM PELE ESCARIFICADA E NÃO ESCARIFICADA (EXPERIMENTO 2)

3.6.1 Teste de toxicidade da serragem (maravalha) utilizada como forração

Para verificar a possibilidade de ação tóxica da maravalha para o crescimento de leptospiros, empregou-se o teste de inibição de crescimento, segundo Tabata et al. (2002) modificado.

Foram utilizadas duas amostras de maravalha, uma limpa e autoclavada e outra suja, proveniente de uma caixa que continha hamsters. Dois gramas de maravalhas de cada caixa foram diluídos em 20 mL de solução tamponada de Sorensem (pH 7,4) e centrifugada a 3.000 rpm por cinco

minutos; em seguida retirou-se 10 mL do sobrenadante. Os sobrenadantes de cada amostra foram submetidos a duas diluições (1:1 e 1:2) em solução tamponada de Sorensen, partindo-se inicialmente da amostra pura, sendo utilizadas cinco repetições para cada diluição. Em tubo de ensaio de vidro com tampa de baquelite e esterilizado, foram adicionados 0,20 mL do sobrenadante, 2,5 mL do meio EMJH modificado (ALVES, 1995) e 0,1 mL do antígeno *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4. Os tubos foram incubados por dez dias a 28 °C em estufa bacteriológica.

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

3.6.2 Estabelecimento e evolução da leptospirose em relação ao potencial de transmissão e disseminação ambiental da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4 entre hamsters doentes e saudáveis com pele escarificada e não escarificada

Foram formados dois grupos de 10 animais, separados em caixas de polipropileno: animais saudáveis com escarificação cutânea (G1); e animais saudáveis com pele íntegra (G2).

Nas caixas de ambos os grupos, foi introduzido um hamster previamente infectado com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, por escarificação cutânea na dose de 100 leptospiplas por campo. As condições de umidade foram mantidas por borrifações diárias (duas vezes ao dia) com água, por um período de 21 dias (Figura 4).

Figura 4 – Simulação de ambiente adequado para a transmissão de leptospirose

3.7 METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES RENAIIS E/OU GENITAIS, E DA PRESENÇA DE LEPTOSPIRAS NO FÍGADO E CÉREBRO

3.7.1 Colheita de material

Os animais foram observados duas vezes ao dia, durante 21 dias. Os animais que vieram a óbito foram necropsiados e colhidos assepticamente rins, fígado, sistema genital (útero e ovário) e cérebro. Os animais sobreviventes foram eutanasiados após 21 dias. Foram ainda colhidas amostras de soro sanguíneo por punção cardíaca para a pesquisa de aglutininas antileptospiras nos animais sobreviventes.

3.7.2 Visualização microscópica a fresco

Durante a necropsia, fígado, rins, genitais (útero e ovário) e cérebro foram retirados separadamente. Uma alíquota de cada órgão foi fragmentada e colocada em tubo plástico tipo *eppendorf* estéril e identificado. Adicionou-se aproximadamente 1 mL de meio EMJH modificado contendo os antibióticos 5-Fluorouracil¹ e ácido nalidíxico² nas concentrações finais de 12 mg e 8 mg, respectivamente, por 100 mL, em cada tubo, agitando-se vigorosamente em vórtex por 30 segundos.

Em condições de assepsia na câmara de biossegurança, utilizando uma pipeta, 1 µL de cada suspensão foi depositada sobre uma lâmina, levando-a ao microscópio de campo escuro (200X) para pesquisa direta da presença leptospiras.

3.7.3 Cultivo de leptospiras

De cada suspensão de órgãos foi semeado aproximadamente 1 mL em 5 mL de meio de cultivo EMJH (DIFCO) modificado e com antibióticos e incubado a 30°C. Após 24 horas, 1 mL desse

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

² Ácido nalidíxico – INLAB, Sorocaba, SP, Brasil

cultivo foi inoculado em tubos contendo 5 mL de meio EMJH modificado sem antibióticos e Fletcher (DIFCO) e incubado nas mesmas condições.

As leituras no microscópio de campo escuro (200X) foram realizadas semanalmente durante dois meses (FAINE et al., 1999).

3.7.4 Histopatologia

Fragmentos dos órgãos (rim, genital e cérebro) de cada grupo de hamsters que morreram ou que foram eutanasiados foram fixados em formalina (1 parte de formol a 37% em 8 partes de água) e posteriormente amostras de alguns animais por grupo experimental foram escolhidos aleatoriamente para o exame histopatológico, com o objetivo de verificar a presença de leptospiros e as lesões histopatológicas entre os grupos experimentais.

3.7.4.1 Coloração pelo método de Whartin-Starry

Para a visualização tecidual das leptospiros foi utilizada a técnica descrita por Young (1969) com modificações.

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

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

3.8 REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (SAM)

Foi utilizada para a determinação dos níveis de aglutininas anti-leptospira nos soros sanguíneos dos hamsters eutanasiados. Sua execução seguiu a metodologia da microtécnica descrita por Galton et al. (1965) e Cole et al. (1973).

Os soros foram testados pela prova de SAM frente a duas estirpes do sorovar Canicola, estirpes LO4 e Hond Utrecht IV, a qual foi empregada como controle do sorovar Canicola. Inicialmente, os soros foram diluídos a 1/25 (0,1 mL de soro para 2,4 mL de solução PBS estéril, pH 7,2). Cinquenta microlitros de cada soro diluído foram depositados em placas de fundo chato de 96 cavidades e misturado com igual volume de antígeno das estirpes. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por três horas. A leitura da reação foi realizada no microscópio óptico Jena Zeiss com condensador de campo escuro (MCE), com objetiva Epiplan 20x/0,2 e ocular de 10 no aumento de 200 vezes, sendo avaliado o grau de aglutinação. Foram consideradas reagentes as amostras sorológicas que aglutinaram pelo menos 50% das leptospiros.

Posteriormente, os soros positivos foram diluídos geometricamente na razão dois para determinação da titulação, considerando-se como título final a recíproca da maior diluição que apresentou pelo menos 50% de leptospiros aglutinadas.

3.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para a comparação da proporção de animais mortos por leptospirose nos diferentes grupos experimentais, foi utilizado o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher (ZAR, 1999). A comparando dos diversos órgãos (rim, cérebro, fígado e genital) no tocante à presença de leptospiros, dentro de cada grupo experimental, foi realizada com o teste de McNemar para amostras relacionadas (SIEGEL; CASTELLAN JR., 2006). O nível de significância adotado foi de 5%. As análises foram efetuadas com os pacotes estatísticos SPSS *for Windows* versão 13.0 e EpiInfo versão 6.04.

Resultados

4 RESULTADOS

Os animais experimentalmente inoculados com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, apresentaram manifestações clínicas compatíveis com a leptospirose, como eriçamento do pêlo, hemorragias, sinais nervosos (convulsões e hiperexcitabilidade) e epistaxe, evoluindo para prostração e morte. As lesões macroscópicas observadas consistiram basicamente de hemorragias nos pulmões, rins e cérebro, hipertrofia e congestão do fígado e baço, útero hiperêmico e aumentado de volume e enterite hemorrágica. A maioria dos animais que foram eutanasiados após o período experimental (21 dias pós-inoculação nos dois experimentos) apresentou fígado e rins aumentados de volume, tecidos uterinos normais e um leve grau de congestão em alguns órgãos.

A visualização a fresco pelo exame direto de microscopia de campo escuro (MCE), realizado após a necropsia, foi muito eficiente na detecção das leptospiros nas suspensões de órgãos (rins, fígado, genital e cérebro) de hamsters experimentalmente infectados com a estirpe LO4. Foram detectadas leptospiros tanto nos animais que morreram como nos eutanasiados em grande parte dos animais dos dois experimentos (Apêndices A - N).

Nas amostras negativas no exame direto, foi realizado o cultivo bacteriológico e apesar da grande maioria ter apresentado contaminação, mesmo com o uso do meio EMJH contendo antibióticos, algumas apresentaram leptospiros após quatro semanas de cultivo (Apêndices A - N).

O título do inóculo empregado na DL_{50} utilizado para o desafio em ambos os experimentos foi realizado através da via intraperitoneal, a diluição empregada foi a 10^{-5} e foi utilizada a diluição 10^{-2} na dose-desafio, resultando no inóculo equivalente a 10.000 DL_{50} .

Todos os animais do grupo controle positivo da estirpe LO4, inoculados por via intraperitoneal ($n = 10$), morreram devido à leptospirose de três a sete dias pós-inoculação e apresentaram lesões generalizadas características da doença. O exame de microscopia direta mostrou a presença da bactéria nos rins, fígado, genitais e cérebro (Apêndice N).

Nos exames histopatológicos dos animais controles as lesões observadas nos rins foram: congestão, hemorragia tubular e glomerular, degeneração tubular e áreas de necrose (Figura 5); em alguns animais foram observados infiltrados inflamatórios discretos e focais. Com relação ao útero, foram observadas congestões, hemorragia da subserosa e hemorragia intersticial na submucosa e na camada muscular (Figura 6). Nos cérebros, foi observada congestão moderada a severa nas leptomeninges com focos de microhemorragia e tumefação vascular, foco extenso de hemorragia e morte neuronal (Figuras 7 e 8). Pela coloração dos tecidos com a técnica de Warthin-Starry foi possível

identificar leptospiras nos tecidos renais e uterinos com grande quantidade da bactéria (Figuras 9 e 10), no entanto, não foi observada a presença da bactéria no cérebro desses animais.

Figura 5 - Corte histológico de rim de hamster morto por leptopirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando hemorragia glomerular e tubular e degeneração tubular (Coloração pela técnica de H.E.)

Figura 6 - Corte histológico de útero de hamster morto por leptopirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando a presença de congestão e hemorragia (Coloração pela técnica de H.E.)

Figura 7 - Corte histológico do encéfalo de hamster morto por leptopirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando áreas de hemorragia nas leptomeninges (Coloração pela técnica de H.E.)

Figura 8 - Corte histológico do encefalo de hamster morto por leptopirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando extensa área de hemorragia nas leptomeninges (Coloração pela técnica de H.E.)

Figura 9 - Corte histológico de rim de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando a presença de leptospiros pela técnica de Warthin-Starry

Figura 10 - Corte histológico de útero de hamster morto por leptospirose pelo sorovar Canicola, estirpe LO4, inoculado pela via intraperitoneal, demonstrando a presença de leptospiros pela técnica de Warthin-Starry

No experimento 1, dos 120 hamsters inoculados, em três animais não foi possível proceder a colheita de materiais, conseqüentemente, esses animais foram desconsiderados.

Os animais que morreram por leptospirose no experimento 1, independente da concentração do inóculo infectante e da condição da pele, as lesões observadas nos exames histopatológicos dos animais foram semelhantes às apresentadas pelo grupo controle, nos rins, genital e cérebro. A presença da bactéria foi verificada apenas nos rins e genital pela técnica de Warthin-Starry.

Nos animais eutanasiados após o período de observação (21º dia pós-inoculação), a maioria apresentou os tecidos renais e uterinos normais e alguns apresentaram leve grau de congestão nos órgãos. Com relação aos cérebros, independente da condição da pele e da concentração do inóculo, foi evidenciada encefalite granulomatosa multifocal discreta, caracterizada por focos aleatórios de infiltrado inflamatório mononuclear na substância cinzenta do córtex cerebral, constituído predominantemente por linfócitos e alguns macrófagos. Congestão moderada nas leptomeninges, edema, tumefação do endotélio, congestão moderada a severa no parênquima, múltiplos focos de microhemorragia, tanto na substância cinzenta como na branca, presença de focos de morte neuronal e figuras de neuroniofagia nas regiões subcorticais e no hipocampo e focos de gliose na substância branca e tumefação axonal também foram observados. O quadro morfológico caracterizou eventos circulatórios e conseqüente edema e morte neuronal (Figuras 11 e 12).

Pela técnica de Warthin-Starry, em nenhum dos tecidos analisados dos animais portadores foi evidenciada presença de leptospiros.

Figura 11 - Corte histológico do encéfalo de hamster eutanasiados, inoculado com o sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via cutânea pele íntegra, demonstrando áreas focais com discreto infiltrado inflamatório mononuclear na substância cinzenta do córtex cerebral e de hemorragia irregulares no córtex cerebral (Coloração pela técnica de H.E.)

Figura 12 - Corte histológico de útero de hamster inoculado com o sorovar Canicola, estirpe LO4, pela via cutânea pele íntegra, demonstrando área focal de infiltrado inflamatório de linfócitos e alguns macrófagos no córtex cerebral (Coloração pela técnica de H.E.)

Com relação ao estudo da evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) pela infecção experimental com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, dos 60 animais expostos por escarificação cutânea, 59 (98,3%) morreram, enquanto que apenas nove (15,8%) dos 58 animais expostos pela pele íntegra morreram (Tabela 1). Todos os animais morreram em um intervalo de nove a 12 dias e apresentaram lesões generalizadas características da doença. Houve diferença significativa na proporção de óbitos entre animais escarificados em relação aos não escarificados ($p < 0,0001$). Comparando as proporções de mortes entre as vias pele escarificada e intraperitoneal, não foi observada diferença estatística ($p = 1,000$). Já para a pele íntegra, a proporção de mortes foi estatisticamente menor do que na via intraperitoneal ($p < 0,0001$).

Tabela 1 - Comparação entre hamsters (*Mesocricetus auratus*) expostos pela pele escarificada e pele íntegra com relação ao óbito por leptospirose - São Paulo - 2007.

Evolução	Tipo de exposição			
	Pele escarificada		Pele íntegra	
	N	%	N	%
Óbito	59/60	98,3	9/57	15,8
Portadores	1/60	1,7	48/57	84,2
Total (%)	60/60	100,0	57/57	100,0

$p < 0,0001$

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da comparação entre a evolução da leptospirose e a detecção de positivos em órgãos segundo o tipo de exposição. Um animal foi considerado positivo quando foram detectadas leptospirosas em pelo menos um dos órgãos, no exame direto ou no cultivo bacteriológico. Nos animais expostos por escarificação cutânea, não houve diferença estatística, pelo teste de McNemar, entre evolução da leptospirose e detecção de positivos em órgãos ($p = 1,000$), ou seja, os resultados discordantes são decorrentes do acaso, significando que 98,3% dos animais morreram e foram positivos na detecção de leptospirosas nos órgãos. Já nos animais expostos pela pele íntegra houve diferença significativa ($p < 0,0001$), ou seja, a maioria dos animais não escarificados foram sacrificados e foi confirmada a condição de portador. Em vista da menor letalidade da pele íntegra quando comparado com a pele escarificada, e de acordo com a definição de portador, a pele íntegra induziu o estado de portador renal e genital com maior frequência.

Tabela 2 - Comparação entre a evolução e o resultado da detecção de positivos em órgãos para a leptospirose segundo o tipo de exposição - São Paulo - 2007.

Evolução	Tipo de exposição			
	Pele escarificada ¹		Pele íntegra ²	
	Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo (%)	Negativo (%)
Óbito	59 (98,3)	0 (0,0)	9 (15,7)	0 (0,0)
Sacrificado(portadores)	1 (1,7)	0 (0,0)	43 (84,3)	5 (100,0)
Total (%)	60 (100,0)	0 (0,0)	52 (89,7)	5 (10,3)

¹ $p = 1,000$, ² $p < 0,0001$

A comparação entre os tipos de exposição no tocante a detecção de leptospiros nos órgãos, com relação ao número de exposições/concentração do inóculo com 30 leptospiros/campo (concentração baixa), está apresentada na tabela 3. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre animais expostos por pele íntegra e pele escarificada em relação ao número de exposições (uma, duas e quatro exposições) de uma mesma concentração (30 leptospiros/campo). Considerando o número de exposições/concentração do inóculo com 100 leptospiros/campo (concentração alta) (Tabela 4), também não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre animais expostos por pele íntegra e pele escarificada. No total, para cada concentração do inóculo infectante, não foi observada diferenças significativas entre as duas vias de inoculação.

Comparando as concentrações do inóculo infectante (30 leptospiros/campo e 100 leptospiros/campo) com relação à proporção de positivos na detecção de leptospiros nos órgãos, não foi observada diferença significativa ($p = 1,000$) (Tabela 5).

Tabela 3 - Comparação entre animais expostos por pele íntegra e pele escarificada em relação à detecção de leptospiros em órgãos, segundo o número de exposições/concentração do inóculo de 30 leptospiros/campo - São Paulo - 2007.

Nº de exposições / concentração	Tipo de exposição			
	Pele escarificada		Pele íntegra	
	Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo (%)	Negativo (%)
1 Exp / 30 lep ¹	10 (100,0)	0 (0,0)	10 (100,0)	0 (0,0)
2 Exp / 30 lep ²	10 (100,0)	0 (0,0)	8 (80,0)	2 (20,0)
4 Exp / 30 lep ³	10 (100,0)	0 (0,0)	9 (90,0)	1 (10,0)
Total (%) ⁴	30 (100,0)	0 (0,0)	27 (90,0)	3 (10,0)

¹ $p = 0,823$; ² $p = 0,473$; ³ $p = 1,000$; ⁴ $p = 0,237$

Tabela 4 - Comparação entre animais expostos por pele íntegra e pele escarificada em relação à detecção de leptospiros em órgãos, segundo o número de exposições/concentração do inóculo de 100 leptospiros/campo - São Paulo - 2007.

Nº de exposições / concentração	Tipo de exposição			
	Pele escarificada		Pele íntegra	
	Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo (%)	Negativo (%)
1 Exp / 100 lep ¹	10 (100,0)	0 (0,0)	9 (100,0)	0 (0,0)
2 Exp / 100 lep ²	10 (100,0)	0 (0,0)	8 (80,0)	2 (20,0)
4 Exp / 100 lep ³	10 (100,0)	0 (0,0)	8 (100,0)	0 (10,0)
Total (%) ⁴	30 (100)	0 (0,0)	25 (92,6)	2 (7,4)

¹ p = 0,823; ² p = 0,473; ³ p = 0,823; ⁴ p = 0,220

Tabela 5 - Comparação entre animais expostos ao sorovar Canicola, estirpe LO4, segundo a concentração do inóculo infectante e o resultado da detecção de leptospiros em órgãos - São Paulo - 2007.

Concentração do inóculo infectante	Detecção de leptospiros			
	Positivo		Negativo	
	N	%	N	%
30 leptospiros/campo	57/60	95,0	3/60	5,0
100 leptospiros/campo	55/57	96,5	2/57	3,5
Total (%)	112/117	95,7	5/117	4,3

p = 1,000

A comparação entre os números de exposições/concentração do inóculo infectante de leptospiros com relação à proporção de animais portadores, por órgão, é apresentada na tabela 6. Houve diferença significativa na proporção de positivos entre os grupos 1 Exp/100 lep e 4 Exp/100 lep (p = 0,009) com relação ao rim. Comparando rim, cérebro e genital (dois a dois), dentro de cada grupo, foi observada diferença significativa (p = 0,015) apenas entre rim e genital no grupo 4 Exp/30 lep, ou seja, os resultados são discordantes entre os dois órgãos. Já para as demais comparações, não houve diferença significativa (p > 0,05), havendo concordância nos resultados entre os órgãos.

Tabela 6 - Comparação entre os números de exposições/concentração do inóculo infectante do sorovar Canicola, estirpe LO4, com relação à proporção de animais portadores, por órgão - São Paulo - 2007.

Nº de exposições/dose	Rim		Fígado		Genital		Cérebro	
	N	%	N	%	N	%	N	%
1 Exp/ 30 lep	8/8	100,0	5/8	62,5	3/8	37,5	4/8	50,0
2 Exp/ 30 lep	5/9	55,6	3/9	33,3	0/10	0,0	3/9	33,3
4 Exp/ 30 lep	7/8	87,5	2/8	25,0	0/8	0,0	4/8	50,0
1 Exp/ 100 lep	2/8	25,0	4/8	50,0	5/8	62,5	6/8	75,0
2 Exp/ 100 lep	8/11	72,7	1/11	9,1	3/11	27,3	3/11	27,3
4 Exp/ 100 lep	6/6	100,0	1/6	16,7	1/6	16,7	1/6	16,7
Total	36/50	73,0	16/50	33,0	12/50	24,0	21/50	42,4

No teste de soroaglutinação microscópica dos animais sobreviventes, apenas um animal do grupo não escarificado exposto a duas doses de 100 leptospiiras/campo foi regente para *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpes LO4 e Hond Utrecht IV, com título 200 para ambas as cepas.

A leitura do teste de inibição do crescimento, no experimento 2, para verificar a possibilidade de ação tóxica da maravalha usada para forragem das caixas revelou que, em ambas as amostras de maravalhas, o crescimento foi positivo, ou seja, sem inibição de crescimento, indicando que as maravalhas, tanto a limpa como a suja, não foram tóxicas, o que poderia ser um fator limitante para a manutenção das leptospiiras naquelas condições ambientais.

Os hamsters previamente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, por escarificação cutânea na dose de 100 leptospiiras por campo, e introduzidos nas caixas morreram sete dias pós-inoculação e foram positivos na detecção de leptospiiras nos rins, fígado e genital. As lesões macroscópicas e microscópicas observadas foram as mesmas descritas no experimento 1, ou seja, hemorragias nos rins e fígado, hipertrofia e congestão do fígado e baço e enterite hemorrágica. Com relação às lesões microscópicas, observou-se congestão, hemorragia tubular e glomerular, degeneração tubular e áreas de necrose nos rins, e infiltrados inflamatórios discretos e focais. No útero, foram observadas congestões, hemorragias na subserosa e hemorragia intersticial na submucosa e na camada muscular, confirmando, dessa forma, a instalação da doença aguda nesses animais.

Os resultados observados no experimento 2 estão apresentados nas tabelas 7 e 8. Dos 10 animais expostos por pele íntegra, oito (80,0%) morreram (Tabela 7), enquanto que apenas dois (20,0%) dos animais com pele escarificada morreram (Tabela 8). Houve diferença significativa na

proporção de óbitos entre os dois grupos ($p = 0,025$). Em todos os animais, de ambos os grupos, foram detectadas leptospiros pelo exame direto em pelo menos um dos órgãos analisados. Por outro lado, nenhum animal sobrevivente foi reagente (título < 25) no teste de soroaglutinação microscópica (SAM).

Tabela 7 - Hamsters expostos a *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, por pele íntegra, segundo a evolução da doença, os dias pós-inoculação, a detecção de leptospiros por microscopia direta e resultados da SAM - São Paulo - 2007.

No. do animal	Evolução	Dias pós-inoculação (colheita de material)	Microscopia direta				SAM (título)
			Fígado	Rim	Genital	Cérebro	
1	Óbito	15	P	P	P	P	N
2	Óbito	15	P	P	N	P	N
3	Óbito	15	P	P	N	P	N
4	Óbito	15	P	P	P	P	N
5	Óbito	15	P	P	P	P	N
6	Óbito	16	P	P	P	P	N
7	Óbito	16	P	P	P	P	N
8	Óbito	16	P	P	P	N	N
9	Portador	21	P	P	N	P	N
10	Portador	21	P	P	N	P	N

P = Positivo; N = Negativo

Tabela 8 - Hamsters expostos a *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, por pele escarificada, segundo a evolução da doença, os dias pós-inoculação, a detecção de leptospiros por microscopia direta e resultados da SAM - São Paulo - 2007.

No. do animal	Evolução	Dias pós-inoculação (colheita de material)	Microscopia direta				SAM (título)
			Fígado	Rim	Genital	Cérebro	
1	Óbito	9	P	P	P	P	N
2	Óbito	15	P	P	P	P	N
3	Portador	21	N	P	N	P	N
4	Portador	21	N	P	P	N	N
5	Portador	21	P	P	N	P	N
6	Portador	21	N	P	N	P	N
7	Portador	21	N	P	N	P	N
8	Portador	21	P	P	N	N	N
9	Portador	21	P	P	N	P	N
10	Portador	21	N	P	N	P	N

P = Positivo; N = Negativo

Discussão

5 DISCUSSÃO

Babudieri (1961), Sanger et al. (1961) e Sebastian (1994) ressaltaram que a patogenicidade e a virulência das leptospiiras podem variar com o sorovar empregado e com o modelo biológico adotado. Enquanto alguns sorovares podem causar a morte do animal dentro de quatro a 10 dias, outros apenas induzem a um aumento de temperatura e lesões brandas que não são suficientes para causar a morte. A manutenção da capacidade de induzir a doença para um determinado sorovar pode ser por congelamento em nitrogênio líquido ou passagens permanentes e sucessivas em animais de laboratórios (FAINE, 1999), contudo os fatores de virulência responsáveis por estas propriedades ainda não estão totalmente esclarecidos. A patogenicidade e a virulência do sorovar Canicola, estirpe LO4, utilizado para induzir a leptospirose em hamsters, foram conseguidas no presente experimento através de 20 passagens consecutivas em hamsters, e mesmo assim ocorreu perda da virulência com redução e até ausência da letalidade; nesse caso foi necessário voltar a um cultivo *in vitro* de baixa passagem para reiniciar o processo de estabilização. Marchiori Filho (2007), trabalhando com a mesma estirpe, também conseguiu estabelecer a patogenicidade e a virulência da estirpe com 20 passagens consecutivas. O autor inoculou a estirpe LO4 em hamsters através das vias conjuntiva-nasal e cervico-vaginal em duas concentrações diferentes, 100 a 130 leptospiiras por campo (alta concentração) e 20 a 30 leptospiiras por campo (baixa concentração). As leptospiiras foram inoculadas por dois dias consecutivos; a via intraperitoneal foi usada como controle de infecção, contudo não foram contempladas as vias escarificação cutânea e pele íntegra.

Apesar do sucesso da manutenção da virulência e patogenicidade da estirpe, o modelo de estudo *in vivo* nem sempre permite o controle total das variáveis que resultam em sintomas e sinais decorrentes da infecção experimental. Outro aspecto que deve ser mencionado, decorrente dos objetivos propostos, foi a tentativa de simulação das condições ambientais promotoras de infecção em animais na natureza. Na metodologia empregada, a infecção pela pele íntegra ou escarificada como portas de entrada naturais não devem ser consideradas como totalmente controladas, uma vez que não se consegue excluir a ingestão pelo ato do animal de lambear a lesão ou mesmo difundir o inóculo pelas mucosas nasais e oculares logo após a deposição sobre o mesmo. Por outro lado, na natureza não há a garantia de que o animal se infecte por uma única via, da mesma forma de que não há garantias de que os animais expostos não apresentem qualquer tipo de lesão na pele. Diante desses variáveis incontroláveis é que estão sendo apresentados os resultados desse trabalho.

Os resultados dos animais do grupo controle positivo que morreram devido à leptospirose, inoculados pela via intraperitoneal, com sintomatologia e lesões na necropsia, são compatíveis com as descrições de Sapp et al. (1980), que inocularam o sorovar Canicola em hamsters pela via intraperitoneal e por Marchiori Filho (2007), que utilizou a estirpe LO4 pelas vias intraperitoneal, conjuntiva-nasal e cérvico-vaginal em hamsters. As lesões observadas nos animais que vieram a óbito confirmam a indução da leptospirose aguda na grande maioria dos animais e a virulência da estirpe pelas hemorragias pulmonares e as enterites severas independentemente da via e da concentração do inóculo.

As manifestações clínicas observadas nos animais experimentalmente infectados com a estirpe LO4 foram semelhantes às observadas para essa mesma estirpe por Marchiori Filho (2007) e para os sorovares Canicola, Copenhageni e Pomona (SAPP et al., 1980; PASSOS et al., 1988; OLIVA et al., 1998; MACEDO et al., 2004), como eriçamento do pêlo, hemorragias, taquipnéia, sinais nervosos, epistaxe, prostração e morte. Uma das principais características observadas nessa estirpe foi a presença de alterações nervosas na fase aguda da doença e morte rápida quando inoculada pela via intraperitoneal (3 a 4 d.p.i), o que difere do sorovar Pomona que induz uma morte apenas a partir do quinto dia pós-inoculação (Macedo et al., 2004), caracterizando assim a alta virulência dessa estirpe nesses animais. Não foi observada icterícia nos animais mortos pela infecção com a estirpe LO4, como descritas nas infecções pelo sorovar Pomona (BRANDESPIM et al., 2004; MACEDO et al., 2004).

A visualização a fresco de leptospiros nos diversos órgãos estudados, em maior quantidade no fígado e rim, foi possível pelo exame direto de microscopia de campo escuro, tanto nos animais que morreram como nos eutanasiados. A visualização foi facilitada pela diluição de cada material em salina estéril e pela grande quantidade de bactérias presentes nos tecidos. Os mesmos resultados foram observados por Camargo et al. (1993); Oliva et al. (1998); Macedo et al. (2004) e Marchiori Filho (2007), que pesquisaram leptospiros nos mesmos órgãos de animais experimentalmente infectados com estirpes virulentas e tiveram sucesso na avaliação direta das amostras. Como a visualização a fresco foi eficiente na identificação da bactéria, não foi necessário a realização de técnicas mais complexas como a PCR. Marchiori Filho (2007) relata que a PCR não apresentou uma sensibilidade satisfatória na identificação de leptospiros nos rins e genitais de hamsters inoculados com a estirpe LO4; provavelmente, esse resultado esteve relacionado com o procedimento de extração do DNA, apesar de ter sido utilizado o método de fervura-fenol proposto por Cortez et al. (2001).

O cultivo bacteriano dos macerados dos órgãos para a identificação da presença de leptospiros, usando o meio EMJH acrescido de antibiótico, foi satisfatório para o crescimento do agente, apesar de terem ocorrido algumas contaminações em alguns cultivos. Foi possível o

um dos agravantes o alto grau de contaminação, o que poderia inibir o crescimento da leptospirose por interferência do pH do meio, mesmo com a utilização de antibióticos seletivos e condução de metodologias para a redução de contaminantes durante a necropsia, como uso de materiais estéreis e assepsia com álcool 70% (v/v). Haanwinckel, Megid e Souza (2004) também tiveram problemas no cultivo de leptospirosas, mas conseguiram conter a contaminação das culturas utilizando a técnica de pipeta Pasteur em meio semi sólido de Fletcher segundo Passos et al. (1988). Apesar disto, o cultivo é sempre difícil, inerente a multiplicação desta bactéria. A regularidade dos resultados do cultivo de leptospirosas obtidos no presente trabalho sugere que os cuidados de assepsia adotados durante a colheita e o processamento dos materiais foram bem sucedidos no controle da contaminação. A elevada concentração observada de leptospirosas nos órgãos, principalmente nos animais que morreram, certamente contribui para a facilitação da visualização a fresco e conseqüentemente no cultivo (CAMARGO et al., 1993).

A coloração dos tecidos com a técnica de Warthin-Starry só foi possível identificar leptospirosas nos animais que apresentaram a doença aguda, principalmente nos tecidos renais e uterinos. Muitos estudos têm mostrado a grande sensibilidade da técnica de impregnação pela prata em detectar a presença da bactéria em infecções agudas. Camargo et al. (1993) destacou a alta eficácia nas colorações pelos sais de prata para revelar a presença de leptospirosas nos ovários de hamsters experimentalmente inoculados com o sorovar Pomona; o autor refere que a técnica foi muito rica em informações, pois possibilitou a visualização do tipo de estrutura do ovário onde as leptospirosas estavam localizadas. Marchiori Filho (2007) detectou grande quantidade de leptospirosas nos rins e em algumas amostras de útero e testículo de hamsters inoculados com a estirpe LO4, por três vias, nos casos agudos da doença. Foi possível ainda relacionar a presença em grande quantidade com lesões nos tecidos no caso agudo. Em contra partida, no presente trabalho, não foi possível a visualização de leptospirosas pelo método de Warthin-Starry nos animais portadores. Da mesma forma, Sanger et al. (1961) inoculou o sorovar Pomona via intraperitoneal em hamsters e também tiveram dificuldades na observação do agente nos tecidos durante a infecção crônica, utilizando a técnica de impregnação por prata pelo método de Warthin-Starry. Ao contrario, as observações de Brandespim et al. (2004), que identificaram a presença de espiroquetas nos testículos, epidídimo e vesícula seminal 30 d.p.i com a técnica de Levaditti em hamsters infectados com o sorovar Pomona. A visualização de leptospirosas a fresco em relação a visualização pela impregnação pela prata na maioria das vezes tem se mostrado discordantes, uma vez que a visualização apresenta a vantagem de ser uma técnica barata e fornecer rapidez na obtenção dos resultados, sendo sua única desvantagem, a realização da leitura imediatamente após a morte do animal.

barata e fornecer rapidez na obtenção dos resultados, sendo sua única desvantagem, a realização da leitura imediatamente após a morte do animal.

Faine et al. (1999) descrevem que a morte dos animais pode ocorrer do efeito das lesões antes mesmo das leptospiros serem evidenciadas na circulação e em tecidos. Desta forma uma das principais desvantagens no uso da técnica de Warthin-Starry seria a baixa sensibilidade na visualização das leptospiros nos tecidos de animais na fase crônica da doença, quando comparada com a microscopia direta.

Os achados histopatológicos dos animais que vieram a óbito em todos os grupos estudados indicam que a estirpe LO4 provoca alterações morfológicas importantes que se caracterizaram pela presença de lesões típicas de um processo inflamatório agudo, com riqueza de alterações vasculares nos tecidos renais, uterinos e cerebral e a presença de infiltrados de células inflamatórias. Brito (1968) verificou que as alterações celulares decorrentes da presença das leptospiros em tecidos com tropismo positivo para este microorganismo, tais como fígado e rins, podem ser visualizadas através da coloração de Hematoxilina-Eosina. Nos rins, os túbulos proximais e distais podem se apresentar dilatados com edema intersticial, sobretudo na junção córtex medular, bem como áreas de infiltrados inflamatórios com linfócitos, histiócitos e raros eosinófilos que são encontrados ao redor dos glomérulos. Cox e Twigg (1981) inocularam hamsters pela escarificação da pele abdominal, com o sorovar Icterohaemorrhagiae, e observaram, nos rins, a presença de leptospiros degeneradas no interior de fagócitos e lesão tubular. Camargo et al. (1994) observaram nos ovários de hamsters inoculados com o sorovar Pomona, na fase aguda da doença, a grande presença de alterações vasculares. Cruz (1986) atribui o comprometimento do endotélio vascular a causa primária das lesões verificadas na leptospirose aguda. Oliva et al. (1994) reproduziram a leptospirose aguda em hamsters sírios machos, infectados com os sorovares Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae e relataram que todos os animais apresentaram processos congestivos e hemorrágicos cuja intensidade variou de acordo com o sorovar aplicado, sendo que nos animais inoculados com o sorovar Pomona foi observada uma ampla congestão renal nas regiões de córtex e medula, com presença de cilindros hialinos, degeneração epitelial e necrose tubular.

Com relação aos cérebros, foram observadas lesões típicas de processo inflamatório, como presença de alterações vasculares. Achados semelhantes foram observados por Pescador et al. (2004) descreveram um caso de aborto equino por *Leptospira* spp. em um feto de seis meses e foi constatada, no exame histológico do cérebro, a presença de hemorragia multifocal moderada com a presença de neutrófilos no interior de alguns focos de hemorragia; os cortes do cérebro corados por Warthin-Starry revelaram a presença de espiroquetas de coloração enegrecida no interior da substância branca do sistema nervoso central. Porém Abdul e Sleight (1964) estudaram

particularmente as lesões no sistema nervoso central de hamsters, inoculados pela via intraperitoneal com o sorovar Pomona, com duas doses e concentrações diferentes (0.5 mL contendo 2.500 bactérias e 1 mL contendo 100 bactérias), o autor relata que os animais apresentaram sintomatologia nervosa a partir do sexto dia pós inoculação, e morte no oitavo dia, mas não foi observada a presença de lesões pela técnica de H.E, essa ausência pode ter sido devido a natureza aguda da doença, com a morte ocorrendo antes do desenvolvimento de lesões detectáveis. Segundo o autor as lesões no cérebro com o sorovar Pomona, têm sido associadas com a infecção subaguda ou crônica. No presente estudo foram verificadas lesões cerebrais também na fase aguda da infecção pela estirpe LO4. Sebatian (1994) refere que na leptospirose a intensidade das lesões teciduais está intimamente ligada à estirpe do sorovar utilizado e à adaptabilidade do hospedeiro. Do mesmo modo, Faine et al. (1999) relataram que as lesões teciduais causadas pelas leptospirosas dependem não só do sorovar infectante, mas também da resposta imunológica do hospedeiro

Nos animais portadores não foram observadas lesões significativas nos tecidos renais e uterinos, alguns apenas apresentaram leve grau de congestão nos órgãos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Marchiori Filho (2007). O autor relata que nos animais eutanasiados não foi observada a presença de tecido conjuntivo no parênquima dos órgãos renal, uterino e nos testículos que de acordo com Sanger et al. (1961) é característico de uma infecção crônica e justifica essa ausência pelo curto período de observação dos animais (21 d.p.i). Van Den Ingh e Hartman (1986) descreveram os achados patomorfológicos da leptospirose em hamsters infectados com o sorovar Icterohaemorrhagiae e fizeram um estudo comparativo dos achados histológicos entre o grupo controle e os que foram submetidos à eutanásia e não encontraram diferenças significativas com relação às lesões observadas.

Ao contrário dos outros órgãos, nos cérebros foi possível a observação de alterações microscópicas que se caracterizaram por eventos circulatórios importantes decorrentes de edema vasogênico, microhemorragias e morte neuronal nos animais portadores em todos os grupos, independente da condição da pele no momento da inoculação. Entretanto, a avaliação histológica dos fragmentos não permite diferenciar os grupos estudados pelo grau de acometimento, uma vez que as regiões representadas não foram uniformes. Contudo, é relevante destacar que os eventos circulatórios são predominantes e possivelmente estão relacionadas com a chegada do agente via circulação sanguínea. É importante interpretar estes achados com relação às alterações em outros órgãos, uma vez que eventos circulatórios podem ser secundários a insuficiência renal, azotemia, insuficiência hepática, dentre outras. Abdu e Sleight (1965) descreveram a presença de lesões no sistema nervoso central de humanos que apresentavam uremia e relacionaram a função renal prejudicada com convulsões. Tendo em vista as alterações nervosas induzidas por essa estirpe,

que Baskerville (1986) refere que alterações histológicas visualizadas pelo método da coloração de H.E. podem ser inespecíficas, sugerindo a utilização complementar de outras técnicas.

O teste de soroaglutinação microscópica mostrou-se negativo nos animais sobreviventes até 21 dias pós-infecção, embora tenham sido detectadas leptospiros nos órgãos, mostrando-se que independentes da concentração do inóculo, do número de exposições e da condição da pele; demonstrando a baixa indução imune da estirpe LO4 nessa espécie animal. Marchiori Filho (2007) trabalhou com a estirpe LO4 com duas concentrações diferentes do inóculo infectante em várias vias e também não detectou soroconversão ou títulos de aglutininas até 21 dias pós-infecção em hamsters e destaca o baixo poder imunogênico pelas vias e concentrações estudadas, por não ser capaz de induzir altos títulos de anticorpos aglutinantes. Sunbul et al. (2001) realizou um estudo com 59 ratos de esgoto (*Rattus norvegicus*) naturalmente infectados e detectou positividade de 32,2% (19/59) usando a técnica de PCR, no entanto, apenas cinco soros desses animais positivos na PCR foram positivos no teste de SAM, com títulos que variaram de 100 a 1600. Segundo o autor, essa condição pode estar relacionada com as diferenças antigênicas de cada espécie de *Leptospira* spp., e com a fase crônica da doença, onde pode ocorrer baixa produção de anticorpos. Por outro lado, Abdu e Sleight (1964) detectaram títulos de anticorpos para o sorovar Pomona em hamsters inoculados pela via intraperitoneal, utilizando duas concentrações diferentes (100 e 2500 bactérias); os anticorpos surgiram no quinto dia nos animais inoculados com 100 bactérias e no oitavo dia nos animais inoculados com 2500 bactérias. Macedo et al. (2004) inocularam hamsters com o sorovar Pomona pelas vias subcutânea e escarificação cutânea, e verificaram títulos de anticorpos anti-leptospiros que variaram de 100 a 1600. Esses autores enfatizam a diferença entre cada estirpe na indução de anticorpos.

No primeiro experimento, na comparação entre hamsters expostos pela pele escarificada e pele íntegra com relação ao óbito por leptospirose, 98,3% (59/60) dos hamsters inoculados por escarificação cutânea morreram, enquanto que apenas 14,0% (8/57) dos animais inoculados pela pele íntegra morreram (Tabela 1). Tal diferença entre os dois grupos foi comprovada estatisticamente ($p < 0,0001$), demonstrando que a pele escarificada mostrou-se ser uma via mais eficiente na indução da doença do que a pele íntegra. A via pele escarificada, em relação a proporção de óbitos por leptospirose, foi semelhante à via intraperitoneal, não havendo diferença estatística na porcentagem de mortes. Era de se esperar que a proporção de hamsters infectados por leptospiros fosse maior em animais expostos por pele escarificada do que em animais inoculados pela pele íntegra, uma vez que naquele grupo foi rompida as barreiras inespecíficas da pele que dificultam a penetração e conseqüente instalação de leptospiros no organismo. Segundo Martins e Castineiras (2001), a presença de pequenos ferimentos na pele facilita a instalação do agente na corrente sanguínea ou

penetração e conseqüente instalação de leptospiros no organismo. Segundo Martins e Castineiras (2001), a presença de pequenos ferimentos na pele facilita a instalação do agente na corrente sanguínea ou linfática e, conseqüentemente, a sua difusão por todo o organismo. Macedo et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes, observando que 80% (8/10) dos hamsters morreram após inoculação de 0,25 mL do sorovar Pomona por escarificação cutânea na face interna dos membros, sem, contudo, avaliarem a pele íntegra; os autores sugeriram que novas investigações deveriam ser conduzidas com a via cutânea com pele escarificada, tendo em vista o grande sucesso desta no estabelecimento da leptospirose em hamsters, assim como a via intraperitoneal.

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 1 e 2, foi constatado que a inoculação pela via cutânea sem escarificação induziu mais fortemente o estado de portador do que a via cutânea escarificada. O estado de portador se caracterizou pela presença de leptospiros nos órgãos de animais sacrificados, principalmente nos rins, com a eliminação de leptospiros pela urina sem, contudo, responder sorologicamente na SAM. Grande importância deve ser dada a esses animais, pois são eles que irão atuar na condição de disseminadores de leptospiros no meio ambiente e conseqüente transmissão da doença para outros animais e para o ser humano (FAINE et al., 1999).

A comparação de animais expostos à estirpe LO4 por pele escarificada e pele íntegra de acordo com as freqüências de uma, duas e quatro exposições e concentrações de 30 leptospiros por campo, no tocante à detecção de positivos em pelo menos um dos órgãos investigados, não revelou diferenças significativas, ou seja, a freqüência de exposições e a concentração do inóculo infectante não influenciaram na indução da infecção (Tabela 3). O mesmo foi observado quando foi considerado o mesmo número de exposições, mas com uma concentração de 100 leptospiros por campo (Tabela 4). Da mesma forma, não houve diferenças significantes nas comparações das concentrações do inóculo infectante de 30 e 100 leptospiros por campo. (Tabela 5). Resultados semelhantes foram observados por Abdu e Sleight (1964), utilizando duas concentrações diferentes do sorovar Pomona (100 e 2500 bactérias por dose), pela via peritoneal. As duas concentrações conseguiram induzir a leptospirose nos animais infectados diferindo apenas quanto ao aparecimento dos sinais clínicos, que ocorreram mais cedo para o grupo de elevada concentração. Contudo, Marchiori Filho (2007) referiu que tanto a via de inoculação quanto a concentração infectante do agente, influenciaram na proporção de mortes por leptospirose em hamsters infectados com a estirpe LO4. Nesse trabalho, a inoculação pela via conjuntiva-nasal apresentou letalidade similar à via intraperitoneal na concentração de 100 a 200 leptospiros por campo; na concentração de 20 a 30 leptospiros por campo, houve redução significativa na letalidade com inoculações por dois dias consecutivos. O autor ainda relata que a dose infectante com maior concentração facilitou a penetração da bactéria na

circulação sanguínea na via conjuntiva-nasal e dessa forma estabeleceu infecção aguda semelhante à via intraperitoneal.

Na análise da tabela 6 observa-se uma tendência inversa entre o número de exposições e a presença de leptospiros em órgãos dos animais portadores nas duas concentrações, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa. Uma única relação direta estatisticamente significativa foi entre os grupos 1 Exp/100 lep e 4 Exp/100 lep ($p = 0,009$) com relação ao rim, ou seja, nos animais que foram submetidos à frequência de quatro exposições houve indução de maior proporção de positivos no rim (6/6, ou seja, 100%) em relação a animais que foram expostos apenas uma vez à bactéria (2/8, ou seja 25%). Apesar desses resultados a soroprecipitação microscópica desses animais foi negativa e, portanto não seria pela presença de anticorpos aglutinantes realizada no 21º dia pós inoculação. Talvez o teste de inibição de crescimento, o qual não foi realizado nesse estudo, seria um caminho para o esclarecimento desse efeito.

Ainda na tabela 6, com relação à presença de leptospiros nos órgãos dos animais inoculados, comparando rim, cérebro e genital (dois a dois), dentro de cada grupo, foi observada diferença significativa pelo teste de McNemar ($p = 0,015$) apenas entre rim e genital no grupo 4 Exp/30 lep, ou seja, os resultados são discordantes entre os dois órgãos (rim e genital). Nos demais grupos, as leptospiros foram detectadas concomitantemente no rim, genital e cérebro ($p > 0,05$).

De todos os animais portadores, 73% foram positivos para leptospiros nos rins, 42% no cérebro, 33% no fígado e 24% no genital, independentemente da via, da concentração do inóculo e do número de exposições. Muitos estudos têm demonstrado a predileção das leptospiros pelos tecidos renais. Miler e Wilson (1967) e Camargo et al. (1998) inocularam hamsters pela via intraperitoneal com o sorovar Pomona. Os primeiros observaram a colonização da bactéria nos rins a partir do sétimo dia pós-inoculação e as leptospiros foram recuperadas até o vigésimo dia pós-inoculação; o segundo encontrou 100% de positividade nos cultivos de rins dos animais experimentalmente infectados.

Marchiori Filho (2007) testou três vias de inoculação e duas concentrações do inóculo infectantes em hamsters, com a estirpe LO4, e observou que independentemente destas, o número de rins e genitais positivos foram semelhantes e demonstrou que a leptospira tende a colonizar esses órgãos durante a infecção crônica com maior número de leptospiros nos tecidos renais. A infecção seguida da liberação persistente de leptospiros pela urina é a mais frequente e assume grande importância do ponto de vista epidemiológico para a maioria das espécies, pois resulta na condição de portador sã, disseminador da doença na natureza (TAYLOR et al., 1970).

A presença das leptospiros no cérebro e no aparelho genital pode estar relacionada à fase imune da doença, que possui uma duração variável. Nesse período, as leptospiros desaparecem da

circulação e do fluido cerebrospinal e localizam-se em áreas de privilégio imunológico, seqüestradas do sistema imune: túbulos contornados renais, câmara anterior do olho, sistema nervoso central e aparelho reprodutor (FAINE et al., 1999).

O experimento 2 foi planejado para avaliar o potencial de transmissão e disseminação ambiental da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, entre hamsters doentes e saudáveis, com pele íntegra e escarificada. As condições ideais para a manutenção das leptospiros no meio ambiente foram simuladas de maneira a favorecer a transmissão da bactéria entre os animais sadios pelo contato com animais doentes. A morte dos dois animais infectados por escarificação cutânea sete dias pós-inoculação, que serviram de disseminadores, confirmam a virulência da estirpe LO4 e seu poder de disseminação ambiental. Os sinais clínicos observados e as lesões na necropsia destes animais foram os mesmos citados no primeiro experimento.

Discordante do primeiro experimento (Tabelas 7 e 8), a proporção de óbitos foi significativamente maior ($p = 0,025$) entre o grupo de animais com pele íntegra do que nos animais com pele escarificada, apesar destes terem a porta de entrada facilitada. Uma maior proporção de mortes era esperada nos hamsters com a pele escarificada, pois nestes animais foi quebrada uma barreira inespecífica que dificulta a penetração e conseqüente instalação de leptospiros no organismo (MARTINS; CASTINEIRAS, 2001). Em contrapartida, em todos os animais de ambos os grupos, foram detectadas leptospiros por exame direto em pelo menos um dos órgãos analisados, sem, contudo não serem reagente (título < 25) no teste de soroaglutinação microscópica.

Contrariamente a literatura, ficou demonstrada a penetração de leptospiros em pele íntegra, uma vez que os animais sadios foram expostos ao ambiente contaminado pela presença de um animal doente. A integridade da pele poderia se questionada, mas nas condições controladas do experimento, aparentemente os animais não apresentavam qualquer abrasão visível. Contudo, nas condições de infecção na natureza em ambiente selvagem, por exemplo, não há garantia de que a pele desses animais não tenha qualquer solução de continuidade.

Penetrar na pele não necessariamente indica multiplicação da bactéria e conseqüente doença, a habilidade de multiplicação depende de vários fatores inespecíficos como: pH, potencial de oxirredução, eletrólitos, ácidos graxos, moléculas orgânicas, anticorpos naturais, sistemas complemento e lisosinas; alguns desses elementos são essenciais, como nutrientes. Durante o trauma ou abrasão da pele ocorre a liberação de mediadores inflamatórios que podem favorecer as leptospiros ganharem a circulação. Um fator limitante seria a capacidade de estirpes virulentas resistirem a todos essas condições inespecíficas e a, principalmente, a presença de imunoglobulinas específicas circulantes devidas à infecção pregressas (FAINE et al., 1999). O tempo necessário para o desenvolvimento de lesões pode depender do tamanho do inóculo. Na infecção natural a dose infectante é assumida como

o que regularia o tempo da incubação para o aparecimento dos sintomas. Pequenas doses podem prolongar o período de incubação produzindo infecções subclínicas ou significantes o que resultaria no animal portador. Miller (1972) ressalta que animais infectados por leptospiros podem se tornar portadores temporários ou permanentes do microorganismo, albergando as leptospiros nos túbulos renais e as eliminando periodicamente ao meio ambiente. Todos esses elementos poderiam explicar ou explicam os resultados do experimento 2, onde certamente comprovou-se a possibilidade real de entrada do agente por pele íntegra e surpreendentemente a falha no desenvolvimento de sintomas do grupo com pele escarificada; muito embora portador renal e genital. Outra possibilidade que pode ter ocorrido nesta falha diz respeito ao controle do teor de umidade das caixas dos dois grupos de animais, as quais foram empiricamente umedecidas com água diariamente, o que limitou a viabilidade das leptospiros do ambiente promovendo sub doses infectantes.

Uma forma de minimizar esta falta de reprodutibilidade teria sido a realização do experimento 2 em triplicatas, o que não foi realizada. De qualquer forma a estirpe LO4 foi capaz de demonstrar a transmissibilidade entre hamsters quer sejam com pele íntegra ou com abrasões, que vieram a óbito ou tornaram-se portadores renal e genital, e mantendo-se em sítio preservado como o cérebro.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi executado o presente estudo, de acordo com os resultados apresentados, as seguintes conclusões foram obtidas:

1. As técnicas de microscopia direta e o cultivo microbiológico foram eficientes na identificação de leptospiros nos órgãos de hamsters inoculados com o sorovar Canicola, estirpe LO4.
2. A via cutânea escarificada induziu maior letalidade quando comparada com a pele íntegra nas duas concentrações do inóculo infectante, e essa foi semelhante à via intraperitoneal, com estabelecimento e evolução da leptospirose com lesões típicas dessa doença.
3. A via cutânea íntegra induziu mais freqüentemente o estado de portador renal e/ou genital para leptospirose em hamsters pelo sorovar Canicola, estirpe LO4.
4. A freqüência de exposição e a concentração do inóculo infectante do sorovar Canicola, estirpe LO4, não influenciaram no estado de portador renal e/ou genital ou mesmo na presença de leptospiros no tecido cerebral nas duas condições cutâneas empregadas na infecção experimental.
5. O sorovar Canicola, estirpe LO4, não induziu resposta humoral, na Soroaglutinação Microscópica (SAM), no presente estudo.
6. A estirpe LO4 apresentou baixo poder imunogênico, não apresentando soroconversão na Soroaglutinação Microscópica, em ambas as condições de inoculação cutânea.
7. A leptospirose pela estirpe LO4 pode ser transmitida entre hamsters pela exposição ao ambiente contaminado.

Referências

7 REFERÊNCIAS*

- ABDU, M. T. F.; SLEIGHT, S. D. Pathology of experimental *Leptospira Pomona* infection in hamsters. **Cornell Veterinarian**, v. 55, p. 74-86, 1965.
- AHMED, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE, M.; VIJAYACHARI, P.; MACHANGU, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 28, 2006. doi: 10.1186/1476-0711-5-28. Disponível em: <http://www.ann-clinmicrob.com/cotents/5/1/28>. Acesso em: 02 jan 2007.
- ALEXANDRE, A. D.; RULE, P. Evaluation of peniciline, cephalosporins, tetracycline and erytromicin in treatment of experimental leptospirosis in hamsters. **Israel Journal Veterinary Medicine**, v. 43, p. 296-306, 1987.
- ALMEIDA, G. A.; BRITO, M. G.; ROCHA, D. L. S.; RESENDE, S. M. R.; MAROTTA, S. H. C.; RODRIGUES, L. C. G. (Ed.). **Manual de raiva e leptospirose**. Belo Horizonte: Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, 1998. 78 p.
- ALVES, C. J. **Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do estado da Paraíba, Brasil**. 1995. 102 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- ALVES, C. J.; VASCONCELOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MACEDO, N. A.; MORAIS, Z. M.; NÜRBERGER JUNIOR, R.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA NETO, J. S. Influência da estimulação inespecífica com a BCG sobre a susceptibilidade do hamster à infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorotipo Pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 2, p. 193-199, 1992.
- ANDERSON, L. Experimental reproduction of canine interstitial nephritis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 77, p. 413-418, 1967.
- ARZUMANYAN, ZH. R. Pathogenicity of a leptospire strain isolated in Armenia for different animals (rabbit, guinea, pig, hamster, mouse, lamb, young bell). **Zheernal Mikrobiologii Epidemiologii Immunobiologii**, v. 44, p. 151, 1967.
- BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BASKERVILE, A. Histopathological aspects of diagnosis of leptospirosis. In: ELLIS, W. A.; LITTLE, T. W. A. (Ed.). **The present state of leptospirosis diagnosis and control**. Northern Ireland, 1986, p. 33-34.

*De acordo com a NBR 6023.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1999. 380 p.

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

BEY, R. Immunogenicity of whole cell and outer envelope leptospiral vaccines in hamsters. **Infection and Immunity**, v. 10, n. 5, p. 1051-1056, 1954.

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

BLAHA, T. **Epidemiologia especial veterinária**. São Paulo: Acribia, 1995. 529 p.

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

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

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

BOQVIST, S.; MONTGOMERY, J. M.; HURST, M.; THU, H. T. V.; OLSSON, E.; ENGVALL, E.; GUNNARSSON, A.; MAGNUSSON, U. *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 361-368, 2003.

BÜRKI, F. Die Virulenz Von *Leptospira Pomona* – Strammen für den Syrischen Goldhamster. **Veterinär Medizin**, n. 9, p. 428-432, 1962.

BÜRKI, F. Zum Nachweis Von *Leptospira Milleis* des Goldhamster Tierversuchs-2 b1. **Bakt. I**, n. 178, p. 211-222, 1960.

BURNSTEIN, T.; BAKER, J. A. Leptospirosis in swine. **Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 53-64, 1954.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Manual de Leptospirose**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98 p.

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

BRITO, T. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. **Revista Internacional de Medicina Tropical**, v. 10, n. 4, p. 238-241, 1968.

BRUNNER, K. K. T. Notes on *Leptospira Canicola* in hamsters (*Mesocricetus auratus*): pathogenesis, treatment and immunity. **California Veterinary**, v. 1, p. 18-20, 1948.

CAMARGO, C. R. A. **Investigação sobre a presença da leptospirose em ovários de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona**. 1991. 31 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

CAMARGO, C. R. A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; NÜRMBERGER JÚNIOR, R.; HEINEMANN, M. B. Pesquisa de leptospiroses nos ovários, úteros e embriões de hamsters experimentalmente infectados e induzidos à condição de portadores renais, através do tratamento com o estolato de eritromicina. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 65, n.1, p. 75-80, 1998.

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

CORREA, M. O. A.; VERONESI, R.; BRITO, T.; HYAKUTAKE, S.; SANTA ROSA, C. A.; EDELWEISS, E. L. Leptospiroses. In: VERONESI, R. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 573-589.

CÔRTEZ, J. A. Aspectos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE. 3º, 1993, Rio de Janeiro, **Anais do III encontro nacional de leptospirose**, p. 53-57.

CRUZ, J. B.; Leptospirose nos animais. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 1. Salvador, 1986. **Anais**, p. 41-43.

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

COX, P. I.; TWIGG, G. I. Observations on kidney damage in hamsters following a non *icterohaemorrhagiae* form of disease resulting from infection by *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 91, p. 153-157, 1981.

DAHER, E. F.; BRUNETTA, D. M.; SILVA JÚNIOR, G. B.; PUSTER, R. A.; PATROCÍNIO, R. M. S. V. Pancreatic involvement in fatal human leptospirosis: clinical and histological features. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 307-313, 2003.

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

EZHKOVA, M. S.; KOTYLEV, O. A.; IONOVA, O. P.; SADYKOV, N. I.; SHOSSKIN, V. A. Morphological and ultrastructural changes in the organs of animals (guinea pig and hamsters) infected with leptospirosis. **Sbornik Nauchnykh Trudov, Kazinskii Veterinary Institut**, v. 5, n. 4, p. 50-54, 1983.

FAINE, S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1982. 171 p. (WHO off set publications, 67).

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

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

FIZETTE, W. B. Studies of the pathogenesis of acute infections caused by *Leptospira Pomona* in the hamster – **Dissertation Abstracts**, v. 17, p. 2118-2119, 1956.

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

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

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E. P.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.

GIORGI, W.; TERUYA, J. M.; MACRUZ, R.; GENOVEZ, M. E.; SILVA, A. S.; BORGIO, F. Leptospirose em eqüinos: inquérito sorológico e isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de feto abortado. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, n. 2, p. 47-53, 1981.

GONZALEZ, Y. H.; DÍAZ, E. M. F.; MATOS, B. O. Método para revitalizar las cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en los ensayos de potencia de la vacuna antileptospirosica. **Health I.G. News**. Buenos Aires, v. 3, n. 4, 1999. Disponível em: <<http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaxst-1/T-007.PDF>>. Acesso em: 12 nov 2007.

GOTTI, T. B. **Avaliação de três protocolos de associações antibióticas na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705)**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GUIMARÃES, M. C.; CÔRTEZ, J. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H. Epidemiologia e controle da leptospirose bovina: papel de portador e seu controle terapêutico. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 6/7, p. 21-34, 1982.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146, p. 1491-504, 2000.

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

HANSON, L. E. Leptospirosis in domestic animals: the public health perspective. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 12, p. 1505-1509, 1982.

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.

HANSON, M. A.; TRIPATHY, D. N. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Iowa State University Press, 1988. p. 237.

HATAWAY, S. C.; BLACKMORE, D. K.; MARSHALL, R. B. Leptospirosis in free-living species in New Zealand. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, p. 189-196, 1981.

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

HUHN, R. G. Immunity to leptospirosis: bacterins in dogs and hamsters. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 1, p. 71-74, 1975.

HÜTTNER, R. D.; PEREIRA, H. C. P.; TANAKA, R. M. Pneumonia por leptospirose. **Journal of Pneumology**, v. 28, n. 4, p. 229-232, 2002.

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

KAZAMI, A.; WATANABE, H.; HAYASHI, T.; KOBAYASHI, K.; OGAWA, Y.; YAMAMOTO, K.; ADACHI, Y. Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 8, p. 735-737, 2002.

KEE, S.; KIM, I.; CHOI, M.; CAANG, W. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.

KOLBER, M. **Emprego do Hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo biológico para a indução da condição de portador renal de leptospirosas**. 2006. 124 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LANGONI, L. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 1, p. 52-58, 1999.

LEPTOSPIRA MOLECULAR BIOLOGY HOME PAGE. **Leptospira strain list**, 2007.

Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Leptospira.html>>.

Acesso em: 18 nov. 2007.

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

LEONARD, F. C.; QUINN, P. J.; ELLIS, W. A. Association between cessation of leptospiuria in cattle and urinary antibody levels. **Research in Veterinary Science**, v. 55, p. 195, 1993.

MACEDO, N. A.; MORAIS, Z. M.; CAMARGO, C. R. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; NÜRMBERGER JÚNIOR, R.; VASCONCELLOS, S. A. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente

infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 194-200, 2004.

MAGAJEVSKI, F. **Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de *Leptospira interrogans* sorovar hardjo em sêmen e urina de touros (*Bos taurus*) sorologicamente reagentes.** 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2002.

MARCHIORI FILHO, M. **Indução do estado de portador renal e genital pela *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe, da via de inoculação e da vacinação.** 2007. 131f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARTINS, S. F.; CASTINEIRAS, T. M. P. **Leptospirose.** In: Centro de Informação em Saúde para viajantes (civis) Disponível em:// www.civis.ufrj.br/informacao/leptospirose/lepiv.html> Acesso em: 20 jan 2001.

MASCOLLI, R. **Inquérito sorológico para leptospirose, doença de Lyme e leishmaniose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo. Colheitas efetuadas durante a campanha de vacinação anti-rábica, no ano de 1999.** 2001. 140f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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

MILLER, N. G.; WILSON, R. B. Electron microscopic study of the relationship of *Leptospira Pomona* to the renal tubules of the hamster during acute and chronic leptospirosis. **American Journal of Veterinary**, n. 28, p. 225-235, 1967.

MCMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Straining methods: histologic and histochemical.** New York: Harper & Row, 1995. 423 p.

NARDI JÚNIOR, 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.

OLIVA, R.; INFANTE, J. F.; GONZÁLEZ, M.; PEREZ, P.; FARINÃS, M.; ESTÉVEZ, L.; PÉREZ, V.; SIERRA, G. Comparación clínico-patológica da La leptospirosis em hámsters sírio dorado y El curiel ducan hartley mediante La infeccción experimetal com tres serovares de *L. interrogans*. **VacciMonitor**, v. 7, n. 5, p. 8-14, 1998.

PASSOS, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; YASUDA, P. H.; NÜRMBERGER JUNIOR, R. Isolamento de leptospiiras a partir de tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospiras interrogans* sorotipo Pomona. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 25, p. 221-235, 1988.

PARMA, A. E.; FERNANDEZ, A. S.; SANTISTEBAN, C. G.; BOWDEN, R. A.; CERONE, S. I. Tears and aqueous humor from horses inoculated with *Leptospira* contain antibodies which bind to cornea. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 14, p. 181-185, 1987.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; LORETTI, A. P.; JÚNIOR, E. W.; FRANTZ, F. J.; DRIEMEIER, D. Aborto equino por *Leptospira* sp. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p.271-274, 2004.

PINTO, C. M.; VASCONCELLOS, S. A.; PINHEIRO, S. R.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A. Utilização do papel filtro para o transporte de amostras destinadas à reação de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico de Leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, n.2, p. 7-13, 1999.

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

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

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

REBHUN, W. C. **Disease of dairy cattle**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p. 625.

SALLES, R. S.; LILENBAUM, W. Leptospirose bovina no Brasil. **Revista CFMV**, Suplemento Técnico, Brasília, n. 21, 2000. Disponível em: <<http://www.cfmv.org.br/rev21/tecnico3.htm>>. Acesso em: 02 nov. 2007.

SANGER, V. L. *Leptospira pomona* infection in hamsters. **Cornell Veterinarian**, v. 28, p. 489-498, 1961.

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

SAPP, W. J.; SIDIQUE, I. H.; WILLIAMS, S. S.; GRAHAN, T. Histopathological evaluation of livers of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1283-1292, 1980.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CARDOSO, M. V.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; TEIXEIRA, S.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Detecção de agentes bacterianos pelas técnicas de isolamento e identificação e PCR – Multiplex em fetos bovinos abortados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 1, p. 23-27, 2004.

SEBASTIAN, E. Leptospirosis. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, n. 205, p. 1518-1523, 1994.

SEMENOVICH, V. N.; POLOTSKÜ, Y. E.; DAITER, A. B.; KLEINERMAN, A. S. Relationship between leptospiroses and the host during experimental leptospirosis in golden hamsters. **Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii**, n. 3, p. 76-82, 1988.

SCHWARTZ, D. A. Emerging and reemerging infections: progress and challenges in the subspecialty of infectious disease pathology. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 121, p. 776-784, 1997.

SHIMIZU, T.; MATSUSAKA, E.; NAGAKURA, N.; TAKAYANAGI, K.; MASUZAWA, T.; IWAMOTO, Y.; MORITA, T.; MIFUCHI, I.; YANAGIHARA, Y. Chemical properties of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strain Moulton. **Microbiology Immunology**, v. 31, n. 8, p. 717-25, 1987.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR., N. J. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 448 p.

SMYTHE, L.; SMITH, I. L.; SMITH, G. A.; DOHNT, M. F.; SYMONDS, M. L.; BARNET, L. J.; MCKAY, D. B. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospiras* spp. **BMC Infectious Diseases**, 2002. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13>. Acesso em: 30 maio 2005.

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

SULLIVAN, N. D. Further observations on *Leptospira hardjo* infection in pregnant cows. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 388-390, 1972.

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

SUNBUL, M.; ESEN, S.; LEBLEBICIOGLU, H.; HOKELEK, M.; PEKBAY, A.; EROGLU, C. *Rattus norvegicus* acting as reservoir of *Leptospira interrogans* in the Middle Black Sea Region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. **Scand Journal of Infected Disease**, n. 33, p. 896-898, 2001.

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. 265-268, 2002.

TAYLOR, P. L.; HANSON, L. E.; SIMON, J. Serological, pathologic and immunologic features of experimentally induced leptospiral nephritis in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 31, p. 1033, 1970.

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

THOME, S. M. G.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CAMARGO, C. R. A.; FERREIRA NETO, J. S. Influência da dosificação prolongada de organofosforado na resposta imune de hamsters vacinados com bacterina anti-leptospira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, n. 1, p. 433-448, 1998.

VAN DEN INGHT, T. S. G. A. M.; HARTMAN, E. G. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae* infection in the Syrian hamster. **Veterinary Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 367-376, 1986.

VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose. **Revista do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 29-32, 1997.

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

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

YUKAWA, M. Differential susceptibility of two stroks of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) to *Leptospira*. **Journal of Experimental Animal Science**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 1991.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663 p.

APÊNDICE A – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO I**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
I	30 leptospiras/campo	uma exposição	P-ESC	10

Data de inoculação: ✎ 25 de maio de 2007

Grupo I	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo								SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	
E S C A R I F I C A D O	1	O (01- Jun- 2007)	+	+	-	+	-	+			+				-
	2	O (01- Jun- 2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+			-
	3	O (01- Jun- 2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+			-
	4	O (01- Jun- 2007)	+	+	+	+	+	+							-
	5	O (01- Jun- 2007)	+	+	-	+	-	+							-
	6	O (02-Jun- 2007)	+	+	+	+	+								-
	7	O (02-Jun- 2007)	+	+	-	+	-	-	-	-					-
	8	O (02-Jun- 2007)	+	+	+	+	+								-
	9	O (02-Jun- 2007)	+	+	+	+	+								-
	10	O (03 -Jun- 2007)	+	+	-	+	-	-	-	-					-

APÊNDICE B – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO II**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
II	30 leptospiras/campo	uma exposição	P-N-ESC	10

Data de inoculação: 25 de maio de 2007

Grupo II	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo																SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				figado				rim				
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	s2	s3	s4	s2	s3	s4			
NÃO E S C A R I F I C A D O	1	O (04 -Jun- 2007)	+	+	-	+	-	-	-	-													-
	2	O (04 -Jun- 2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-										-
	3	S (15- Jun- 2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	+				-	-	-						-
	4	S (15- Jun- 2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	+				-	-	-						-
	5	S (15- Jun- 2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-										-
	6	S (15- Jun- 2007)	+	+	+	+																	-
	7	S (15- Jun- 2007)	+	+	+	-					-	-	-	-									-
	8	S (15- Jun- 2007)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-			-
	9	S (15- Jun- 2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						-
	10	S (15- Jun- 2007)	-	+	+	-					-	+			-	-	-						-

APÊNDICE C – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO III**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
III	30 leptospiras/campo	duas exposições	P-ESC	10

Datas de inoculação: ✍ primeira dose - 23 de maio de 2007
✍ segunda dose - 25 de maio de 2007

Grupo III	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo								SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	
E S C A R I F I C A D O	1	O (30 -Mai- 2007)	+	+	-	+	-	-	-	-					-
	2	O (30 -Mai- 2007)	+	+	+	+									-
	3	O (30 -Mai- 2007)	+	+	+	+									-
	4	O (30 -Mai- 2007)	+	+	+	+									-
	5	O (30 -Mai- 2007)	+	+	-	+	-	-	-	-					-
	6	O (30 -Mai- 2007)	+	+	+	+									-
	7	O (30 -Mai- 2007)	+	+	+	-					-	+			-
	8	O (30 -Mai- 2007)	+	+	+	+									-
	9	O (30 -Mai- 2007)	+	+	+	-					-	-	-	-	-
	10	O (30 -Mai- 2007)	+	+	+	+									-

APÊNDICE D – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO IV**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
IV	30 leptospiras/campo	duas exposições	P-N-ESC	10

Data de inoculação: primeira dose - 23 de maio de 2007
segunda dose - 25 de maio de 2007

Grupo IV	Animais	Óbito (O) ou sacrificio(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo																SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				fígado			rim					
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	s2	s3	s4	s2	s3	s4			
NÃO E S C A R I F I C A D O	1	O (02 -Jun- 2007)	+	+	-	+	-	-	-	-													-
	2	S (13 -Jun- 2007)	-	-	-	+	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	S (13 -Jun- 2007)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-		-	-
	4	S (13 -Jun- 2007)	-	+	-	+	-	-	-	-					+								-
	5	S (13 -Jun- 2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						-
	6	S (13 -Jun- 2007)	-	+	-	+	-	-	-	-					-	-	-						-
	7	S (13 -Jun- 2007)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	S (13 -Jun- 2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+			-	-	-				-	-	-
	9	S (13 -Jun- 2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+			+								-
	10	S (13 -Jun- 2007)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			-	-	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE E – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO V**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
V	30 leptospiras/campo	quatro exposições	P-ESC	10

Datas de inoculação: primeira dose - 23 de maio de 2007
segunda dose - 25 de maio de 2007
terceira dose - 27 de maio de 2007
quarta dose - 29 de maio de 2007

Grupo V	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo								SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	
E S C A R I F I C A D O	1	O (30 -Maio- 2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	O (30 -Maio- 2007)	+	+	+	+	+				+				-
	3	O (30 -Maio- 2007)	+	+	-	+	-	-	-	-	+				-
	4	O (30 -Maio- 2007)	+	+	+	+	+				+				-
	5	O (30 -Maio- 2007)	+	+	+	-	+				-	+			-
	6	O (31 -Maio- 2007)	+	+	-	+	-	-	-	-	+				-
	7	O (31 -Maio- 2007)	+	+	+	+	+	+	+		+				-
	8	O (31 -Maio- 2007)	+	+	-	-	-	-	+		-	-	-	-	-
	9	O (31 -Maio- 2007)	+	+	-	-	-	+	+		-	-	-	-	-
	10	O (31 -Maio- 2007)	+	+	-	-	-	+	+		-	-	-	-	-

APÊNDICE F – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO VI**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
VI	30 leptospiras/campo	quatro exposições	P-ESC	10

Datas de inoculação: primeira dose - 23 de maio de 2007
segunda dose - 25 de maio de 2007
terceira dose - 27 de maio de 2007
quarta dose - 29 de maio de 2007

Grupo VI	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo																SAM	
			F	R	G	C	genital				cérebro				fígado				rim					
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	s2	s3	s4	s2	s3	s4				
NÃO E S C A R I F I C A D O	1	O (03 –Jun- 2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+												-
	2	O (06 -Jun- 2007)	+	+	+	+																		-
	3	S (13 -Jun- 2007)	-	+	-	+	-	-	-	-					-	-	-							-
	4	S (13 -Jun- 2007)	-	+	-	+	-	-	-	-					-	-	-							-
	5	S (13 -Jun- 2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							-
	6	S (13 -Jun- 2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										-
	7	S (13 -Jun- 2007)	+	+	-	+	-	-	-	-														-
	8	S (13 -Jun- 2007)	-	+	-	+	-	-	-	-					-	-	-							-
	9	S (13 -Jun- 2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							-
	10	S (13 -Jun- 2007)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE G – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO VII**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
VII	100 leptospiras/campo	uma exposição	P-ESC	10

Data de inoculação: 27 de maio de 2007

Grupo VII	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo								SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	
E S C A R I F I C A D O	1	O (02-Jun-2007)	+	+	-	+	-	-	-	-	+				-
	2	O (02-Jun-2007)	+	+	+	+	+	+			+				-
	3	O (02-Jun-2007)	+	+	+	+	+	+			+				-
	4	O (02-Jun-2007)	+	+	-	+	-	-	-	-	+				-
	5	O (03-Jun-2007)	+	+	-	+	-	+			+				-
	6	O (03-Jun-2007)	+	+	-	+	-	-	-	-	+				-
	7	O (03-Jun-2007)	+	+	+	-	+				-	-	-	-	-
	8	O (03-Jun-2007)	+	+	-	+	-	-	-	-	+				-
	9	O (03-Jun-2007)	+	+	+	-	+				-	+			-
	10	O (03-Jun-2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+			-

APÊNDICE H – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO VIII**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
VIII	100 leptospiras/campo	uma exposição	P-N-ESC	10

Data de inoculação: 27 de maio de 2007

Grupo VIII	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo																SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				fígado			rim					
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	s2	s3	s4	s2	s3	s4			
NÃO E S C A R I F I C A D O	1	O (03 -Jun- 2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+			-	-	-				-		
	2 *	O (10 -Jun- 2007)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	3	S (18- Jun- 2007)	-	-	+	+									-	-	-	-	-	-	-		
	4	S (18- Jun- 2007)	+	-	-	+	-	-	-	-								-	-	-	-		
	5	S (18- Jun- 2007)	-	-	-	+	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-		
	6	S (18- Jun- 2007)	-	+	-	+	+								-	-	-				-		
	7	S (18- Jun- 2007)	-	+	-	+	+														-		
	8	S (18- Jun- 2007)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-		
	9	S (18- Jun- 2007)	+	-	+	-					-	-	-	-				-	-	-	-		
	10	S (18- Jun- 2007)	+	-	+	+												-	-	-	-		

* animal descartado

APÊNDICE I – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO IX**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
IX	100 leptospiras/campo	duas exposições	P-ESC	10

Data de inoculação: ✎ primeira dose - 23 de maio de 2007
✎ ✎ segunda dose - 25 de maio de 2007

Grupo IX	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo												SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				fígado				
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	s2	s3	s4		
E S C A R I F I C A D O	1	O (29 -Mai-2007)	+	+	+	+												-	
	2	O (29 -Mai-2007)	+	+	+	+												-	
	3	O (29 -Mai-2007)	+	+	+	+												-	
	4	O (29 -Mai-2007)	+	+	+	+												-	
	5	O (30 -Mai-2007)	+	+	-	+	-	-	-	-								-	
	6	O (30 -Mai-2007)	+	+	-	+	-	-	-	-								-	
	7	O (30 -Mai-2007)	+	+	-	+	-	+	+									-	
	8	O (31 -Mai-2007)	+	+	+	+												-	
	9	O (31 -Mai-2007)	+	+	+	-					-	+						-	
	10	S (13 -Jun-2007)	-	+	+	+									-	-	-	-	

APÊNDICE J – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO X**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
X	100 leptospiras/campo	duas exposições	P-N-ESC	10

Data de inoculação: ✍ primeira dose - 23 de maio de 2007
✍ ✍ segunda dose - 25 de maio de 2007

Grupo X	Animais	Óbito (O) ou sacrificio(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo												SAM				
			F	R	G	C	genital				cérebro				fígado					Rim			
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	s2	s3	s4	s2		s3	s4		
NÃO E S C A R I F I C A D O	1	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	+	-	-	-	-	+				-	-	-				-		
	2	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-		
	3	S (13 -Jun-2007)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	4	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+						-		
	5	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-		
	6	S (13 -Jun-2007)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P (C e LO4 200)		
	7	S (13 -Jun-2007)	-	-	+	-	+				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	8	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-		
	9	S (13 -Jun-2007)	-	+	+	+	+				+				-	-	-				-		
	10	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-		

P: positivo

C: *Leptospira* spp. sorovar Canicola

LO4: *Leptospira* spp. sorovar LO4

APÊNDICE L – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO XI**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
XI	100 leptospiiras/campo	quatro exposições	P-ESC	10

Datas de inoculação: primeira dose - 23 de maio de 2007
segunda dose - 25 de maio de 2007
terceira dose - 27 de maio de 2007
quarta dose - 29 de maio de 2007

Grupo XI	Animais	Óbito (O) ou sacrificio(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo								SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	
E S C A R I F I C A D O	1	O (29 -Maio-2007)	+	+	+	+									-
	2	O (30 -Maio-2007)	+	+	+	+									-
	3	O (30 -Maio-2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	O (30 -Maio-2007)	+	+	+	-					-	-	-	-	-
	5	O (30 -Maio-2007)	+	+	+	+									-
	6	O (30 -Maio-2007)	+	+	-	+	-	-	-	-					-
	7	O (30 -Maio-2007)	+	+	-	+	-	+							-
	8	O (31 -Maio-2007)	+	+	-	+	-	+							-
	9	O (31 -Maio-2007)	+	+	+	+									-
	10	O (31 -Maio-2007)	+	+	+	+									-

APÊNDICE M – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica do **GRUPO XII**.

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Nº de exposições	Via de inoculação	Nº de animais
XII	100 leptospiras/campo	quatro exposições	P-N-ESC	10

Datas de inoculação: primeira dose - 23 de maio de 2007
segunda dose - 25 de maio de 2007
terceira dose - 27 de maio de 2007
quarta dose - 29 de maio de 2007

Grupo XII	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta				Cultivo																SAM
			F	R	G	C	genital				cérebro				fígado				rim				
							s1	s2	s3	s4	s1	s2	s3	s4	s2	s3	s4	s2	s3	s4			
NÃO E S C A R I F I C A D O	1	O (02 –Jun-2007)	+	+	+	+																	-
	2	O (04 -Jun-2007)	+	+	+	+																	-
	3*	O (09 –Jun-2007)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
	4*	O (09 -Jun-2007)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
	5	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	+	-	-	-	-					-	-	-						-
	6	S (13 -Jun-2007)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-									-
	7	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						-
	8	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						-
	9	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						-
	10	S (13 -Jun-2007)	-	+	-	-	-	+			-	-	-	-	-	-	-						-

* animais descartado

APÊNDICE N – Dados da Microscopia direta, cultivo bacteriológico e Soroaglutinação Microscópica dos **CONTROLES**

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Via de inoculação	Nº de animais
Controle 1	30 leptospiplas/campo	Intraperitoneal	10

Data de inoculação: ✍ 25 de maio de 2007

Grupo Controle 1	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta			
			F	R	G	C
I P	1	O (29 –Mai-2007)	+	+	+	+
	2	O (29 –Mai-2007)	+	+	+	+
	3	O (29 –Mai-2007)	+	+	+	+
	4	O (02 –Jun-2007)	+	+	+	+
	5	S (13 –Jun-2007)	+	+	+	-

Grupo	Concentração do inóculo infectante	Via de inoculação	Nº de animais
Controle 2	100 leptospiplas/campo	Intraperitoneal	10

Data de inoculação: ✍ 25 de maio de 2007

Grupo Controle 2	Animais	Óbito (O) ou sacrifício(S) (data)	Microscopia direta			
			F	R	G	C
I P	1	O (28 –Mai-2007)	+	+	+	+
	2	O (28 –Mai-2007)	+	+	+	+
	3	O (28 –Mai-2007)	+	+	+	+
	4	O (28 –Mai-2007)	+	+	+	+
	5	O (30 –Mai-2007)	+	+	+	-