

MARIA CARMEN DE REZENDE COSTA

**AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CRUZADA
ENTRE LEPTOSPIRAS *hardjo* E *wolffi***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina
Veterinária.

Área: Medicina Veterinária
Preventiva.

Orientador: Prof. Élvio Carlos
Moreira

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1996

C837a Costa, Maria Carmen de Rezende, 1966 -
Avaliação da imunidade cruzada entre
leptospiras *hardjo* e *wolffi*. Maria
Carmen de Rezende Costa. - Belo
Horizonte: UFMG - Escola de
Veterinária, 1966.

80p.: il.

Dissertação (Mestrado)

1- Leptospira - Controle - Teses. 2-
Leptospirose - Vacina - Modelo
animal - Teses. I. Título.

CDD.636.089 692

Dissertação defendida e aprovada em 29/02/1996 pela Comissão Examinadora, constituída por:



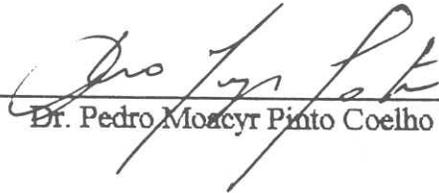
Prof. Elvio Carlos Moreira (Orientador)



Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota



Dr. Francisco Baptista

Ao Papai (José Oswaldo) e à Mamãe (Áurea),
que, com seus exemplos, têm me ensinado
muito além do que os livros podem ensinar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Élvio pela oportunidade que me proporcionou de acompanhar seu trabalho, orientando-me desde a Iniciação Científica até hoje, no Mestrado, sempre com muita sabedoria, competência, amizade, conhecimento e confiança.

Aos Professores Rômulo e Nelson pelo ânimo, estímulo, correções e sugestões enriquecedoras.

Ao Antônio Benjamin (Toninho), que contribuiu em cada etapa desse trabalho sempre com muito empenho, competência e amizade.

À Márcia e ao Carlos, do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que, com seriedade e pontualismo, reproduziram e criaram os hamsters para a realização desse experimento.

À amiga Marilene, Prof. Girão, Silvana e Roberto que, com seus trabalhos, contribuíram enormemente nas técnicas e estudos histopatológicos.

Ao André pelo entusiasmo e profissionalismo na realização das fotografias e "slides".

À Francesca pelo coleguismo e ajuda nos cálculos da DI 50.

À Nádia que estava sempre pronta para ajudar no computador.

Ao apoio da CAPES e DMVP da Escola de Veterinária da UFMG que, através da concessão de auxílio financeiro, equipamentos e laboratórios, viabilizaram a execução desta pesquisa.

Ao Prof. Ivan pelas “dicas” e sugestões estatísticas.

À Cláudia, Sandra, Nilda e Fátima que, sem burocracia, sempre me ajudaram a resolver a parte burocrática!

Aos meus colegas Maria Helena, Simone, Apolo, Kit, Nery, Marieta, Clara, Orlando, Anapolino, Anna Christina, Marcelo Resende (*in memorian*), Marília, Cláudio, Patrícia Macedo, Marcelo, Clóvis, Paula, Denise, Isabela, Maurílio, Patrícia, Marcos e Sharon pela alegre e divertida convivência, que tornaram os dias de trabalho muito mais agradáveis!

Ao meu namorado e marido, Rodrigo, por sua ajuda, paciência, dedicação e companheirismo.

Aos meus queridos irmãos, Lelena, Beбето, Nanato, Vadinho e Fael, que estão sempre por perto apoiando e fortalecendo nossa família.

À Deus, que colocou todos em meu caminho e, sem Ele, nada teria sido possível!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 LITERATURA CONSULTADA	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Vacinas	30
3.2 Antígenos	30
3.3 Características e manutenção dos animais	31
3.4 Grupos experimentais	32
3.5 Obtenção da amostra-desafio	32
3.6 Vacinação e desafio dos hamsters	35
3.7 Análise da proteção conferida pelas vacinas	35
4 RESULTADOS	39
4.1 Titulação da amostra-desafio	39
4.2 Cálculo da DI 50	44
4.3 Proteção conferida pelas vacinas	45
5 DISCUSSÃO	60

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Tipo e frequência (%) de sinais clínicos nos hamsters inoculados para a titulação da amostra-desafio de *hardjo*.....42
- FIGURA 2 Corte histológico de fígado de hamster inoculado com *hardjo*.....49
- FIGURA 3 Corte histológico de pulmão de hamster inoculado com *hardjo*.....53
- FIGURA 4 Corte histológico de fígado de hamster inoculado com *hardjo*.....55

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Titulação da amostra-desafio: Frequência (%) de hamsters com sinais clínicos inoculados com *hardjo*.....40
- TABELA 2 Tipo e frequência de sinais clínicos nos hamsters inoculados para a titulação da amostra-desafio de *hardjo*.....41
- TABELA 3 Frequência de *hardjo* em meios de cultura contendo órgãos de hamsters inoculados para titulação da amostra-desafio.....43
- TABELA 4 Determinação da DI 50 de amostra de *hardjo* ativada, inoculada por via intraperitoneal, em cinco grupos de seis hamsters adultos.....44
- TABELA 5 Hamsters positivos de acordo com a presença de *hardjo* nos tecidos hepático, renal e/ou pulmonar - método de coloração pela prata.....47
- TABELA 6 Número de hamsters positivos à *hardjo*, de acordo com as lesões histopatológicas em fígado, rins e pulmão - coloração pela hematoxilina-eosina.....57
- TABELA 7 Hamsters com títulos para *hardjo* e/ou *wolffi*, de acordo com o método de Microaglutinação Rápida....58

TABELA 8 Taxa de proteção em hamsters vacinados com *hardjo*
ou *wolffi* e desafiados com *hardjo*.....59

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se a imunidade cruzada entre as leptospiros *hardjo* e *wolffi*, em quatro grupos de hamsters adultos e sadios. O primeiro e o segundo grupos foram constituídos por hamsters vacinados, respectivamente, com *hardjo* e *wolffi*. Os outros grupos foram os controles: um positivo e outro negativo. Com exceção do grupo controle negativo, todos os animais receberam um desafio 18 dias após a vacinação. Esse inóculo-desafio constituiu-se de 100 vezes a dose infectante 50 (DI 50) de *hardjo* previamente ativada através de uma série de passagens em hamsters. A proteção conferida pelas vacinas foi avaliada através de pesquisa direta de leptospiros (pelos métodos de cultura de macerado de órgãos em meios de Fletcher e EMJH modificado e histopatologia com coloração pela prata: Warthin-Starry) e pesquisa indireta de leptospiros (avaliação de sinais clínicos e estudo histopatológico de fígado, rim e pulmão pela coloração hematoxilina-eosina dos cortes histológicos). O título sorológico dos hamsters foi avaliado pela Microaglutinação Rápida em Placas. Os resultados revelaram que a vacinação dos hamsters tanto com *hardjo* quanto com *wolffi* conferiram imunidade frente ao desafio com *hardjo*.

Palavras-chave: *Leptospira hardjo*, vacina, hamster.

1 INTRODUÇÃO

As leptospiroses são consideradas de importância econômica nas explorações pecuárias e possuem também implicações na saúde pública. São zoonoses que infectam a maioria dos mamíferos e estão distribuídas mundialmente. No homem, caracteriza-se por ser doença grave, atingindo, geralmente, indivíduos que trabalham com animais, em serviços de água e esgotos, arrozais, plantações de cana-de-açúcar e laboratórios.

Nos bovinos, as leptospiroses podem causar enormes perdas econômicas devido a abortos, natimortos, nascimentos prematuros e/ou de bezerros fracos, repetições de cio, queda na produção de leite, mamite, sub-fertilidade ou até mesmo infertilidade (Ellis, 1984; Bolin et al., 1989). Os animais infectados são capazes de eliminar leptospiras pela urina durante vários meses e, possivelmente, por vários anos depois da infecção, atuando como portadores e transmissores do microrganismo para outros animais ou para o homem (Ruíz et al., 1991).

As lesões atribuídas às leptospiroses são comparáveis tanto no homem, quanto nos animais domésticos e de laboratório, principalmente hamsters (Ingh & Hartman, 1986).

Todas as perdas pelas leptospiroses podem ser causadas por qualquer uma das cerca de 200 sorovarietades existentes, pertencentes aos 26 sorogrupos reconhecidos da espécie *Leptospira interrogans* (Ellis, 1984 e 1986). Teoricamente, quaisquer dessas sorovarietades podem estar presentes numa região, infectando qualquer espécie animal; contudo, na prática, somente poucos

"serovars" tornam-se endêmicos em determinado país ou região e a transmissão direta é, provavelmente, de maior importância (Ellis, 1984). Além disso, cada sorovarietade possui a tendência de se manter em hospedeiros específicos (Blackmore & Schollum, 1980; Thiermann, 1984; Hanson, 1986). Esse fato é visto com a sorovarietade *hardjo*, a qual tem se mostrado adaptada e mantida em bovinos de várias partes do mundo (Ellis, 1986; Hanson, 1986).

A *Leptospira hardjo* tem sido apontada como a mais prevalente e patogênica entre os bovinos. Atualmente, é conhecida pela abreviatura *hardjo*, com amostra de referência Hardjoprajitno-OMS.

Além da *hardjo*, a sorovarietade *wolffi* também tem se destacado entre os bovinos pela sua alta frequência em inquéritos sorológicos.

De acordo com Madruga et al. (1980), as reações cruzadas são muito comuns entre algumas sorovarietades do mesmo sorogrupo. Resultados encontrados em sorologias de trabalhos experimentais mostram a existência de reações cruzadas de aglutinação entre duas sorovarietades diferentes em soros de animais que tenham sido infectados com apenas um "serovar".

As reações cruzadas entre *hardjo* e *wolffi* são muito comuns devido às relações antigênicas existentes entre ambas. Essas relações antigênicas tornam possível a utilização de um critério para classificar as leptospiros em sorogrupos. No caso de *hardjo* e *wolffi*, elas estão classificadas dentro do sorogrupo SEJROE.

A comprovação da existência de *hardjo* nos bovinos de Minas Gerais, conforme Moreira et al. (1978), dependia apenas da intensidade de busca nos rebanhos com suspeita de leptospirose. Essa hipótese foi confirmada por Morais (1994), quando isolou-se e tipificou-se, pela primeira vez no Brasil, a *hardjo*, genótipo *Hardjoprajitno*. Esse fato sugeriu que a maioria das reações

sorológicas para as outras sorovariedades do sorogrupo SEJROE fossem apenas reações antigênicas cruzadas.

Tendo em vista todas as perdas que podem advir de uma infecção por leptospirosas, a imunização artificial tornou-se amplamente utilizada como método de controle das leptospiroses em animais. Tem sido provado que as vacinas são muito efetivas no controle dessa doença na maioria dos países (Venugopal & Ratnam, 1991).

De acordo com Ruíz et al. (1991), a imunização com bacterinas é o método primário no controle das leptospiroses bovinas, desde que contenham as sorovariedades específicas da região.

Entretanto, a *hardjo* tem sido apontada como sendo pouco imunogênica, uma vez que, à prova sorológica, produz baixo título de anticorpos aglutinantes, além desses anticorpos durarem menos tempo que aqueles produzidos por outras sorovariedades (Bolin et al., 1989; Siddique & Shah, 1990; Bolin et al., 1991).

A identificação das leptospirosas que infectam um rebanho, torna possível o desenvolvimento de uma vacina específica. Contudo, existe a dificuldade de se identificar com precisão o(s) agente(s) causador(es) da doença devido ao alto grau de reações cruzadas entre as leptospirosas (Le Febvre, 1987). Por causa dessas reações cruzadas, Siddique & Shah (1990) relatam que mais sorovariedades do antígeno acabam sendo incorporadas à vacina. Essas vacinas polivalentes, por sua vez, também determinam reações cruzadas nos animais levando à ausência de títulos uniformes entre as sorovariedades.

O presente estudo pretende avaliar a existência de imunidade cruzada entre as sorovariedades *hardjo* e *wolffi* empregando-se um método *in vivo* recomendado pelo United States Department of Agriculture (1976), o qual utiliza hamsters em um esquema de vacinação-desafio, a fim de se determinar a potência de bacterinas

contendo *Leptospira interrogans*. Esse teste foi adotado por apresentar correlação entre o grau de proteção conferida entre hamsters e bovinos, desde que sejam feitos os devidos ajustes na dosagem da vacina a ser usada nas duas diferentes espécies.

Considerando-se os vários trabalhos já realizados, sabe-se que existem reações cruzadas devido às relações antigênicas entre ambas e que a *hardjo* é pouco imunogênica, produzindo baixos títulos de anticorpos que duram pouco tempo. Com a imunidade cruzada, há a possibilidade de menos sorovarietades serem incorporadas à vacina, o que possibilitará menor custo de produção e evitará títulos desuniformes nos animais vacinados.

2 LITERATURA CONSULTADA

York, em 1957, recomendava a prevenção e o controle das leptospiroses nos animais domésticos baseados em medidas higiênicas e a combinação dessas medidas com a vacinação. Essa vacinação era indicada para grupos humanos e animais com potencial de risco para infecção.

A leptospirose em bovinos foi detectada pela primeira vez no Brasil em 1957, em São Paulo, por Freitas et al., quando isolaram *pomona* de um feto abortado.

Lacerda et al. (1960) apresentaram dados sorológicos, anátomo-patológicos e bacteriológicos que confirmaram a sorovariedade *pomona* no conjunto etiológico das leptospiroses no Brasil.

Roth & Galton (1960), nos Estados Unidos, realizaram o primeiro isolamento de *hardjo* em bovinos. Até então, *pomona* era considerado o principal agente etiológico das leptospiroses no país.

Em Minas Gerais, a primeira referência foi feita em 1962 por Barbosa, que, através de sorologia em bovinos, identificou *pomona* como a sorovariedade mais prevalente.

Santa Rosa et al. (1969/70), em levantamento sorológico de bovinos, no período de 1960 a 1968, observaram prevalência de 23,6% de reações positivas, com predomínio do sorotipo *wolffi*.

Sullivan & Stallman, em 1969, na Austrália, investigaram sorologicamente um rebanho e encontraram uma novilha negativa

frente a *hyos* e *pomona* eliminando grande quantidade de leptospiras na urina. No teste sorológico contra *hardjo*, ela apresentou título de 1:30.000. Os pesquisadores conseguiram isolar *hardjo* da urina deste animal. Foi o primeiro isolamento dessa sorovariedade na Austrália e os autores consideraram que o baixo número de isolamentos em relação ao número de tentativas, deveu-se à sensibilidade e exigência da *hardjo* quanto à sua manutenção em laboratório. Em exames sorológicos subsequentes, o rebanho, em geral, apresentou alta prevalência de aglutininas contra *hardjo*.

Hanson et al. (1972) relatam que as bacterinas têm sido utilizadas no controle das leptospiroses em bovinos e suínos para reduzir perdas financeiras e para proteção de humanos que têm contato com esses animais. Eles verificaram que as taxas de bovinos reagentes reduzem a zero após nove anos de vacinação contra *pomona*. Situação similar foi observada em bovinos de rebanhos vacinados contra *hardjo*, a partir de três meses de idade.

Em 1972, em São Manuel, São Paulo, Corrêa et al. fizeram inquérito sorológico para brucelose e leptospirose e encontraram 53% das granjas leiteiras positivas para leptospirose, sendo *wolffi* a sorovariedade mais prevalente.

Teruya et al. (1974) examinaram soros de várias espécies animais, provindos de diversos estados do Brasil. Os resultados mostraram maior prevalência de *wolffi* (15,42%) entre os bovinos.

No Rio Grande do Sul, Williams et al. (1975) avaliaram clínica e sorologicamente 63 bovinos de uma propriedade onde ocorreram 22 abortos. Entre os animais que abortaram, 17 apresentaram sorologia positiva, com maior prevalência para *sejroe*, seguida de *wolffi*, *hardjo* e *pomona*.

Myers & Jelambi (1975) estudaram a prevalência da leptospirose em bovinos na Argentina. Coletou-se 1857 amostras sanguíneas e a

sorologia mostrou aglutininas anti-leptospiras em 59,1% dos soros examinados. A maior prevalência foi para *hardjo* (45,8%), com títulos variando entre 1:100 e 1:25.600.

Tripathy et al. (1976) consideraram a vacinação com bacterinas de leptospiras como o método mais efetivo no controle de rebanhos suscetíveis, desde que fossem específicas contra as sorovariedades prevalentes na área. Nos Estados Unidos, recomendavam bacterinas multivalentes contendo *grippothyphosa*, *hardjo* e *pomona* por serem usualmente as mais isoladas em bovinos nesse país.

Em 1978, Vaz & Oliveira, no Rio Grande do Sul, pesquisaram aglutininas anti-leptospiras em 71 touros usados em inseminação artificial e detectaram 38 animais soropositivos. Os títulos encontrados variaram entre 1:100 e 1:3.200, sendo *sejroe* e *wolffi* as sorovariedades predominantes.

Ávila et al. (1978) testaram, através da microaglutinação rápida, soros de 474 bovinos para leptospirose, em Jaboticabal, São Paulo. Encontraram 130 animais (27,4%) positivos para uma ou mais sorovariedades, sendo a maior prevalência para *wolffi* (60,7%).

Em Minas Gerais, Moreira et al. (1979) verificaram que 811 bovinos (14,05%) de um total de 5563 testados por microaglutinação rápida, foram positivos à sorologia frente *hardjo*. Eles concluíram ser muito provável a existência dessa sorovariedade nesse estado e no Brasil.

Madruga et al. (1980) realizaram levantamento sorológico em 670 bovinos de 62 propriedades distribuídas em nove municípios da região do cerrado no sul do estado do Mato Grosso. A frequência de anticorpos anti-leptospiras foi de 74,3%, sendo *hardjo* (41%), *sejroe* (40%) e *wolffi* (30%) as sorovariedades mais encontradas.

Oliveira et al.(1980) realizaram levantamento sorológico em rebanho bovino com problemas reprodutivos no Rio Grande do Sul. Encontraram títulos variando de 1:50 a 1:3.200 para *hardjo* e de 1:400 a 1:800 para *wolffi*. Com amostra de sangue de um animal soropositivo, realizaram isolamento de *Leptospira* pertencente ao sorogrupo Hebdomadis. De acordo com os autores, a baixa porcentagem de isolamentos neste trabalho confirma a exigência da *hardjo* quanto ao crescimento em meios de cultura.

Na Colômbia, Aycardi et al. (1980) isolaram, pela primeira vez no país, *hardjo* de bovinos com baixos títulos sorológicos (1:100 a 1:200). Os autores confirmam a evidência sorológica de que *hardjo* é o mais importante agente causador das leptospiroses em gado de corte criado extensivamente naquela região e que as reações observadas com outras sorovariedades são devido, provavelmente, às relações antigênicas existentes dentro do sorogrupo.

Giorgi et al. (1981), durante sete anos, examinaram contra leptospirose 100.080 soros pertencentes a várias espécies de animais e de diversos estados do Brasil. À microaglutinação lenta, mais de 50% dos soros bovinos foram positivos para *wolffi*. Eles observaram que das várias regiões onde foi constatada esta sorovariedade, não havia qualquer sinal clínico da doença, estando os animais aparentemente normais. Tanto neste, quanto em outros trabalhos de levantamento sorológico citados anteriormente, nos quais *wolffi* foi mais prevalente, não houve inclusão da *hardjo* na bateria de antígenos utilizada. A alta prevalência de *wolffi* nesses inquéritos, de acordo com Madruga et al. (1980), são devido, provavelmente, a reações cruzadas.

Vários autores (Aycardi et al., 1980; Ellis et al., 1981; Ellis et al., 1982; Thiermann, 1982 e 1983) relataram que *hardjo* tem sido frequentemente isolada de animais soronegativos ou com títulos aglutinantes muito baixos.

De acordo com Ellis et al. (1981), os levantamentos sorológicos são boa medida para avaliação da doença no rebanho. O diagnóstico conclusivo necessita do isolamento do agente, já que a relação entre o estado de portador e a presença de soroaglutininas é baixa, principalmente no caso de infecção pela *hardjo*.

Para isolamento de leptospiras de urina ou tecidos animal, Faine (1982) cita que deve-se utilizar animais de laboratório, sendo o mais indicado o hamster. Os hamsters são, também, os animais de escolha para testes de patogenicidade e para manutenção de virulência das leptospiras (Faine, 1982).

Thiermann (1982 e 1983) e Ellis (1986) apontam que a *hardjo* tem sido reconhecida em todo o mundo como a *Leptospira* mais prevalente e bem adaptada aos bovinos. Entretanto, produz títulos aglutinantes frequentemente baixos ou indetectáveis nos animais infectados. Essa sorovariedade tem causado aborto, nascimentos prematuros, infertilidade e mamite ou agalaccia em bovinos. Na infecção crônica, não se observa doença clínica, mas os animais permanecem eliminando leptospiras pela urina por longos períodos.

Em 1982, Aycardi et al. relataram a ocorrência de aglutininas anti-*wolffi* em bovinos inoculados com amostra pura de *hardjo*. O mesmo fato foi observado por Girio & Mathias (1988) que, além da sorologia positiva para *wolffi* nos cobaios inoculados com *hardjo*, obteve aglutininas para *hardjo* em animais inoculados com *wolffi*. Essas reações cruzadas entre as duas sorovariedades apresentaram títulos elevados.

Ribeiro (1983), numa fazenda de gado de corte de Minas Gerais, observou, entre os 53,3% de bovinos com aglutininas anti-leptospiras, maior prevalência para a sorovariedade *hardjo* (31,7%).

Hathaway & Little (1983) realizaram estudo para identificar *hardjo* como causa primária de abortos em bovinos. Concluíram que os

aspectos mais relevantes foram: a constatação dos susceptíveis se tornarem infectados após período longo de exposição aos adultos com leptospirúria; a alta prevalência da doença clínica nas vacas infectadas; a confirmação do diagnóstico laboratorial incriminando *hardjo* como agente etiológico primário dos abortos e a presença de títulos relativamente baixos à *hardjo* nesses animais com infecção aguda.

Thiermann & Garrett (1983) isolaram *hardjo* de seis bovinos, sendo que três deles foram negativos à sorologia ou apresentaram títulos menores que 1:100 à microaglutinação com essa sorovariedade.

Broughton et al. (1984), citam que além dos prejuízos causados pela *hardjo* nos bovinos, a infecção humana também tem sido um problema. A incidência da leptospirose no homem que lida com gado reflete a situação da doença nos bovinos. Eles relatam a importância da vacinação bovina, citando que 12 meses após o início desta, a infecção humana por *hardjo* foi significativamente reduzida.

As vacinas são comumente testadas *in vivo*, usando-se, com frequência, hamsters dourados, os quais são altamente susceptíveis às infecções pelas leptospirosas. Além dessa susceptibilidade à doença, Fox et al. (1984) citam que a preferência de uso de hamsters em testes de vacinas é devido também à facilidade de reprodução desses animais, que possuem pequeno período de gestação, são muito prolíficos, com desenvolvimento e ciclo de vida rápidos, apresentando características fisiológicas e anatômicas com grande potencial para estudo.

Ellis (1984) revisando trabalhos de prevalência, patogênese e controle das leptospiroses em bovinos nos trópicos, registrou que a vacinação anual é recomendada para rebanhos fechados e rebanhos abertos devem ser revacinados a cada seis meses. Em casos clínicos, a vacina deve ser administrada juntamente com antibioticoterapia. O

autor sugere que as linhas de investigação devem receber apoio nacional para identificar as sorovarietades que afetam os animais produtores de alimentos, conduzir estudos de laboratórios e epidemiológicos para avaliar as perdas econômicas em rebanhos infectados, e os efeitos da vacinação com bacterinas adequadas.

Abuchaim & Dutra (1985), na bacia leiteira de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, fizeram levantamento sorológico para leptospirose e concluíram que a doença está presente nesta área, numa prevalência de 49,8%, sendo a *hardjo* a mais prevalente.

Em 1985, Ellis et al. citam a frequência de relatos sobre bovinos portadores renais que espalham *hardjo* no ambiente, através da urina. Contudo, essa sorovarietade foi isolada de descargas vaginais, indicando que esta poderia ser uma fonte de infecção para outros bovinos, como o touro em monta natural, e para aqueles que lidam com o gado, como veterinários e vaqueiros.

Kingscote (1985) relata a dificuldade do crescimento de *hardjo* em meios de cultura, não só em material de isolamento, mas também em repiques comuns de uma cultura positiva para um meio novo.

Em 1986, Ellis recomendou a vacinação como método mais prático para controlar *hardjo*, pois previne e reduz a infecção nos bovinos susceptíveis. O controle permanente deve ser baseado na vacinação de todos os bovinos acima de seis meses de idade, com duas doses de vacina em intervalo de um mês e revacinação anual.

Hanson & Tripathy (1986) citam que, embora a proteção conferida pelas bacterinas seja primordialmente específica para cada sorovarietade, pode ser que exista alguma proteção cruzada entre sorovarietades de um mesmo sorogrupo.

No Chile, Zamora et al. (1988) fizeram exames sorológicos e bacteriológicos para leptospirose em 82 bovinos, aparentemente

sadios, que foram abatidos. À sorologia, 43,9% dos animais foram positivos, sendo *hardjo* mais prevalente (72,2%). Na bacteriologia, isolaram *hardjo* dos rins de dois animais, sendo que um deles tinha mostrado título de 1:100 e o outro apresentou resultado negativo.

Miller et al. (1991) isolaram *hardjo* de rins de bovinos abatidos em 49 estados dos E.U.A. e Porto Rico. Eles relataram que a sorologia apresentada frente *wolffi*, nesses animais, deve-se, provavelmente, às estreitas relações antigênicas entre as duas sorovariedades, as quais determinam reações cruzadas entre ambas.

Little et al. (1992) trabalharam três estratégias com o objetivo de controlar infecção por *hardjo* em gado de corte na Escócia: promoveram mudanças de manejo, antibioticoterapia e vacinação. Os autores consideraram a vacinação como o único meio de controle e possível erradicação da doença. As características epidemiológicas da infecção mostraram que o programa de vacinação deve ser aplicado em todo o rebanho por um período de cinco anos.

De acordo com Jubb et al. (1993), a incidência da infecção por leptospirosas é usualmente maior que a incidência da doença clínica e, em relação à morbidade, a mortalidade é bem menor na leptospirose. Animais com infecção subclínica e aqueles que se recuperaram da doença continuam excretando o agente, principalmente pela urina, por períodos prolongados de tempo, atuando como fonte de infecção para outros animais. Após a fase de bacteremia, as leptospirosas persistem em alguns órgãos dos animais, localizando-se, principalmente, no fígado, rins e útero gestante. Conforme esses autores, a patogenicidade das leptospirosas parece estar amplamente relacionada com a injúria capilar causada por todas as sorovariedades, no organismo do animal. Assim, é comum que se encontre lesões hemorrágicas e outras advindas dessas hemorragias, tais como áreas de necrose, nos órgãos acometidos.

Morais (1994) isolou e tipificou, pela primeira vez no Brasil, *hardjo*, genótipo Hardjoprajtno, de urina de vacas pardo-suíço em Minas Gerais. Esse trabalho sugere que a maioria das reações sorológicas para outras sorovariedades do sorogrupo SEJROE sejam reações antigênicas cruzadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 VACINAS

As bacterinas foram produzidas no laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG. Elas foram elaboradas em meio de EMJH modificado com fração de albumina bovina (Ellinghausen & McCulloug, 1965), inativadas com formol e adsorvidas em hidróxido de alumínio.

Foram elaboradas duas vacinas monovalentes: uma contendo *hardjo* e outra *wolffi*, cada uma com cerca de um bilhão da sorovariedade por dose. No caso de bovinos, a dose recomendada para a vacina que foi produzida seria de cinco ml por animal.

As bacterinas foram avaliadas previamente com relação à pureza e inocuidade e adaptadas para uso em hamsters, conforme normas preconizadas pelo United States Department of Agriculture (USDA), 1976: obteve-se uma diluição final de 1:40 da vacina e, em conformidade com as normas americanas, a dose utilizada para cada hamster foi de 0,25 ml dessa diluição.

3.2 ANTÍGENOS

Os dois antígenos usados, *hardjo* (amostra de referência Hardjoprajitno-OMS) e *wolffi* (amostra de referência 3705), pertencem ao sorogrupo SEJROE. As duas sorovariedades foram oficialmente obtidas do antigo Centro Panamericano de Zoonoses da Organização Panamericana da Saúde e são mantidas no Laboratório de Zoonoses da Escola de Veterinária da UFMG em

culturas vivas de leptospiras com cinco a sete dias de idade, com aproximadamente 100 bactérias por campo microscópico de 400 X de aumento.

Foram utilizadas normas padrões de segurança laboratorial requeridas para se trabalhar com leptospiras. Cuidados especiais foram tomados no manuseio de agulhas e seringas contaminadas. Todo o material e vidraria utilizados, tais como tubos de ensaio, lâminas, pipetas e material cirúrgico eram previamente colocados em solução desinfetante para, posteriormente, serem lavados. Utensílios descartáveis também eram desinfetados antes de serem descartados.

3.3 CARACTERÍSTICAS E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais utilizados foram hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) adultos e sadios, pesando entre 70 e 90 gramas ao início do teste.

Os hamsters eram mantidos em caixas plásticas com tampa de grade de metal. O material da cama era constituído de serragem de madeira, o qual era trocado de dois em dois dias. As garrafas de água eram lavadas e reabastecidas diariamente, juntamente com a ração granulada, mantendo-se, dessa forma, água e ração frescas e à vontade por todo o período do experimento.

A limpeza da sala utilizada para o alojamento dos animais era feita diariamente, sendo que, ao início do experimento, toda a sala (prateleiras, bancada, tampas de grade, etc) foi desinfetada com uso de lança-chamas. As janelas permaneciam semi-abertas durante todo o dia, a fim de se obter ventilação e arejamento adequados. Ao anoitecer, as janelas eram fechadas.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os hamsters foram divididos em quatro grupos – para acompanhamento por 18 dias após a vacinação e mais 14 dias após o desafio.

Grupo 1: constituído de 20 hamsters vacinados por via subcutânea com dose de 0,25ml de bacterina contendo *hardjo*. Foi desafiado com *hardjo*, por via intraperitoneal.

Grupo 2: formado por 20 hamsters vacinados por via subcutânea com dose de 0,25 ml de vacina contendo *wolffi*. Recebeu o desafio de *hardjo* por via intraperitoneal.

Grupo 3: é o grupo "Controle Positivo". Constituído por dez hamsters e receberam dose de 0,25 ml de solução salina tamponada estéril por via subcutânea. Injetou-se o desafio de *hardjo* por via intraperitoneal.

Grupo 4: é o grupo "Controle Negativo". Constituído por cinco hamsters que receberam 0,25 ml de solução salina tamponada estéril por via subcutânea. Esse grupo não recebeu o desafio 18 dias após a "vacinação", tendo sido injetado apenas solução salina tamponada.

3.5 OBTENÇÃO DA AMOSTRA-DESAFIO

3.5.1 Ativação de *hardjo*

A *hardjo* é mantida no Laboratório de Zoonoses da Escola de Veterinária da UFMG em meio de Fletcher (Myers, 1985) e em repiques semanais em meio EMJH modificado, há vários anos. Essas passagens sucessivas da leptospira em meio de cultura, ao longo do tempo, faz com que haja perda da sua patogenicidade.

Para obtenção de uma amostra "desafio" para os animais vacinados, procedeu-se a reativação de *hardjo*. Cinco hamsters recém desmamados foram, então, inoculados por via intraperitoneal com quatro ml, por animal, de cultura de *hardjo*. Essas culturas utilizadas possuíam sete dias de crescimento em meio EMJH modificado, com cerca de 100 leptospiras por campo em microscópio de campo escuro, com aumento de 400 vezes. Dois dias após, esses animais eram sacrificados e coletava-se amostras de fígado e sangue de cada um deles. À microscopia de campo escuro, verificou-se que o macerado do fígado, juntamente com o sangue, mostrava presença de leptospiras. A esse macerado, acrescentava-se mais cultura de *hardjo*, misturando-se em um gral. Todo o procedimento foi feito em capela, em condições totais de assepsia. O sobrenadante era aspirado com seringa e agulha estéreis e novamente inoculado em mais cinco hamsters recém desmamados, por via intraperitoneal, mantendo-se o volume do inóculo de quatro ml por animal. Trabalhou-se sempre com luvas cirúrgicas estéreis, gorro, máscara e óculos para proteção própria e para evitar contaminação do material com outros agentes patógenos.

Esse procedimento foi conduzido por um período de três meses, aumentando-se, gradativamente, o intervalo entre o inóculo e o sacrifício para quatro a cinco dias. Além de hamsters recém desmamados, animais adultos também foram sucessivamente inoculados, até que se observou que o número de leptospiras que infectavam o fígado aumentou e, paralelamente, os animais passaram a apresentar lesões características da leptospirose.

Dessa maneira, conseguiu-se a ativação de *hardjo*, a qual foi mantida sob duas passagens semanais em hamsters para utilização como desafio, após a titulação da mesma.

3.5.2 Preparação e titulação da amostra-desafio

Trabalhou-se com um hamster que havia sido inoculado com amostra de *hardjo* ativada. O animal moribundo foi sacrificado através de inalação de éter. O fígado foi usado como fonte de leptospiros: uma amostra de um grama desse fígado foi assepticamente removido e pesado em uma placa de petri estéril. Essa amostra foi triturada em gral, juntamente com nove ml de diluente (solução de albumina bovina a 1%, recomendado por USDA, 1976). Depois de bem homogeneizada, a suspensão correspondeu a uma diluição de 1:10.

Uma série de diluições a partir da suspensão a 1:10 se seguiu, sempre de maneira asséptica, utilizando-se como diluente a solução de albumina bovina 1%. Obteve-se diluições de 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000. Uma gota de cada uma dessas diluições foi observada ao microscópio de campo escuro e todas elas apresentavam leptospiros com grande motilidade.

Essa suspensão foi titulada em hamsters não imunizados para a determinação da dose infectante 50 (DI 50). Os inóculos contendo diluições 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000 de *hardjo* ativada através de passagens sucessivas, foram feitos em 30 hamsters (seis animais para cada uma das cinco diluições).

Cada grupo de seis hamsters recebeu, conforme preconizado pelo Teste de Potência de Vacinas de Leptospiros (USDA, 1976), 0,2 ml da diluição apropriada por via intraperitoneal. Os animais permaneceram sob observação por um período de 14 dias.

O critério adotado para considerar animal positivo foi a presença de *Leptospira* em tecido(s) do organismo ou no sangue. Para tanto, amostras de fígado, rim, pulmão e sangue foram semeados em tubos com meio de cultura (Fletcher e EMJH modificado) e incubadas em estufa a 28°C, sendo examinadas em lâminas (uma gota de cada

tubo) ao microscópio de campo escuro com aumento de 400 vezes, de três em três dias, por um período de 40 dias. A determinação da DI 50 foi calculada pelo método de Reed & Muench (1938).

3.6 VACINAÇÃO E DESAFIO DOS HAMSTERS

Para avaliar a imunidade cruzada entre as vacinas monovalentes contendo *hardjo* e *wolffi*, empregou-se um método *in vivo* recomendado pelo USDA (1976), o qual utiliza hamsters em um esquema de vacinação-desafio, a fim de se determinar a potência de bacterinas contendo *Leptospira interrogans*.

Cada hamster foi vacinado com dose de 0,25 ml por via subcutânea: o grupo 1 com bacterina contendo *hardjo* e o grupo 2 com bacterina contendo *wolffi*. Os grupos 3 e 4 receberam 0,25 ml de solução salina tamponada estéril também por via subcutânea.

Após 18 dias da vacinação, todos os animais receberam o desafio de *hardjo*, por via intraperitoneal. Conforme o Teste de Potência de Bacterinas de Leptospiras (USDA, 1976), o desafio foi efetuado com a administração de uma dose de 0,2 ml da suspensão de fígado de um animal moribundo, previamente titulada, a qual correspondeu a cem vezes a DI 50. O grupo 4 recebeu apenas 0,2 ml de solução salina tamponada estéril.

3.7 ANÁLISE DA PROTEÇÃO CONFERIDA PELAS VACINAS

Para avaliar a proteção conferida pelas vacinas, os hamsters foram acompanhados por 14 dias após o desafio com *hardjo*. Os sinais clínicos, mudanças fisiológicas e/ou comportamentais observados, foram criteriosamente registrados. Depois desses 14 dias, os animais foram sacrificados. Fez-se, então, pesquisa de leptospiras e de lesões nos órgãos dos hamsters, além de sorologia.

Coletou-se, utilizando-se de material cirúrgico estéril, amostras de fígado, rim, pulmão e sangue de cada animal dos quatro grupos para possível crescimento de *hardjo* em meios de cultura. O sangue foi coletado por punção cardíaca com seringa e agulhas estéreis, imediatamente antes do sacrifício dos hamsters. Todo o procedimento foi realizado em capela, trabalhando-se sempre com luvas cirúrgicas estéreis, gorro e máscara, próximo à chama de fogo. Depois de semear uma gota de sangue em meios de cultura, procedeu-se a separação dos soros para posterior prova sorológica.

Para se detectar presença direta ou indireta de leptospiras nos tecidos, foram feitos estudos histopatológicos, através das colorações pela prata e pela hematoxilina-eosina.

3.7.1 Crescimento/Presença de *hardjo*

A fim de se diagnosticar presença de *hardjo*, após o desafio, em tecidos hepático, renal e/ou pulmonar dos hamsters, fez-se macerado de amostras desses órgãos, que foram processados separadamente, em condições assépticas, semeando-se uma amostra de cada macerado em dois tubos de ensaio com meio Fletcher e mais dois tubos com meio EMJH modificado. Uma gota de sangue de cada hamster também foi colocada em ambos meios de cultura. Conforme metodologia proposta por Myers (1985), foram adicionados discos de 30 mcg de Neomicina¹ aos tubos com meios de cultura (um disco de 30 mcg para cada tubo contendo dez ml de meio), objetivando controlar microrganismos contaminantes.

Ao final, obteve-se uma série de 16 tubos de ensaio por animal: dois tubos com meio EMJH modificado e dois tubos com meio de Fletcher para cada órgão (fígado, rim e pulmão), além do sangue.

¹ Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda. Rua Maranguape, 84. São Paulo, Brasil.

Todo o material foi incubado em estufa e mantido em temperatura de 28°C por 90 dias. Para pesquisa de leptospiros, uma gota de cada tubo foi examinada semanalmente em microscópio com condensador de campo escuro a seco, com objetiva de 40 X e ocular 10 X, perfazendo-se um total de 12 semanas de exames dos tubos. As culturas positivas eram devidamente registradas.

3.7.2 Coloração pela Prata

Após o sacrifício de cada animal, fragmentos de fígado, pulmão e um rim eram colocados em formol a 10%. Depois de fixados em formol, o material foi desidratado em álcool, diafanizado em xilol e incluído em blocos de parafina purificada¹. Trabalhou-se com cortes seriados de quatro µm de espessura dos órgãos incluídos.

Foram feitas seis lâminas, por animal, com os cortes dos órgãos de cada hamster para pesquisa de leptospiros através da coloração pela prata. Empregou-se o Método de Warthin-Starry para coloração de espiroquetas (Luna, 1968).

3.7.3 Coloração pela Hematoxilina-Eosina

Foram coradas duas lâminas com cortes dos órgãos (previamente fixados, desidratados, diafanizados e incluídos), de cada animal, pela hematoxilina-eosina (Luna, 1968) para estudo histopatológico.

3.7.4 Prova Sorológica

Como antígenos, utilizou-se culturas vivas das sorovarietades *hardjo* e *wolffi* com cinco a sete dias de crescimento em meio de EMJH modificado e com cerca de 100 microrganismos vivos por campo microscópico de 400 vezes de aumento, sem autoaglutinação, sem contaminação e com mobilidade.

¹ Reagen - Quimibrás Indústrias Químicas S.A. - Rua General Correia e Castro, 465 - Rio de Janeiro.

A pesquisa de aglutininas anti-leptospiras foi feita pelo Método de Microaglutinação Rápida (MAR) descrito por Ryu (1970). Os soros dos hamsters foram diluídos a 1:50 em solução salina tamponada estéril. Desta diluição tomou-se uma gota, que era colocada em placa de porcelana escavada à qual era acrescentado o mesmo volume de antígeno, chegando-se à diluição de 1:100. A placa era então agitada e colocada em repouso por seis a oito minutos, em temperatura ambiente. Após este período, com uma alça de platina, tomava-se uma gota da mistura que era colocada sobre lâmina e examinada em microscópio de campo escuro com condensador à seco, oculares de 10 x e objetivas de 16 x.

O critério utilizado para leitura foi descrito por Galton et al. (1962), onde o grau de aglutinação e lise é dado em cruces, variando de negativo até quatro cruces. A reação uma cruz (1+) ocorre quando há 25% de leptospiras aglutinadas por campo; duas cruces (2+) quando 50% das leptospiras estão aglutinadas; três cruces (3+) quando cerca de 75% das leptospiras se aglutinam e quatro cruces (4+) quando aproximadamente 100% dos microrganismos no campo estão aglutinados. Os soros são considerados positivos quando ocorre, no mínimo, 50% de aglutinação, ou seja, a partir da reação duas cruces.

4 RESULTADOS

4.1 TITULAÇÃO DA AMOSTRA-DESAFIO

Os resultados dos inóculos das diluições de 1:10, 1:100 e 1:1.000 do fígado do animal moribundo, mostraram, respectivamente, seis hamsters (100%), quatro (66,7%) e dois hamsters (33,3%) com sinais clínicos da doença (TAB. 1). Esses sinais iniciaram-se entre o 6º e o 9º dia após o inóculo e permaneceram por cerca de cinco a sete dias ou até o sacrifício dos animais.

Os sinais clínicos mais comuns foram prostração, hipertermia, pelo sem brilho e ressecado, fraqueza e anorexia (TAB. 2 e FIG. 1).

Os hamsters positivos e os negativos para a presença de leptospiras nos tecidos, em cada uma das diluições da amostra-desafio, foram registrados na Tabela 3. Não foi observado crescimento ou presença de leptospiras no pulmão ou no sangue de nenhum dos hamsters, enquanto 46,7% dos animais apresentaram leptospiras no fígado e 26,7% nos rins (TAB. 3).

Dos 14 fígados positivos à *Leptospira*, 13 (92,9%) apresentaram *hardjo* tanto em Fletcher quanto em EMJH modificado. Somente um (7,1%) continha *hardjo* em EMJH modificado. Dos oito rins onde isolou-se *Leptospira*, em cinco (62,5%) observou-se crescimento tanto em Fletcher quanto em EMJH modificado. Em dois rins (25,0%) houve presença de *hardjo* somente no meio EMJH modificado e em um (12,5%) detectou-se *Leptospira* só no meio de Fletcher.

De acordo com os registros feitos de cada hamster, constatou-se que em todos animais que apresentaram sinais clínicos da doença, foi diagnosticada presença de *hardjo* no(s) meio(s) de cultura contendo macerado de órgãos. Por outro lado, de alguns animais que não apresentaram sinais clínicos, foi observado crescimento de leptospiras.

TABELA 1. Titulação da amostra-desafio: Frequência (%) de hamsters com sinais clínicos inoculados com *hardjo*.

Diluição**	Número de Animais			%
	Inoculados	Sem Sinais	Com Sinais	
1:10	6	0	6	100,0
1:100	6	2	4	66,7
1:1000	6	4	2	33,3
1:10000	6	6	0	0,0
1:100000	6	6	0	0,0
Controle*	6	6	0	0,0

* Inoculados com soro fisiológico.

** Diluições de fígado de hamster com leptospirose, inoculado experimentalmente.

TABELA 2. Tipo e frequência de sinais clínicos nos hamsters inoculados para a titulação da amostra-desafio de *hardjo*.

Sinais Clínicos	Número de Hamsters	%
Prostração	15	50,0
Pelo sem brilho e ressecado	12	40,0
Hipertermia	12	40,0
Fraqueza	12	40,0
Anorexia	11	36,7
Anemia*	06	20,0
Petéquias na mucosa nasal	05	16,7
Petéquias na conjuntiva ocular	05	16,7
Petéquias subcutâneas plantares	03	10,0
Incoordenações motoras	03	10,0

* diagnosticada ao exame clínico: palidez de mucosas oral e ocular
 OBS: de um modo geral, a maioria dos animais apresentou síndrome febril, sem observação de sinais clínicos isolados.

FIGURA 1. Tipo e frequência (%) de sinais clínicos nos hamsters inoculados para titulação da amostra-desafio de *hardjo*.

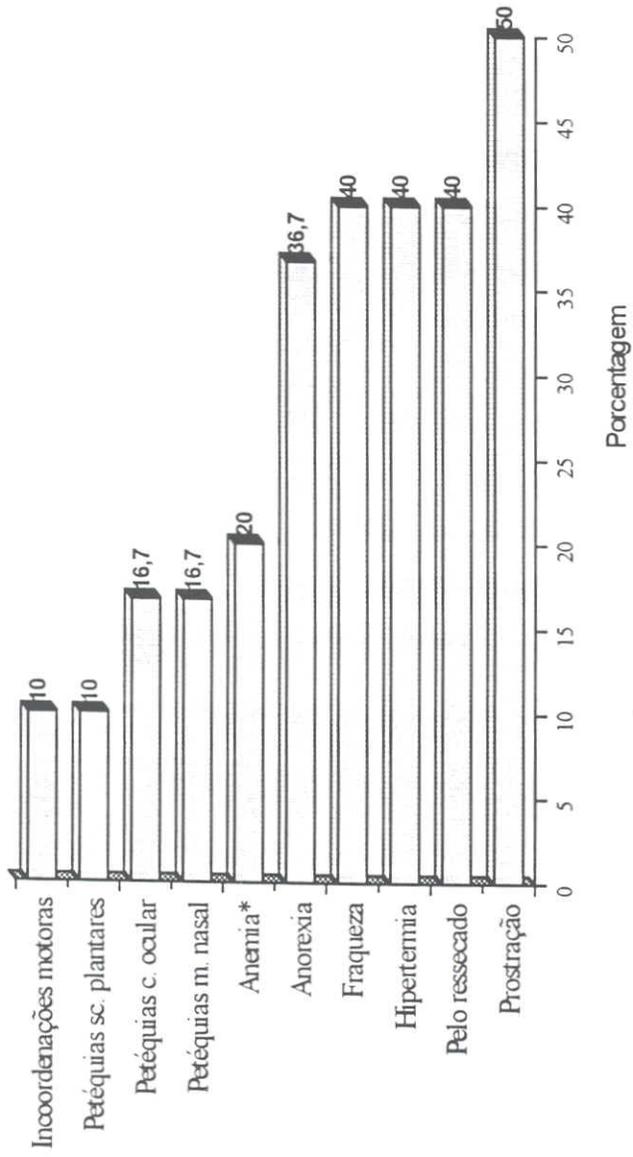


TABELA 3 Frequência de *hardjo* em meios de cultura contendo órgãos de hamsters inoculados para titulação da amostra-desafio.

Diluição	Órgãos		Fígado		Rim		Pulmão		Sangue	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1:10	6	0	5	1	6	0	6	0	6	6
1:100	4	2	2	4	6	0	6	0	6	6
1:1000	3	3	1	5	6	0	6	0	6	6
1:10000	1	5	0	6	6	0	6	0	6	6
1:100000	0	6	0	6	6	0	6	0	6	6
Total de Hamster	14*	16	8**	22	30	0	30	0	30	30

* equivalente a 46,7% dos hamsters

** equivalente a 26,7% dos hamsters

+ número de hamsters positivos

- número de hamsters negativos

4.2 CÁLCULO DA DI 50

Com os resultados obtidos na observação dos sinais clínicos apresentados pelos animais nas cinco diferentes diluições e o crescimento de leptospiras nos meios de cultura contendo macerado dos órgãos, calculou-se a Dose Infectante 50, pela técnica de Reed & Muench (1938) (TAB. 4). A DI 50 foi de $10^{-2.83}$.

Utilizando uma tabela de logaritmo e antilogaritmo, estabeleceu-se a diluição que correspondeu a cem vezes a Dose Infectante 50 (100 DI 50), como sendo o desafio para os animais vacinados. Assim, dois gramas de fígado contendo *hardjo* ativada (oriundo de hamster moribundo) foi triturado, assepticamente, em 11,52 ml de diluente (solução salina tamponada estéril - soro fisiológico).

TABELA 4. Determinação da DI 50 de amostra de *hardjo* ativada, inoculada por via intraperitoneal, em cinco grupos de seis hamsters adultos.

Diluição	I	NI	Resultados Acumulados				
			I	NI	Total	Fração	%I
1:10	6	0	14	0	10	14/14	100
1:100	4	2	8	2	10	8/10	80
1:1000	3	3	4	5	9	4/9	44
1:10000	1	5	1	10	11	1/11	9
1:100000	0	6	0	16	16	0/16	0

I: hamsters infectados

NI: hamsters não infectados

%I: porcentagem de hamsters infectados

4.3 PROTEÇÃO CONFERIDA PELAS VACINAS

4.3.1 Sinais Clínicos

Após o desafio, os hamsters dos grupos 1, 2 e 4 não apresentaram modificações comportamentais e/ou fisiológicas dignas de nota. Eles permaneceram com apetite e ingestão hídrica normais. A temperatura média (36,8°C), as fezes e o aspecto dos pelos estavam em condições compatíveis com a normalidade. Todos os animais desses grupos continuaram atentos, com olhos vivos, conjuntivas oral e ocular rosadas, não apresentando sinal clínico frente ao desafio.

No grupo 3, não se observou mudança nas condições gerais dos hamsters até o 4º dia após o desafio. Entre o 5º e o 8º dia, os animais começaram a manifestar sinais de doença, os quais se estenderam por cerca de sete dias. Foram observados hamsters prostrados, quietos, deprimidos, com falta de apetite, hipertermia (média de 39,5°C), pelos ressecados e sem brilho, descargas nasais e oculares (coriza e lacrimejamento). No 14º dia (quando foram sacrificados), a maioria deles já não apresentavam hipertermia, mas permaneciam fracos, com perda de peso (média de 8,1g/animal) e pelos ressecados.

4.3.2 Crescimento/Presença de *hardjo*

Nos grupos 1 e 4, não se detectou presença de leptospiras em nenhum meio de cultura e/ou órgão. No grupo 2, apenas um hamster (5%) mostrou-se positivo à presença de leptospira: na 5ª semana de leitura, ou seja, após 35 dias de incubação em estufa, constatou-se *hardjo* em tubo com meio de Fletcher e amostra de fígado macerado.

O grupo 3 apresentou crescimento de leptospiras em todos os dez hamsters (100% de animais infectados). Desses dez animais, cinco foram positivos nas culturas do fígado e rim, tanto no meio de

Fletcher, quanto no meio EMJH modificado. Um hamster apresentou somente o rim com *hardjo* em meio de Fletcher. Os outros quatro animais foram positivos somente nas culturas com amostras de fígado em meio EMJH modificado. Não houve presença ou crescimento de leptospiras no pulmão nem no sangue de nenhum animal.

A partir da 9a. semana de leitura, a maior parte dos tubos com as culturas passaram a ser descartadas por apresentarem contaminações secundárias com bactérias e/ou fungos. Essas contaminações levaram à mudança de pH e empobrecimento dos meios de cultivo, impossibilitando a continuidade das condições ideais para o crescimento de leptospiras. Dessa forma, ao final da 12a. semana, todas as culturas foram descartadas.

4.3.3 Coloração pela Prata

O número de hamsters que apresentaram leptospiras nos tecidos hepático, renal e/ou pulmonar, diagnosticados pela impregnação pela prata (Método de Warthin-Starry), foram relacionados na Tabela 5.

As leptospiras coraram-se em negro e o tecido em amarelo-pardo ou castanho (FIG. 2). No grupo 3, o fígado de sete hamsters continha *hardjo* e em dois outros animais visualizou-se leptospiras tanto no fígado quanto no rim. Dessa forma, 90% dos hamsters desse grupo foram positivos para *hardjo* frente ao método de coloração pela prata.

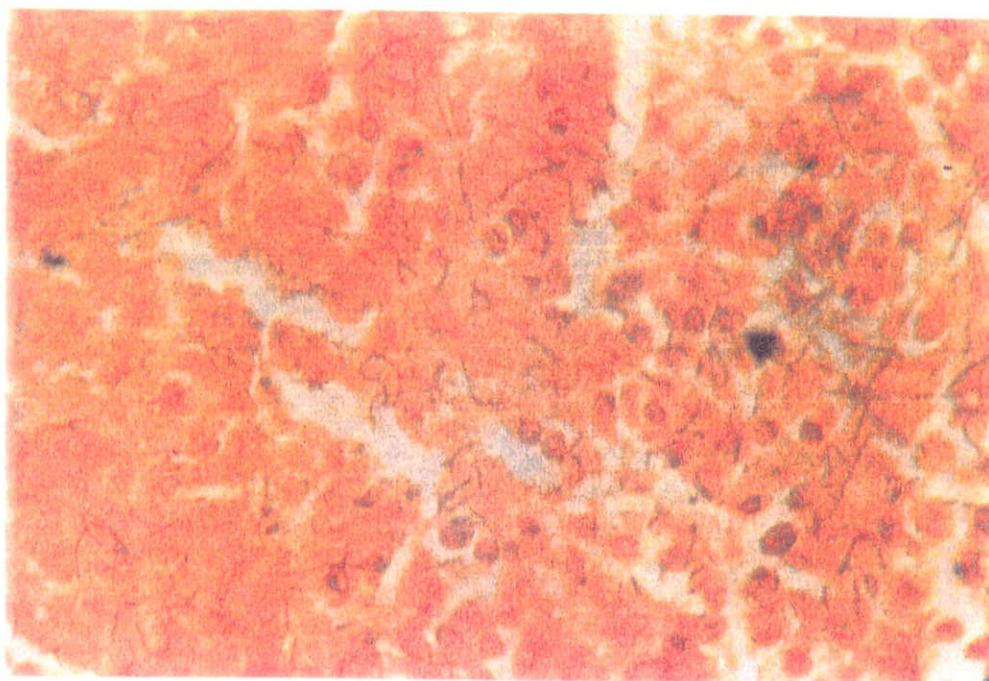
Nos grupos 1, 2 e 4, não se encontrou leptospiras através desse método.

TABELA 5. Hamsters positivos de acordo com a presença de *hardjo* nos tecidos hepático, renal e/ou pulmonar - método de coloração pela prata.

Órgão*	Grupo			
	1	2	3	4
Fígado	0	0	7	0
Rim	0	0	0	0
Pulmão	0	0	0	0
Fígado e Rim	0	0	2	0
Total	0	0	0	0

*cortes histológicos de quatro μm de espessura dos órgãos

FIGURA 2. Corte histológico de fígado de hamster inoculado com *hardjo*



Leptospira hardjo em fígado de hamster do grupo 3. Método de coloração pela prata (Warthin-Starry). Microscopia óptica. 400X

4.3.4 Coloração pela Hematoxilina-Eosina

Todos os hamsters do grupo 3 apresentaram lesões pulmonares. As principais alterações observadas foram congestão e hemorragia moderadas distribuídas difusamente no parênquima pulmonar, principalmente nos alvéolos (FIG. 3).

No fígado de todos esses hamsters foram encontradas lesões, sendo que a mais frequente foi a congestão de vasos e sinusóides, em grau moderado. Observou-se também: áreas focais de inflamação crônica; necrose focal de coagulação; discreta dissociação de hepatócitos e infiltrados mononucleares peri-portal, ao redor da veia terminal hepática e em alguns focos do parênquima hepático (FIG.4).

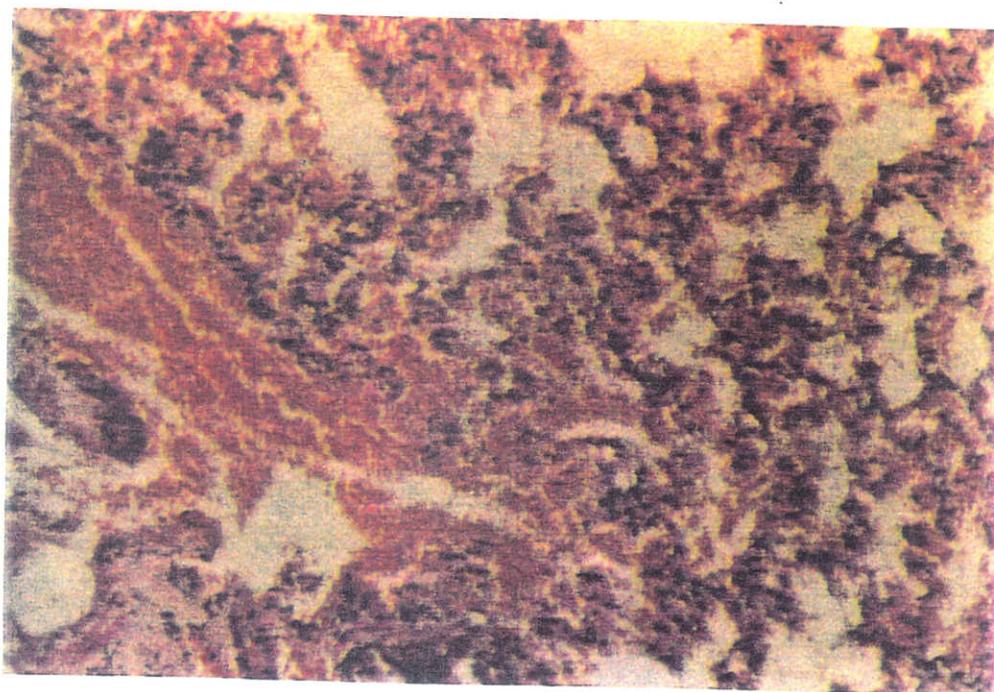
Apenas quatro animais do grupo 3 apresentaram congestão e hemorragias moderadas nas regiões cortical e medular renal.

Assim sendo, constatou-se que 100% dos hamsters do referido grupo foram infectados pela *hardjo*, tendo apresentado lesões causadas pela leptospirose.

Nos grupos 1 e 4 nenhum dos animais apresentaram quaisquer lesões no fígado, rim ou pulmão.

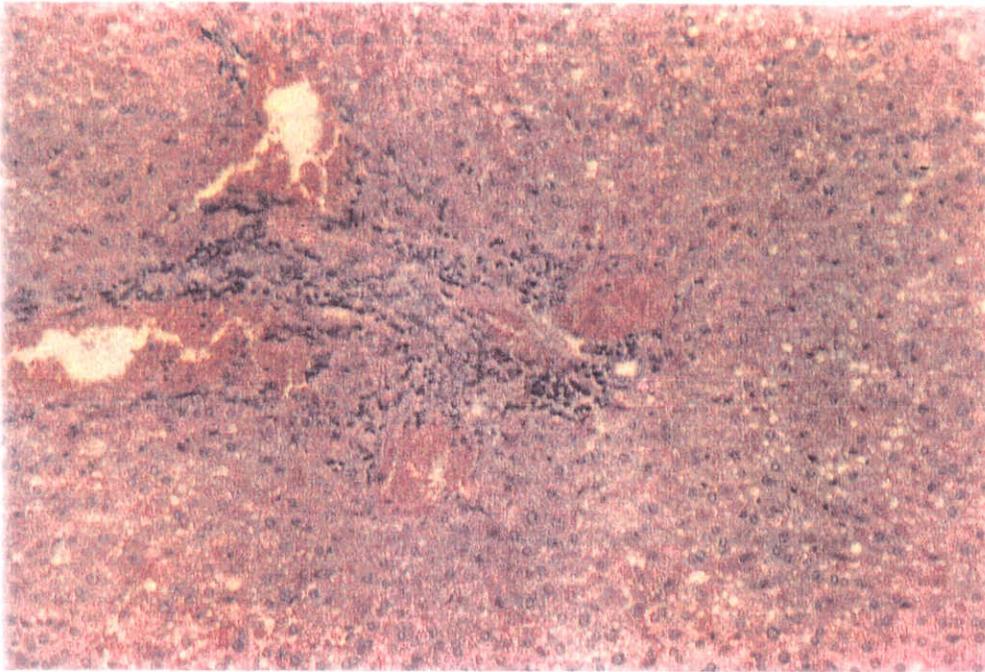
No grupo 2, um hamster (5%) possuía o fígado com congestão de vasos e sinusóides e infiltrados mononucleares peri-portal. Esse mesmo animal foi positivo no isolamento de *Leptospira* do tecido hepático em meio de Fletcher.

FIGURA 3. Corte histológico de pulmão de hamster inoculado com *hardjo*



Note-se congestão e hemorragia no parênquima pulmonar de hamster do grupo 3. Coloração pela hematoxilina-eosina. M.O. 100X.

FIGURA 4. Corte histológico de fígado de hamster inoculado com *hardjo*.



Note-se congestão moderada de vasos, infiltrado mononuclear peri-portal, discreta dissociação e degeneração vacuolar de hepatócitos em fígado de hamster do grupo 3. Coloração pela hematoxilina-eosina. M.O. 100X.

TABELA 6. Número de hamsters positivos à *hardjo*, de acordo com as lesões histopatológicas em fígado, rins e pulmão - Coloração pela hematoxilina-eosina.

Órgão(s)	Grupo			
	1	2	3	4
Fígado	0	1	0	0
Rim	0	0	0	0
Pulmão	0	0	0	0
Fígado e Rim	0	0	0	0
Fígado e Pulmão	0	0	6	0
Rim e Pulmão	0	0	0	0
Fígado, Rim e Pulmão	0	0	4	0
Total	0	1	10	0

4.3.5 Prova Sorológica

A Microaglutinação Rápida mostrou que os 20 hamsters do grupo 1 (100%) tiveram títulos para *hardjo*, sendo que 80% (16 animais) e 20% (quatro animais) apresentaram, respectivamente, títulos de 1:100 e 1:200. Esse mesmo grupo apresentou hamsters com títulos para *wolffi*: 55% (11 animais) com título de 1:100 e 10% (dois animais) com 1:200, totalizando 65% de animais reagentes frente *wolffi*.

No grupo 2, todos os 20 hamsters foram positivos à aglutinação com *wolffi*, sendo que nove deles apresentaram título de 1:100 e outros onze hamsters, título de 1:200. À sorologia feita com *hardjo*, 75% dos animais foram positivos: 65% (13 hamsters) e 10% (dois hamsters) tiveram, respectivamente, títulos de 1:100 e 1:200.

No grupo 3 cinco hamsters (50%) mostraram título de 1:100 frente a *hardjo*. Ainda nesse grupo, oito animais (80%), foram reagentes à

wolffi, sendo que seis deles (60%) tiveram título de 1:100 e dois (20%) título de 1:200.

O grupo 4 não apresentou nenhum animal positivo à sorologia.

TABELA 7. Hamsters com títulos para *hardjo* e/ou *wolffi*, de acordo com o método de Microaglutinação Rápida.

Grupo	Título para <i>hardjo</i>			Título para <i>wolffi</i>		
	1:100	1:200	Total (%)	1:100	1:200	Total (%)
1	16	4	20 (100)	11	2	13 (65)
2	13	2	15 (75)	9	11	20 (100)
3	5	0	5 (50)	6	2	8 (80)
4	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)

Para análise da proteção conferida pelas vacinas frente ao desafio de 100 DI 50, considerou-se protegido todo hamster que não apresentou sinais clínicos da doença, presença de *hardjo* nos cultivos de órgãos e sangue em meios próprios para crescimento de leptospiros, presença da espiroqueta em órgãos corados pela prata ou lesões histopatológicas da doença nos tecidos hepático, renal e/ou pulmonar.

Com essa análise, pode-se observar que 100% dos hamsters do grupo 1 e 95% dos do grupo 2, foram protegidos pelas vacinas (TAB. 8). Essa diferença não foi estatisticamente significativa (teste de qui-quadrado).

TABELA 8. Taxa de proteção em hamsters vacinados com *hardjo* ou *wolffi* e desafiados com *hardjo*.

Vacinas	Hamsters		%
	Vacinados	Protegidos	
<i>hardjo</i>	20	20	100
<i>wolffi</i>	20	19	95

5 DISCUSSÃO

No mundo todo, a *hardjo* tem sido descrita como a *Leptospira* de maior prevalência e a principal sorovariedade patogênica para bovinos (Thiermann, 1982, Ellis, 1986, Bennett, 1993). As infecções a campo são resultado de uma ativa exposição natural a amostras patogênicas.

Contudo, para manutenção do antígeno no laboratório, são processadas sucessivas passagens em meios de cultura, ocorrendo, de acordo com Faine (1982), o princípio do crescimento de leptospiras mutantes avirulentas. A virulência da amostra pode ser restaurada e mantida através de passagens em animais susceptíveis. Durante essas passagens, os microrganismos virulentos sobrevivem, enquanto os avirulentos morrem no animal. Para manter a virulência máxima da amostra, o sangue ou uma emulsão do fígado contendo grande número de leptospiras, devem ser injetados diretamente em outro animal, por via intraperitoneal. O animal inoculado deve ser sacrificado dentro de cinco a sete dias, no máximo, e o material repassado para um outro. Os hamsters são os animais mais usados para essa finalidade e são, também, o padrão de referência para testes de laboratório para vacinas, uma vez que são susceptíveis a várias sorovariedades, inclusive *hardjo* (Faine, 1982).

Procedendo-se dessa forma, restaurou-se a patogenicidade da amostra a ser usada como desafio à vacinação. A *hardjo* apresentava-se, inicialmente, com virulência baixa, uma vez que foi preciso cerca de 27 passagens em grupos de cinco hamsters, perfazendo-se um total de três meses para se obter a reativação da amostra. Nesse tipo de experimento, esta é uma fase muito importante, já que é preciso obter *hardjo* para o posterior desafio. É

também uma fase laboriosa e perigosa, pois passa-se a trabalhar com amostra de *Leptospira* ativada.

De acordo com cada sorovariedade, o curso da doença pode ser inaparente ou letal. Conforme Thiermann (1982), a patogenicidade da *hardjo* pode não ser suficiente para causar morte. No presente trabalho, observou-se que a amostra ativada não foi letal para os hamsters, mas levou a perda de peso, febre, prostração e lesões no fígado (que apresentou-se pálido, friável, com áreas de necrose), rins (congestão) e pulmões (congestão, edema e hemorragias petequiais difusas).

A identificação dos casos de leptospirose é complexa e o diagnóstico clínico não é conclusivo (Moreira, 1994), já que a infecção não apresenta sinais patognomônicos (Stoenner, 1972). Manifestações como febre, anorexia, debilidade e prostração são sinais clínicos que podem ser confundidos com outras doenças. De acordo com Jubb et al. (1993), na leptospirose, a incidência da infecção é muito maior que a incidência de doença clínica e, em relação à morbidade, a mortalidade é bem menor. Assim, a determinação exata da infecção por leptospirosas depende da visualização direta e isolamento do agente, havendo necessidade de suporte laboratorial.

Dessa forma, a avaliação da vacina frente ao desafio, no presente trabalho, não levou em consideração somente os sinais clínicos apresentados pelos animais inoculados. Processou-se incubação de amostras de fígado, pulmão e rins, além do sangue, em meios de cultura próprios para crescimento de leptospirosas e, também, sorologia. Estudos histopatológicos, com a finalidade de visualizar o agente diretamente e/ou as lesões causadas por ele nos órgãos citados acima, foram feitos, usando-se, respectivamente, a impregnação pela prata e a coloração pela hematoxilina-eosina.

Os animais que adoeceram na titulação da amostra-desafio ou no desafio propriamente dito (grupo 3), começaram a mostrar sinais da

doença entre o 5º e o 9º dia após o inóculo de *hardjo*. Assim, o período médio de incubação da doença nos hamsters foi de sete dias. Os principais sinais clínicos da doença foram prostração, febre, pelo sem brilho e ressecado, fraqueza, anorexia, perda de peso e anemia. Não se observou icterícia. Esses sinais estão de acordo com o citado por Jubb et al.(1993) e Faine (1982), que relatam, além desses sinais, que a icterícia nem sempre está presente na infecção.

Usando a técnica de Warthin-Starry de impregnação pela prata, diagnosticou-se nove animais (90%) do grupo 3 com presença de *hardjo* no fígado e/ou rim (nove com leptospiras no fígado, sendo que, dois dentre eles, apresentavam o microrganismo também no rim). Por esse método, os grupos 1, 2 e 4 não apresentaram leptospiras em nenhum dos órgãos examinados.

Através da coloração pela hematoxilina-eosina, não foram identificadas lesões histopatológicas nos grupos 1 e 4. Os hamsters do grupo 3 mostraram lesões hepáticas em 100% dos animais, lesões renais (40%) e pulmonares (100%). Um único hamster do grupo 2 apresentou alterações hepáticas. As lesões encontradas conferem com as descritas por Jubb et al. (1993), com exceção das alterações degenerativas no epitélio dos túbulos renais e nefrite intersticial, as quais não foram diagnosticadas no presente estudo.

A presença de *hardjo* nos meios de cultura com amostras de órgãos, nesse trabalho, mostram a importância de se trabalhar com material coletado e processado imediatamente após o sacrifício dos animais, em condições máximas de assepsia. Essa observação está em concordância com Thiermann (1984) apud Gregoire et al. (1987) que diz que as principais razões de ter conseguido isolar leptospiras de rins bovinos são as amostras serem frescas e processadas tão logo quanto possível. Por outro lado, Sullivan & Stallman (1969) e Oliveira et al. (1980) relataram a sensibilidade, dificuldade e exigência para isolamento de *hardjo* em meios de cultura. Apesar de encontrarem vários animais com títulos altos em teste sorológico, o número de isolamentos foi muito pequeno. Contudo, o objetivo

desse trabalho não foi obter culturas puras de leptospiros, mas presenciar ou não o agente nos meios.

No grupo 3 foi possível diagnosticar presença de *hardjo* em um ou em ambos meios de cultura (Fletcher e EMJH modificado) contendo macerado do fígado e rim dos dez animais. De um modo geral, tanto na cultura dos tecidos quanto nos estudos histopatológicos, o fígado se mostrou como um foco de infecção da *hardjo*, já que a presença do agente nesse órgão foi maior quando comparado ao rim, sangue ou pulmão. Além disso, o número de tubos com meio EMJH modificado contendo macerado hepático e presença de leptospiros foi também maior que o meio de Fletcher.

O hamster do grupo 2 que apresentou *hardjo* no fígado (diagnosticado na 5a. semana de cultivo em Fletcher e pelas lesões histopatológicas) não teve quaisquer sinais clínicos de infecção, apresentando, portanto, curso inaparente da doença. A ausência de sinais foi observada também em alguns animais usados para o cálculo da DI 50.

Os tubos de ensaio contendo Fletcher ou EMJH modificado e semeados com amostras de sangue e/ou pulmão dos hamsters desafiados não mostraram a presença de leptospiros. Esse fato foi constatado até mesmo nos animais do grupo 3, os quais já haviam se mostrado positivos nos cultivos de outros órgãos. Assim, sugere-se que 14 dias após a inoculação, as leptospiros já não se encontram mais na corrente sanguínea e/ou no pulmão, entretanto, as lesões pulmonares persistiram, mesmo sem a presença do agente neste órgão. De acordo com Faine (1982), as leptospiros só são encontradas no sangue nos primeiros dias de infecção e, depois da 1a. semana da doença, raramente obtém-se sucesso na cultura do sangue. O mesmo autor cita que o rim é o órgão mais importante para o isolamento de leptospiros, mas conforme os resultados obtidos nesse trabalho, o fígado dos hamsters mostrou-se o melhor foco de infecção e isolamento para *hardjo*.

A rápida dispersão da infecção no grupo 3 (controle positivo), diagnosticada tanto pela presença de sinais clínicos quanto pela histopatologia (colorações pela hematoxilina-eosina e pela prata) e isolamento em meios de cultura, indica que os animais receberam um forte desafio.

Apesar de alguns tubos com meios de cultivo e macerado de órgãos serem mantidos incubados por até 90 dias após terem sido semeados, nenhum deles apresentou crescimento de leptospiras depois de 63 dias em estufa. A partir daí, todos os tubos passaram a não apresentar mais leptospiras, seja pela mudança de pH, empobrecimento e/ou contaminação dos meios ou pela associação destes fatores.

O grupo 1 mostrou-se protegido pela vacina, já que tanto nos estudos histopatológicos quanto no isolamento, ele permaneceu negativo. O grupo 4 não apresentou alterações em nenhum dos exames efetuados, permanecendo os animais sadios e constatando que as condições de manejo e instalação foram adequadas e sem presença de outros patógenos.

As reações cruzadas entre as sorovariedades são determinadas pelas relações antigênicas existentes, as quais tornam possível a utilização de um critério para classificar as leptospiras em sorogrupos. Essas reações cruzadas são muito comuns entre as sorovariedades *hardjo* e *wolffi*, sendo que ocorrem aglutinações das duas sorovariedades em soros de animais que tenham sido infectados com apenas um sorotipo.

O presente trabalho confirma esses dados, uma vez que 65% do grupo 1 (vacinados com *hardjo*) e 75% do grupo 2 (vacinados com *wolffi*) apresentaram títulos, respectivamente, para *wolffi* e para *hardjo* à reação sorológica. No grupo 3, onde os animais só receberam *hardjo* do desafio, houve presença de aglutinações tanto para *hardjo* (50% dos hamsters) quanto para *wolffi* (80% dos animais). Assim sendo, *wolffi* mostrou-se mais sensível na detecção

de *hardjo* ao teste que a própria *hardjo*. O grupo 4 (controle negativo) não apresentou títulos sorológicos à prova de microaglutinação.

Hanson et al., em 1972, relataram que as relações antigênicas identificadas com os testes de aglutinação não indicam propriedades protetoras e que a imunidade conferida por vacinas é sorotipo-específica. Já em 1986, Hanson & Tripathy consideraram a possibilidade da existência de proteção cruzada entre sorovariedades de um mesmo sorogrupo. Conforme os resultados obtidos nesse experimento, houve proteção cruzada entre as sorovariedades *hardjo* e *wolffi*, ou seja, *wolffi* foi capaz de induzir formação de anticorpos que protegeram os hamsters ao desafio com *hardjo*. A taxa de proteção conferida aos hamsters pelas vacinas monovalentes contendo *hardjo* e *wolffi*, frente ao desafio com *hardjo*, foi de 100% e 95%, respectivamente.

Vários autores (Aycardi et al., 1980, Ellis et al., 1981, Ellis et al., 1982, Thiermann, 1982) relataram que *hardjo* tem sido frequentemente isolada de animais soronegativos ou com títulos aglutinantes muito baixos. Zamora et al. (1988), conseguiram isolar *hardjo* dos rins de dois animais e, à sorologia, encontrou um deles com título 1:100 e o outro negativo. Existe baixa correlação entre o estado de portador e a presença de soroaglutininas, principalmente no caso de infecção por *hardjo* (Ellis et al., 1981).

A *hardjo* possui altas exigências e sensibilidade para sua manutenção e crescimento em meios de cultura em laboratório (Sullivan & Stallman, 1969, Myers & Jelambi, 1975, Oliveira et al., 1980). Além disso, segundo Ellis et al. (1981), Ellis et al. (1982), Thiermann (1982 e 1983), Kingscote (1985), Bolin et al. (1989), Siddique & Shah (1990) e Bolin et al. (1991), a *hardjo* é pouco imunogênica, produzindo menor título de anticorpos aglutinantes à prova sorológica que outras sorovariedades ou nem sempre induzindo títulos aglutinantes. Bolin et al. (1991) citam também que

os anticorpos produzidos após a vacinação duram pouco tempo, conferindo curta duração à imunidade.

Como citado anteriormente, o papel da *hardjo* como a principal sorovariedade patogênica para bovinos é aceito e conhecido atualmente no mundo todo. Por outro lado, a patogenicidade de *wolffi* para bovinos ainda não está bem determinada. Em nosso meio, é muito comum sua predominância nos levantamentos sorológicos. As pesquisas não conseguiram demonstrar através de isolamento a efetiva participação de *wolffi* em casos de leptospirose bovina, ficando restrita a demonstração da ocorrência dessa sorovariedade somente a estudos sorológicos. Santa Rosa et al. (1969/70) e Giorgi (1981) revelaram ter encontrado mais de 50% dos soros positivos para *wolffi*, sem, entretanto, haver qualquer sinal clínico da doença, estando os bovinos aparentemente saudáveis.

A sorologia e o isolamento permitem identificar as leptospirosas que infectam um rebanho, tornando possível o desenvolvimento de uma vacina específica. Contudo, existe a dificuldade de se identificar com precisão o(s) agente(s) causador(es) da doença devido ao alto grau de reação cruzada entre as leptospirosas (Le Febvre, 1987). Por causa dessas reações cruzadas, Siddique & Shah (1990) relatam que mais sorovariedades do antígeno acabam sendo incorporados à vacina. Essas vacinas polivalentes, por sua vez, também determinam reações cruzadas nos animais levando à ausência de títulos uniformes entre as sorovariedades. Moreira (1995) cita que as vacinas modernas multivalentes não devem ultrapassar de três antígenos para maior eficácia no controle das leptospiroses.

A imunização artificial tornou-se universalmente utilizada como método de controle das leptospiroses em animais. De acordo com Moreira (1994), a vacinação tem-se revelado medida prática e eficiente não só no controle, mas também na erradicação da doença em focos de leptospiroses. Nos rebanhos bovinos abertos, a vacinação deve ser feita a cada seis meses.

Considerando-se os trabalhos citados, sabe-se que existem relações antigênicas entre *hardjo* e *wolffi* e que a *hardjo* é pouco imunogênica, uma vez que produz baixos títulos de anticorpos que duram pouco tempo. Por outro lado, *wolffi* tem-se mostrado apatogênica e possui poucas exigências laboratoriais, quando comparada à *hardjo*, além de conferir altos títulos aglutinantes a animais que tenham sido inoculados com amostras puras de *hardjo*.

Pelo presente trabalho, pode-se afirmar que vacina monovalente contendo *wolffi* protege hamsters do desafio com *hardjo*, mostrando que, nessa espécie (*Mesocricetus auratus*), há imunidade cruzada.

Novos estudos devem ser efetuados no sentido de selecionar amostras imunogênicas para produção de vacinas. Constatando-se imunidade cruzada também em bovinos, menos sorovariedades poderão ser incorporadas à vacina, possibilitando menor custo de produção e evitando títulos desuniformes nos animais vacinados.

6 CONCLUSÕES

- 1- Em hamsters, bacterina contendo a sorovariedade *wolffi* conferiu imunidade frente ao desafio com *hardjo*.
- 2- Existem reações cruzadas entre *hardjo* e *wolffi* também em hamsters.
- 3- O fígado é o melhor indicador para avaliar infecção por *hardjo* em hamsters.

SUMMARY

The cross-immunity between *Leptospira hardjo* and *L. wolffi* was experimentally evaluated in four groups of adult healthy golden hamsters. Each animal in groups I and II were vaccinated, respectively with *hardjo* and *wolffi*. 18 days after the vaccination, all the animals, except those in the negative control group, received a challenge dose of a virulent sample of *hardjo*. This sample was 100 X (times) greater than the infectious dose (ID 50) of *hardjo* previously activated through serial passages in hamsters. The achieved protection was evaluated by the direct finding of leptospiras (slides silver stained: Warthin-Starry and cultures of macerated organs in Fletcher and in modified EMJH media). Clinical signs and histological lesions in liver, kidney and lungs HE stained slides were also analysed to detect the presence of leptospiras. The sera titres of the hamsters was tested by fast microagglutination in plates. The results strongly suggested that the vaccination of the animals either with *hardjo* or *wolffi* developed immunity against the *hardjo* strain.

Key-words: *hardjo*, vaccine, golden hamster.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUCHAIM, D.M., DUTRA, N.L.F. Prevalência da leptospirose em bovinos da bacia leiteira de Porto Alegre-RS. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, v.13, p.55-60, 1985.
- ÁVILA, J.A., COSTA, A.J., MORAES, F.R., PINHEIRO, L.E.L., MANGERONA, A.C.S. Pesquisa de aglutininas anti-*leptospira* em soros de bovinos do município de Jaboticabal, Brasil. **Científica**, v.6, n.3, p.451-453, 1978.
- AYCARDI, E.R., RIVIERA, B., TORRES, B., BOHORQUEZ, V. Experimental infection with a *Leptospira hardjo* strain isolated from cattle of the eastern plain of Colombia. **Veterinary Microbiology**, v.7, n.6, p.545-550, 1982.
- AYCARDI, E.R., TORRES, B., GUZMAN, V.H., CORTÊS, M. Leptospirosis in Colombia. Isolation of *Leptospira hardjo* from beef cattle grazing tropical savannas. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.22, p.73-77, 1980.
- BARBOSA, M. Aglutininas e lisinas anti-leptospiras em soros de bovinos, equinos e suínos em Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária U.M.G.**, v.14, p.1-27, 1962.
- BENNETT, R.M. Decision support models of leptospirosis in dairy herds. **The Veterinary Record**, v.132, n.1, p.59-61, 1993.

- BLACKMORE, D.K. & SCHOLLUM, L.M. Leptospirosis: a neglected health hazard in the meat industry? In: **Proceedings of the 26th European Meeting of Meat Research Workers**, 31 August-5 September, 1980, Colorado, v.2, p.313-315, 1980.
- BOLIN, C.A., CASSELLS, J.A., ZUERNER, R.L., TRUEBA, G. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* vaccine on type *hardjo-bovis* infection of cattle. **American Journal Veterinary Research**, v.52, n.10, p.1639-1643, 1991.
- BOLIN, C.A., THIERMANN, A.B., HANDSAKER, A.L., FOLEY, J.W. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccines on *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* infection of pregnant cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.1, p.161-165, 1989.
- BROUGHTON, E.S., MARSHALL, R.B., LITTLE, T.W.A., HATHAWAY, S.C., MACKINTOSH, C.G. & HELLSTROM, J.S. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* vaccines in cattle: immunogenicity of vaccines prepared from cultures grown in a protein-free medium. **Preventive Veterinary Medicine**, v.2, p.423-433, 1984.
- CORRÊA, C.N.M., GOTTSCHALK, A.F., CORRÊA, W.M., SILVA, A.S., TERUYA, J.M. Brucelose e leptospirose bovina em São Manuel, Estado de São Paulo. Inquérito sorológico. **O Biológico**, n.2, p.46-51, 1972.
- ELLINGHAUSEN JR. & H.C., McCULLOUGH, W.G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American Journal of Veterinary Research**, v.26, n.110, p.45-51, 1965.

- ELLIS, W.A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive Veterinary Medicine**, v.2, n.1-4, p.411-421, 1984.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis. **Journal of Small Animal Practice**, v.27, n.10, p.683-692, 1986.
- ELLIS, W.A., O'BRIEN, J.J., CASSELS, J. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype *hardjo* infection in Northern Ireland. **Veterinary Record**, v.108, n.26, p.555-557, 1981.
- ELLIS, W.A., O'BRIEN, J.J., CASSELS, J.A., NEILL, S.D., HANNA, J. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* following calving or abortion. **Research in Veterinary Science**, v.39, p.296-298, 1985.
- ELLIS, W.A., O'BRIEN, J.J., NEILL, S.D., HANNA, J. Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. **The Veterinary Record**, v.110, n.8, p.178-180, 1982.
- FAINE, S. **Guidelines for the Control of Leptospirosis**. W.H.O. offset publication n.67. World Health Organization, Geneva, 1982.
- FOX, J.G., COHEN, B.J., LOEW, F.M. **Laboratory Animal Medicine**. American College of Laboratory Animal - Medicine Series, London, 750p., 1984.
- FREITAS, D.C., LACERDA JR., P.M.G., VEIGA, J.S., LACERDA, J.P.G. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. **Revista Faculdade Medicina Veterinária São Paulo**, v.6, n.1, p.81-83, 1957.

- GALTON, N.M., MENGES, R.W., SHOTTS JR., E.B., NAHMIAS, A.J., HEATH, C.W. *Leptospirosis: epidemiology clinical manifestation in man and animals, and methods in laboratory diagnosis. Public Health Series, 951.* Washington, D.C., Public Health Organization, 1962.
- GIORGI, W., TERUYA, J.M., SILVA, A.S., GENOVEZ, M.E. *Leptospirose: resultados das soro-aglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1974/1980. Biológico, v.47, n.11, p.299-309, 1981.*
- GIRIO, R.J.S. & MATHIAS, L.A. Use a saprophytic *Leptospira* strain in the serodiagnosis of experimental leptospirosis in guinea pigs. *Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo, v.30, n.2, p.91-94, 1988.*
- GRÉGOIRE, N., HIGGINS, R., ROBINSON, Y. Isolation of leptospire from nephritic kidneys of beef cattle at slaughter. *American Journal of Veterinary Research, v.48, n.3, p.370-371, 1987.*
- HANSON, L.E.. *Leptospirosis.* In: **Current Veterinary Therapy; Food Animal Practice 2**, Toronto, Canada; W.B. Saunders Company, p.594-596, 1986.
- HANSON, L.E., TRIPATHY, D.N., KILLINGER, A.H. Current status of leptospirosis immunization in swine and cattle. *Journal of American Veterinary Medicine Association, v.161, p.1235-1243, 1972.*
- HANSON, L.E. & TRIPATHY, D.N. *Leptospira.* In: GYLES, C.L., THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals.** Ames: Iowa State University, 1986. p.200-204

- HATHAWAY, S.C. & LITTLE, T.W.A. Epidemiological study of *Leptospira hardjo* infection in second calf dairy cows. **The Veterinary Record**, v.112, n.9, p.215-218, 1983.
- INGH, T.S.G.A.M. van den & HARTMAN, E.G. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae* infection in the syrian hamster. **Veterinary Microbiology**, v.12, p.367-376, 1986.
- JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals** 4.ed. San Diego: Academic Press, 1993. 3v.
- KINGSCOTE, B.F., The diagnosis of *Leptospira* serovar *hardjo* infection in cattle in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v.26, p.270-274, 1985.
- LACERDA JR., P.M.G., FREITAS, D.C., LACERDA, J.P.G. Notas sobre leptospirose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.27, p.86-91, 1960.
- Le FEBVRE, R.B. DNA probe for detection of the *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* genotype *hardjo-bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.11, p.2236-2238, 1987.
- LITTLE, T.W.A., HATHAWAY, S.C., BOUGHTON, E.S., SEAWRIGHT, D. Development of a control strategy for *Leptospira hardjo* infection in a closed beef herd. **The Veterinary Record**, v.131, p.383-386, 1992.
- LUNA, L.G. **Manual of histologic stainine methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3ed., New York, McGraw Hill. 1968, 258p.

- MADRUGA, C.R., AYCARDI, E., PUTT, N. Frequência de aglutininas anti-*leptospira* em bovinos de corte da região de cerrado do Estado de Mato Grosso. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v.32, n.2, p.245-249, 1980.
- MILLER, D.A., WILSON, M.A., BERAN, G.W. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.11, p.1761-1765, 1991.
- MORAIS, M.H.F. Isolamento de *Leptospira hardjo* em rebanho bovino com problemas de reprodução. Belo Horizonte-Escola de Veterinária-UFMG, 1994. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Curso de Pós-Graduação em Epidemiologia, 1994.
- MOREIRA, E.C. Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Belo Horizonte-Escola de Veterinária da UFMG, 1994, 95p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia), 1994.
- MOREIRA, E.C. Epidemiologia e controle das leptospiroses em bovinos no Brasil. In: Seminário apresentado para a prova de Professor Titular, 1994, Belo Horizonte. Escola de Veterinária da UFMG, 30 p., 1995.
- MOREIRA, E.C., SILVA, J.A., VIANA, F.C., MOREIRA, W.L. Leptospiroses bovina: I- Pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. In: ENCONTRO DE PESQUISAS, VII, 1978, Belo Horizonte. **Anais**. Escola de Veterinária da UFMG, p.81, 1978.

- MOREIRA, E.C., SILVA, J.A., VIANA, F.C., SANTOS, W.L.M., ANSELMO, F.P., LEITE, R.C. Leptospirose bovina: I-Aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v.31, n.3, p.373-388, 1979.
- MYERS, D.M. **Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis**. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis, 47p. (Nota Técnica n.30), 1985.
- MYERS, D.M. & JELAMBI, F. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Argentina. **Tropical and Geographical Medicine**, v.27, p.63-70, 1975.
- OLIVEIRA, S.J., PIANTA, C., GOMES, M., SANTIAGO, C. Abortos em bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. Isolamento de leptospiras do sorogrupo Hebdomadis. **Boletim Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"**, v.7, p.51-56, 1980.
- REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v.27, n.3, p.493-497., 1938.
- RIBEIRO, S.C.A. **Alguns Aspectos Epidemiológicos da Infecção por *Leptospira interrogans*, numa fazenda de Minas Gerais, Brasil**. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1983, 42p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 1983.
- ROTH, E.E. & GALTON, M.M. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Louisiana. **American Journal of Veterinary Research**, p.422-427, 1960.

- RUIZ, V.M.B., RUBLO, E.L., SÁNCHEZ, P.M. Eficiencia del hidroxido de aluminio, vitaminas liposolubles y levamisol, empleados en una bacterina de *Leptospira* en vaquillas, para la generacion de anticuerpos específicos. **Técnica Pecuaria en Mexico**, v.29, n.3, p.139-143, 1991.
- RYU, E. Rapid microscopic agglutination test for leptospirosis based on 400 x magnification of dark field examination. **Journal Veterinary Medicine and Animal Illustrated**, n.17, p.1-9, 1970.
- SANTA ROSA, C.A., CASTRO, A.F.P., SILVA, A.S., TERUYA, J.M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.29, n.30, p.19-27, 1969/70.
- SIDDIQUE, J.H. & SHAH, S.M. Evaluation of polyvalent leptospiral vaccine in hamsters. **Indian Veterinary Journal**, v.67, n.11, p.1006-1010, 1990.
- STOENNER, H.G. Application of serologic findings to the diagnosis of leptospirosis. **Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v.76, p.622-634, 1972.
- SULLIVAN, N.D. & STALLMAN, N.D. The isolation of a strain of *Leptospira*, serotype *hardjo*, from cattle in Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.45, p.281-283, 1969.
- TERUYA, J.M., SILVA, A.S., CASTRO, A.F.P., GIORGI, W. Soro-aglutinações para leptospirose realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante o ano de 1973. **O Biológico**, v.40, p.228-232, 1974.

- THIERMANN, A.B. Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, n.5, p.780-784, 1982.
- THIERMANN, A.B. Leptospirosis: current developments and trends. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.184, n.6, p.722-725, 1984.
- THIERMANN, A.B. Bovine leptospirosis: Bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, n.12, p.2244-2245, 1983.
- THIERMANN, A.B. & GARRETT, L.A. Enzyme-linked-immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* and *pomona* in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, p.884-888, 1983.
- TRIPATHY, D.N., HANSON, L.E., MANSFIELD, M.E. Evaluation of the immune response of cattle to leptospiral bacterins. **American Journal of Veterinary Research**, v.37, n.1, p.51-55, 1976.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Internal Reference Guide for Potency Assay of *Leptospira interrogans* serotype *grippotyphosa* bacterins. USDA Veterinary Services, Ames, IA, 1976.
- VAZ, A.K. & OLIVEIRA, S.J.de Títulos aglutinantes para *Leptospira* de touros usados em inseminação artificial no Rio Grande do Sul. **Boletim Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"**, v.5, p.23-26, 1978.
- VENUGOPAL, K. & RATNAM, S. Preparation and standardisation of trivalent leptospiral vaccine. **Indian Veterinary Journal**, v.68, n.2, p.108-111, 1991.

WILLIAMS, H.A., OLIVEIRA, S.J., RIBEIRO, L.A.O.
Leptospirose como causa de aborto em um rebanho bovino no
Rio Grande do Sul. **Boletim Instituto de Pesquisas
Veterinárias "Desidério Finamor"**, v.3, p.73-81, 1975.

YORK, C.J. Immunology and prophylaxis of leptospirosis.
Veterinary Medicine, v.52, n.11, p.563-570, 1957.

ZAMORA, J., RIEDEMANN, S., FRÍAS, M. Leptospirosis bovina.
Aislamiento de los serovares *hardjo bovis* A y *portlanvere*.
Archivs Medicine Veterinary, v.20, n.2, p.136-140, 1988.