

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO
MACROSCÓPICA PARA DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE EM
SUÍNOS.

GERSON SILVA DE LIMA

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

**PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO
MACROSCÓPICA PARA DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE
EM SUÍNOS**

GERSON SILVA DE LIMA

Sob a Orientação do Professor
Walter Flausino

Dissertação submetida
como requisito parcial
para obtenção do grau
de Mestre em
Microbiologia
Veterinária.

Seropédica, RJ

Outubro de 2008

636.089696

9

L732p

T

Lima, Gerson Silva de, 1963-
Padronização de um teste de
soroaglutinação macroscópica para
diagnóstico da leptospirose em
suínos / Gerson Silva de Lima -
2008.

50f. : il.

Orientador: Walter Flausino.
Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Microbiologia Veterinária.

Bibliografia: f. 37-50

1. Microbiologia veterinária -
Teses. 2. Leptospirose -
Diagnóstico - Teses. 3. Suíno -
Doenças - Teses. 4. Leptospirose em
animais - Teses. I. Flausino,
Walter, 1953-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em
Microbiologia Veterinária. III.
Título.

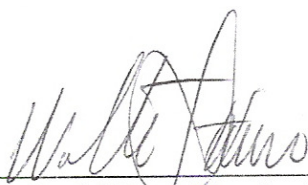
Bibliotecário: _____ **Data:** ____/____/____

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

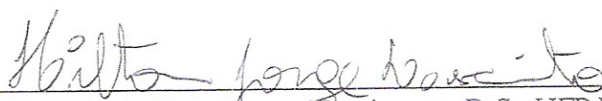
GERSON SILVA DE LIMA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária.

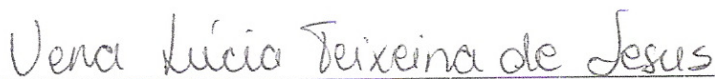
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/10/2008



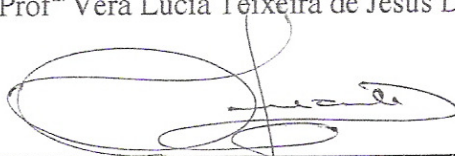
Prof. Walter Flausino D.Sc Ph.D UFRRJ
(Orientador)



Prof. Hilton Jorge Nascimento D.Sc UFRJ



Prof.^a Vera Lucia Teixeira de Jesus D.Sc UFRRJ



Prof. Antonio Nascimento Duarte D.Sc. ENSP/FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

*A minha esposa, Luzia e as minhas filhas Twane e Thamiris, as razões da minha vida, sem as
quais não poderia ter dado mais este passo.*

Aos meus pais José e Tereza pela minha formação.

Aos amigos de sempre que ajudaram até hoje.

E a Deus sempre presente em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a formulação e conclusão deste trabalho.

Em especial, ao Dr. Walter Flausino (Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Departamento de Parasitologia, UFRuralRJ), pela orientação, amizade e dedicação.

Aos Drs. Carlos Wilson e Walter Leira Teixeira Filho (Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Departamento de Parasitologia, UFRuralRJ), por todas recomendações e sugestões.

Ao Emilson Domingos da Silva (Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP/FIOCRUZ) pelo companheirismo, ajuda e apoio em todas as horas.

Ao professor Roberto M. Yanaguita pela confiança em disponibilizar seu ultimo exemplar de tese para consulta.

Ao Gerente de Projeto Pedro Paulo Ferreira Ribeiro de ajuda na elaboração da tese.

Ao Tecnologista Fernando José Vasconcelos (Laboratório Nacional de Referencia para Leptospirose-IOC/FIOCRUZ), pela ajuda nas sorologias.

A Biotecnologista Rafaela Lopes Diniz por ter compreendido minhas ausências e ajudado em todas as horas no Laboratório.

Ao amigo Biólogo Marcelo Oliva pela amizade e ajuda e companheirismo.

A Lidiane de Castro Soares pela ajuda na elaboração da Tese.

Ao Dr. Marcelo Pinto (IOC/FIOCRUZ) por possibilitar as idas nas coletas de amostras no município Pirai.

Ao médico veterinário Cláudio Rogério Rocha de Almeida (Emater-RJ, Rio Claro), por possibilitar as coletas no município de Rio Claro.

Ao Dr. Raouf Emile Sykora e Marco Lemos pelo apoio e incentivo.

Aos amigos de laboratório da Fiocruz pela ajuda e compreensão e paciência.

A todos os proprietários das criações, por permitirem o acesso e a coleta das amostras.

BIOGRAFIA

GERSON SILVA DE LIMA, filho de Jose Barbosa de Lima e Tereza Silva de Lima, brasileiro, nasceu em 30 de dezembro de 1963, no município do Rio de Janeiro, RJ.

Iniciou sua formação profissional em 1982, ingressando no Curso Técnico em Pesquisa em Biologia Parasitária da Fundação Oswaldo Cruz, onde se diplomou em Técnico em Laboratório de pesquisa. Trabalhou no Instituto Oswaldo Cruz nos Departamento de Micologia, Bacteriologia de 1983 a 1985.

Em 1985 foi contratado como técnico pela Universidade Federal do Rio de Janeiro no Curso de Pos-Graduação em Processos Bioquímicos.

Em 1987 foi contratado pela Empresa Brasileira de Infra-Estrutura Aeroportuário-INFRAERO, como responsável pelo Laboratório de Bacteriologia, em 1989 ingressou na Fundação Oswaldo Cruz com funcionário público no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos onde hoje responde pelo Setor de Bactérias e Recombinantes.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade de Nova Iguaçu em 1988, graduando-se em dezembro de 1992.

Em 2006 ingressou no Mestrado do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária da UFRRJ sob a orientação do Dr. Walter Flausino.

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

Fernando Sabino

RESUMO

Lima, Gerson Silva de. **Padronização de um Teste de Soroaglutinação Macroscópica para Diagnóstico da Leptospirose em Suínos**. 2008. 50 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A leptospirose é considerada um problema global de saúde na área humana e veterinária. É uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*, prevalente em todos os continentes. O desenvolvimento de um teste de soro aglutinação macroscópica eficaz contra a leptospirose se justifica, já que os existentes são caros, trabalhosos e restritos a laboratórios especializados. No Brasil, a leptospirose em suínos tem sido uma das principais causas de falhas reprodutivas em vários estados, principalmente nas regiões sul e sudeste do país. Dentre os animais de produção explorados em ecossistemas rurais os suínos apresentam as manifestações clínicas mais frequentes na esfera reprodutiva com abortamentos, usualmente no terço final da gestação. A infertilidade, a esterilidade o nascimento de leitões debilitados que morrem nos primeiros dias de vida são sinais da presença da bactéria nas matrizes reprodutoras. No presente estudo, utilizou-se seis formulações de suspensões antigênicas dos sorovares *pomona*, *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni* em forma de suspensão única ou em combinações de dois sorovares. Foram testadas frente a soros de suínos sem suspeita clínica de leptospirose comparando com a soroaglutinação microscópica que é o teste aceito como padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Dentre as seis suspensões propostas a combinação dos sorovares *pomona* + *icterohaemorrhagiae* apresentou o melhor resultado. Os resultados obtidos demonstraram um percentual de 89% de sensibilidade e 89% de especificidade para a suspensão com a combinação dos sorovares *pomona* + *icterohaemorrhagiae* e de 87% de valor preditivo positivo e 90% de valor preditivo negativo para a mesma combinação, comprovado pelos métodos estatísticos Qui-quadrado, Kappa e Modelo Linear Logístico. Dada à importância da leptospirose em suínos e o impacto econômico que causa mundialmente, além da carência de informações atuais, este trabalho teve por objetivo desenvolver um teste rápido de triagem para diagnóstico em suínos mantidos em criações rurais de diferentes regiões e tamanhos no Estado do Rio de Janeiro.

Palavras chave: Leptospirose; Diagnóstico; Macroaglutinação; suínos.

ABSTRACT

Lima, Gerson Silva de. **Standardization of a Macroscopic Seroagglutination test for the diagnostic of leptospirosis in pigs.** 2008. 50 p. Dissertation (Master in Veterinary Microbiology). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Leptospirosis is considered a global health problem in human and veterinary medicine. It is a zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Leptospira*, prevalent on every continent. The development of an effective macroscopic serum agglutination test against leptospirosis is justified, since the available ones are expensive, cumbersome and restricted to specialized laboratories. In Brazil, leptospirosis in pigs has been a major cause of reproductive failure in several states, mainly in the south and southeast regions of the country. Among the animals used in production of rural ecosystems, pigs have the most frequent clinical manifestations in the reproductive sphere with abortions, usually in the final third of pregnancy. Infertility, sterility or birth of debilitated or dead pigs which dies in the first days of life are signs of the presence of the bacteria in the breeding matrix.

In the present study, six suspensions formulations of antigenic serovars pomona, icterohaemorrhagiae and copenhageni were used in single suspension form or in two serovars combinations. These were tested against pig serum with no clinical suspicion of leptospirosis compared with the microscopic agglutination test that is accepted as the gold standard by the World Health Organization (WHO). Among the six proposed suspensions the combination of serovars pomona + icterohaemorrhagiae showed the best result. The results demonstrates a percentage of 89% sensitivity and specificity of 89% for the suspension with the serovars combination of pomona + icterohaemorrhagiae and 87% for positive predictive value and 90% negative predictive value for the same combination, demonstrated by the statistics methods such as Chi-square, Kappa and Linear Logistic Model. Given the importance of leptospirosis in pigs and economic impact that it causes worldwide, in addition to the lack of current information, this study aimed to develop a screening rapid test for the diagnosis of pigs kept in variable dimension farms from rural regions of the Rio de Janeiro state.

Keywords: Leptospirosis; Diagnosis; Macroagglutination; pig.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Localidade, local de coleta e data das coletas das amostras de sangue dos suínos na região rural, Municípios de Piraí e Rio Claro no Estado do Rio de Janeiro, RJ.....	22
Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar “ <i>pomona</i> ” e da macroaglutinação com a suspensão “A” <i>pomona</i> , para diagnóstico da leptospirose suína.....	24
Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar “ <i>icterohaemorrhagiae</i> ” e da macroaglutinação com a suspensão “B” <i>icterohaemorrhagiae</i> , para diagnóstico da leptospirose suína.....	25
Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar “ <i>copenhageni</i> ” e da macroaglutinação com a suspensão “C” <i>copenhageni</i> , para diagnóstico da leptospirose suína.....	26
Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar <i>pomona</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i> ” e da macroaglutinação com a suspensão “D” <i>pomona</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i> , para diagnóstico da leptospirose suína.....	27
Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com os sorovares “ <i>pomona</i> e <i>copenhageni</i> ” e da macroaglutinação com a suspensão “E” <i>pomona</i> e <i>copenhageni</i> , para diagnóstico da leptospirose suína.....	28
Tabela 7. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar “ <i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>copenhageni</i> ” e da macroaglutinação com a suspensão “F” <i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>copenhageni</i> , para diagnóstico da leptospirose suína.....	29
Tabela 8. Probabilidade de ocorrência de positivo ou falso positivo através do Modelo Linear Logístico.....	31
Tabela 9. Resultados comparativos dos testes de avaliações das suspensões antigênicas.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Foto de microscopia eletrônica de leptospira (Universidade de Cornell USA, 01/11/07).....	4
Figura 2. Foto de um aborto provocado pela leptospirose. (CanalTortuga,06/07/2005).....	10
Figura 3. Foto de reação de soroaglutinação macroscópica. (Fonte: manual de instrução kit macroaglutinação/FIOCRUZ).....	19
Figura 4. Mapa das Microrregiões do Estado do Rio de Janeiro. (IBGE, 2008.).....	23
Figura 5. Comparação das sensibilidades e especificidades das suspensões.	33
Figura 6. Comparação dos valores preditivos positivos e valores preditivos negativo.....	34
Figura 7. Probabilidade de ocorrência de positivos ou falsos positivos.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Histórico.....	2
2.2. A Leptospirose.....	2
2.3. O Agente etiológico.....	3
2.4. Características gerais.....	4
2.5. Classificação.....	5
2.6. Leptospirose em humanos.....	6
2.7. Leptospirose em animais.....	6
2.8. Caracterização da leptospirose suína.....	7
2.9. Patogenia da leptospirose suína.....	8
2.10. Epidemiologia.....	10
2.11. Patogenia.....	11
2.12. Diagnóstico.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Origem das Amostras de soros.....	16
3.2. Coleta e Processamento das Amostras.....	16
3.3. Preparação do Antígeno.....	17
3.4. Soroaglutinação Microscópica.....	17
3.5. Triagem.....	17
3.6. Titulação.....	18
3.7. Soroaglutinação Macroscópica.....	19
3.8. Avaliação Estatística.....	20
3.9. Etapas.....	21
3.10. Suspensões propostas.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÃO.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose constitui-se em um sério problema de Saúde Pública e durante muitos anos tem causado preocupação tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária e os suínos representam importante elo de transmissão.

A leptospirose é uma doença aguda infecciosa, auto-limitada geralmente de caráter ocupacional provocada por uma bactéria do gênero *leptospira* amplamente distribuída no mundo, tendo homens e animais afetados uma importância médica e econômica. A bactéria leptospira possui um grande número de reservatórios, tais como artrópodes, anfíbios e mamíferos, é comumente transmitida pela urina do rato e é considerado hospedeiro natural, ao se infectarem não desenvolvem a doença, mais podendo causar alterações importantes, inclusive reprodutivas em animais apresentando um grande índice de abortamentos.

A leptospirose em humanos possui um quadro clínico polimórfico, apresentando formas desde gripal, meningítica, encefalítica, pulmonar até a icterohemorrágica, que é considerada mais grave, com quadro de insuficiência renal aguda, hepática e sangramentos. Em animais a leptospirose é uma zoonose bacteriana associada, principalmente com infertilidade e baixa produção. A doença possui difícil diagnóstico pela falta de sinais clínicos característicos, e pelas mudanças no padrão de infecção. Dentre os animais de produção, mais particularmente dos suínos explorados em ecossistemas rurais, as manifestações clínicas mais frequentes atingem a esfera reprodutiva, incluindo o abortamento, em qualquer fase de gestação. Em algumas ocasiões, as matrizes atingidas podem apresentar infertilidade ou mesmo esterilidade. Alguns sinais clínicos em particular podem ser observados de acordo com a espécie animal e em determinadas faixas etárias. A falta de trabalhos utilizando sorovares de *L. interrogans* para o diagnóstico da leptospirose animal, em especial a leptospirose suína, levou-nos a investigar qual seria o comportamento dos sorovares de leptospiros em soros de suínos sem suspeita clínica de desta doença. Baseando-se nestes fatos, este trabalho teve por objetivos padronizar uma metodologia através da soroaglutinação macroscópica, e formular um “kit” a ser utilizado como prova de triagem no diagnóstico da leptospirose em suínos de acordo com as normas exigidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico

De acordo com o MANUAL DE LEPTOSPIROSE, (1997) a doença foi descrita pela primeira vez em 1880, no Cairo, por LARREY sendo posteriormente mencionado por ADOLF WEIL em 1886, quatro casos de leptospirose em humanos, tendo o seu nome, ainda hoje, associado às formas graves da doença, denominada Síndrome de Weil. O agente etiológico da leptospirose foi isolado pela primeira vez em 1915, no Japão (INADA et al., 1915).

A partir de então, leptospirosas foram identificadas como causa de diversas síndromes no homem e em animais (ALSTON, 1958). Com passar dos anos, a doença assumiu um papel de importância tanto para humanos como para animais mostrando os prejuízos a economia pecuária pelo mundo (CORTES, 1983). Em 1954, WOLFF e BROOM sugeriram um sistema de classificação com bases em análises antigênicas que incluía 34 sorotipos de leptospirosas em humanos isoladas e animais. Em 1962 o Grupo de Pesquisa em leptospirose da Organização Mundial de Saúde recomendou a divisão do gênero *Leptospira* em duas espécies: *Leptospira biflexa* como as saprófitas e *Leptospira interrogans* que envolve as espécies patogênicas (WHO, 1967).

No Brasil, os primeiros relatos descrevendo a presença de leptospirose em ratos na cidade do Rio de Janeiro, datam de 1917 (ARAGÃO, 1918) e (CARINI, 1918). Através dos estudos sobre leptospirose animal realizados por pesquisadores do Instituto Biológico de São Paulo, levantou-se a possibilidade de diferentes espécies serem possíveis fontes de infecção em humanos (Ministério da Saúde, 1997).

2.2. A Leptospirose

A leptospirose é classificada como uma antropozoonose direta que ocorre de forma endêmica mundialmente. Ela é causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* e tem sido considerada nos últimos 10 anos como uma doença emergente que afeta humanos e

diversas espécies de animais domésticos e silvestres (McBRIDE et al., 2005), conhecida como a febre da queda ou a febre da lama (PICKERING, 2006; COHEN, 2004).

O ressurgimento do interesse no controle da leptospirose deve-se a sua ocorrência como epidemia, tanto em países de clima tropical, subtropical ou temperado, desenvolvidos ou em desenvolvimento (BHARADWAJ, 2004). O Brasil e a China são os países em que a leptospirose é tida como um dos maiores problemas de saúde pública (McBRIDE et al., 2005). O aumento na incidência de casos costuma ocorrer durante os períodos de chuva e enchentes, resultando em perdas de importância econômica e social. Na América do Sul e Central esses períodos têm sido intensificados pelo fenômeno climatológico “El Niño” (KO et al., 1999; PLANK; DEAN, 2000; LEVETT, 2001), que é caracterizado por um significativo aumento nos níveis pluviométricos.

2.3. O Agente etiológico

A ordem Spirochaetales se subdivide em duas famílias. A família *Leptospiraceae* que compreende os gêneros *Leptonema*, *Turneria* e *Leptospira* e a família *Spirochaetacea* que inclui os gêneros *Borrelia* e *Treponema* (FAINE, 1999). Filogeneticamente, análises baseadas no seqüenciamento do 16S rDNA classificam *Leptonema* como um grupo a parte e dividem o gênero *Leptospira* em dois grupos: um formado por espécies patogênicas (*L. interrogans*) e outro por não patogênicas (*L. biflexa*) (FAINE, 1999). Em laboratório as espécies saprófitas são diferenciadas das patogênicas por crescerem a 13° C, e por sua incapacidade de formar células esféricas em 1 M de NaCl (LEVETT, 2001).

O gênero *Leptospira* é bastante diverso, contendo vários sorovares. Estes são antigenicamente distintos, devido a mudanças na composição do LPS (lipopolissacarídeo) (ZUERNER et al., 2000). Tradicionalmente, *Leptospira spp.* é subdividida em mais de 250 sorovares. Estes são agrupados em sorogrupos de acordo com seus determinantes antigênicos, através do teste de microaglutinação (MAT) (FAINE, 1999).

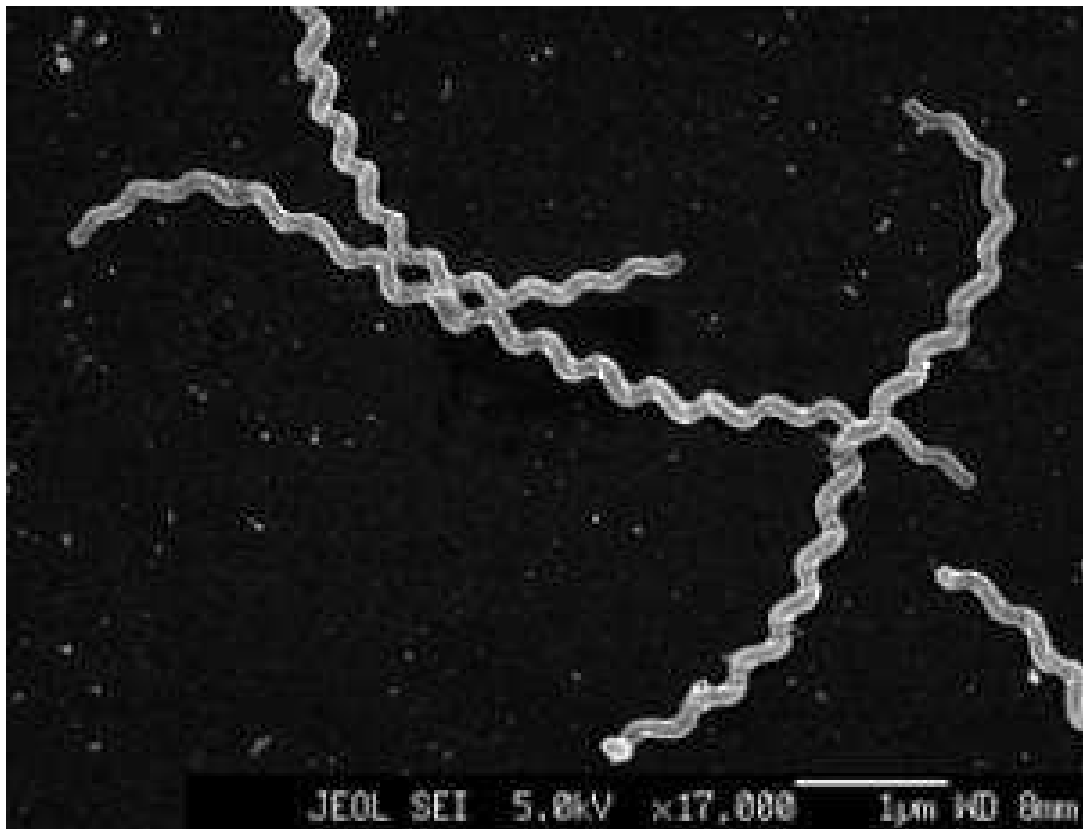


Figura 1. Foto microscopia eletrônica de leptospira (Universidade de Cornell-USA 01/11/07).

2.4. Características gerais

As espiroquetas que compõem *Leptospira* spp. são microrganismos móveis, filamentosos e espiralados, que somente podem ser visualizados em microscopia de campo escuro e de contraste de fase (FAINE, 1999). Seu tamanho é de 0,1 a 0,2 µm de diâmetro e de 6 a 20 µm de comprimento, com uma ou as duas extremidades curvadas como um ponto de interrogação (daí a denominação interrogans). Sua mobilidade deve-se a filamentos axiais dispostos um em cada pólo da célula, apresentando estrutura protéica complexa (FAINE, 1999) (figura 1). A membrana externa das leptospiras compartilha características tanto com bactérias Gram-positivas como com as Gram-negativas (ZUERNER et al., 2000), sendo que a porção lipopolissacarídica da célula tem composição similar a outras bactérias Gram-negativas (VINH; ADLER; FAINE, 1986). As leptospiras e as bactérias gram-negativas têm uma membrana externa que funciona como uma barreira permeável,

protegendo-as de condições de stress, tanto no meio externo quanto nos tecidos do hospedeiro (SHANG et al, 1996).

As bactérias não coradas são visíveis por microscopia de contraste de fase ou por microscopia de campo escuro, as leptospiros são quimioorganotróficas, utilizando ácidos graxos ou álcoois graxos, possuindo 15 ou mais átomos de carbono como fonte de energia. Não utilizam carboidratos ou aminoácidos como fonte de energia. Soro ou albumina sérica é necessária para o crescimento (JOHNSON & WALBY, 1972).

2.5. Classificação

Embora a reclassificação das leptospiros utilizando determinantes genéticos forneça informações taxonômicas relevantes, ela se desenvolve independentemente à classificação sorológica, que é mais aceita entre microbiologistas e epidemiologistas (BHARTI et al., 2003). As leptospiros são bactérias aeróbias estritas que crescem a temperatura de 28 a 30° C em meios simples. O crescimento é lento e as culturas podem levar semanas até aparecerem amostras positivas. As espécies patogênicas, ao contrário das saprófitas, não se multiplicam em condições naturais fora de um hospedeiro, mas sobrevivem em solo úmido, com pH ligeiramente alcalino e com baixa salinidade. Os sorovares patogênicos são mais sensíveis à radiação ultravioleta em relação aos saprófitas e, quando não expostos a esta, sua sobrevivência pode se estender até seis meses (VINETZ, 2001). Em período anterior ao ano de 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans* e *Leptospira biflexa*. A primeira compreendia as leptospiros patogênicas, enquanto *L. biflexa* abrangia as saprófitas do meio ambiente (FAINE e STALLMAN, 1982). As patogênicas consistiam em mais de 200 sorovares, contidos em 23 sorogrupos. A partir da utilização de técnicas de diagnóstico molecular, leptospiros foram classificadas por hibridização do DNA (RAMADAS et al. 1992). Estudos de hibridização do DNA bacteriano definiram primeiramente 10 espécies de diferentes genomas (YASUDA et al. 1987); a seguir foi definida outra espécie, *L. kirschneri* (RAMADAS et al., 1992). Atualmente estão definidas 16 espécies. Estas diferem pelo genoma e não correspondem às duas espécies anteriormente definidas *L. interrogans* e *L. biflexa*. Podem ocorrer sorovares patogênicos e não patogênicos pertencendo à mesma

espécie. Estudos demonstraram heterogenicidade genética entre sorovares (BRENNER et al., 1999; FERREZU et al., 1999).

2.6. Leptospirose em humanos

A leptospirose como doença emergente, (RATHINAM, et al, 1997), cuja ocorrência, na forma de surtos em humanos ou animais, tem sido registrada em vários países associada as diferentes circunstâncias, prática de esportes e lazer (KATZ et al., 1997), em atividades ocupacionais (PERROCHEAU & PEROLAT, 1997) ou, apresentando sintomatologia diferenciada da forma clássica descrita (ZARI & SHIEH, 1996).

A leptospirose, classicamente, tem sido associada a determinadas categorias ocupacionais como, trabalhadores em abatedouros, tratadores de animais, médicos veterinários e Saneamento ambiental (ACHA & SZYFRES 1986).

Apesar disso, alguns autores têm sugerido o envolvimento de leptospiras como variáveis sociais na ocorrência da doença (EVERARD *et al.*1995; ANDRADE & BRANDÃO, 1987). O conhecimento da frequência de infecção antileptospira e de seus determinantes em populações de trabalhadores pode ser de grande valor para orientar as ações preventivas de saúde.

2.7. Leptospirose em animais

Estudos sorológicos para determinação da proporção de animais soro-reativo para a leptospirose, têm sido realizados no Brasil, particularmente em animais de produção e companhia. Em algumas situações houve planejamento para determinação de prevalência (MOREIRA, et al., 1979; SOUZA, 2000; HOMEM et al., 2001; MASCOLLI et al., 2002; MARVULO et al., 2002-b), em outras retratam o monitoramento de rebanhos (ALVES et al., 1997) e em outras são relatórios retrospectivos de serviços de diagnóstico que recebem soros de animais ou rebanhos com suspeita clínica (SANTA ROSA et al., 1969/1970, GIORGI et. Al., 1981, FÁVERO et. al., 2000).

No Brasil as relações entre sorovar de leptospira e os hospedeiros preferenciais mais frequentes variam segundo a região, no entanto de uma forma geral os registros predominantes são: roedor sinantrópico: *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni*; marsupiais:

grippotyphosa; bovídeos: *hardjo*, *wolffi*, *hebdomadis*; suínos: *pomona*, *icterohaemorrhagiae*; eqüídeos: *icterohaemorrhagiae*; cães: *canícola*, *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni*; ovinos e caprinos *icterohaemorrhagiae* (VASCONCELLOS, 1997, FÁVERO et al.2001; FÁVERO et al.2002,).

Dentre os animais de produção explorados em ecossistemas rurais, as manifestações clínicas mais freqüentes são as da esfera reprodutiva com abortamento, usualmente no terço final da gestação, infertilidade, esterilidade ou o nascimento de produtos a termo debilitados que morrem nos primeiros dias de vida (GUIMARÃES et al., 1982/1983; ELLIS, 1994; FERREIRA NETO, et al., 1997; DELBEM, et. Al. 2002).

A leptospirose bovina é endêmica no Brasil, sendo freqüente nos rebanhos bovinos, podendo determinar abortamentos, distúrbios reprodutivos (retenção de placenta e natimortos), alterações congênitas, ou infecções inaparentes capazes de comprometer a eficiência reprodutiva do animal, levando-o à subfertilidade (LILENBAUM et al., 1995).

Na leptospirose as fontes de infecção são os animais selvagens, sinantrópicos e domésticos que podem assumir as modalidades de doentes típicos, atípicos ou de portadores sadios - roedores silvestres e sinantrópicos e portadores convalescentes - animais de produção e companhia (CÔRTEZ, 1993).

2.8. Caracterização da leptospirose suína

A leptospirose suína está classificada como uma doença da lista B, no Office International dês Épizooties, grupo ao qual pertencem as doenças transmissíveis de grande importância do ponto de vista sócio-econômico e/ou sanitário, com considerável repercussão no comércio internacional de animais e produtos de origem animal (BLAHA, 1989; PERRY; HEARDY, 2000).

A leptospirose suína é uma importante causa de prejuízos em rebanhos de reprodução e ocorre em suínos de todas as partes do mundo. No entanto, o impacto econômico da doença está restrito a criações industriais do hemisfério Norte, Nova Zelândia, Argentina e Brasil (CLARK, 1996; MAILLOUX, 2001).

No Brasil, a leptospirose em suínos tem sido uma das principais causas de falhas reprodutivas em vários estados, principalmente nas regiões sul e sudeste do país (LANGONI *et al.*, 1995).

2.9. Patogenia da leptospirose suína

A suscetibilidade do suíno em contrair a infecção por leptospiras foi conhecida em 1944, quando Gsell, na Suíça, demonstrou a etiologia da meningite em leitões (SANTA ROSA *et al.*, 1962). A penetração das leptospiras nos suínos ocorre basicamente por contato com pele lesada e mucosas. O período de incubação é de dois a cinco dias, ocorrendo disseminação hematogênica com localização e proliferação em órgãos parenquimatosos, particularmente, fígado, rins, baço e, algumas vezes, as meninges (ROSE 1966).

A leptospiremia dura, em geral, de dois a três dias, representada por uma fase febril discreta. No quarto dia as leptospiras já estão presentes nos rins mais especificamente no lúmen dos túbulos proximais, causando nefrite intersticial (CORREA; CORREA, 1992).

As leptospiras também penetram e multiplicam-se nos fetos, podendo levar à morte e reabsorção fetal, abortamento ou prole fraca. Embora existam muitos sorovares de leptospiras, somente alguns são usualmente endêmicos em determinadas regiões.

As leptospiras tendem a persistir em lugares como túbulos renais, olhos e útero, onde a atividade de anticorpos é mínima (BASTOS, 2006; SARAZÁ; VAZCAÍNO, 2002). ELLIS *et al.* (1986) constataram a persistência de leptospiras em fêmeas suínas que abortaram, confirmando a presença da bactéria nos rins e tecidos genitais em até 147 dias após o abortamento. Quando a infecção acontece durante o terceiro trimestre de gestação, pode ocorrer produção de anticorpos específicos que, ocasionalmente, superam a manifestação da doença (BASTOS, 2006; BORDIN, 1992; CORREA; CORREA, 1992; DANNEBERG *et al.*, 1975; EDWARDS, 1979; ELLIS, 1999; FAINE, 1982; ROSE 1966; SOTO *et al.*, 2006). Estudos com fêmeas suínas desafiadas com *Leptospira interrogans*, sorovar *canicola*, mostraram a transmissão vertical da leptospirose suína com o nascimento de leitões saudáveis. Nestes estudos a identificação da positividade foi realizada pela técnica de PCR utilizando-se diversos órgãos destes animais. Os leitões que

morrem por leptospirose apresentam anemia, às vezes, icterícia; petéquias e sufusões subserosas e submucosas; esplenomegalia; aumento do volume hepático e áreas amareladas irregulares; rins congestos aumentados de volume, com hemorragias corticais em casos bem recentes, e com focos necróticos acinzentados, quando o período de estado passou de sete a dez dias, porém sem aderência de cápsula renal. Em casos mais graves, há presença de petéquias pleurais e hepatização vermelha, em alguns lóbulos pulmonares, e petéquias epi e endocárdicas (Figura 2). Os linfonodos costumam estar aumentados de volume e edematosos (BORDIN, 1992; CORREA; CORREA, 1992).

A leptospirose nos suínos pode se apresentar basicamente nas formas aguda e crônica. Na forma aguda, pode ocorrer febre e mastite focal não supurativa e leptospirúria em animais adultos. Em suínos jovens, principalmente leitões, pode ocorrer febre, anorexia, icterícia, hemoglobinúria e alta mortalidade, principalmente de recém-nascidos. Geralmente, os sorovares associados com este quadro é o *icterohaemorrhagiae*. Também nos animais jovens, durante a fase de aleitamento, podem ocorrer casos de encefalite caracterizados por incoordenação motora e acessos convulsivos com movimentos de pedalamo (FAINE, 1982).

Na forma crônica da leptospirose suína, comum nos animais adultos, pode ocorrer a leptospirúria, geralmente com o sorovar *pomona*, sendo os suínos considerados hospedeiros de manutenção. A infertilidade, com a ocorrência de abortamentos e natimortos, é comum aos sorovares *canicola*, *pomona* e *icterohaemorrhagiae* (BASTOS, 2006; ELLIS, 1999).

A ocorrência da leptospirose em uma criação de suínos no setor de gestação resulta em elevado aumento da infertilidade das fêmeas reprodutoras como retornos de cio acíclicos, anestro e ocorrência de abortamentos, prejudicando a taxa de parto do plantel (EDWARDS, 1979). O número de abortamentos em fêmeas recém-infectadas pode chegar a alguns casos em mais de 20%, geralmente nas jovens e recém-adquiridas.

As fêmeas mais velhas geralmente ficam imunes. Entretanto, na primeira ocorrência da doença no plantel, todas as faixas etárias de fêmeas podem abortar. As fêmeas abortam somente uma vez, desenvolvendo suas gestações posteriores normalmente (DANNEMBERG *et al.*, 1975)(figura 2). No setor de maternidade, são comuns os partos distócicos, baixo número de nascidos totais, mumificação fetal, natimortos, nascimento de leitões fracos que não sobreviverão, aumentando significativamente o índice de mortalidade

destes animais e reduzindo o número de leitões desmamados por porca/ano. (EDWARDS, 1979). Estes dados foram confirmados por FERREIRA NETO *et al.* (1997) em que também relataram um número elevado de nascimento de leitões debilitados de fêmeas suínas sororeagentes para o sorovar *icterohaemorrhagiae*.



Figura 2. Foto de um aborto provocado pela leptospirose (Canal Tortuga, 06/07/2005).

2.10. Epidemiologia

A leptospirose é considerada um paradigma dentre as doenças infecciosas. A globalização e as desigualdades sociais produzem padrões epidemiológicos divergentes para pobres e ricos (McBRIDE *et al.*, 2005). O ciclo de transmissão da leptospirose envolve a interação entre reservatórios animais, um ambiente favorável e grupos humanos susceptíveis. Os fatores de risco associados à infecção dependem, portanto, de características da organização espacial dos ecossistemas e das condições de vida e trabalho da população (MURHEKAR *et al.*, 1998).

Em países desenvolvidos a leptospirose está comumente associada à prática de atividades recreacionais, viagens e esportes aquáticos, como, por exemplo, natação, canoagem, *rafting* e pesca em água doce (PLANK; DEAN, 2000). No entanto, a incidência

é maior nos países quentes e/ou em desenvolvimento, por causa da maior sobrevivência da leptospira e do contacto mais freqüente com animais e ambiente contaminado. A doença é sazonal (verão e outono) nos países temperados, e acompanha a precipitação pluviométrica nos países tropicais (LEVETT, 2001). O diagnóstico ineficiente da infecção associado à doença autolimitante faz com que o número real de casos seja, freqüentemente, subestimado.

2.11. Patogenia

A patogenia da Leptospirose inclui a penetração ativa dos microrganismos através de mucosas (ocular, digestiva, respiratória e gênito-urinária), da pele escarificada e inclusive da pele íntegra, em condições especiais que favoreçam a dilatação dos poros, como ocorre quando da permanência por tempo prolongado em coleções de água contaminada (BLENDEN, 1976). Vencidas as barreiras da porta de entrada, as leptospirosas multiplicam-se ativamente no interstício e nos humores orgânicos (sangue, linfa e líquido), caracterizando um quadro agudo, septicêmico (leptospiremia). 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-enfartes (FAINE, 1982). Os sinais clínicos evidenciado pelo hospedeiro infectado são variáveis de acordo com a extensão das lesões e o tipo de órgão atingido. Se os mecanismos de defesa do hospedeiro suplantam as lesões e conseqüentes alterações funcionais são atingidas o segundo período clínico referido como de imunidade, (presença de anticorpos circulantes) e de leptospirúria (presença de leptospirosas na urina). Nesta etapa ocorre à colonização dos túbulos renais pelas leptospirosas, local privilegiado onde o agente fica protegido da imunidade humoral (FAINE et al., 1999). A excreção urinária de leptospirosas é intermitente e pode ser de longa duração, dependendo dos hospedeiros animais acometidos e do sorovar de leptospira envolvido. Nos roedores infectados a presença de leptospirosas na urina pode ser permanente. Nos animais de produção acometidos as leptospirosas têm sido evidenciadas tanto na urina como no sêmen e em corrimentos vaginais o que confirma não só a colonização dos túbulos renais como também dos órgãos da reprodução e das suas glândulas anexas, (ELLIS, 1994). A partir da instalação do período de imunidade e

leptospirose, algumas lesões poderão ser estabelecidas, devido agora a persistência do microrganismo em locais específicos aonde ocorrem reações de hipersensibilidade do tipo III, nas quais há a deposição nos tecidos de imunocomplexos formados “in vivo”. É a partir deste mecanismo que são explicadas as lesões renais de nefrite intersticial crônica e as oculares, uveítes. (TURNER, 1967). Dentre os animais de produção explorados em ecossistemas rurais, as manifestações clínicas mais frequentes são as da esfera reprodutiva com abortamento, usualmente no terço final da gestação, infertilidade, esterilidade ou o nascimento de produtos a termo debilitados que morrem nos primeiros dias de vida (GUIMARÃES et al., 1982/1983; ELLIS, 1994; FERREIRA NETO, et al., 1997; DELBEM, et. al. 2002), no entanto, alguns sinais particulares podem ser observados de acordo com a espécie animal e em determinadas faixas etárias em suínos jovens, durante a fase de aleitamento, podem ocorrer casos de encefalite caracterizados por incoordenação motora e acessos convulsivos com movimentos de pedalamo (FAINE, 1982). Em bezerros jovens pode ser observado um quadro febril com icterícia e hemoglobinúria o qual solicita o estabelecimento de um diagnóstico diferencial com a tristeza parasitária (infecção por Babesias e Anaplasmas). Nas vacas adultas das raças com aptidão leiteira pode haver a infecção da glândula mamária com mastite atípica, diminuição da secreção de leite, úbere flácido e leite manchado por coágulos de sangue. (ELLIS, 1994; FAINE, 1982). Nos cavalos a manifestação clínica mais frequente é o comprometimento do globo ocular com a presença de uma conjuntivite recidivante que pode evoluir para a cegueira. As repetições de cio também têm sido verificadas, no entanto, a questão dos abortamentos ainda é um ponto controverso. (FAINE et. al., 1999; GIRIO, et. al., 1999). Nos cães verifica-se febre, vômitos, diarreia, hemorragias, icterícia e uremia, com alto grau de letalidade por insuficiência hepática e renal (FAINE et. al., 1999).

2.12. Diagnóstico

A interpretação dos resultados sorológicos é complexa por vários fatores: reação cruzada de anticorpos, títulos de anticorpos induzidos por vacinação e a falta de consenso sobre que títulos de anticorpos são indicativos de infecção ativa. Normalmente títulos de anticorpos > 100 são considerados significantes. Em resposta à vacinação, no geral o rebanho desenvolve baixos títulos de anticorpos aglutinantes (100 a 400) e estes persistem por um a três meses. Entretanto, alguns animais desenvolvem altos títulos após a vacinação que reduzem com o tempo, podendo persistir por seis meses ou mais (BOLIN e ALT, 1999). O ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos e é considerado uma prova sensível no diagnóstico da leptospirose, entretanto em regiões onde a vacinação é comumente realizada, poderá ocorrer a presença de resultados falso-positivos. TAGLIABUE & FARINA (1995), realizaram experimento com a padronização do ELISA no diagnóstico sorológico dos bovinos, obtendo bons resultados em comparação ao método de aglutinação microscópica, o que também consideram BERCOVICH (1990), onde se referem ao ELISA como método de diagnóstico vantajoso frente ao teste de aglutinação microscópica.

A marcação fluorescente de anticorpos também é um método de diagnóstico rápido e preciso na detecção de leptospirose. Um teste de fixação de complemento tem eficiência comparável ao teste de aglutinação microscópica (BLOOD et al., 1988).

A reação de macroaglutinação é considerada gênero específico, e deve ser utilizada como prova de triagem. Os antígenos empregados constam de suspensão concentrada de leptospirose inativadas pelo formol e podem ser adquiridos em kits no comércio. Esta prova apresenta algumas divergências, como o aparecimento freqüente de resultados falsos negativos e com menor freqüência de falsos positivos. Este teste reage melhor contra soros colhidos na fase aguda da doença (LANGONI, 1996).

O diagnóstico da leptospirose animal apoia-se fundamentalmente nos resultados obtidos em exames laboratoriais que determinam a presença do agente etiológico ou de anticorpos humorais induzidos pelo mesmo. A demonstração do agente etiológico pode ser estabelecida por métodos de visualização (exame a fresco em campo escuro, coloração pela prata, imunofluorescência direta), métodos de cultivo, inoculação em animais de

laboratório (hamster), e pela demonstração do ácido nucléico do agente infeccioso, PCR (FAINE, et al., 1999).

Os materiais indicados para encontro do agente etiológico são: sangue (pico febril), materiais colhidos por ocasião de necropsia, fígado e rins; produtos do abortamento estomacal do feto, fígado, pulmão ou humor vítreo do feto, urina, fase de imunidade e leptospirúria. Todos estes materiais devem ser colhidos e processados tomando-se os cuidados de assepsia e submetidos ao laboratório o mais rápido possível. A pesquisa de anticorpos já é possível a partir da primeira semana após o início dos sintomas e o material examinado é o soro sanguíneo que deve ser armazenado em temperatura de congelamento e transportado sob refrigeração. (SANTA ROSA, 1970).

Os métodos de cultivo de leptospiras têm sido aprimorados (PASSOS et. al., 1988). A partir do sucesso no isolamento de uma cepa de leptospira torna-se necessária a tipificação da amostra isolada que envolve o preparo de soro hiperimune seguido do encaminhamento da amostra e do respectivo anti-soro para laboratório de referência aonde será efetuada a tipagem através do teste de absorção cruzada de aglutininas (FAINE et al., 1999) ou do emprego de uma coleção de anticorpos monoclonais (FAINE et al., 1999). A identificação primária em nível do sorogrupo pode ser efetuada em laboratórios de rotina, desde que os Laboratórios de Referência forneçam anti-soros policlonais oficialmente controlados.

As novas técnicas de biologia molecular (HEINEMANN et al., 1999; HEINEMANN, et al., 2000; RICHTZENHAIN, et al. 2002) oferecerem grandes vantagens em relação às limitações dos métodos clássicos de cultivo e inoculação em animais (rapidez, praticidade, sensibilidade), entretanto os métodos clássicos ainda não podem ser abandonados, pois só através deles é que é possível o conhecimento da identidade antigênica dos sorovares presentes em uma dada região (FAINE et al., 1999).

Dentre os métodos de laboratório que revelam a presença de anticorpos anti-leptospira, o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos (GALTON et al., 1965; SANTA ROSA, 1970; COLE et al., 1973), ainda é o teste aceito como padrão, no entanto é um procedimento trabalhoso, restrito a laboratórios especializados (VASCONCELLOS, 1979).

Alternativas para o teste clássico de SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose animal têm sido investigadas e incluem o emprego de estirpes aquícolas como antígeno gênero específico (SANTA ROSA, 1978; CALDAS, 1985; GENOVEZ, 1985; GIRIO, et al., 1985; CALDAS et al., 1991; VIEGAS et al., 1993; VIEGAS et al., 1994, VASCONCELLOS et al. 1989a, VASCONCELLOS et al., 1989b, VASCONCELLOS, et al., 1990; Teste de Aglutinação Macroscópica (MAZZONELLI, et al., 1974; YANAGUITA, 1987, CALDAS et. al. 1997/1998; LILENBAUM, et. al., 2002b; e Teste de contraimuno eletroforese (GENOVEZ et al., 2001). No entanto os resultados obtidos indicam estas provas apenas como métodos de triagem.

O aprimoramento de reações imunoenzimáticas, ainda em nível experimental, talvez venha a oferecer alternativas para o aumento da oferta de testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da leptospirose animal (FAINE et al., 1999).

A coleção de antígenos mantida por um laboratório que execute o teste SAM como método de rotina pode variar de uma localidade para a outra e também segundo as espécies animais cujos soros são examinados, no entanto para fins de Vigilância Epidemiológica é recomendável que as coleções sejam constituídas com pelo menos uma variante sorológica por sorogrupo e de algumas estirpes de importância regional (FAINE, 1982).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem das amostras de soros

Os pontos de coleta foram selecionados de acordo com a quantidade, a disponibilidade, as interações intra e interespecíficas e a disponibilidade dos recursos aos quais os suínos apresentaram-se na localidade. Foram selecionadas duas localidades por conveniência no Estado do Rio de Janeiro, e que tivessem características de criações rurais, tendo como municípios base Rio Claro e Pirai (Tabelas 1).

3.2. Coleta e processamento das amostras

As amostras foram encaminhadas sob refrigeração ao Laboratório de Coccídeos situado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) para realização dos procedimentos dos testes laboratoriais tendo como apoio o Centro Nacional de Referência para Leptospirose do Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ MS e do Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos FIOCRUZ MS.

De cada animal foi colhida por venopunção jugular uma amostra de 5 ml de sangue com seringa do tipo vacuntainer em frascos estéreis. O sangue colhido foi centrifugado e o soro obtido foi acondicionado a -20°C até a realização dos testes.

Os municípios selecionados é base dos trabalhos do Laboratório de Coccídeos e correspondem a uma amostragem significativa para realização deste trabalho.

A população de suínos dos municípios selecionados foi obtida dos arquivos do censo agropecuário do ano de 2006 (IBGE, 2008) e as fazendas visitadas foram selecionadas através do conhecimento da área da EMATER.

Não foram obtidos dados de vacinação e de registros de histórico de doenças dos animais por não ter campanhas de vacinação.

3.3. Preparação do antígeno

As culturas de leptospiros provenientes do Centro de Nacional Referencia para Leptospirose foram mantidas entre cinco e dez dias a 28°C em meio de Ellighausen (EMJH-Difco) em volume de 10 ml enriquecido com soro de coelho. Após este tempo, verificou-se o grau de pureza em microscopia de campo escuro.

Em segunda passagem foram inoculadas em garrafas com 100 ml do mesmo meio de cultura e deixadas na estufa à temperatura de 28°C, com agitação constante. Durante sete dias realizou-se novamente a verificação do grau de pureza e por fim o material foi inoculado em garrafas de 1000 ml com o mesmo meio de cultura e mantendo os mesmos procedimentos.

Após o cultivo a uma concentração de 0,3%v/v a 37°C por duas horas, adicionou-se formol nos antígenos. Posteriormente, estes foram centrifugados a 8000 rpm por 30 minutos, desprezando-se o sobrenadante e lavando-se o centrifugado em solução salina (0,9g % de NaCl) a uma concentração de $1,7 \times 10^{10}$ leptospiros por ml e deixado a temperatura de 4°C por 24 horas.

3.4. Soroaglutinação microscópica

Foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (GALTON et al., 1965; CALDAS et al., 1991; VIEGAS et al., 1993; VIEGAS et al., 1994,) com uma coleção de antígenos vivos que incluiu 20 sorovares de leptospiros patogênicos (*australis*, *autumnalis*, *bataviae*, *canicola*, *celledoni*, *cynoptery*, *djasiman*, *grippotyphosa*, *hebdomadis*, *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae*, *javanica*, *panama*, *pomona*, *pyrogenes*, *hardjo*, *wolffi*, *saxkoebing*, *shermani*, *tarassovi*).

3.5. Triagem

O soro foi diluído 1:50 para cada sorovar, colocando-se 100 µl deste em 4,9 ml de PBS pH 7,6 em tubo de ensaio tipo Wassermann®. Em microplaca devidamente identificada, foram pipetados 50 µl de cada amostra diluída nos respectivos poços.

Procedeu-se da mesma forma para o controle, utilizando-se PBS pH 7,6. A seguir foram pipetados 50 µl das suspensões antigênicas correspondentes, completando-se assim a diluição 1:100. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 60 minutos, e a seguir, com o auxílio de alça bacteriológica de dois mm de diâmetro, colocou-se uma gota de cada poço, dispostas em fileiras sobre lâmina microscópica, examinando-se sem a utilização de lamínula, em microscópio com condensador de campo escuro, utilizando-se a objetiva e a ocular de 10X. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram 50% ou mais de leptospiros aglutinadas, tendo como referência os respectivos controles. As amostras positivas foram tituladas para verificação do título de anticorpos aos sorovares reagentes.

3.6. Titulação

A partir da diluição 1:50, foram preparadas mais cinco diluições consecutivas e ao dobro, em microplacas com fileiras de seis poços correspondendo à titulação de um determinado sorovar. Foram pipetados 100 µl do soro diluído no primeiro poço da reação do sorovar em teste, e 50 µl de PBS pH 7,6 nos demais poços para este sorovar. Para a obtenção da diluição final desejada, foi pipetado 50 µl da primeira diluição, e após homogeneização, para a seguinte, agindo-se assim sucessivamente, desprezando-se 50 µl da última diluição, obtendo-se as diluições 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600, em cada fileira. Foi utilizado também um poço como controle de cada antígeno testado.

A seguir foram pipetados 50 µl de antígeno, ou seja, do sorovar correspondente em cada poço, bem como no controle, e as diluições tornaram-se equivalentes a 1:100 até 1:3200. As placas foram incubadas a 37 °C por 60 minutos, e a leitura foi realizada como descrito para a prova de triagem. Foi considerada como título a maior diluição do soro, capaz de aglutinar 50% ou mais das leptospiros em relação ao controle. Foram consideradas positivas as amostra de soro com títulos iguais ou superiores a 100.

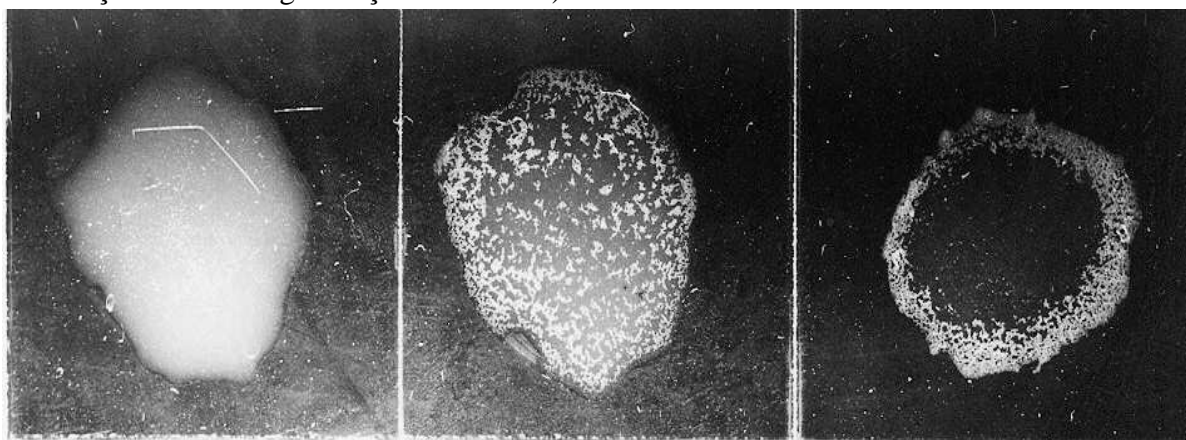
3.7. Soroaglutinação macroscópica

Na realização da sorologia de macroaglutinação, foi utilizada uma placa de vidro transparente, com 45 quadrados de 2cm x 2 cm, pipetas de 20 µl e 100 µl com ponteiros estéreis, uma caixa de fundo e paredes escuras com uma lâmpada de 40W, um anteparo na metade superior e agitador de plataforma.

Na soroaglutinação macroscópica foram seguidos os seguintes procedimentos: na placa de vidro bem limpa e no meio de cada quadrado, colocou-se 20 µl de soro de suíno a ser pesquisado; em seguida, acrescentou-se ao lado sem que se misturassem, 55 µl de antígeno; homogenizou-se bem com bastão de vidro ou similar, sendo em seguida colocado sob agitação por 10 minutos em agitador tipo kline (plataforma), a uma rotação de 110 rpm, tendo-se o cuidado para evitar a secagem da reação. A leitura do teste foi realizada com auxílio de uma fonte luminosa indireta e fundo escuro, com dimensões 35 x 35 x 30 cm, observando-se assim os níveis de aglutinação.

O teste foi padronizado da seguinte forma: os soros foram classificados com os seguintes critérios: ++++ aglutinação total (grumos dispersos em fundo límpido), +++ aglutinação de aproximadamente 75% (grumos dispersos em fundo levemente opalescente), ++ aglutinação de 50% (grumos dispersos em fundo opalescente), + aglutinação de aproximadamente 25% (grumos dispersos em fundo com forte opalescência) e negativo

Figura 3. Foto de reação de soroaglutinação macroscópica, primeira uma reação negativa, segunda uma reação de +++ cruces, terceira uma reação de ++++ cruces (fonte: manual de instrução kit macroaglutinação/FIOCRUZ).



(ausência de grumos) (Figura 4). Considerou-se como reagente na sorologia de macroaglutinação os soros que apresentaram aglutinação igual a superior a uma cruz. Os soros negativos foram diluídos a 1:4 em salina fisiológica (0,9g% de NaCl) e retestados conforme os critérios anteriormente descritos, com o objetivo de evitar os falsos negativos em decorrência do efeito prozona, que é a ausência da reação imunológica detectável em um sistema de teste na presença de baixas diluições de anti-soro de alto título. Isto pode ser devido a um largo excesso de anticorpo ou à inibição da aglutinação pelo complemento ou anticorpo não aglutinante. (MORRIS, 1982).

3.8. Avaliação estatística

As análises estatísticas para o estudo das suspensões foram feitas através do modelo linear logístico com objetivo avaliar a probabilidade de ocorrência de soros positivos e soros falsos positivos tendo como base a microaglutinação. Esse modelo é muito utilizado para descrever a probabilidade de ocorrência de um evento (COSTA, 1997), a análise da sensibilidade que é a capacidade de um teste detectar os animais verdadeiramente doentes, foi avaliada para observar proporção de animais com a doença, quanto maior a sensibilidade, menor a possibilidade de obtenção de resultados falsos negativos, porém quase sempre é menor a especificidade. A especificidade também foi analisada para detectar os indivíduos verdadeiramente sadios, quanto maior a especificidade, menor a possibilidade de obtenção de resultados falsos positivos, porém quase sempre é menor a sensibilidade. Em complemento dos testes foram feitos os valores preditivos positivos e negativos para detecção de animais realmente infectados e resultados para animais que não estão infectados respectivamente.

Para comparação das análises estatísticas foram incluídos no estudo o teste de Qui-quadrado (X^2) e o coeficiente de Kappa com as finalidades de verificar se a distribuição dos resultados observadas se desvia significativamente dos resultados esperadas e de avaliar a concordância entre os resultados obtidos respectivamente.

3.9. Etapas

O presente trabalho em sua fase laboratorial foi desenvolvido de acordo com as seguintes etapas:

a) Cultivo das cepas – Ellighausen-Mc Cullough modificado por Johnson & Harris (EMJH) 30 dias;

b) Preparação das suspensões antigênicas, com base na técnica utilizada por GALTON et al., (1958), pela inativação em formol 0,3% por duas horas, com os sorovar *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *pomona*, em forma de suspensão única ou em combinações de dois sorovares;

c) Sorologia de Microaglutinação (Recomendação da OMS);

d) Teste de macroaglutinação, utilizando-se as suspensões antigênicas *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae* + *copenhageni*, *pomona*+ *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni* + *pomona*, e comparação com os resultados da sorologia microscópica;

e) Formulação de um “kit” para o diagnóstico em suínos.

3.10. Suspensões antigênicas propostas

- Suspensão A: *pomona*
- Suspensão B: *icterohaemorrhagiae*
- Suspensão C: *copenhageni*
- Suspensão D: *pomona* + *icterohaemorrhagiae*
- Suspensão E: *pomona* + *copenhageni*
- Suspensão F: *icterohaemorrhagiae* + *copenhageni*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para alcançar o objetivo proposto, foram obtidas 154 amostras provenientes de matrizes de suínos e animais jovens, da Região Sul Fluminense do Vale do Paraíba Fluminense tendo como municípios bases Rio Claro e Piraí, com o apoio da EMATER.

Tabela 1. Localidade, local de coleta e data das coletas das amostras de sangue dos suínos na região rural, Municípios de Piraí e Rio Claro no Estado do Rio de Janeiro, RJ.

Município	Propriedade	Números de amostras	Data
Rio Claro	Propriedade 1	3	21/08/07
Rio Claro	Propriedade 2	17	28/08/07
Rio Claro	Propriedade 3	22	27/09/07
Piraí	Propriedade 4	43	21/08/07
Piraí	Propriedade 5	21	21/08/07
Piraí	Propriedade 6	13	28/08/07
Piraí	Propriedade 7	10	28/08/07
Piraí	Propriedade 8	25	28/08/07

Foram obtidos 79 soros positivos e 75 soros negativos decorrentes de coletas em fazendas da Microrregião Vale do Paraíba Fluminense inserida na Mesorregião Sul Fluminense (Figura 4).

REGIÕES E MICRORREGIÕES DE SAÚDE

cenário prospectivo até 2004

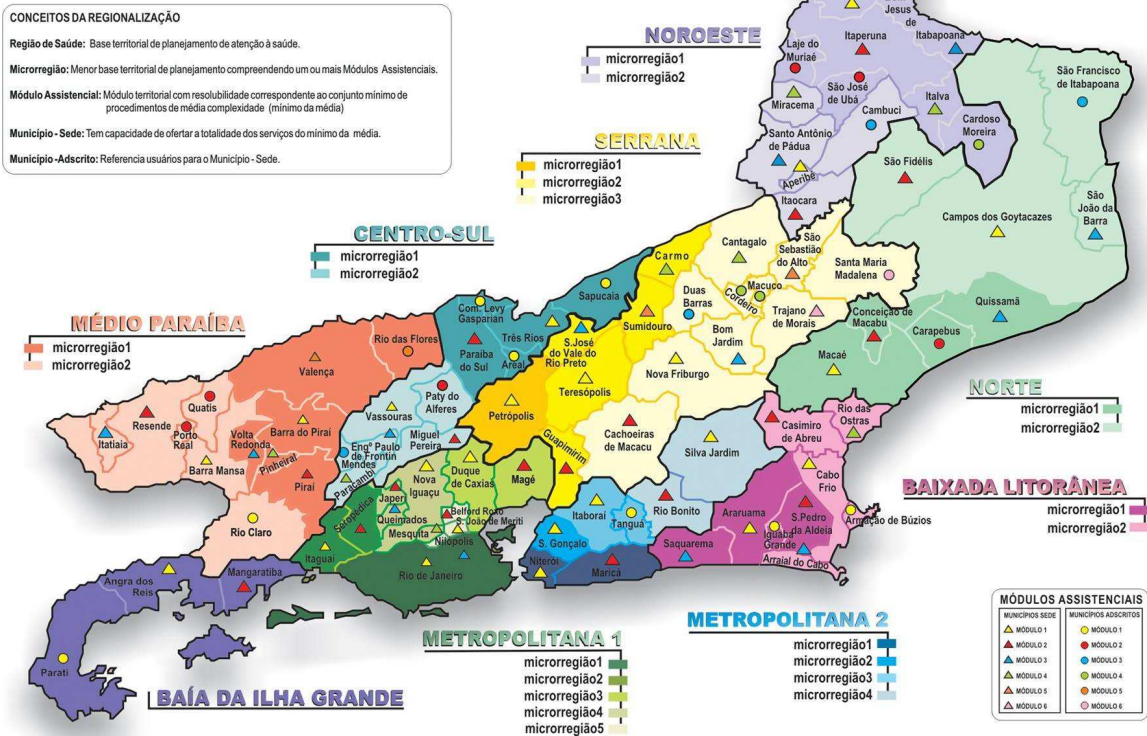


Figura 4. Mapa das Microrregiões do Estado do Rio de Janeiro (IBGE, 2008).

Os soros de suínos foram selecionados levando-se em consideração a sorologia de microaglutinação, como preconiza a Organização Mundial de Saúde, para o diagnóstico laboratorial da leptospirose humana e animal.

A tabela 3 apresenta comparação dos resultados da suspensão “A” (*pomoma*) com os resultados do teste de microaglutinação. Observa-se que um total de 103 soros, 29 reagentes e 74 não reagentes na sorologia de microaglutinação, 20 apresentam-se reagentes tanto na macroaglutinação como na microaglutinação, 9 apresentam-se reagentes na microaglutinação e não reagentes na macroaglutinação. Dos 74 soros não reagentes na no teste de microaglutinação, 3 apresentam reatividade na macroaglutinação e 71 soros apresentaram-se não reagentes em ambos os testes. Verificaram-se os resultados da

suspensão “A” (*pomona*) com 88% de sensibilidade e 86% de especificidade e valor preditivo positivo de 68% enquanto para o valor preditivo negativo 95%.

Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar “*pomona*” e da macroaglutinação com a suspensão “A” *pomona*, para diagnóstico da leptospirose suína.

Microaglutinação	Macroaglutinação		Total
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	20(68,9%)	9(31,1%)	29(28,2%)
Não reagentes	3(4%)	71(96%)	74(71,8%)
Total	23(22,3%)	80(77,7%)	103(100%)

A Tabela 4 apresenta os resultados da comparação entre a suspensão “B” (*icterohaemorrhagiae*), utilizando-se a sorologia de macroaglutinação frente à microaglutinação. Observa-se que de um total de 111 soros, 36 reagentes e 75 não reagentes na sorologia de microaglutinação, 21 apresentaram-se reagentes tanto na macro como na microaglutinação e 15 apresentaram-se reagentes na microaglutinação e não reagentes na macroaglutinação. Dos 75 soros não reagentes no teste de microaglutinação 4 apresentaram reatividade na macroaglutinação e 71 apresentaram-se não reagentes em ambos os testes. A sensibilidade e especificidade da suspensão “B” (*icterohaemorrhagiae*) obtiveram valores respectivamente de 84% de sensibilidade e 82% de especificidade e para valor preditivo positivo 58% e para valor preditivo negativo 94%.

Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar “*icterohaemorrhagiae*” e da macroaglutinação com a suspensão “B” *icterohaemorrhagiae*, para diagnóstico da leptospirose suína.

Microaglutinação	Macroaglutinação		Total
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	21(58,3%)	15(41,7%)	36(32,4%)
Não reagentes	4(5,3%)	71(94,7%)	75(67,6%)
Total	25(22,5%)	86(77,5%)	111(100%)

Na Tabela 5 estão demonstrados os resultados da comparação entre a suspensão “C” (*copenhageni*), utilizando-se a sorologia de macroaglutinação em comparação com a microaglutinação. Observamos que de um total 87 soros, 12 reagentes e 75 não reagentes na sorologia de microaglutinação, 5 apresentaram-se reagente tanto na macro como na microaglutinação e 7 apresentaram-se reagente na microaglutinação e não reagentes na macroaglutinação. Dos 75 soros não reagentes no teste de microaglutinação, 4 apresentaram reatividade na macroaglutinação e 71 apresentaram-se não reagentes nos dois testes. Os resultados da suspensão “C” (*copenhageni*) sendo a sensibilidade 55% e a especificidade de 91% com valor preditivo positivo de 41% e valor preditivo negativo de 94%.

Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar “*copenhageni*” e da macroaglutinação com a suspensão “C” *copenhageni*, para diagnóstico da leptospirose suína.

Microaglutinação	Macroaglutinação		Total
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	5(41,7%)	7(58,3%)	12(13,%)
Não reagentes	4(5,3%)	71(94,7%)	75(86,2%)
Total	9(10,3%)	78(89,7%)	87(100%)

A Tabela 6 apresenta os resultados da comparação entre a suspensão “D” *pomona* mais *icterohaemorrhagiae* juntas, utilizando-se a sorologia de macroaglutinação em comparação com a microaglutinação. Observa-se que de um total de 140 soros, destes 66 reagentes e 74 não reagentes na sorologia microaglutinação, 58 apresentaram-se reagentes tanto na macro como na microaglutinação e 8 apresentaram-se reagentes na microaglutinação e não reagente na macroaglutinação. Dos 74 soros não reagente no teste de microaglutinação, 7 apresentaram reatividade na macroaglutinação e 67 soros apresentaram-se não reagente tanto na micro como na macroaglutinação. Os resultados da suspensão “D” *pomona* mais *icterohaemorrhagiae* como suspensão única tendo como resultado 89% de sensibilidade e 89% de especificidade. O teste apresentou valor preditivo positivo de 87% e para valor preditivo negativo 90%.

Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar “*pomona* e *icterohaemorrhagiae*” e da macroaglutinação com a suspensão “D” *pomona* e *icterohaemorrhagiae*, para diagnóstico da leptospirose suína.

Microaglutinação	Macroaglutinação		Total
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	58(41,4%)	8(5,7%)	66(47,1%)
Não reagentes	7(9,46%)	67(90,54%)	74(52,9%)
Total	65(46,4%)	75(53,6%)	140(100%)

A Tabela 7 apresenta os resultados da comparação entre a suspensão “E” *pomona* mais o sorovar *copenhageni*, como uma única suspensão, utilizando-se a sorologia de macroaglutinação em comparação com a microaglutinação. Observa-se que de um total de 116 soros, 41 reagentes e 75 não reagentes na sorologia de microaglutinação, 25 dos soros apresentaram-se reagentes tanto na macro como na microaglutinação e 16 apresentaram-se reagentes na microaglutinação e não reagentes na macroaglutinação. Dos 75 soros não reagentes no teste de microaglutinação, 6 apresentaram reatividade na macroaglutinação e 69 apresentaram-se não reagentes em ambos os testes. Para a suspensão “E” *pomona* mais o sorovar *copenhageni* como suspensão única demonstrando 80,6% de sensibilidade e 81% de especificidade como valor preditivo positivo de 61% e valor preditivo negativo de 92%.

Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com os sorovares “*pomona* e *copenhageni*” e da macroaglutinação com a suspensão “E” *pomona* e *copenhageni*, para diagnóstico da leptospirose suína.

Microaglutinação	Macroaglutinação		Total
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	25(61%)	16(39%)	41(35,3%)
Não reagentes	6(8%)	69(92%)	75(64,7%)
Total	31(26,7%)	85(73,7%)	116(100%)

A Tabela 8 apresenta os resultados da comparação entre a suspensão “F” *icterohaemorrhagiae* mais *copenhageni* juntas, utilizando-se a sorologia de macroaglutinação em comparação com a microaglutinação. Observou-se 124 soros no total, 48 reagentes e 76 não reagentes na sorologia de microaglutinação, 26 soros apresentaram reatividade em ambas as técnicas e 22 apresentaram-se reagente na microaglutinação e não reagente na macroaglutinação. Dos 76 soros não reagentes no teste de microaglutinação, 8 apresentaram reatividade na macroaglutinação e 68 apresentaram-se não reagente em ambos os testes. Os resultados da suspensão “F” tendo *icterohaemorrhagiae* mais *copenhageni* como suspensão única com valores de 76% de sensibilidade e 75% de especificidade, com valor preditivo positivo de 54% e 89% para valor preditivo negativo.

Tabela 7. Comparação dos resultados obtidos dos testes de microaglutinação com o sorovar “*icterohaemorrhagiae e copenhageni*” e da macroaglutinação com a suspensão “F” *icterohaemorrhagiae e copenhageni*, para diagnóstico da leptospirose suína.

Microaglutinação	Macroaglutinação		Total
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	26(20,9%)	22(45,8%)	48(38,7%)
Não reagentes	8((10,5%)	68(89,5%)	76((61,3%)
Total	34((27,4%)	90(72,6%)	124(100%)

Analisando a sensibilidade das suspensões observou-se a suspensão *pomona* mais *icterohaemorrhagiae* como a que obteve o melhor resultado dentre as seis suspensões testadas com um índice de 89% e a especificidade que melhor apresentou melhor índice foi a *copenhageni*. Estes resultados demonstram as evidências sorológicas obtidas onde suínos abatidos para consumo humano nas cidades de Timon-MA e Teresina-PI foram infectados pelos sorovares *icterohaemorrhagiae*, *canícola*, *autumnalis*, *pyrogenes*, *pomona* e *copenhageni*, também são semelhantes aos obtidos em estudos realizados com suínos das cidades de Viçosa e Ponte Nova, e dos estados do Rio grande do sul e Goiás (FARIA et al., 1989; OLIVEIRA et al. 1995; SOUZA, 2000).

No conjunto a suspensão com melhores índices de sensibilidade e especificidade foi *pomona* mais *icterohaemorrhagiae*(tabela 5). Este resultado é comprovado os estudos de SANTA ROSA et al. (1969/70), OLIVEIRA (1977), RAMOS et al. (1981), VIEGAS et al. (1980), LARSSON et al. (1984) e OLIVEIRA et al. (1987) e por CARVALHO et al. (1990) e VIEGAS et al. (1980) obtidos no PR, GO e SC que acusaram o sorovar. *icterohaemorrhagiae* como mais freqüente e sugeriram que a evolução da suinocultura nacional, observada nos últimos anos deve ter modificado o perfil da infecção por leptospiras, na qual o sorovar *pomona* tradicionalmente mantido pelos próprios suínos, está

sendo substituído pelo *icterohaemorrhagiae* cujo achado fomenta a implantação de procedimentos destinados ao controle de roedores sinantrópicos como parte do manejo das criações

Da comparação pelo conjunto dos resultados dos valores preditivos positivos e negativos observou-se a suspensão *pomona* mais *icterohaemorrhagiae* como a que melhor apresentou resultado com percentuais de 87 % e 90% respectivamente, como demonstrado na figura 6, Mason et al. (2002) examinaram anticorpos contra leptospiros em 195 soros de porcos selvagens abatidos em temporada de caça na Austrália. Eles utilizaram 14 sorovares previamente isolados de suínos domésticos e selvagens na região. Os resultados demonstraram aglutininas em 20% dos soros testados sendo que o sorovar *pomona* foi mais freqüentemente detectado.

As análises estatísticas pelas estimativas dos parâmetros do modelo linear logístico confirmam os resultados da probabilidade de ocorrência de positivo ou falso positivo, demonstrando na tabela 8, a suspensão *pomona* mais *icterohaemorrhagiae* apresentou 87,8% de positivos e 12,1% de falsos positivos, este resultados foram comprovados por Girio et al. (2004) que examinou 39 amostras de soros de porco monteiro provenientes da Região de Nhecolândia utilizando 24 sorovares na prova de microaglutinação. Sete soros foram reagentes (17,9%), sendo *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni* os sorovares observados com maior freqüência.

Tabela 8. Probabilidade de ocorrência de positivo ou falso positivo das suspensões antigênicas através do Modelo Linear logístico.

Suspensões de Antígenos	Probabilidade	
	Positivo	Falso positivo
A	22,5%	77,5%
B	58,3%	41,6%
C	41,6%	58,3%
D	87,8%	12,1%
E	60,9%	39,0%
F	54,1%	45,8%

Tabela 9. Resultados comparativos dos testes de avaliações das suspensões antigênicas.

Suspensões de antígenos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor Preditivo Positivo (%)	Valor Preditivo negativo (%)	X ²	Kappa
“A” pomona	88	86	68	95	p<0,0001	0,28
“B” icterohaemorrhagiae	84	82	58	94	p<0,0001	0,98
“C” copenhageni	55	91	41	94	p=0,002	0,98
“D” pomona + icterohaemorrhagiae	89	89	87	90	p<0,0001	0,99
“E” pomona + copenhageni	80,6	81	61	92	p<0,0001	0,99
“F” icterohaemorrhagiae + copenhageni	76	75	54	89	p<0,0001	0,99

Comparação da Sensibilidade e Especificidade

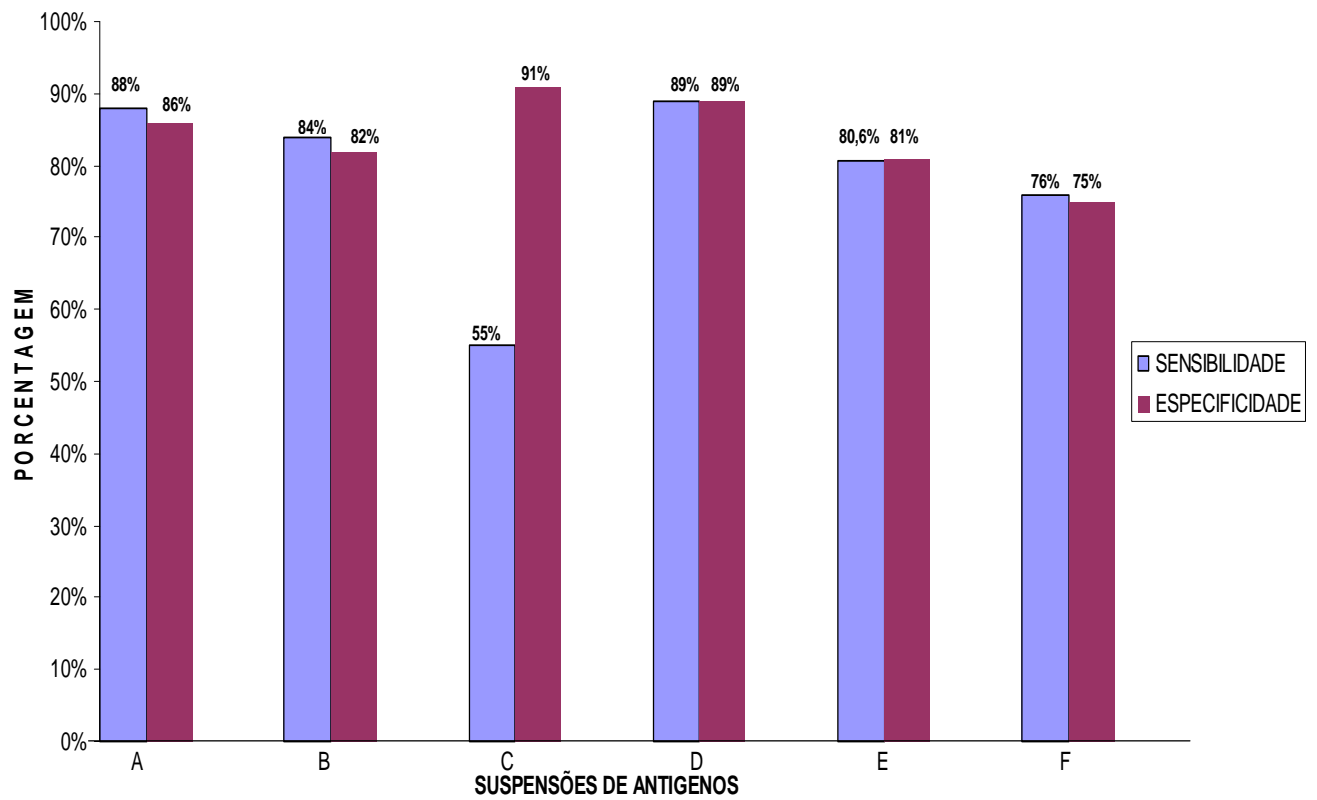


Figura 5. Perfil da sensibilidade e especificidade das suspensões.

Comparação do valor preditivo positivo e valor preditivo negativo

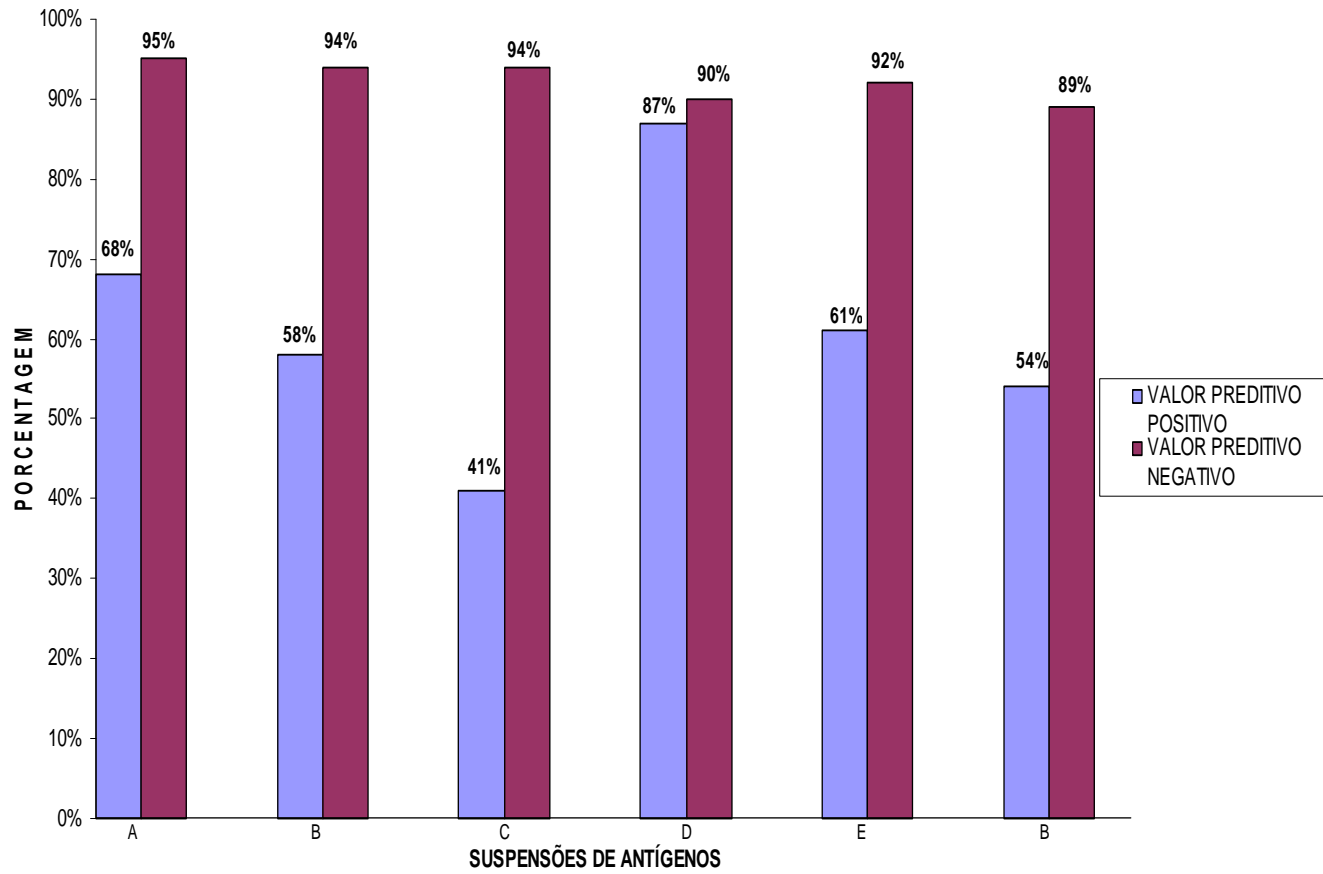


Figura 6. Perfil da sensibilidade e especificidade das suspensões.

Probabilidade de ocorrência de positivo ou falso positivo

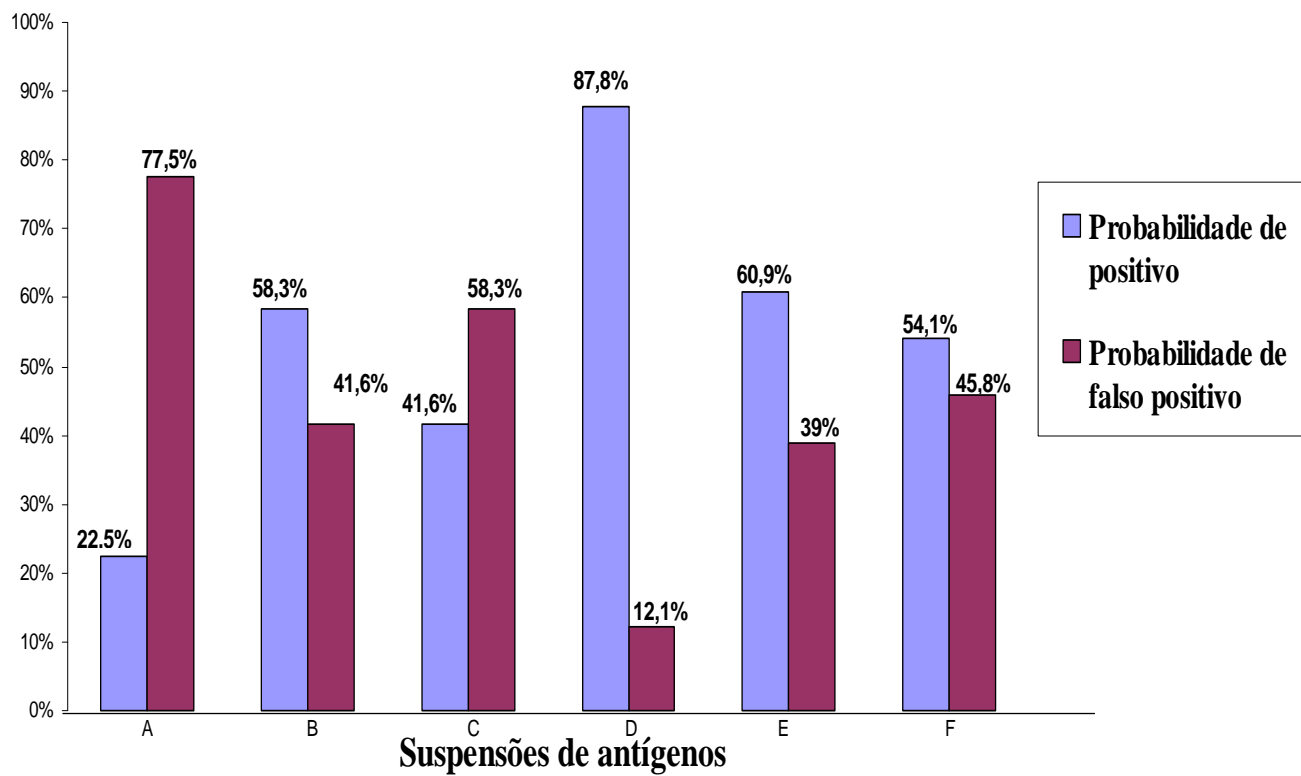


Figura 7. Probabilidade de ocorrência de positivo ou falso positivo.

5. CONCLUSÕES

- Os resultados do presente trabalho permitiram avaliar a eficiência de um teste de triagem que seja rápido, de fácil execução, baixo custo e com um grau de especificidade elevado, aplicando no diagnóstico da leptospirose em suínos.
- A suspensão antigênica que continha a combinação dos sorovares *pomona* + *icterohaemorrhagiae*, apresentou os melhores índices de sensibilidade e especificidade;
- Com as conclusões de todos os resultados avaliados estatisticamente a suspensão *pomona* + *icterohaemorrhagiae*, obteve os melhores resultados para formulação de um kit para diagnóstico da leptospirose em suíno;
- A estabilidade da suspensão pode ser mantida por um ano, sem alterações nas propriedades antigênicas, possibilitando a preparação de um “kit” que poderá ser comercializado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, 2.ed. Washington: **Organizacion Panamericana de la Salud**,. p.112-120, 425-449, 1986.

ANDRADE J.; BRANDÃO AP. Epidemiology of human leptospirosis,with special reference to greater Rio de Janeiro, Brazil, from 1970 to 1982. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 82: 91-100, 1987.

ALSTON J.M. Leptospiral infection as an occupational risk to health throughout the world. **Institute Public Health**. Jul; 20(7), 232-46, 1958.

ALVES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; CAMARGO, C.R.A.; MORAIS, Z.M. Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 63, n.2, p.11-18, 1997.

ARAGÃO, B.H. Sobre a pesquisa do Spirochaeta icterohaemorrhagiae nos ratos do Rio de Janeiro. **Brasil Médico**, v. 31, p.329-330, 1918.

BASTOS, M. Leptospirose. Disponível em: < <http://www.cca.ufes.br/caklbacteri>. >. Acesso em: 14 mar. 2006.

BHARADWAJ, R. Leptospirosis - a Reemerging Disease **Indian Journal of Medical Research**. 120, 136-138, 2004.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a Zoonotic Disease of Global Importance. **Lancet Infectious Diseases**, 3, 757-771, 2003.

BLAHA, T. Applied veterinary epidemiology. **Elsevier**, p.95-103, 1989.

BERCOVICH, Z.; R. TAAIJKE.; B.A. BORKHOUT. Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira hardjo* infections in cattle, **Veterinary Microbiology**, 1990, pp. 255–262.

BOLIN, C.A.; ALT, D.P. Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. **Bovine Practitioner**, v.33, p. 50-55, 1999.

BORDIN, E.L. Contribuição ao diagnóstico em patologia suína. 2.ed. São Paulo: Editora Roca, 192p, 1992.

BRENNER, A.F.; KAUFMANN, KR.; SULZER, AG.; STEIGERWALT, FC.; ROGERS.; RS WEYANT, FURTHER. Determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp nov and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p. 839–858, 1999.

CALDAS, E.M.; SILVA, E.D.; REIS, R.S.; VIEGAS, S.A.R.A.; VASCONCELLOS, S.A. Estudo comparativo entre o teste da macroaglutinação e a soroaglutinação microscópica, utilizando antígenos de *L. interrogans* e *L. biflexa* no diagnóstico rápido da leptospirose em animais. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 19, n.1, p. 155-176, 1997/1998.

CALDAS, E.M.; VIEGAS, E. A.; MASSA, L.F.M.; REIS, R. Comportamento de estirpes apatogênicas no diagnóstico de triagem da leptospirose em animais. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v. 14, n.1, p. 3-24, 1991.

CARINI, A. Espirochaetose icterohaemorrágica nos ratos em São Paulo. Sessão Sociedade Medicina e Cirurgia São Paulo. Resumo **In Anais Paulista de Medicina e Cirurgia**, v. 9, p. 70, 1918.

CLARK. J.A.; Pickles JO. The effects of moderate and low levels of acoustic overstimulation on stereocilia and their tip links in the guinea pig. Department of Physiology, University of Birmingham, UK, 1996.

COHEN J.; POWDERLY WG. Infections from pets. **Infectious diseases**. 2nd ed. London, Mosby, p. 971, 2004.

COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PURSELL, A.R. Improved microtechnique for the Leptospiral Microscopic Agglutination Test. **Applied Microbiology**, v. 25, .6, p. 976-980, 1973.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2a ed., São Paulo: **MEDSI** , 843p, 1992.

CÔRTEZ, S.A.; VASCONCELLOS, F.H. Ito **Revista. Faculdade. Medicina. Veterinária. Zootecnia**. USP, 1983.

COSTA, S. C. da. Regressão logística aplicada na identificação de fatores de risco para doenças em animais domésticos. 104 f. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1997.

DELBEM, A. C.B.; FREITAS, J.C.; BRACARENSE, A .P.F.R.; MÜLLER, E. E.; OLIVEIRA, R.C. Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n.2, p. 174-177, 2002.

DANNEMBERG, H.D.; RICHTER, W.; WESCHE, W.D. Schweinekrankheiten . Berlin, Veb **Deutscher Landwirtschaftsverlag**, Berlin,. 465p, 1975.

EDWARDS, J.D.; DAINES, D.A Leptospirosis outbreak in a piggery. **New Zealand Veterinary Journal**, v.27, n.11, p.247-248, 1979.

ELLIS, W.A.; CASSELLS, J.A.; DOYLE, J. Genital leptospirosis in bull. **Veterinary Record**, v. 118, p. 333, 1986.

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

ELLIS, W.A.; STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; AYLOR, D.J.; LEMAN, A.D. Leptospirosis in Diseases of swine. **Ames, Iowa State University**, 7.ed. p.483-493. 1999.

FAINE, S. Guidelines for the control of leptospirosis, Geneva, **WORLD HEALTH ORGANIZATION**, 171pp, 1982, (WHO off set publication, 67).

EVERARD, C.O.; EDWARDS, C.N.; EVERARD, J.D.; CARRINGTON, D.G. A twelve-year study of leptospirosis on Barbados. **European Journal of Epidemiology**, v.11, n.3, p. 311-320, 1995.

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

FAVERO, A.C.M. Estudo retrospectivo dos exames sorológicos de leptospirose realizados pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período de 1984 a 1997. São Paulo, 2000, 115p. (Master Thesis. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. USP).

FAVERO, A.C.M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Leptospirose bovina – Variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 Estados brasileiros. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 68, n.2, p.29-35, 2001.

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

FEREZU, S. B.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. DNA relatedness of Leptospira strains isolated from beef cattle in Zimbabwe. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, Pt. 3, p. 1111-1117, 1999.

GALTON, M.; POWERS, D.K.; HALE, A.D.; CORNELL, R. A. Rapid macroscopic slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. **American Journal Veterinary Research**, v.19, p.505-512, 1958.

GALTON, M.; SULZER, C.R.; SANTA ROSA, C.A.; FIELDS, M. Application of a Microtechnique to the agglutination Test for Leptospiral Antibodies. **Applied Microbiology**, v.13, n.1, p.81-85, 1965.

GENOVEZ, M.E. Avaliação da eficiência de estirpes de *L.biflexa* no diagnóstico sorológico da leptospirose animal. São Paulo, 1985. 59p. [Dissertação de Mestrado Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

GENOVEZ, M.E.; YASUDA, P. H.; VASCONCELLOS, S. A.; SCARCELLI, E.; CARDOSO, M.V.; GIRIO, R. J. Evaluation fo the counterimmunoelectrophoresis reaction as serodiagnosis test for swine Leptospirosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 147-152, 2001.

GIORGI, W.; TERUYA, J.M.; SILVA, A.S.; GENOVEZ, M. Leptospirose: resultados das soroaglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1974 a 1980. **Biológico**, São Paulo, v. 47, p. 299-309, 1981.

GIRIO, R.J.S.; YANAGUITA, R.M.; MATHIAS, L.A . Comparative study of four saprophytic *Leptospira* strains as screening antigens in the serodiagnosis of leptospirosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **International Journal of Zoonosis**, v. 12, p.61-66, 1985.

GIRIO, R.J.S.; MATHIAS, L. A.; LACERDA NETO, J. C.; VASCONCELLOS, S. A.; Leptospirose experimental em eqüinos infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo copenhageni. Aspectos clínicos e sorológicos. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 66, n. 2, p. 21-26, 1999.

GUIMARÃES, M.C.; CÔRTEZ. J.A.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos: papel do portador e seu controle terapêutico. Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, v.6/7, n.1/4, p.21-34, 1982/1983.

HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M.; MORAIS, Z.M.; GREGORI, F.; CORTEZ, A.; VASCONCELLOS, S.A.; VISINTIN, J.A.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection of leptospire in bovine semen by polymerase chain reaction. **Australian Veterinay Journal**, v. 77, n.1, p. 32-34, 1999.

HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; MORAIS, Z.M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restritction fragment lenght polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v. 73, p. 261-267, 2000.

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

INADA, R. e IDO, Y. The Pure Cultivation Of *Spirochaeta Icterohæmorrhagiae*. **The Journal of Experimental Medicine**, Vol 23, 557-562 (1916).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal, 2006.

JOHNSON, R.C.; WALBY, J.; HENRY, R.A.; AURAN, R.E. Cultivation of parasitic leptospire: effect of pyruvate. **Applied Microbiology** 26:118-119, 1972.

KATZ, A.R.; SASAKI, D.M.; MUMM, A.H. et al. Leptospirosis on Oahu:na outbreak among military personnel associated with recreational exposure. **Mil Med**, v. 162, n. 2, p. 101-104, 1997.

KO, A.I.; REIS, M. G.; DOURADO, C. M. R.; JOHNSON, W. D.; RILEY, L. W. Urban Epidemic of Severe Leptospirosis in Brazil. **Lancet**. 354, 820-825, 1999.

LANGONI, H. Introdução as Zoonoses. Apostila da Disciplina de Zoonoses da UNESP-Botucatu, São Paulo. 30p, 1996.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiological Review**. 14, 296-326, 2001.

LILENBAUM, W.; SANTOS, M.R.C. Leptospirosis in animal reproduction III. The role of serovar hardjo in bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 37, n.2, p.87-92, 1995.

LILENBAUM, W.; RISTOW, P.; FRAGUAS, S. A .; SILVA, E. D. Evaluation of a rapid slide agglutination test for the diagnosis of acute canine leptospirosis in Brazil Proceedings of International Leptospirosis Society, Third Meeting. Barbados, 2002b, p. 56.

KATZ, A.R.; SASAKI, D.M.; MUMM, A.H. et al. Leptospirosis on Oahu:na outbreak among military personnel associated with recreational exposure. **Mil Med**, v. 162, n. 2, p. 101-104, 1997.

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

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

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; MORAIS, Z.M.; PINTO, C. O.; SUCUPIRA, M.C.A.; DIAS, R. A .; MIRAGLIA, F.; CORTEZ, A .; COSTA, S.S.; TABATA, R.; MARCONDES, A .G. Inquérito sorológico para Leptospirose em cães do Município de Santana do Parnaíba, São

Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 69, n. 2, p. 25-32, 2002

MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A. ; LABRUNA, M.B.; MORAIS, Z.M.; CAMARGO, L.M.A. ; CAMARGO, E. P.; FERREIRA NETO, J.S.; VASCONCELLOS, S. A . Prevalence of leptospiral antibodies in dogs from Monte Negro, Rondônia, Western Amazon, Brazil. Proceedings of International Leptospirosis, Society, Third Meeting, Barbados, 2002b, p.96.

MAZZONELLI, J.; DORTA de MAZZONELLI, G.; MAILLOUX, M. Possibilité de diagnostic sérologique macroscopique des leptospires à l'aide d'un antigène unique. **Medicine et Maladies Infectieuses**, v. 4/5, p.253-254, 1974.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Leptospirose, Brasília, 1997.

MOREIRA, E.C.; SILVA, J.A.; VIANA F.C.; SANTOS, W.L.; 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 Universidade Federal Minas Gerais**, v. 31, n.3. p.375-378, 1979.

MURHEKAR, M. V.; SUGUNAN, A. P.; VIJAYACHARI, P.; SHARMA, S.; SEHGAL, S. C. Risk Factors in the Transmission of Leptospiral Infection. **Indian Journal of Medical Research**, 107, 218-223, 1998

PASSOS, E.C.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.O.; YASUDA, P.H.; NÜRMBERGER JUNIOR, R. Isolamento de Leptospiras a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona: Emprego das técnicas de Pipeta Pasteur e das diluições seriadas em meio de cultura de Fletcher tratado com 5-fluor-uracil ou sulfato de neomicina. **Revista Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia. Univ. São Paulo**, v.25, p.221-235, 1988.

PERROCHEAU, A.; PEROLAT, P. Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia South Pacific, a one-year survey. **European Journal of Epidemiology**, v. 13, n. 2, p. 161-167, 1997.

PERRY, G.; HEARDY, R. A Scientific Review of Leptospirosis and implications for quarantine policy. Austrália, Editora Canberra, 2000. 115p.

PICKERING LK. Report of the Committee on Infectious Diseases. Elk Grove Village (IL), **American Academy of Pediatrics**; 2006.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis of *Leptospira* Spp. in Humans. **Microbes and Infection**, 2, 1265-1276, 2000.

RAMADAS, P.; JARVIS, B. D. W.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Genetic-Characterization of Pathogenic *Leptospira* Species by Dna Hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 42, 215-219, 1992.

RATHINAM,S.R.; RATHINAM, S.; SELVARAJ,S.; et al. Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis. **American journal of ophthalmology**, v. 124, n. 1, p. 71-79, 1997.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 139-147, 2002.

ROSE, G.W. Mechanism of tissue cell penetration by *Leptospira pomona*: active, penetration studies invitro. **American Journal Veterinary Research**, n.27, p.1461-1471, 1966.

SANTA ROSA, C.A. Estudo comparativo de algumas estirpes de leptospira apatogênicas para o diagnóstico da leptospirose animal. 1978. [Tese de Livre Docência Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].

SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; TROISE, C. Isolamento de *L. pomona* de suínos em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 29, p.165-174, 1962.

SANTA ROSA, C.A.; GIORGI, W.; SILVA, A.S.; TERUYA, J. Aborto em suíno: isolamento conjunto de *Leptospira*, sorotipo icterohaemorrhagiae e *Brucella suis*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.37, p. 9-13, 1970.

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

SHANG, E. S.; SUMMERS, T. A.; HAAKE, D. A. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding LipL41, a Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. **Infection and Immunity**. 64, 2322-2330, 1996

SOTO, F.R.M.; AZEVEDO, S.S.; MORAIS, Z.M.; PINHEIRO, S.R.; DELBEM A.C.B.; MORENO, A.M.; PAIXÃO, R.; VUADEN, E.R.; VASCONCELLOS, S.A. Detection of leptospire in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola. **Brazilian Journal Microbiology**, v.37, p.582-586, 2006.

SOUZA, A.S. Estudo da prevalência da *Leptospira interrogans* em reprodutores suínos em produção e aspectos epidemiológicos da infecção em Goiás Goiânia, 74 p, 2000. [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás].

TAGLIABUE, S.; FARINA, R. Sero-epidemiological study on the prevalence of leptospirosis in domestic and wild animals. **Selezione Veterinaria**, v. 36, p. 941-42, 1995.

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

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

VASCONCELLOS, S.A.; OHTSUBO, I; MORETTI, A.S.A.; ITO, F.H.; PASSOS, E.C.; CÔRTEZ, J.A.; YASUDA, P. H. Ausência de resposta imunológica em suínos que receberam água de beber contaminada com *Leptospira biflexa* estirpe Buenos Aires. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 20, n.1, p. 56-61, 1989a.

VASCONCELLOS, S.A.; OHTSUBO, I.; ITO, F.H.; PASSOS, E.C.; CÔRTEZ, J.A.; MORENO, A.G.; YASUDA, P. H. Emprego de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires na reação de sorroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em suínos experimentalmente infectados com *L.interrogans* sorotipo pomona. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.20, n.1, p. 62-70, 1989b.

VASCONCELLOS, S.A.; OHTSUBO, I.; YASUDA, P. H.; MORETTI, A.S.A.; ITO, F.H.; PASSOS, E.C.; CÔRTEZ, J.A. Efeito da concentração do soro sobre a sensibilidade e especificidade da reação de sorroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose suína, tendo como antígeno a *L. biflexa* estirpe

Buenos Aires. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 27, n.1, p.33-39, 1990.

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

VERONESI R, FOCACCIA R: Tratado de Infectologia. São Paulo, Editora Atheneu, 1996.

VIEGAS, E. A.; YANAGUITA, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; VIEGAS, S.A.R.A.; SILVA, L.A. Infecção experimental em caprinos com a estirpe pomona: comportamento de novos sorotipos de *Leptospira biflexa* na prova de soroaglutinação microscópica. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 16, n.1, p. 20-30. 1993.

VIEGAS, E. A.; YANAGUITA, R.M.; VIEGAS, S.A.R.A .; SILVA, L.A.; VASCONCELLOS, S.A. Emprego de estirpes de *Leptospira biflexa* na prova de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose caprina e ovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 31. , n.1. p.25-30, 1994.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 14, 527-538 2001.

VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. Ultrastructure and Chemical-Composition of Lipopolysaccharide Extracted From *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. **Journal of General Microbiology**. 132, 103-109, 1986.

YANAGUITA, R.M.; Diagnóstico rápido da leptospirose animal pela soroaglutinação macroscópica com antígenos de *L. biflexa*. São Paulo, 1987, 68p

[Tese de Livre Docência Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

YASUDA, P. H.; SULZER, C.R.; GIORGI, W.; GENOVEZ, M.E. *Leptospira biflexa* sorotipo ranarum isolada de feto abortado eqüino. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 17, n.1, p. 25-27, 1987.

YASUDA, P. H. Experimental leptospirosis(*L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae) of the guinea pig: leptospiral antigen gamma globulin and complement C3 detection in the kidney. **Experimental Pathology**, Estados Unidos, v. 29, p. 35-43, 1986.1997.

WOLFF, J. W., AND BROOM, J. C.: The genus *Leptospira* Noguchi, 1917. Problems of classification and a suggested system based on antigenic analysis. **Documents Medicine Geographic et Tropical**, 6, 78-95 1954.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Current problems in leptospirosis research. **Technology Report**. Ser. 380, p. 3-13, 1967.

ZARI, S.R., SHIEH, W.J. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. **Lancet**, v. 347, n. 9000, p. 535-536, 1996.

ZUERNER, R.; HAAKE, D.; ADLER, B.; SEGERS, R. Technological Advances in the Molecular Biology of *Leptospira*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 2, 455-462, 2000.