

MILTON KOLBER

Emprego do hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo biológico para a indução da condição de portador renal de leptospiras

Tese apresentada ao Programa de Pós – graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos

SÃO PAULO
2006

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

E. Lya
BIBLIOTECA VIRGÍNIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
20/1/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1634
FMVZ

Kolber, Milton

Emprego do hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo biológico para a indução da condição de portador renal de leptospiras / Milton Kolber. – São Paulo : M. Kolber, 2006.
124 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, 2006.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos.

1. Leptospirose animal. 2. Hamsters. 3. Portador renal.
4. Bioquímica renal e hepática. 5. Histopatologia do portador renal.
I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
10	1	1	Emprego do Hamster sírio	Emprego do Hamster
13	1	2	Emprego do Hamster sírio	Emprego do Hamster



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

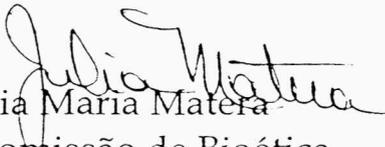
Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Emprego do hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo biológico experimental para a reprodução da condição de portador renal de leptospiras", Protocolo nº 143/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 17/04/2002.

(We certify that the Research "The use of hamster (*Mesocricetus auratus*) in Biologic Experimental Model, for Reproduction the Condition of Renal Carrier of Leptospiras" protocol number 143/2002, under the responsibility of Prof.Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 04/17/2002 meeting.

São Paulo, 17 de abril de 2002


Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KOLBER, Milton

Título: Emprego do hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo biológico para a indução da condição de portador renal de leptospiros

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À Deus todo poderoso que me deu forças nos momentos mais difíceis da minha vida, onde pensei em desistir, onde enxergava somente trevas, mas mostrou-me o caminho da luz e da compreensão e que me abençoou com três pérolas, Camila, Michelle e Nicolle, minhas amadas filhas.

Aos meus queridos e amados pais *in memoriam*, pois sem vocês onde eu estaria?

A vocês filhas que independente de tudo, provei que não existe idade e hora para o aprendizado, tudo tem o seu momento.

Mesmo com as nossas diferenças de opiniões, sempre me apoiaste e me incentivaste no caminho do saber e do aprendizado, muito obrigado Telma, minha esposa.

Todo ser tem um mestre oculto ou não, mas tive o privilégio de tê-lo presente na forma de pessoa humana, reta, ílibada, que me guiou nas veredas do saber; homen íntegro que possui uma qualidade que está em extinção aqui neste planeta, a humildade. Apesar de todo o seu conhecimento humano e científico, consegue dar forças e ânimo àqueles que o estão perdendo. A você Professor Silvio Arruda Vasconcellos a minha eterna gratidão.

Finalmente ao plano espiritual que tem me ajudado sobremaneira.

AGRADECIMENTOS

Agradeco

Ao Prof. Dr. Vicente Borelli que durante a minha tese, nunca deixou de incentivar-me e de ajudar-me quando necessrio. Meu querido Professor na Universidade de S3o Paulo, orgulho-me de sua amizade. Um irm3o que n3o esquecerei.

Ao Prof. Dr. Nilton Abreu Zanco, filho espiritual, que sempre estava e est3a presente para ajudar e orientar, apesar da pouca idade, meu muito obrigado.

A Zenaide, Gisele e 3dina, que sem a colaboraço e o 3rduo trabalho desenvolvido por voc3s junto a mim, esta tese nunca seria terminada. Pessoas em que nunca escutei a palavra n3o, sempre com sorrisos nos l3bios e muita f3 em meu trabalho. Deus vos abenço.

Ao Prof. Dr. Fumio Honma Ito pela suas luzes no ingl3s e no DL 50, alem das palavras de incentivo e coragem que me deram na qualificaço dizendo-me antes de começo: "Como voc3 e corajoso Milton, com sua idade ser sabatinado por n3s que temos a sua idade ou inferior, parab3s".

A querida amiga de longa data Profa. Dra. Silvia Gaido Cortopassi, cuja ajuda foi fundamental no campo da anestesia dos hamsters. Sempre presente, preocupada e pronta a ajudar este amigo (e n3o foram raras as ocasi3es). Deus te abenço e lhe d3 muita luz e sa3de para que continues a ser a pessoa maravilhosa que tens sido comigo.

Ao querido colega de turma Prof. Dr. Idercio Luiz Signorini que prontamente se prop3s a ajudar-me nas t3cnicas histol3gicas. Primeiro indiv3duo que encontrei no tempo de aluno e cuja amizade foi selada permanentemente.

Aos amigos Prof. Dr. Cl3udio Roberto de Almeida Camargo, sem o qual eu nunca poderia estar onde estou e ao Prof. Dr. Celso Martins Pinto pelo incentivo durante os momentos dif3ceis.

A todos os Professores das disciplinas cursadas durante o doutorado, o que seria de mim sem o vosso conhecimento transmitido?

Ao Prof. Casemiro Fernando e ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias pela inestim3vel ajuda na parte estat3stica.

3 Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterin3ria e Zootecnia da USP, em nome das Senhoras F3tima dos Santos e Elza Faquim, que n3o mediram esforços na correço e elaboraço da ficha catalogr3fica.

Ao Departamento de Cl3nica M3dica da do HOVET da USP em nome da Dra. Regina que infatigavelmente ajudou-me na elaboraço dos exames de laboratoriais.

A todos os colegas da p3s-graduaço que direta e indiretamente ajudaram-me com palavras, carinho e amizade, voc3s ser3o inesquec3veis, bem como a todos os amigos e funcion3rios do VPS.

RESUMO

KOLBER, M. **Emprego do Hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) como modelo biológico para a indução de portador renal de leptospiras.** [The use of sirius hamster (*Mesocricetus auratus*) with a biological model to inducing a kidney carrier from leptospirosis.].2006. f. tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.

O emprego do hamsters (*Mesocricetus auratus*) como modelo biológico experimental para a reprodução da condição de portador renal de leptospiras foi investigado em machos e fêmeas jovens com 80 a 120 g de peso vivo. Os animais foram experimentalmente infectados com estirpe patogênica do sorovar Pomona caracterizada por provocar a morte por leptospirose entre o quinto e o décimo dia pós-infecção. No segundo dia pós-infecção os animais foram tratados com estolato de eritromicina, nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 mg/kg de peso vivo. Aos 30 dias, da infecção experimental os sobreviventes foram anestesiados com isoflurano e procedeu-se a colheita de sangue para a determinação dos indicadores da função hepática e renal (Proteínas totais, Albumina, Uréia, Creatinina, Fosfatase Alcalina, Alanina Aminotransferase, Aspartato Aminotransferase, Bilirrubinas Indireta, Bilirrubinas Direta e Bilirrubinas Totais), bem como o título de aglutininas pela prova de soro aglutinação microscópica. A seguir, com o aprofundamento da anestesia, os animais foram submetidos a eutanásia e necropsiados para a colheita de tecido renal e hepático destinados aos exames histopatológicos pelas colorações de Hematoxilina – Eosina e Warthin- Starry, bem como do isolamento de leptospiras por cultivo em meio de Fletcher. Houve controles do inóculo infeccioso, do tratamento com antibiótico e do sistema de manejo adotado. O número de DL 50 efetivamente empregadas no inóculo infeccioso foi de 7,11. No grupo controle do antibiótico foi constatado elevação do nível de fosfatase alcalina e degeneração vacuolares dos hepatócitos para as concentrações de 40 a 80 mg de antibiótico. Os portadores renais de leptospira foram obtidos entre os animais tratados com 40 ou 80 mg de estolato de eritromicina, independentemente do sexo; estes animais apresentaram elevação dos níveis

séricos de creatinina e proteínas totais já as determinações de albumina, uréia, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, bilirrubinas direta, bilirrubinas indiretas e totais foram iguais as encontradas em animais não infectados por leptospiroses e não tratados com antibióticos. As alterações histológicas encontradas nos animais portadores de leptospiroses foram degeneração vacuolar em hepatócitos, sangue no espaço porta, congestão glomerular. Nos animais induzidos a condição de portadores renais de leptospiroses os títulos de anticorpos aglutinantes, para o sorovar homólogo ao da infecção, expressos em logaritmo de base, 10 foram iguais ou superiores a 1,19.

Palavras-chave: Leptospirose. Hamster. Portador renal. Bioquímica renal e hepática.

Histopatologia do portador renal.

ABSTRACT

Kolber, M. **The use of sirius hamster (*Mesocricetus Auratus*) as a biological model for inducing kidney carrier of leptospirosis.** São Paulo, 2005

The use of hamsters (*Mesocricetus auratus*) as experimental model for the reproduction of leptospires kidney carrier condition was investigated on young males and females with 80 to 120 g of living weight. The animals were experimentally infected with pathogenic strain of serovar Pomona able of causing the death by leptospirosis between the fifth and the tenth post-infection day. On the second day post-infection the animals were treated with erythromycin estolate at the concentrations of 10, 20, 40 and 80 mg/ kg of living weight. At the 30th day of experimental infection the survivors were anesthetized with isoflurane and blood sample were collected for the determination of kidney and liver functions (Total proteins, Albumin, Urea, Creatinine, Alkaline Phosphatase, Alanine Aminotransferase, Aspartate Aminotransferase, Indirect Bilirubins, Direct Bilirubins and Total Bilirubins), and the of agglutinine title by the microscopic agglutination test (MAT). The animals were killed with the reinforcement of the anesthesia, and necropsied for the collection of kidney and liver sample for histopathologic tests by staining of Hematoxylin-Eosina and Warthin-Starry, such as the isolation of leptospiras by cultivation into Fletcher's medium. There were controls of the infectious inoculum, antibiotic treatment and of the management system adopted. The number of DL 50 effectively applied in the infectious inoculum was 7,11. The antibiotic controls presented elevation of the alkaline phosphatase level and vacuolar degeneration of hepatocytes at the concentrations of 40 to 80 mg of antibiotic. The leptospire's kidney carriers were obtained in the animals treated with 40 or 80 mg of Erythromycin Estolate, regardless of the sex; these animals showed increase in creatinine's and total protein serum levels but of albumin, urea, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, direct bilirubins, indirect

bilirubins and total bilirubins were the same as found in animals not infected by leptospire and not treated with the antibiotic. The histological changes found in the animals induced as leptospire carrier were vacuolar degeneration in hepatocytes, blood in the portal tract, and glomerular congestion. The agglutinine titles for the homologous serovar, expressed on base 10 logarithm, were at least 1.19.

Keywords: Leptospirosis. Hamster. Kidney carrier. Kidney and liver biochemistry. Kidney and liver histopathology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fígado de hamster do grupo 4 tratado com meio de cultura (EMJH grupo controle) submetido à eutanásia no 30º dia de observação, não havendo alterações histológicas dignas de nota. Presença de hepatócitos bem conservados, não foram encontradas formas compatíveis com leptospiros. Coloração HE e aumento de 750x. São Paulo, 2006..... 75
- Figura 2 - Fígado de hamster do grupo 4 tratado com meio de cultura (EMJH grupo controle) submetido à eutanásia no 30º dia de observação, não havendo alterações histológicas dignas de nota. Não foram encontradas formas bacterianas compatíveis com leptospiros. Coloração de WS e aumento 750x. São Paulo,..... 76
- Figura 3 - Rim de hamster do grupo 4 tratado com meio de cultura (EMJH-grupo controle) submetido à eutanásia no 30º dia de observação, não havendo alterações histológicas dignas de nota. Nota-se cápsula de Bowman bem conservada e sem alterações, além de ausência de formas compatíveis com leptospiros. Coloração de HE e aumento de 750x. São Paulo, 2006..... 77
- Figura 4 - Rim de hamster do grupo 4 tratado com meio de cultura (EMJH grupo controle) submetido à eutanásia no 30º dia de observação não havendo alterações histológicas dignas de nota. Não foram encontradas formas bacterianas compatíveis com leptospiros. Coloração de WS e aumento de 750x. São Paulo..... 78
- Figura 5 - Fígado de hamster do grupo 1 tratado com antibiótico e meio de cultura (EMJH-grupo controle de tratamento com antibiótico) submetido à eutanásia no 28º dia após tratamento com antibiótico, notando-se vacuolização no citoplasma de hepatócitos próximo ao espaço porta. Coloração de HE e aumento 750x. São Paulo, 2006..... 79
- Figura 6 - Fígado de hamster do grupo 1 tratado com antibiótico e meio de cultura (EMJH-grupo controle de tratamento com antibiótico) submetido à eutanásia no 28º dia após tratamento com antibiótico, notando-se vacuolização de citoplasma de hepatócitos próximo ao espaço porta e sem a presença de formas compatíveis com leptospiros. Coloração de WS e aumento 750x. São Paulo, 2006..... 80
- Figura 7 - Rim de hamster do grupo 1 tratado com antibiótico e meio de cultura (EMJH-grupo controle de tratamento com antibiótico) submetido à eutanásia no 28º dia após tratamento com antibiótico, sem alterações renais. Coloração de HE, aumento de 750x. São Paulo, 2006..... 81

Figura 8 - Rim de hamster do grupo 1 tratado com antibiótico e meio de cultura (EMJH-grupo controle de tratamento com antibiótico) submetido à eutanásia no 28º dia após tratamento com antibiótico, sem alterações renais. Coloração de WS, aumento de 750x. São Paulo, 2006.....	82
Figura 9 - Fígado de hamster do grupo 2 que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 10 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção. Nota-se ligeira vacuolização em citoplasma de hepatócitos e formas compatíveis com leptospiras. Coloração de HE, aumento 1150x. São Paulo-2006.....	83
Figura 10 - Fígado de hamster do grupo 2 que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 10 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção, apresentando formas bacterianas compatíveis com leptospiras. Coloração de WS e aumento de 750x. São Paulo- 2006.....	84
Figura 11 - Fígado de hamster do grupo 2 que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 40 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção, observa-se intensa vacuolização em hepatócito, além de congestão do espaço porta. Coloração de HE, aumento de 750 x. São Paulo- 2006.....	85
Figura 12 - Rim de hamster do grupo 2, que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 40 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção, observando-se congestão glomerular. Coloração de HE, aumento de 1150x. São Paulo-2006.....	86
Figura 13 - Rim de hamster do grupo 2, que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 40 mg/ kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção, onde se notam evidentes formas bacterianas compatíveis com leptospiras. Coloração de WS e aumento de 750x. São Paulo- 2006.....	87
Figura 14 - Rim de hamster do grupo 2, que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 80 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção, não há formas suspeitas de leptospiras. Coloração de WS e aumento de 750x. São Paulo-2006.....	88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Hamsters experimentalmente infectados com *L.interrogans*, sorovar Pomona e tratados com diferentes concentrações de estolato de eritromicina. Proporção de portadores renais de leptospiras (cultura positiva), no 30º dia pós infecção, segundo o sexo e concentração de antibiótico. São Paulo-2006..... 57
- Tabela 2 - Hamsters do grupo 4 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado segundo o sexo, a dosagem de proteínas totais, albumina, creatinina uréia dadas em mg/dl, ALT, AST, FAL expressas em UI/L e BD, BI e BT em mg/dl. São Paulo-2006..... 58
- Tabela 3-Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem das proteínas séricas expressa em g/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo- 2006..... 59
- Tabela 4 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da albumina sérica dada em g/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006..... 60
- Tabela 5 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem de creatinina sérica dada em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006..... 60
- Tabela 6 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da uréia dada em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006..... 61
- Tabela 7 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da AST sérica dada em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006..... 61
- Tabela 8 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da ALT sérica dada em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006..... 62
- Tabela 9 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da FAL sérica dada em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006..... 62

Tabela 10 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BD sérica dada em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	63
Tabela 11 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BI sérica dada em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	63
Tabela 12 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, e a dosagem da BT sérica dada em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	64
Tabela 13 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da proteína total sérica expressa em g/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	65
Tabela 14 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da albumina sérica expressa em g/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	66
Tabela 15 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da creatinina sérica expressa em mg/dL e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	67
Tabela 16 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da uréia sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	68
Tabela 17 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da AST sérica expressa em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	69
Tabela 18 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da ALT sérica expressa em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	70
Tabela 19 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da FAL sérica expressa em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	71

Tabela 20 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BD sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	72
Tabela 21 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BI sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	73
Tabela 22 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BT sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.....	74
Tabela 23 - Hamsters do grupo 2, infectados com estirpe patogênica do sorovar Pomona e induzidos a condição de portadores renais de leptospiras pelo tratamento com estolato de eritromicina segundo o sexo, concentração de antibiótico administrada, resultado do cultivo do tecido renal e o títulos de aglutininas anti <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona São Paulo-2006.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT	-alanina aminotransferase
AST	-aspartato aminotransferase
BA	-Bahia
BCG	-Bacilo de Calmette-Guérin
BD	-bilirrubina direta
BI	-bilirrubina indireta
BT	-bilirrubina total
**	-desvio padrão
DL 50	-dose letal 50%
EMJH	-Ellinghausen, McCullough, Jonhson e Harris
F	-fêmea
FAL	-fosfatase alcalina
g/dl	-gramas por decilitros
°C	- graus centígrados
HE	-hematoxilina-eosina
IFCC	-International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.
kg	-kilogramas
M	-macho
≥	-maior ou igual
*	-média
μl	-microlitros
μm	-micrometro

mg	-miligramas
mg/dl	-miligramas por decilitro
mg/kg	-miligramas por quilo
MG	-Minas Gerais
p	-significância estatística
PA	-Pará
PB	-Paraíba
PR	-Paraná
%	-porcentagem
pH	-concentração de hidrogênio iônico
PT	-proteínas totais
RJ	-Rio de Janeiro
SP	-São Paulo
SVS	-Serviço de Vigilância Sanitária
UI/L	-unidades internacionais por litro
WS	-Warthin-Starry

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	CARACTERÍSTICA DA LAPTOSPIROSE.....	27
1.2	AGENTE ETIOLÓGICO.....	29
1.3	IMPORTÂCIA DA LEPTOSPIROSE.....	30
1.3.1	Saúde Pública	30
1.3.2	Saúde Animal	32
1.4	PATOGENIA.....	34
1.5	USO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS PARA O ESTUDO DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS.....	40
1.6	USO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS PARA O ESTUDO DA LEPTOSPIROSE	41
2	OBJETIVO	47
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	ANIMAIS.....	49
3.2	INÓCULO INFECCIOSO.....	49
3.3	ANTIBIÓTICO.....	50
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	50
3.5	MEIOS DE CULTURA.....	451
3.6	TÍTULOS DE AGLUTININAS.....	51
3.7	FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	52
3.8	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE HEPÁTICA E RENAL.....	52
3.9	EXAMES HISTOLÓGICOS.....	54
3.10	CULTIVOS PARA ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS.....	54
3.11	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	55
4	RESULTADOS	57
5	DISCUSSÃO	92

6	CONCLUSÕES.....	98
7	REFERÊNCIAS.....	101
8	ANEXOS.....	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICA DA LEPTOSPIROSE

A palavra leptospirose vem do grego “leptos” que significa fino e “speira” que significa enovelado, novelo (CHEN, 2005).

A leptospirose é uma zoonose de reconhecida importância na saúde pública que vem preocupando epidemiologistas e clínicos, tanto pela dificuldade de erradicação, devido a complexos aspectos epidemiológicos, como pela elevada taxa de letalidade. A doença foi caracterizada como entidade distinta, pela primeira vez em 1880 no Cairo por Larrey, em 1883 na cidade de Paris (França), foram apresentados os resultados de Landouzy, no entanto foi em 1886, na Alemanha que Weil descreveu minuciosamente, quatro casos clínicos em seres humanos, que apresentavam quadros de febre, icterícia, nefrite e hemorragias passando a doença a ser aceita como uma entidade distinta. (ALMEIDA et al., 1998).

A leptospirose é uma doença infecciosa cosmopolita, contudo é mais freqüente nos países tropicais e subtropicais, devido aos fatores climáticos e sócio-econômico-culturais vigentes nestas regiões. Os seres humanos são hospedeiros secundários, acidentais, já os animais domésticos (bovinos, suínos, eqüinos, caprinos e cães) e selvagens (roedores, marsupiais e edentados) comportam-se como hospedeiros primários de manutenção (ACHA; SZYFRES, 1986).

Krawczyk em 2004 na Polônia comparou o risco da transmissão da leptospirose de animais para seres humanos, estudando 457 indivíduos (homens e mulheres) divididos em dois grupos, o primeiro considerado de alto risco, pois trabalhavam em fazendas, com bovinos e suínos e o segundo de risco relativo, selecionando pessoas ao acaso. Os animais da fazenda foram previamente analisados e o resultado foi considerado positivo

para leptospirose pelo teste de aglutinação microscópica. O resultado do grupo I em relação à positividade foi de 13,79% ao passo que o grupo 2 apresentou uma positividade frente aos sorovares utilizados (18) de 1,5%, o que demonstra que o grupo considerado por pessoas que trabalhavam em fazendas de criação de bovinos e suínos apresentou uma proporção de reatores nove vezes maior que o do grupo que não desempenhava atividades ocupacionais relacionadas a animais.

Embora a leptospirose seja reconhecida como doença ocupacional, desde 1970 tem sido observados casos associados a esporte e lazer, como a canoagem, pesca, natação, *wind surf* entre outras, ou seja, modalidades esportivas que utilizam a água como meio de recreação (MC KENZIE, 2004), como registrado em Illinois, e no Hawaii, nos Estados Unidos da América (KATZ et al. , 1991; MORGAN et a l. , 2002), e na Malásia (SEJVAR et al., 2003) nestas situações admite-se que a principal fonte de infecção tenha sido os animais silvestres.

Nos seres humanos as manifestações clínicas da leptospirose são muito variáveis: em algumas ocasiões, ocorrem casos de pequena gravidade que confundem o médico com uma simples gripe e em outras, há formas graves com febre, icterícia, dores abdominais, vômitos, diarreia e meningite que, muitas vezes, levam o paciente à morte, por insuficiência renal, respiratória e/ou hepática (ACHA; SZYFRES, 1986). Atualmente é muito importante o diagnóstico diferencial com a dengue, (KO et al., 2003).

Em algumas ocorrências a leptospirose humana apresenta caráter ocupacional, intimamente relacionado às atividades profissionais de indivíduos que entram em contato com o meio ambiente contaminado por animais infectados. Entre estes profissionais destacam-se: plantadores de arroz, cortadores de cana de açúcar, limpadores de esgotos, mineradores, militares, veterinários e magarefes. (ACHA; SZYFRES, 1986).

No Estado de São Paulo, a leptospirose humana tem apresentado surtos epidêmicos entre dezembro e abril, ou seja, no período do verão e das chuvas, o que confirma ser a doença adquirida na maior parte das vezes por exposição à água de chuva contaminada (ROMERO; BERNARDO; YASUDA, 2003).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da leptospirose foi cultivado com sucesso pela primeira vez em 1914 no Japão por INADA, IDO, HOKI, KANEKO e ITO, que verificaram a presença de um espiroqueta no fígado de uma cobaia (*Cavia porcellus*) inoculada com o sangue de um paciente humano (minerador de carvão) acometido pela doença de Weil (INADA et al., 1916).

As leptospiras são espiroquetas helicoidais com comprimento variável de 6 a 20 µm por cerca de 0,1µm de diâmetro. Possuem movimentação característica e um gancho em pelo menos uma das extremidades. São aeróbios estritos e quando cultivadas em meios adequados, em temperatura de 28 a 30°C, reproduzem-se em sete a doze horas. Em preparações a fresco só podem ser observadas em microscopia de campo escuro. Apresentam afinidade tintorial por corantes à base de sais de prata o que possibilita o emprego das técnicas de coloração de Fontana-Tribondeau para esfregaços e a de Levaditi em cortes de tecido (BEHMER; TOLOSA; FREITAS, 1976; MC MANUS; MOWRY, 1965; SANTA ROSA, 1970), além do método de Warthym-Starryn. Há estirpes de leptospiras patogênicas capazes de provocar doença no homem e nos animais e outras saprófitas encontradas em água doce e salgada de superfície (FAINE, 1982).

As técnicas de impregnação pela prata como Levaditi e Warthin-Starry são utilizadas na rotina para identificação de alguns tipos de espiroquetas; mas apresentam alguns inconvenientes tais como estabilidade dos reagentes, custo, falhas na identificação dos

microorganismos e coloração de estruturas não identificadas como leptospiras, que podem limitar sua utilização (ALVES, 1987; SCANZIANI; IRONI; MANDELI, 1989). Contudo a de Warthin Starry é considerada como a de melhor estabilidade, menor custo e tempo de processamento (ABDU; SLEIGHT, 1965; MICHIMA; CAMPBELL, 1969; TRIPATHY; HANSON, 1974; BRITO 1996).

Na atualidade as leptospiras estão classificadas na ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. Este gênero é formado por sete espécies patogênicas para o homem e animais, *L. interrogans* (senso estrito), *L. borgpetersenii*, *L. weilli*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. kirchneri* e *L. feini* (KMETY; DIKKEN, 1997), com 23 sorogrupos e 230 sorovares (POSTIC et al, 2000) e quatro espécies saprófitas de vida livre, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *T parva*, *L. wolbachii* (EXOPOL, 2005) distribuídas em seis sorogrupos e 38 sorovares, com poucos casos de infecção nos animais e no homem (FAINE, 1982).

Em ausência de parasitismo as condições ambientais favoráveis à sobrevivência das leptospiras são: umidade, proteção contra os raios solares e pH neutro ou levemente alcalino. (ACHA; SZYFRES, 1986; BLENDEN, 1976).

1.3 Importância da Leptospirose:

1.3.1 Saúde Pública

A leptospirose assume papel importante na patologia humana devido à taxa de letalidade que pode ser alta, principalmente nos indivíduos acometidos pela forma icterica. (GOMES et al., 1968; SANTA ROSA et al., 1970).

A leptospirose é hoje identificada como uma doença infecciosa emergente que se manifesta em diversos países sob a forma de grandes surtos (SCHWARTZ, 1997). A Organização Mundial da Saúde considera a leptospirose como a única doença no mundo, transmitida pela exposição à água contaminada que tem se manifestado sob a forma de surtos

epidêmicos como os registrados na Nicarágua em 1995, na região de Kraznodar na Federação Russa em 1997, em Santa Fé nos Estados Unidos da América em 1988, em Orissa na Índia em 1999, na Tailândia em 2000 e no Brasil em 1983, 1988 e 1996.

No Brasil no período de 1993 a 2002, foram registrados um total de 32930 casos de leptospirose em seres humanos, com a média anual de 3293 casos. Destaque-se o ano epidêmico de 1996 que contou com 5579 casos. Cerca de 10 a 15% destes casos são fatais com óbitos decorrentes da insuficiência hepática e renal. A manifestação da doença no Brasil, em ecossistemas urbanos, obedece a um perfil característico, nos quais os focos estão associados à presença de roedores sinantrópicos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

No Brasil, o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) é o principal responsável pela infecção humana. As leptospiros podem infectar diversos grupos de animais vertebrados, no entanto, na atualidade os mamíferos são os que apresentam maior significado epidemiológico. Investigações executadas em ecossistemas silvestres, não modificados pela ação humana, referem à presença de infecção em roedores, marsupiais, carnívoros e edentados, no entanto, no Brasil, nos ecossistemas rurais e urbanos o principal reservatório de leptospiros são os roedores sinantrópicos, principalmente o *Rattus norvegicus*, (VASCONCELLOS, 1987). Saliente-se que neste último grupo de animais a relação hospedeiro-parasita apresenta uma condição de equilíbrio, na qual os animais acometidos usualmente não exteriorizam qualquer sinal de infecção (VASCONCELLOS, 1993; VASCONCELLOS 1997). As leptospiros multiplicam-se nos rins do *R. norvegicus* sem causar danos, e são eliminadas pela urina, às vezes durante toda a vida. O homem é infectado casual e transitoriamente e não tem importância na cadeia epidemiológica como transmissor da doença. (MARTINS; CASTANHEIRAS, 2001).

O primeiro isolamento de leptospiras em roedor sinantrópico (*Rattus norvegicus*), no Brasil foi efetuado por Aragão, em 1917 na cidade do Rio de Janeiro. As constatações subseqüentes foram registradas em São Paulo (SP) (CARINI, 1918), Rio de Janeiro (RJ) (LINS, 1925), Salvador (BA) (ARAUJO, 1928), São Paulo (SP) (FONSECA; PRADO, 1923), Rio de Janeiro (RJ) (FIALHO, 1936), São Paulo (SP) (FORATTINI, 1947; NÓBREGA, 1947), Rio de Janeiro (RJ) (SANTOS, 1947), Belém (PA) (DEANE, 1947), São Paulo (SP) (GUIDA, 1949; GUIDA; MONICI, 1949), São Paulo e Santos (SP) (GOMES et al., 1950), Belo Horizonte (MG) (BARBOSA; HIPÓLITO, 1952), Curitiba (PR) (ENRIETTI, 1954), Salvador (BA) (ANDRADE; OLIVEIRA, 1954), São Paulo (SP) (MEIRA; SANTA ROSA, 1964), São Paulo (SP) (SANTA ROSA et al., 1980), Rio de Janeiro (RJ) (CORDEIRO et al., 1981), Itaguaí (RJ) (CORDEIRO et al., 1981), Pindamonhangaba (SP) (CORDEIRO et al., 1981) e Santos (SP) (GIORGI et al., 1984).

Dentre os animais domésticos presentes em áreas urbanas, os cães destacam-se como fontes de infecção para a leptospirose humana. Estes animais podem eliminar leptospiras pela urina, durante meses, sem apresentar sinais clínicos (ACHA; SZYFRES, 1986). Durante o período de agosto de 1997 a julho de 1998 em Patos (PB), a prevalência de leptospirose canina foi de 20% das 114 amostras colhidas (ALVES et al., 2000). Em áreas metropolitanas adensadas como as cidades de São Paulo e Rio de Janeiro, a proporção de cães sororeatores para leptospirose tem sido superior a 20%. (SANTA ROSA, 1981; YASUDA et al., 1980a; YASUDA et al., 1980b).

1.3.2 Saúde Animal

Os mamíferos domésticos de produção, trabalho e companhia são susceptíveis e acometidos por leptospiras tanto nas áreas rurais como urbanas (VASCONCELLOS, 1987; VASCONCELLOS, 1997). Nas espécies domésticas de interesse

zootécnico (bovinos, ovinos, caprinos, suínos e eqüinos) a leptospirose está relacionada basicamente a distúrbios da esfera reprodutiva, causando abortamentos, natimortalidade, esterilidade e queda da fertilidade. Dependendo do sorovar envolvido e de fatores relativos ao hospedeiro, como espécie, grau de imunidade e estado fisiológico, pode ocasionar grandes prejuízos econômicos nos rebanhos com a mortalidade de animais jovens e a queda no ganho de peso e na produção de leite (GUIMARÃES et al., 1982/83).

TERUYA et al. (1981) pesquisaram aglutininas anti-leptospira em suínos de um matadouro próximo a cidade de São Paulo, aparentemente sadios encontrando 16,20 % animais positivos, com predominância para os sorovares Pomona, Wolffii e Grippytyphosa; Lilenbaum (1998), em criações de eqüinos no Estado do Rio de Janeiro encontrou 42,96% de positividade; Lilenbaum et al. (2003) encontrou 46,90% de positividade em rebanhos bovinos na cidade do Rio de Janeiro; Rodrigues et al. (1999), na bacia leiteira da região de Londrina, PR registraram 13,25% de reatores positivos. Fávero et al. (2001) e Fávero et al. (2002) reuniram resultados obtidos pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período de 1984 a 1997 e de um total de 46.954 soros examinados de diferentes espécies animais as proporções de reatores positivos foram: bovinos 38,07% (11884/31210), bubalinos 43,30% (381/879), caprinos 4,170% (65/1262), ovinos 0,70% (2/284), suínos 24,46% (2096/8568), eqüinos 29,07% (844/2903) e cães 17,70% (174/983); houve variações regionais no percentual de animais reatores e nos sorovares predominantes. Oliveira et al. (2001) na cidade de Garanhuns em Pernambuco, investigaram a prevalência da leptospirose em quinze propriedades, obtendo 221 positivas, de 464 animais examinados, ou seja, 47,53% com título maior ou igual a 100.

Ferreira Neto et al. (1997) analisaram o desempenho reprodutivo de uma granja de suínos a partir de registros colhidos no período de 1988-1993 em 28 porcas soro positivas para *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae e 87 soro negativas,

verificaram estatisticamente que os animais soropositivos possuíam maior risco de produzir leitões debilitados, no entanto para as outras características analisadas: retorno ao cio, mumificação fetal e natimortalidade não houve diferenças significativas.

Langoni et al. em 1999 colheram amostras pareadas de soro de 120 vacas Holstein de 10 propriedades do Estado de São Paulo que apresentaram abortamento, bem como os rins dos fetos abortados (histológico e cultura) e verificaram entre outros resultados que 72 dos 120 fetos examinados apresentaram evidências de infecção por leptospirose.

Dentre os animais silvestres mantidos em cativeiro, Lilenbaum et al. (2002) encontraram 37,7% de positividade em 77 animais do Zoológico do Rio de Janeiro distribuídos em nas 38 espécies. Os grupos mais acometidos foram canídeos (7/9), procionídeos (5/9) e edentados (5/9). Correa et al. (2004), em levantamento sorológico efetuado em animais silvestres mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, verificaram que de 302 animais atendidos na Divisão Veterinária no período de 1996 a 1999, 59 (19,5%) apresentavam resultados sorológicos positivos para a leptospirose. Animais sinantrópicos: ratos (*Rattus norvegicus*) e gambás (*Didelphis marsupialis*) foram capturados na Instituição e examinados encontrando-se soropositividade em 48,2% dos ratos e 40% dos gambás, concluindo-se que a presença dos mesmos estava associada as áreas críticas do Zoológico.

1.4 PATOGENIA

As leptospiras eliminadas na urina de animais infectados têm acesso ao ambiente e aí sobrevivem por tempo variável de acordo com as condições de umidade, temperatura e pH (FAINE et al., 1999). Quando entram em contato com hospedeiros vertebrados suscetíveis os microrganismos penetram através da pele e das mucosas (ocular, respiratória, digestiva e genito-urinária). A presença de pequenos ferimentos da pele facilita a

instalação, no entanto até a pele íntegra pode ser vencida desde que haja permanência prolongada em água contaminada o que provoca a dilatação dos poros (MARTINS; CASTINEIRAS, 2001).

Após a invasão das barreiras naturais, tais como pele e mucosas, as leptospiras ganham a corrente sanguínea ou linfática e difundem-se por todo o organismo. O período de incubação é variável de acordo com o sorovar e a dose infectante e situa-se entre dois a 20 dias. A partir do início dos primeiros sintomas, ocorre a fase septicêmica (leptospiremia) com duração de quatro a sete dias, neste período as leptospiras são encontradas no sangue, fluido cerebrospinal e tecidos. As lesões primárias observadas nas células endoteliais de revestimento dos vasos sanguíneos são sucedidas por hemorragias, formação de trombos e infartos nas áreas cujo aporte sanguíneo foi bloqueado pelos coágulos. Os órgãos mais comprometidos nesta fase são usualmente fígado, rins e pulmões que ao perderem suas respectivas funções determinam a presença de icterícia, uremia e hemorragias pulmonares. Nesta fase há um aumento da uréia e creatinina sérica que em casos muito severos apresentam níveis muito elevados. Estabelece-se uma nefrite intersticial; a urinálise demonstra a presença de hemácias, leucócitos, cilindros granulosos e de bilirrubina. Os níveis de bilirrubinas podem alcançar picos elevados, mas os níveis de aminotransferases são variáveis. (FAINE, 1982).

Brito (1968), verificou que as alterações celulares decorrentes da presença das leptospiras em tecidos com tropismo positivo para este microorganismo tais como fígado e rins, podem ser visualizadas através da prova de Hematoxilina – Eosina. Nos rins os túbulos proximais e distais podem se apresentar dilatados com edema intersticial, sobretudo na junção córtex medular, além de áreas onde infiltrados inflamatórios com linfócitos, histiócitos e raros eosinófilos são encontrados em volta dos glomérulos.

Oliva et al. (1994) reproduziram a leptospirose aguda em hamsters sírios machos, experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovares Pomona, Canícola e Icterohaemorrhagiae. Todos os animais apresentaram processos congestivos e hemorrágicos cuja intensidade variou de acordo com o sorovar aplicado, sendo que os mais afetados foram os animais inoculados com o sorovar Pomona. O fígado mostrou grande congestão com perda do arranjo estrutural dos cordões de hepatócitos, vários graus de degeneração como necrose e focos de reservatórios de hemossiderina. Houve ampla congestão renal nas regiões de córtex e medula, com presença de cilindros hialinos, degeneração epitelial e necrose tubular.

Van Den Ingh e Hartman (1986) descreveram os achados patomorfológicos da leptospirose na fase aguda em hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans*, sorovar Icterohaemorrhagiae. Dois animais foram submetidos a eutanásia três dias após a infecção em ausência de sinais clínicos, três animais foram submetidos a eutanásia entre cinco e sete dias pós-inoculação na presença de sinais clínicos da doença e o sexto animal morreu seis dias após inoculação. Houve dois animais não infectados como grupo controle. Os estudos comparativos dos achados histológicos entre o grupo controle e os que foram submetidos a eutanásia no terceiro dia pós-inoculação não apresentaram diferenças significativas, no entanto os demais apresentaram rins com glomerulopatia trombótica com evidente trombose em capilares glomerulares e deposição de proteína incluindo fibrina e eritrócitos na cápsula de Bowman, e também, tubulonefrose severa, hiperemia e leucócitos nos vasos. O fígado apresentou arquitetura normal, porém com intensa celularidade devido a proliferação de células de Kupffer, leucocitose, especialmente neutrófilos e notaram também a presença de algumas células mononucleares e neutrófilos em áreas do sistema porta. Foram vistas algumas células hepáticas apresentando necrose. As leptospirosas só foram observadas nos exames de imunofluorescência e na microscopia eletrônica.

Silva e et al. (2005) estudaram a histopatologia de fígado, rins e útero de 96 fêmeas bovinas escolhidas aleatoriamente em um abatedouro frigorífico do Estado do Paraná, pelo método da hematoxilina eosina e imunoperoxidase. Em nove animais foram visualizados leptospiros na urina pelo método do campo escuro, mas todas as tentativas de isolamento na urina, fragmentos de rim, fígado e útero mostraram-se negativas após 16 semanas de incubação nos meios de cultura EMJH modificado e Tween 80. As alterações histológicas observadas em fragmentos de rim foram infiltrados intersticiais de células mononucleares. Não foram encontradas alterações sugestivas de leptospirose em fragmentos de fígado e útero.

Skilbeck et al. (1988) não observaram lesões significativas em rins de bovino em que houve isolamento de leptospiros.

Venugopal e Ratnam (1989), na Índia, investigaram hamsters sírios e cobaios de ambos os sexos com soroprecipitação prévia negativa para *Leptospiras interrogans* sorovares Autumnalis, Grippotyphosa e Pomona concluindo que após inoculação destes sorovares e utilizando as técnicas da impregnação pela prata, microscopia de campo escuro e imunofluorescência, ocorreu a presença do sorovar Pomona nos rins, fígado e urina de hamsters no 7º dia pós infecção, somente no fígado no 14º dia e finalmente somente nos rins no 21º dia. Verificaram a presença do sorovar Pomona no fígado e urina de cobaios no 7º dia pós - infecção, nos rins no 14º dia, sendo que no 21º e 28º dia não foram encontradas leptospiros e no 35º dia o microorganismo foi registrado nos rins e nas urinas dos cobaios. Verificaram também a presença de alterações histológicas nos rins e fígado de todos os grupos inoculados, sendo que as lesões hepáticas iniciais foram de natureza hemorrágica nas duas espécies na 1ª semana pós-infecção a partir de então houve degeneração vacuolar nos cobaios, nos hamsters foi constatado perda dos núcleos, edema endotelial com obliteração e necrose focal dos sinusoides hepáticos. Nos hamsters e nos cobaios as alterações renais iniciais observadas nos primeiros sete dias foram hiperemia glomerular, degeneração

gordurosa nos túbulos contornados proximais seguidas nas semanas seguintes, nos hamsters, por uma hemorragia tubular, necrose, nefrite intersticial e descamação epitelial enquanto que nos cobaios além destas lesões também houve a exposição da membrana basal. Concluíram que as lesões histopatológicas no fígado são progressivas nos hamsters, mas muito mais severas nos cobaios. A demonstração das leptospiros no fígado foi verificada com maior intensidade nos estágios iniciais da doença, mas a partir do momento em que se inicia a resposta imunológica as leptospiros instalam-se nos rins, embora em poucos casos o agente também possa ser encontrado nos rins nos primeiros dias de infecção.

Faine et al. (1999), relataram que as lesões teciduais causadas pelas leptospiros dependem do sorovar infectante e da resposta imunológica do hospedeiro, ao passo que Baskerville (1986), verificou que as alterações histológicas visualizadas pelo método da coloração de hematoxilina-eosina (HE) podem ser inespecíficas, propondo que esta técnica deva ser sempre associada a outros ensaios.

Sebastian (1994) verificou que na leptospirose a intensidade das lesões teciduais está intimamente ligada a estirpe do sorovar utilizado e a adaptabilidade do hospedeiro.

Marinho et al. (2003) estudaram além da formação de anticorpos, o perfil tecidual de fragmentos de rim, fígado, coração e pulmão de camundongos de linhagens específicas H (bons produtores de anticorpos), L (maus produtores de anticorpos) e Balb/c no estudo da leptospirose utilizando camundongos com 4 a 8 semanas de idade e inóculo constituído de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae praticando a eutanásia em oito momentos diferentes. As técnicas histológicas utilizadas foram a Hematoxilina-Eosina (HE) e a impregnação pela prata, técnica de Warthin-Starry. As lesões apresentadas nos órgãos dos camundongos infectados foram processos inflamatórios e degenerativos, que não se alteraram, variando apenas o grau de comprometimento tecidual, de acordo com a linhagem. A linhagem

H apresentou lesões mais extensas que as linhagens L e Balb. A única linhagem em que foram encontradas leptospiros pela técnica de Warthin-Starry foi a H, no 14º dia pós infecção.

Alves et al. (1992) estudando a influência da estimulação inespecífica com o BCG sobre a susceptibilidade do Hamster, verificaram que no grupo que só recebeu placebo (meio de Souton) e inóculo infeccioso (*L. interrogans* sorovar Pomona), as alterações histológicas do rim, foram constituídas por hemorragia intersticial, tanto na cortical quanto medular, necrose de túbulos e glomérulos, hemossiderose e calcificação tubular. No fígado as lesões encontradas foram congestão severa e presença de áreas necróticas com distribuição médio zonal, desorganização trabecular com isolamento dos hepatócitos e sinais de destruição dos sinusóides, com degradação dos eritrócitos e hemossiderose.

Nos indivíduos que sobrevivem a leptospiremia, há a produção de anticorpos humorais e o estabelecimento da fase imune com duração variável. Neste período, as leptospiros desaparecem da circulação e do fluido cerebrospinal e localizam-se, em áreas de privilégio imunológico, seqüestradas do sistema imune: túbulos contornados renais, câmara anterior do olho, sistema nervoso central e aparelho reprodutor. (FAINE, 1982; TURNER, 1967).

Os animais que sobrevivem a fase aguda da leptospirose podem desenvolver a condição de portadores convalescentes onde as leptospiros instalam-se e multiplicam-se nos túbulos renais e são eliminadas para o meio ambiente por períodos variáveis. Imunoglobulinas específicas são normalmente achadas na urina, provavelmente produzidas nos rins. Estes indivíduos desempenham importante papel na transmissão da doença para outros animais e para o homem. As leptospiros também podem persistir no trato genital, sendo desta forma eliminadas pelo sêmen e secreções vaginais e, portanto transmitidas pela cópula ou inseminação artificial (FAINE et al., 1999).

Na leptospirose em seres humanos, de acordo com o sorovar infectante pode ocorrer a forma anictérica (90% dos casos) e a forma ictérica (5 a 10% dos casos) com características já descritas (FERNANDES, 2001).

Os animais domésticos infectados e que resistem a fase aguda da doença tornam-se fontes de infecção em potencial (portadores convalescentes) as fêmeas que abortam passam a eliminar leptospiras via envoltórios fetais, corrimentos vaginais e urina; os machos eliminam o microrganismo via urina e sêmen. A eliminação urinária de leptospiras é intermitente, porém pode persistir durante meses ou anos (FAINE et al., 1999).

1.5 USO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS PARA O ESTUDO DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS

O uso de animais para pesquisas biológicas iniciou-se em meados do século XIX particularmente na Alemanha e França quando houve um avanço acentuado no estudo da fisiologia. Desde então o uso de animais vivos para a pesquisa no campo da microbiologia, imunologia, cirurgia, oncologia e farmacologia foi uma constante. Entende-se por modelo biológico de laboratório, definido pelo Comitê Nacional de Modelos Animais para Pesquisa dos Estados Unidos como sendo um “modelo animal onde normas biológicas e de comportamento podem ser estudadas, ou nos quais os processos patológicos espontâneos ou induzidos podem ser investigados e cujos fenômenos verificados podem ser semelhantes aos encontrados no homem ou em outros animais”. Muitas vezes a escolha de um animal como modelo biológico que se assemelhe ao homem como, por exemplo, o macaco, pode falhar na repetição de patologias que ocorrem no primeiro por isso não é raro o insucesso na pesquisa biológica quando se usa um modelo animal. Portanto o problema principal é a extrapolação, ou seja, a transferência dos resultados obtidos no modelo biológico. (SALÉN, 1994).

1.6 USO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS PARA O ESTUDO DA LEPTOSPIROSE

Dentre os animais de laboratório usualmente empregados para o estudo da leptospirose, tais como cobaias (FAINE, 1982), gerbil (YUKAWA, 1991), e primatas (PEREIRA et. al., 1999) o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*), tem sido um dos mais utilizados (FAINE et al., 1999).

O hamster sírio (*Mesocricetus auratus*), descrito por Waterhouse em 1839, é um roedor de cor amarelo forte, de pelos moderadamente longos (MAGALHÃES, 1959) que tem sido utilizado como modelo biológico de grande valia para o estudo das infecções por leptospiras devido à suscetibilidade, facilidade de manutenção em biotérios e também por apresentar grande uniformidade genética. Nestes animais já foram efetuados estudos da leptospirose experimental (BRUNNER, 1948; BÜRKI, 1960; SANGER, 1961; SEMENOVICH et al. 1988; VYSOTSKII, 1970), da patogênese da doença (FIZETTE, 1956; ARZUIMANIAN, 1967), do aprimoramento do diagnóstico empregando-se a fixação do complemento (BUERKI, 1961), da nutrição (SMITH et al., 1961), da pesquisa da virulência do agente (BURKI, 1962), da investigação da patologia (ABDU et al., 1965; BADIOLA et al., 1983; INGH et al., 1986; MURTI, 1962), do monitoramento da forma aguda, da doença por microscopia eletrônica para verificação da lesão tubular renal (MILLER et al., 1967), do emprego da hemoaglutinação microscópica como resposta a agressão pelo sorovar Pomona (NEGI et al., 1971), do isolamento e propriedades imunogênicas (AURAM, 1972; KRONHAUS, et al., 1989), do teste de agentes químicos e do efeito de antimicrobianos aplicados a terapia de leptospirose (BALDWIN et al., 1972; SANTOS et al., 2001; WOOD et al., 1960), de técnicas de anti corpos fluorescentes (COOK et al., 1972), como portador (MILLER, 1972), do desenvolvimento de vacinas (BEY, 1974; HUHN, 1975; HUHN et al., 1975) da observação de lesões renais frente a infecção pelo sorovar Icterohaemorrhagiae (COX; TWIGG, 1981), da análise de alterações

morfológicas em órgãos frente a doença (EZHKOVA, et al., 1983), da avaliação histopatológica do fígado de hamsters gestantes infectadas por leptospiras (SAPP et al., 1981), da avaliação de rins de hamsters gestantes infectadas por leptospiras (WILLIAMS et al., 1981), do controle da hematopoese frente a destruição de células com radiação gama (THOMPSON; JOHSTONE, 1987), no isolamento de leptospiras de tecido renal de hamsters experimentalmente infectados (PASSOS et al., 1988), na presença do agente nos ovários (CAMARGO et al., 1998).

A busca da reprodução experimental da condição de portador renal de leptospiras em sistemas biológicos tem suscitado o emprego de diferentes expedientes: concentrações decrescentes do sorovar infectante (YUKAWA, 1991); o tipo de via empregada para a infecção experimental (MACEDO et al., 2004); infecções imunomoduladas (ALVES 1992); a imunização e infecção associadas a doses variáveis do imunógeno e do inóculo infectante (THOMÉ et al., 1998), bem como o controle da infecção experimental através do uso estratégico de antimicrobianos que sustentam a leptospiremia, mas que não impedem a colonização dos túbulos renais (ALEXANDER; RULE, 1987; CAMARGO et al., 1998; PINTO et al., 1999).

Miller (1972) ressalta que animais infectados por leptospiras podem se tornar portadores temporários ou permanentes do microorganismo, albergando as leptospiras nos túbulos renais e as eliminando periodicamente ao meio ambiente. Um mesmo sorovar pode prontamente transformar uma espécie animal em portadora, enquanto que pode falhar em outras. Verificou também que diferentes estirpes de leptospiras pertencentes a um mesmo sorovar podem comportar-se diferentemente no mesmo hospedeiro. Assim trabalhando com diferentes estirpes da *Leptospira interrogans*, do sorovar Pomona (linhagem 3341 e MLS aguda), em hamsters de três a quatro semanas de idade e inoculando 0,5 ml de cultura positiva, verificou que os animais infectados com a linhagem 3341 apresentaram um índice de

positividade para cultura de urina de 83%, para fragmentos de rins de 85% e dos cortes histológicos 79%, ao passo que os que receberam a linhagem MLS, na mesma ordem obtiveram em porcentagem 46%, 65% e 36%, ficando claro que nas mesmas condições e usando-se o mesmo modelo biológico houve variação nos indicadores de infecção empregados.

Alexander e Rule (1987) verificaram que em hamster experimentalmente infectados com uma estirpe de *L. interrogans*, sorovar Bataviae e tratados pela via oral, no segundo dia pós-infecção, com concentrações variáveis (10 a 160 mg/kg), de quatro diferentes grupos de antimicrobianos (penicilina, cefalosporinas, tetraciclina e eritromicina), houve uma maior proporção de portadores renais entre os sobreviventes do grupo tratado com o estolato de eritromicina (concentrações de 40 e 160 mg/kg).

Camargo et al. (1998), em hamsters fêmeas experimentalmente infectadas com uma estirpe de *L. interrogans* sorovar Pomona e tratadas pela via oral, no segundo dia pós-infecção, com o estolato de eritromicina na concentração de 40 mg/kg obtiveram 88,5% (54/61) de portadores renais com declínio na frequência da infecção renal durante o período de observação adotado (17 a 78 dias pós-infecção).

Pinto et al. (1999), em hamsters machos, experimentalmente infectados com a mesma estirpe de *L. interrogans* sorovar Pomona, empregada por Camargo et al. (1998) e tratados pela via oral, no segundo dia pós-infecção, com o estolato de eritromicina na dose de 25 mg/kg de peso vivo encontraram 36,61% (26/71) de portadores renais com declínio na frequência da infecção renal durante o período de observação adotado (15 a 120 dias pós-infecção).

A eritromicina é um macrolídeo que possui um anel lactônico macrocíclico, ao qual estão ligados açúcares e de acordo com o número de átomos deste anel são classificados em grupos entre os quais está a eritromicina, que possui 14 átomos. Este macrolídeo foi obtido em 1952 a partir de culturas de *Streptomyces erythreus*. Possui ação

bacteriostática intermediária e é ativo contra bactérias Gram positivas e micoplasmas possuindo boa atividade contra bactérias anaeróbias. A eritromicina é lipossolúvel, atravessa barreiras celulares, é bem absorvida quando administrada por via oral biotransformada no fígado (SPINOSA, 1999).

O estearato de eritromicina raramente provoca efeitos colaterais e não induz a toxicidade hepática e renal, entretanto o estolato de eritromicina é citado em diversas publicações, relativamente a sua potencial hepatotoxicidade e fenômenos de colestase intra-hepática (MOCE; MOCEL, 1977).

Longueville et al. (2003) usaram como modelo biológico culturas de hepatócitos de ratos expostos a vários agentes hepatotóxicos, entre os quais o estolato de eritromicina para avaliação da expressão gênica frente a uma nova técnica de avaliação dos agentes tóxicos em hepatócitos.

Lazarczyc e Duffy (2000) citam um caso clínico onde uma senhora foi tratada com eritromicina oralmente por oito dias e após três semanas a mesma apresentou icterícia pelo uso do antibiótico, acarretando a instalação de uma cirrose biliar primária onde a fosfatase alcalina, AST, ALT e a bilirrubina total, estavam alteradas, confirmando-se o diagnóstico por histologia. Os mesmos autores afirmam que o estolato de eritromicina é a forma de eritromicina que pode ter como efeito indesejável a colestase intrahepática com evidente aumento da fosfatase alcalina e aminotransferases séricas.

Venkateswaran et al. (1977), usaram o estolato de eritromicina como modelo biológico experimental para provocar hepatotoxicidade em ratos machos albinos da linhagem Wistar, observando que os animais tratados com estolato de eritromicina apresentaram alterações hepáticas significantes com elevação de aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e bilirrubinas séricas. A histopatologia revelou congestão dos vasos portais,

dilatação vascular sangüínea infiltração de células inflamatória na zona II e dilatação sinusoidal.

O ajuste dos pontos divergentes dos experimentos de Camargo et al. (1998) e Pinto et al. (1999) no relativo a sexo, concentração do inóculo infectante e dose do estolato de eritromicina poderá contribuir para a caracterização de um modelo biológico experimental que apresente maior reprodutibilidade.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo geral o emprego hamster (*Mesocricetus auratus*), como modelo biológico para a reprodução da condição de portador renal de leptospiros.

Os objetivos específicos são:

1- Determinar a dose ideal de estolato de eritromicina que possibilite a maior proporção de portadores renais de leptospiros com menor interferência nos parâmetros clínicos (função hepática e renal) do sistema biológico empregado.

2- Investigar a hipótese da influência do sexo (machos jovens e fêmeas nulíparas) no que concerne a instalação da condição de portador renal de leptospiros.

3- Determinar os parâmetros clínicos do sistema biológico empregado: provas de função hepática (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina e bilirrubinas) e renal (uréia e creatinina) dos animais a fim de se aquilatar alterações que possam ocorrer nos portadores renais de leptospiros comparativamente aos controles não infectados por leptospiros e não tratados com antimicrobianos.

4-Determinar títulos de aglutininas anti-leptospira no momento da eutanásia dos animais portadores renais de leptospiros.

5-Analisar as alterações histológicas dos rins dos animais portadores renais de leptospiros, comparativamente aos controles não infectados, por leptospiros e não tratados com antimicrobianos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 146 hamsters jovens (*Mesocricetus auratus*), 73 machos e 73 fêmeas, cujo peso variou de 80 a 120 g, criados no Biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais com base no princípio da homogeneização do peso vivo.

3.2 INÓCULO INFECCIOSO

O inóculo infectante foi uma suspensão de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona tipificada pela prova de absorção de aglutininas (SANTA ROSA, 1970), fornecida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A concentração do inóculo foi determinada por contagem em câmara de Petroff-Hauser (Anexo B).

O inóculo infectante (Anexo A) foi preparado a partir de macerados de tecido hepático de hamsters infectados e submetidos a eutanásia na fase agônica como preconizado pelo United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service, (1977).

3.3: ANTIBIÓTICO

O antibiótico empregado foi o estolato de eritromicina* concentração de 100 mg/ml (ALEXANDER; RULE, 1987; ALT; BOLIN,1996) na dosagem variável de 10 a 80 mg por kg de peso vivo, administrado pela via oral.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo 1. Quatro conjuntos de seis animais (três machos e três fêmeas), mantidos em gaiolas separadas que receberam individualmente 0,2 ml de EMJH modificado (ALVES et al. 1996; TURNER, 1970) e 48 horas depois o antibiótico nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 mg/kg de peso vivo, incluindo seis animais dos quais três machos e três fêmeas por concentração de antibiótico (grupo controle de tratamento com antibiótico).

Grupo 2. Oito conjuntos de dez animais (quatro conjuntos de dez machos e quatro conjuntos de dez fêmeas) inoculados com 0,2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/mL e 48 horas depois receberam o antibiótico nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 mg/kg de peso vivo ou seja, oitenta animais dos quais 40 machos e quarenta fêmeas por concentração de antibiótico (grupo infectado por leptospira e tratado com antibiótico).

Grupo 3. Um conjunto de seis animais (três machos e três fêmeas) que receberam individualmente 0,2 ml do inóculo infeccioso de leptospira (grupo controle do inóculo).

Grupo 4. Um conjunto de seis animais (três machos e três fêmeas) que receberam individualmente 0,2 ml de EMJH modificado, (ALVES et al. 1996; TURNER, 1970) (grupo controle do ambiente).

Grupo 5. Cinco conjuntos de seis animais (três machos e três fêmeas) recebendo o primeiro 0,2 ml de inóculo na diluição 10^{-1} , o segundo 0,2 ml de inóculo na

* Ilosone-Laboratório Lilly Av. Morumbi, 8264, São Paulo/Brasil

diluição 10^{-2} , o terceiro 0,2 ml de inóculo na diluição 10^{-3} e assim sucessivamente até o quinto conjunto que recebeu 0,2 ml de inóculo na diluição 10^{-5} (grupo titulação do inóculo infeccioso).

3.5 MEIOS DE CULTURA

O meio semi-sólido de Fletcher (SANTA ROSA, 1970), foi empregado para a manutenção do sorovar infectante, para as provas de isolamento, bem como dos demais sorovares utilizados para a prova de soroaglutinação microscópica (Anexo F). O meio líquido de EMJH modificado* (ALVES *et al.*, 1996; TURNER, 1970) foi empregado para o crescimento dos sorovares de leptospiros utilizados na reação de soroaglutinação microscópica, e para as infecções experimentais (Anexo D).

3.6 TÍTULOS DE AGLUTININAS

Foi empregada a microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose (COLE et al., 1973; GALTON et al., 1965), com ponto de corte na diluição 1:100 e titulação em série geométrica de diluições de razão dois. O título foi considerado como a recíproca da maior diluição do soro em que houve 50% de leptospiros aglutinados por campo microscópico.

* Difco® Distribuído por Sunmoon Produtos Científicos LTDA-ME, R. Cleo Mario Gaccione, 263 V.Alba SP/Brasil

3.7 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

Os animais foram observados diariamente (duas vezes pela manhã e duas vezes à tarde e duas vezes durante os finais de semana) e os que apresentaram sinais clínicos de leptospirose (emagrecimento, pelos arrepiados, anorexia, hemorragias e icterícia) foram submetidos à eutanásia na fase agônica (inalação de vapores de isoflurano) para a colheita de sangue para determinação dos níveis de aglutininas anti-leptospira e avaliação das funções hepática e renal e fígado, destinado aos exames microbiológicos e histológicos.

No trigésimo dia da infecção experimental os sobreviventes foram anestesiados pela inalação de vapores de isoflurano[®] e foi efetuada a colheita de sangue por punção cardíaca para a avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira bem como das funções hepática e renal, a seguir com o aprofundamento da anestesia os animais foram submetidos a eutanásia para colheita dos materiais (fígado e rim) destinados aos exames microbiológicos e histológicos.

3.8 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE HEPÁTICA E RENAL

a) Proteínas Totais (Labtest) foram avaliadas com o reativo de Biureto, método de Kjeldahl (HENRY et al., 1974; PENNOCK et al., 1968; TIETZ, 1970) e leitura em espectrofotômetro analógico ou digital convencional.

b) Bilirrubinas totais e frações (Merckotest) foram determinadas pelo método do Diazo reativo (LIPSITZ; LONDON, 1973) em volumes individuais de 400 µl de soro, com leitura em espectrofotômetro convencional.

[®] Forane-Abbott

c) Fosfatase Alcalina (Labtest) foi investigada pelo método de Bowers e Mc Comb modificado (IFCC, 1983; MC COMB et al., 1981; TIETZ, et al., 1983) a partir do exame individual de um volume de 20µl de soro.

d) Aspartato Amino Transferase (AST) (Merckotest), foi determinada pelo método da catálise e transaminação da L-aspartato e do 2- oxoglutarato em oxalacetato e glutamato proposto pela IFCC (BERGMEYER, 1972; SCHLEBUSCH et al., 1974) a partir do exame de um volume de 50µl de soro.

e) Alanina Amino Transferase (ALT) (Merckotest), determinada por catálise reversível e transaminação da L- alanina e 2- oxalglutarato para piruvato e glutamato proposto pela IFCC (BERGMEYER, 1986; SCHLEBUSCH et al, 1974) a partir do exame de um volume de 50µl com leitura espectrofotométrica.

f) Uréia (Wiener), pelo método de Berthelot modificado (LORENZO et al., 1991) aplicado ao exame de um volume 10µl de soro com leitura espectrofotométrica convencional.

g) Creatinina (Merckotest), pelo do método do ácido pícrico (BARTELS et al., 1972; HELGER et al., 1974; ULLMANN; BONITZ,1976), utilizando-se 500µl de soro e leitura espectrofotométrica.

3.9 EXAMES HISTOLÓGICOS

Para avaliação histológica das lesões, o material foi colhido através da necrópsia. Após fixação em formol a 10%, por período aproximadamente de 24 horas, seguiu-se a desidratação em solução de concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina de onde foram obtidos cortes de 5 μ de espessura que por sua vez foram corados pelas técnicas de Hematoxilina Eosina (HE) e Warthym-Starryn (WS) (WARTHIN; STARRY, 1920).

3.10 CULTIVOS PARA ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS

Nos animais que morreram durante o período de observação foram colhidos fragmentos do fígado para cultura e isolamento de leptospiras e naqueles que foram submetidos à eutanásia após o trigésimo dia (incluindo os grupos 1 e 4), foram efetuados cultivos dos rins para isolamento de leptospiras.

Os fragmentos de rins e fígado colhidos sob condições assépticas, foram macerados com solução salina tamponada de Sorensen estéril, de modo a ser obtida uma suspensão de tecido a 10% (1,0 grama de tecido com 9,0 mL de solução salina tamponada estéril); a partir desta diluição inicial foram preparadas duas outras diluições seriadas de razão dez, concentrações finais de 10; 1,0 e 0,1%. O volume de 0,1 ml das diferentes concentrações da suspensão de órgãos foi semeado em tubos contendo o meio semi-sólido de Fletcher, dois tubos por concentração. A seguir os tubos foram incubados em estufa a temperatura de 28-30° C durante seis semanas com observações semanais macro e microscópicas (PASSOS et al., 1988).

3.11 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise estatística dos resultados obtidos entre os sexos, concentração de antibiótico e em relação aos parâmetros renais e hepáticos foi efetuada por análise de variância levando-se em consideração o modelo bicaudal e um nível de significância de 0,05. Quando houve diferença significativa foram efetuadas análises duas a duas pelo teste de Dunnet (VIEIRA, 1999). As proporções de portadores renais segundo as concentrações de antibiótico foram comparadas pelo Teste Exato de Fisher (SIEGEL, 1975).

4 RESULTADOS

O título do inóculo empregado (grupo 5) foi $10^{-3,852}$ como a dose empregada foi 10^{-3} o número de DL 50 efetivamente utilizadas foi 1,4.

No grupo 4, ou seja, animais que só receberam meio de cultura (figuras: 1, 2, 3, e 4) não houve alterações clínicas e histológicas no fígado e nos rins e não foram observadas formas suspeitas de leptospiros pela coloração argêntica.

Na tabela 1 são apresentadas as proporções de hamsters induzidos à condição de portadores renais de leptospiros segundo a concentração de estolato de eritromicina administrada no segundo dia pós-infecção. Os resultados obtidos revelam que as maiores proporções de animais que sobreviveram à infecção experimental e que apresentaram cultivos de tecido renal positivo para leptospiros foram observadas a partir da concentração de 40 mg/kg de peso vivo de estolato de eritromicina, independentemente do sexo. Nas concentrações de 10 a 20 mg p/ kg de peso vivo de estolato de eritromicina houve menor número de portadores e a diferença absoluta observada segundo os sexos na concentração de 20 mg/ kg de peso vivo (5/10 e 2/10) foi destituída de significância estatística ($p=0,35$).

Tabela 1 - Hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans*, sorovar Pomona e tratados com diferentes concentrações do estolato de eritromicina. Proporção de portadores renais de leptospiros (cultura positiva), no 30º dia pós infecção segundo o sexo e a concentração de antibiótico. São Paulo-2006

Concentração de antibiótico mg/kg de peso vivo	Proporção de portadores	
	Machos	Fêmeas
10	0/10	2/10
20	5/10	2/10
40	10/10	9/10
80	9/10	10/10

Na tabela 2 são apresentados os resultados bioquímicos da função renal e hepática dos animais do grupo controle, ou seja, aqueles que não receberam inóculo infeccioso e nem antibiótico. Não houve diferença significativa quanto ao sexo ($p>0,05$).

Tabela 2 - Hamsters do grupo 4 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado, segundo o sexo, a dosagem de proteínas totais, albumina, creatinina, uréia, dadas em mg/dl, AST, ALT, FAL expressas em UI/L e BD, BI e BT em mg/dl. São Paulo-2006.

Proteína Total		Albumina		Creatinina		Uréia		AST		ALT		FAL		BD		BI		BT	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
6,75	6,68	3,57	3,71	0,78	0,84	60,23	68,84	84,22	56,13	62,88	68,10	465,88	620,75	0,092	0,018	0,388	0,333	0,48	0,351
6,59	6,40	3,40	3,59	0,83	0,79	74,21	67,69	66,41	76,72	50,26	50,49	1037,90	692,92	0,129	0,000	0,129	0,702	0,258	0,702
6,51	5,57	3,55	3,04	0,75	0,71	69,23	72,90	73,36	70,70	57,83	69,52	813,08	815,72	0,000	0,000	0,369	0,739	0,369	0,739
6,61*	6,21	3,50*	3,44	0,78*	0,78	67,89*	69,81	76,66*	67,85	56,99*	62,70	772,28*	709,79	0,073*	0,006	0,295*	0,591	0,369*	0,597
0,12**	0,57	0,09**	0,35	0,04**	0,06	7,08**	2,73	8,97**	10,58	6,35**	10,60	288,18**	80,48	0,066**	0,01	0,144**	0,224	0,111**	0,214
6,21*		3,44*		0,78*		69,81*		72,25*		59,84*		741,03*		0,039*		0,433*		0,597*	
0,432**		0,235**		0,048**		4,917**		6,714**		8,419**		195,648**		0,056**		0,234**		0,197**	

M= macho, F= fêmea, *= média, ** = desvio padrão, AST= aspartato aminotransferase, ALT = alaninaaminotransferase, FAL= fosfatase alcalina

BD= bilirrubinas dirata, BI = bilirrubinas indireta, BT = bilirrubinas totais.

Neste grupo, não tratado com antibiótico e não infectado por leptospiros, as diferenças observadas entre os sexos foram não significativas ($p\geq 0,12$) para resultados indicadores de função hepática e renal.

As tabelas de 3 a 12 apresentam os resultados do grupo 1 (controle tratamento com antibiótico). Os valores de proteínas séricas totais, uréia, AST, ALT, BD, BI e BT não foram influenciados pela administração do antibiótico ($p \geq 0,24$) sendo iguais entre os sexos, concentração de antibióticos e inclusive iguais aos valores observados no grupo 4, não tratados com antibiótico e não infectados com leptospiros. Contudo houve diferença significativa para a enzima FAL (Tabela 9) entre as concentrações de antibiótico ($p = 0,03$), porém não em relação ao grupo 4, não tratados com antibiótico e não infectados ($p = 0,20$).

Tabela 3 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo a dosagem das proteínas séricas expressa em g/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

Concentração de antibiótico							
10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F
6,66	6,75	6,50	7,21	6,55	7,38	6,15	6,40
6,64	6,56	6,52	6,98	6,64	6,55	6,95	6,45
6,58	6,19	6,13	6,40	6,39	6,56	5,98	7,07
6,63*	6,5	6,38	6,86	6,53	6,83	6,36	6,64
0,04**	0,28	0,22	0,42	0,13	0,48	0,52	0,37
6,50*		6,62		6,68		6,50	
0,194**		0,397		0,353		0,431	
M= macho		F=fêmea		* = média		** = desvio padrão	

ANOVA: Não houve diferença significativa entre membros do grupo ($p=0,54$) e entre o grupo controle com os membros deste grupo sendo que para machos $p=0,61$ e fêmeas $p=0,40$.

Tabela 4- Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da albumina sérica expressa em g/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração de antibiótico							
		10		20		40		80	
		M	F	M	F	M	F	M	F
		3,56	3,76	3,54	3,65	3,44	3,74	3,39	3,22
	...	3,6	3,41	3,39	3,44	3,45	3,64	3,39	3,66
		3,58*	3,57	3,5	3,58	3,48	3,63	3,55	3,47
		0,028**	0,175	0,100	0,121	0,072	0,115	0,277	0,226
		3,57*		3,54		3,55		3,51	
		0,112**		0,108		0,116		0,73	
		M= macho		F=fêmea		*=média		** desvio padrão	

ANOVA: Observamos que neste grupo não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,92$) e entre o grupo controle com os membros deste grupo sendo que para os machos $p=0,96$ e para fêmeas $p=0,81$.

Tabela 5- Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem de creatinina sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração de antibiótico							
		10		20		40		80	
		M	F	M	F	M	F	M	F
		0,79	0,85	0,71	0,90	0,63	0,71	0,79	0,68
		0,66	0,85	0,62	0,91	0,84	0,77	0,83	0,75
		0,75	0,86	0,76	0,71	0,84	0,86	0,69	0,90
		0,79*	0,85	0,69	0,84	0,77	0,78	0,77	0,77
		0,066**	0,005	0,071	0,112	0,121	0,075	0,072	0,112
		0,85*		0,77		0,77		0,77	
		0,078**		0,115		0,09		0,084	
		M= macho		F=fêmea		*=média		** = desvio padrão	

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,44$) e entre o grupo controle com os membros deste grupo sendo que para machos $p=0,64$ e para fêmeas $p=0,67$.

Tabela 6- Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da uréia expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração de antibiótico							
		10		20		40		80	
		M	F	M	F	M	F	M	F
		68,05	78,44	68,89	75,34	61,26	80,07	68,49	67,18
		64,95	70,51	68,27	73,25	68,92	66,72	76,79	71,38
		70,58	71,08	68,87	77,79	70,31	59,17	67,67	72,43
		67,86*	73,34	68,67	75,46	66,83	68,65	70,98	70,33
		2,82**	4,42	0,35	2,27	4,87	10,58	5,04	2,77
		73,34*		72,06		67,74		70,65	
		4,475**		3,990		7,436		3,660	
		M= macho		F=fêmea		*=média		**=desvio padrão	

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,45$) e entre o grupo controle com os membros deste grupo sendo que para machos $p=0,84$ e para fêmeas $p=0,56$.

Tabela 7- Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da AST sérica expressa em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.

		Concentração de antibiótico							
		10		20		40		80	
		M	F	M	F	M	F	M	F
		42,05	47,98	52,78	83,39	31,82	257,12	77,82	120,96
		55,18	71,85	82,77	49,74	148,28	72,56	93,59	52,12
		59,61	69,08	61,26	68,22	67,32	48,96	46,9	72,94
		52,28*	62,97	65,60	67,11	82,47	126,21	72,77	82,00
		9,13**	13,05	15,46	16,85	59,69	113,98	23,75	35,3
		62,97*		66,36		104,34		77,38	
		11,654**		14,487		84,828		27,382	
		M= macho	F=fêmea	*=média		**=desvio padrão		AST= aspartato aminotransferase	

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,72$) e entre o grupo controle e os membros deste grupo, sendo que para machos $p=0,78$ e para fêmeas $p=0,61$.

Tabela 8- Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, dosagem da ALT sérica expressa em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.

Concentração de antibiótico							
10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F
58,82	56,29	74,53	65,7	41,23	134,65	50,96	80,16
48,50	49,56	49,85	46,34	82,29	69,19	126,34	63,55
70,82	77,58	69,21	71,46	93,01	50,83	83,1	93,57
59,38*	61,14	64,53	61,16	72,17	84,89	86,80	79,09
11,17**	14,62	12,98	13,16	27,33	44,06	37,82	15,03
61,14*		62,84		78,53		82,95	
11,680**		11,838		33,523		26,088	

M= macho F=fêmea * =média **=desvio padrão ALT= alanina aminotrasferase

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,74$) e entre o grupo controle e os membros deste grupo, sendo que para machos $p=0,51$ e para fêmeas $p=0,59$.

Tabela 9- Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da FAL sérica expressa em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.

Concentração de antibiótico							
10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F
580,6	802,13	541,61	752,98	957,12	482,59	487,59	771,06
615,74	707,89	596,51	617,86	582,22	646,52	484,99	722,69
684,51	665,34	433,02	790,6	608,95	641,39	533,15	749,32
626,95*	725,12	523,71	720,48	716,09	590,16	501,91	747,69
52,85**	70,00	82,2	90,84	209,15	93,19	27,08	24,22
676,03*		622,90		653,12		624,80	
77,258**		132,98		160,41		136,57	

M= macho F=fêmea * =média **=desvio padrão FAL= fosfatase alcalina

ANOVA: Houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,03$), mas não houve diferença significativa entre o grupo controle e os membros deste grupo, sendo que para machos $p=0,27$ e para fêmeas $p=0,20$.

Tabela 10 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BD sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

Concentração de antibiótico							
10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F
0,443	0,000	0,000	0,166	0,129	0,000	0,129	...
0,000	...	0,160	0,110	0,000	1,053	0,092	0,203
0,166	0,000	0,757	0,018	0,000	0,000	0,332	0,240
0,203*	0,000	0,306	0,098	0,043	0,351	0,184	0,221
0,223**	0,000	0,398	0,074	0,074	0,607	0,129	0,026
0,101*		0,202		0,197		0,202	
0,180**		0,280		0,422		0,202	

M= macho F=fêmea *=média **=desvio padrão BD= bilirrubina direta ...=soro não examinado.

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,84$) e entre o grupo controle e os membros deste grupo, sendo que para os machos $p=0,60$ e para as fêmeas $p=0,64$.

Tabela 11- Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BI sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

Concentração de antibiótico							
10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F
0,259	0,517	0,314	0,499	0,406	0,572	0,443	...
0,295	...	0,870	0,204	0,794	0,462	0,406	0,259
0,296	0,646	0,295	0,333	0,295	0,628	0,037	0,090
0,283*	0,581	0,493	0,345	0,498	0,554	0,295	0,174
0,021**	0,091	0,326	0,147	0,262	0,084	0,224	0,119
0,581*		0,419		0,526		0,234	
0,159**		0,240		0,176		0,162	

M= macho F=fêmea *=média **= desvio padrão BI= bilirrubina indireta ...=soro não examinado.

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,27$) e entre o grupo controle e os membros deste grupo, sendo que para os machos $p=0,62$ e para as fêmeas $p=0,056$.

Tabela 12 - Hamsters do grupo 1 que receberam 0,2 ml de EMJH modificado e 48 horas após o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BT sérica expressa em mg/kg e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

Concentração de antibiótico							
10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F
0,702	0,517	0,314	0,665	0,535	0,572	0,572	...
0,295	...	1,030	0,314	0,794	1,515	0,498	0,462
0,462	0,646	0,462	0,351	0,295	0,628	0,369	0,330
0,486*	0,581	0,602	0,443	0,541	0,905	0,479	0,396
0,204**	0,091	0,377	0,192	0,249	0,529	0,102	0,093
0,533*		0,453		0,723		0,437	
0,151**		0,344		0,42		0,087	

...=soro não examinado
M= macho F=fêmea *=média **=desvio padrão BT= bilirrubina total

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,56$) e entre o grupo controle e os membros deste grupo, sendo que para os machos $p=0,79$ e para as fêmeas $p=0,39$.

As tabelas de 13 a 22 apresentam resultados do grupo 2, infectados com leptospiras e tratados com antibiótico. Houve ausência de diferenças significativas para os níveis de albumina sérica, ALT, AST, BD, BI e BT ($p \geq 0,22$). No entanto foram constatadas diferenças significativas nos níveis séricos de proteínas totais, creatinina e FAL tanto em relação às concentrações do estolato de eritromicina ($p < 0,00$) como quando comparado os valores observados no grupo 4 controle sem tratamento com antibiótico e infecção por leptospiras ($p < 0,002$).

Tabela 13- Hamsters do grupo 2 que receberam 0,2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da proteína total sérica expressa em g/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração de antibiótico							
		10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
...	7,80	6,21	6,99	6,58	7,68	6,66	6,70		
...	7,25	6,69	7,18	7,41	7,62	7,55	6,78		
...	...	6,98	6,69	7,56	7,05	7,63	6,97		
...	...	6,65	...	6,38	6,79	7,02	7,59		
...	...	6,78	...	7,00	...	6,71	6,82		
...	6,51	6,74	7,42	6,66		
...	6,48	7,49	6,91	6,70		
...	6,30	6,81	7,54	6,70		
...	6,90	7,77	6,70	6,13		
...	6,51	7,32	6,65	6,98		
...	7,53*	6,62	6,95	6,76	7,25	7,07	6,80		
...	0,430**	0,282	0,247	0,438	0,212	0,411	0,362		
...	7,52*	6,78		7,00		6,93			
		0,293**		0,484		0,403			
M= macho		F= fêmea		*=média		**=desvio padrão		...=soro não examinado	

ANOVA: Houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,019$) e também houve diferença significativa entre o grupo controle e os membros deste grupo ($p=0,002$) e aplicando-se o teste de Dunnet verificou-se existir diferença significativa entre o grupo controle com fêmeas que recebeu 10 e 40 mg de estolato de eritromicina e os machos que receberam 80mg do mesmo antibiótico.

Tabela 14- Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da albumina sérica expressa em g/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração do antibiótico							
		10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
...	3,73	3,41	3,46	3,34	3,52	3,21	3,46		
...	3,63	3,62	3,72	3,89	3,72	3,85	3,53		
...	...	3,65	3,53	3,9	3,66	3,64	3,51		
...	...	3,55	...	3,45	3,51	3,67	3,56		
...	...	3,66	...	3,73	3,99	3,59	3,57		
...	3,50	3,50	3,81	3,41		
...	3,52	3,71	3,76	3,28		
...	3,36	3,53	3,77	3,55		
...	3,67	3,75	3,79	3,33		
...	3,41	3,71	3,44	3,64		
...	3,68*	3,57	3,57	3,57	3,66	3,65	3,48		
...	0,07**	0,10	0,13	0,20	0,15	0,19	0,11		
...	3,68*	3,57		3,61		3,56			
		0,106**		0,183		0,179			
M= macho		F= fêmea		*=média		**=desvio padrão		...=soro não examinado	

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,24$) e o grupo controle e os membros deste grupo ($p= 0,22$).

Tabela 15 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0,2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da creatinina sérica expressa em mg/dL e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração do antibiótico							
		10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
...	2,17	1,05	1,33	1,09	1,94	1,34	0,75		
...	1,42	1,05	1,62	1,53	2,15	2,93	0,75		
...	...	1,15	1,23	2,23	1,79	2,38	0,72		
...	...	1,13	...	1,24	1,46	2,14	0,88		
...	...	1,24	...	1,41	2,75	2,89	0,77		
...	1,37	1,43	1,58	0,79		
...	1,48	1,93	1,57	0,81		
...	1,00	1,23	1,76	0,78		
...	1,11	1,43	1,49	0,71		
...	1,03	2,42	1,20	0,83		
...	1,79*	1,12	1,39	1,34	1,85	1,92	0,80		
...	0,53**	0,07	0,20	0,36	0,48	0,62	0,05		
...	1,79*	1,25		1,59		1,36			
		0,186**		0,491		0,73			
M= macho		F= fêmea		*=média		**=desvio padrão		...=soro não examinado	

ANOVA: Houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,00$) e também houve diferença significativa entre o grupo controle e os membros deste grupo ($p=0,00$) e aplicando-se o teste de Dunnet verificou-se haver diferença significativa entre o grupo controle com fêmeas que receberam 10 e 40mg de estolato de eritromicina e machos que receberam 40 e 80mg do mesmo antibiótico.

Tabela 16 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da uréia sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006.

		Concentração do antibiótico							
		10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
...	79,16	56,14	121,51	69,16	76,97	46,7	67,71
...	78,73	73,62	66,5	64,13	64,82	73,66	80,83
...	...	63,57	102,49	64,83	66,65	64,04	72,66
...	...	73,12	...	62,89	62,14	59,63	90,07
...	...	76,19	...	65,09	...	61,01	66,28
...	66,06	69,03	63,76	69,54
...	51,17	58,67	60,28	71,5
...	66,85	67,85	60,84	75,99
...	61,26	67,74	58,67	58,79
...	65,8	71,02	128,86	73,9
...	78,94*	68,52	96,83	63,72	67,21	67,74	72,72
...	0,3**	8,42	27,93	4,90	5,22	22,45	8,5
...	78,94*	82,67		65,46		70,23	
...	...	6,657**		5,231		16,724	

M= macho F= fêmea *=média **=desvio padrão ...=soro não examinado

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,62$) e o grupo controle e os membros deste grupo ($p=0,67$).

Tabela 17 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da AST sérica expressa em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração do antibiótico							
		10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
...	90,67	92,51	76,2	236,88	50,91	82,64	69,26		
...	111,87	83,25	56,31	78,36	80,21	97,22	94,01		
...	...	97,61	52,84	123,7	86,74	190,75	340,37		
...	...	218,02	...	80,42	61,78	86,21	125,65		
...	...	58,14	...	65,27	...	79,04	68,21		
...	69,45	85,69	139,36	65,11		
...	95,49	81,85	83,6	112,84		
...	118,6	85,5	64,66	88,02		
...	78,95	71,65	106,29	59,98		
...	126,01	150,94	77,22	62,64		
...	101,27*	109,9	61,78	107,31	83,91	100,69	108,6		
...	14,99**	62,31	12,6	50,81	27,95	37,7	84,46		
...	101,27*	85,84		95,61		104,64			
...		53,709**		42,220		63,791			

M= macho F= fêmea *=média **=desvio padrão AST= aspartato aminotransferase ...=soro não examinado

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,81$) e o grupo controle e os membros deste grupo ($p=0,68$).

Tabela 18 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da ALT sérica expressa em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração do antibiótico					
10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F
...	79,96	56,93	60,50	84,92	67,83	49,16	71,87
...	84,11	58,59	69,00	62,40	62,8	62,84	84,48
...	...	82,32	47,26	69,76	78,83	3,80	16,41
...	...	91,03	...	58,45	59,01	58,61	79,77
...	...	60,81	...	66,00	...	53,33	71,40
...	73,69	62,18	84,00	42,26
...	54,78	60,59	61,04	54,71
...	72,4	81,89	66,53	88,47
...	77,86	77,38	75,32	70,04
...	81,93	83,69	79,02	72,61
...	82,03*	69,93	58,92	70,21	70,46	59,36	65,2
...	2,93**	15,64	10,95	9,91	9,91	22,46	21,86
...	82,03*	64,425		70,33		62,28	
		14,337**		9,635		21,784	

M= macho F= fêmea *=média **= desvio padrão ALT= alanina aminotransferase ...=soro não examinado

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,50$) e o grupo controle e os membros deste grupo ($p=0,45$).

Tabela 19 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da FAL sérica expressa em UI/L e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração do antibiótico							
		10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
...	654,90	527,62	835,04	424,63	845,40	317,19	761,16		
...	949,79	484,66	853,43	619,25	723,76	409,26	869,82		
...	...	474,86	678,67	560,75	792,93	475,24	672,26		
...	...	546,26	...	569,07	602,15	841,80	657,17		
...	...	652,46	...	468,75	...	606,88	856,83		
...	518,54	955,62	636,77	640,99		
...	471,50	722,97	710,21	763,69		
...	561,69	801,57	563,29	674,82		
...	512,22	873,78	695,66	764,83		
...	591,93	800,45	566,95	588,50		
...	802,35*	537,172	789,04	529,83	790,96	582,32	725,00		
...	208,51**	70,89	96,03	61,46	101,1991	153,62	93,29		
...	802,35*	663,10		660,39		653,66			
		161,763**		187,710		143,754			

M= macho F= fêmea *=média **= desvio padrão FAL= fosfatase alcalina ...=soro não examinado

ANOVA: Houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,00$) e também houve diferença significativa entre o grupo controle e os membros deste grupo ($p=0,00$) e aplicando-se o teste de Dunnett verificou-se haver diferença significativa entre o grupo controle com fêmeas que receberam 20mg de estolato de eritromicina e macho que recebeu 40mg do mesmo antibiótico.

Tabela 20 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0,2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BD sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração do antibiótico							
		10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
...	s/l	0,110	0,092	0,000	0,147	0,739	0,203		
...	0,400	0,000	0,129	0,110	0,314	0,200	0,203		
...	...	0,000	0,203	0,000	0,147	0,000	s/l		
...	...	0,000	...	0,000	0,330	0,036	0,000		
...	...	0,000	...	0,000	...	0,200	0,000		
...	0,000	0,092	0,000	0,129		
...	0,270	0,000	0,240	0,000		
...	0,120	0,018	0,150	0,351		
...	0,290	0,166	0,140	0,000		
...	0,120	0,000	0,018	0,200		
...	0,400*	0,022	0,141	0,091	0,134	0,172	0,120		
...	0**	0,049	0,056	0,113	0,124	0,218	0,128		
0,400*		0,082		0,113		0,146			
		0,0781**		0,117		0,178			

M= macho F= fêmea *=média **= desvio padrão BD= bilirrubina direta ...=soro não examinado.

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,52$) e o grupo controle e os membros deste grupo ($p=0,38$).

Tabela 21- Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BI sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração do antibiótico							
		10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
...	0,670	0,074	0,277	0,680	0,037	0,092	0,517
...	...	0,220	0,148	0,680	0,074	0,020	0,314
...	...	0,850	0,166	1,090	0,315	0,730
...	...	0,646	...	0,055	0,250	0,130	0,790
...	...	0,460	...	0,665	...	0,760	1,090
...	0,295	0,314	0,770	0,203
...	0,890	0,406	0,148	0,517
...	1,300	0,721	0,250	0,369
...	0,110	0,406	0,630	0,406
...	0,670	0,277	3,123	0,260
...	0,670*	0,450	0,197	0,644	0,311	0,665	0,496
...	0,000**	0,313	0,236	0,401	0,200	0,915	0,282
0,670*		0,324		0,477		0,580		...	
		0,273**		0,356		0,679		...	

M= macho F= fêmea *=média **= desvio padrão BI= bilirrubina indireta ...=soro não examinado

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,52$) e o grupo controle e os membros deste grupo ($p=0,58$).

Tabela 22 - Hamsters do grupo 2 que receberam 0, 2 ml do inóculo contendo $1,5 \times 10^4$ leptospiras/ml e após 48 horas o antibiótico, segundo o sexo, a dosagem da BT sérica expressa em mg/dl e a concentração de estolato de eritromicina expressa em mg/kg de peso vivo. São Paulo-2006

		Concentração do antibiótico							
		10		20		40		80	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
...	1,07	0,184	0,369	0,680	0,184	0,831	0,720		
...	...	0,220	0,277	0,790	0,388	0,220	0,517		
...	...	0,850	0,369	1,090	0,462	0,730	...		
...	...	0,646	...	0,055	0,590	0,166	0,790		
...	...	0,460	...	0,665	...	0,960	1,090		
...	0,295	0,406	0,770	0,332		
...	1,160	0,406	0,388	0,517		
...	1,420	0,739	0,400	0,720		
...	1,07*	0,472	0,338	0,769	0,453	0,558	0,669		
...	0,00**	0,282	0,053	0,425	0,173	0,300	0,243		
...	1,07*	0,405		0,611		0,613			
		0,226**		0,376		0,271			

M= macho F= fêmea *=média **= desvio padrão BT= bilirrubina total ...=soro não examinado

ANOVA: Não houve diferença significativa entre os membros do grupo ($p=0,21$) e o grupo controle e os membros deste grupo ($p=0,22$).

Os exames histopatológicos efetuados nas preparações coradas pelo método de hematoxilina-eosina ou Warthyn Starry são apresentados nas figuras de 1 a 14. Nos animais do grupo 4, ou seja, àqueles que só receberam o meio de cultura EMJH modificado, não houve alterações hepáticas nem renais pelo método da HE e não foram encontradas leptospiras pelo método de WS (Figuras de 1 a 4).

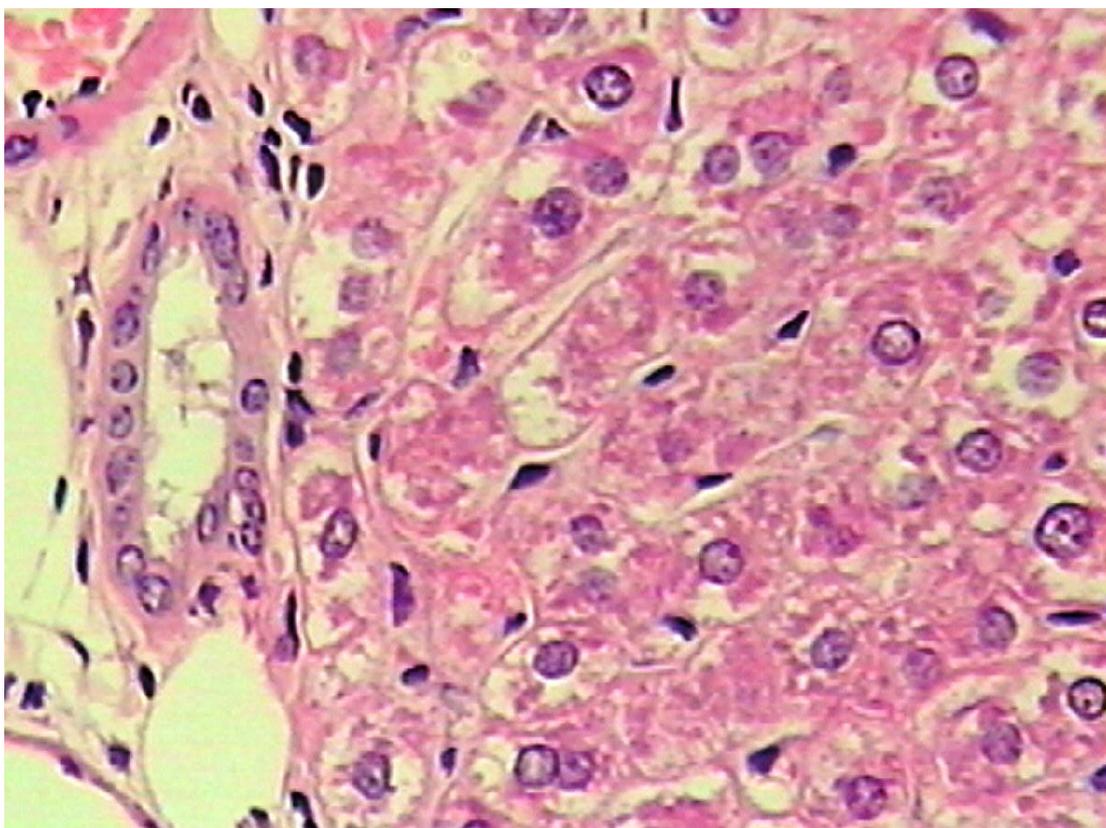


Figura-1 Fígado de hamster do grupo 4 tratado com meio de cultura (EMJH grupo controle), submetido à eutanásia no 30º dia de observação, não havendo alterações histológicas dignas de nota. Presença de hepatócitos bem conservados, não foram encontradas formas compatíveis com leptospiras. Coloração de HE e aumento de 25x. São Paulo – 2006.

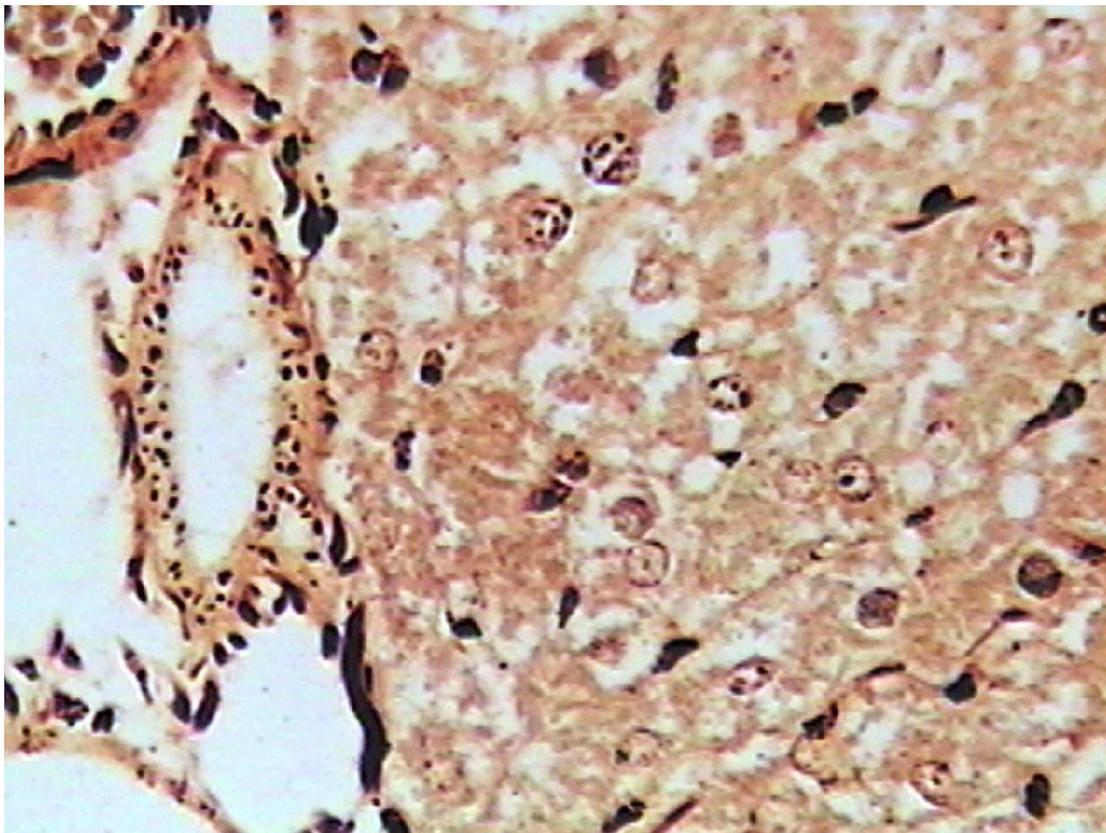


Figura 2: Fígado de hamster do grupo 4 tratado com meio de cultura (EMJH grupo controle), submetidos à eutanásia no 30º dia de observação, não havendo alterações histológicas dignas de nota. Não foram encontradas formas bacterianas compatíveis com leptospirose. Coloração de WS e aumento 25x. São Paulo-2006.

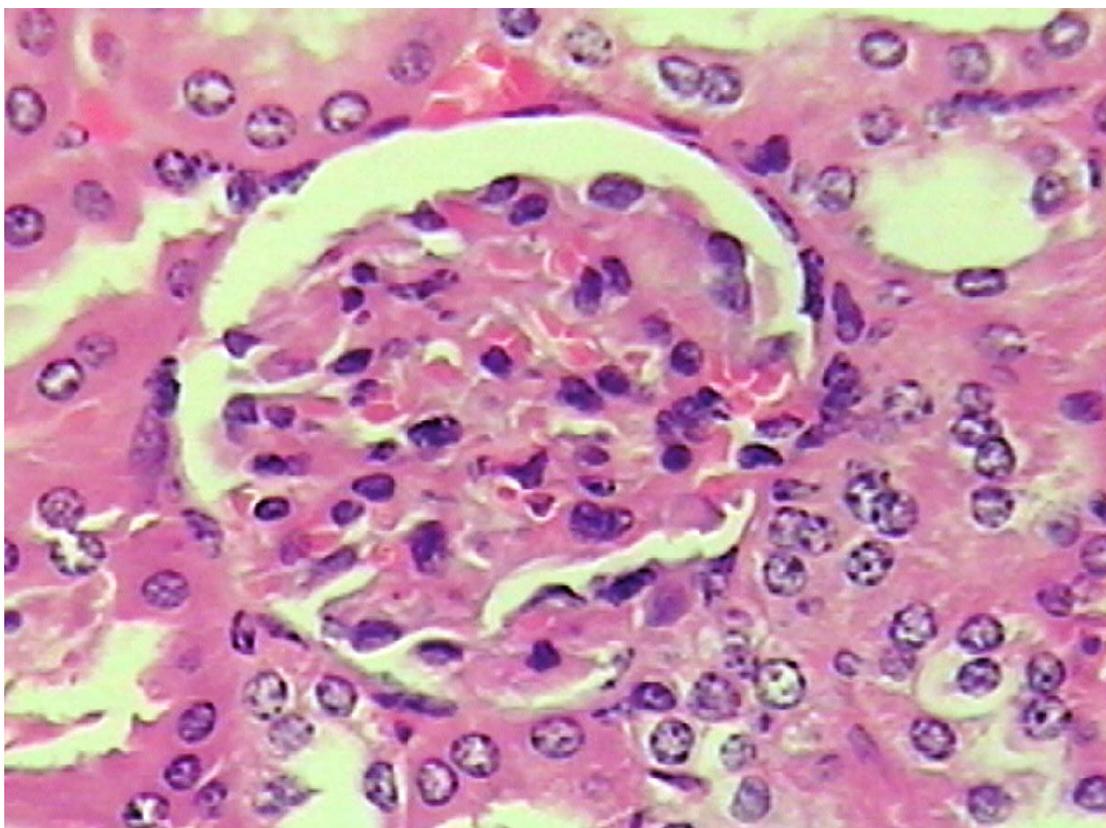


Figura 3: Rim de hamster do grupo 4 tratado com meio de cultura (EMJH-grupo controle), submetidos à eutanásia no 30º dia de observação, não havendo alterações histológicas dignas de nota. Nota-se cápsula de Bowman bem conservada e sem alterações, além de ausência de formas compatíveis com leptospira. Coloração de HE e aumento de 25x. São Paulo-2006



Figura 4: Rim de hamster do grupo 4 tratado com meio de cultura (EMJH grupo controle), submetidos à eutanásia no 30º dia de observação, não havendo alterações histológicas dignas de nota. Não foram encontradas formas bacterianas compatíveis com leptospiras. Coloração de WS e aumento de 25x. São Paulo- 2006.

No que tange ao grupo I, ou seja, àqueles animais tratados com o estolato de eritromicina nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 mg/kg de peso vivo (grupo controle de antibiótico) e o placebo do inóculo infeccioso, meio de cultura (EMJH modificado), verificaram-se a presença de alterações vacuolares em hepatócitos, pelo método da HE. Não foram observadas formas bacterianas pela coloração de WS (fig 5 a 8).

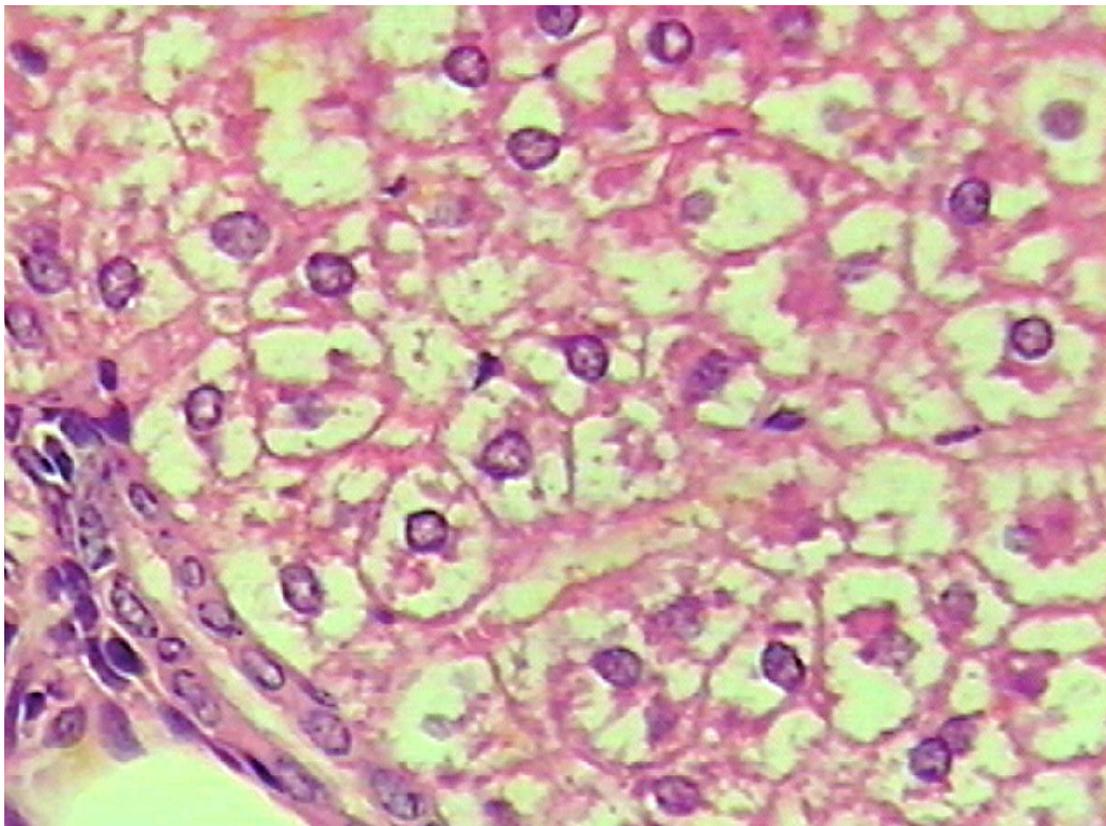


Figura 5: Fígado de hamster do grupo 1 tratado com antibiótico e meio de cultura (EMJH-grupo controle de tratamento com antibiótico), submetido à eutanásia no 28º dia após o tratamento com antibiótico, notando-se vacuolização de citoplasma de hepatócitos próximo ao espaço porta. Coloração de HE e aumento de 25x. São Paulo-2006.

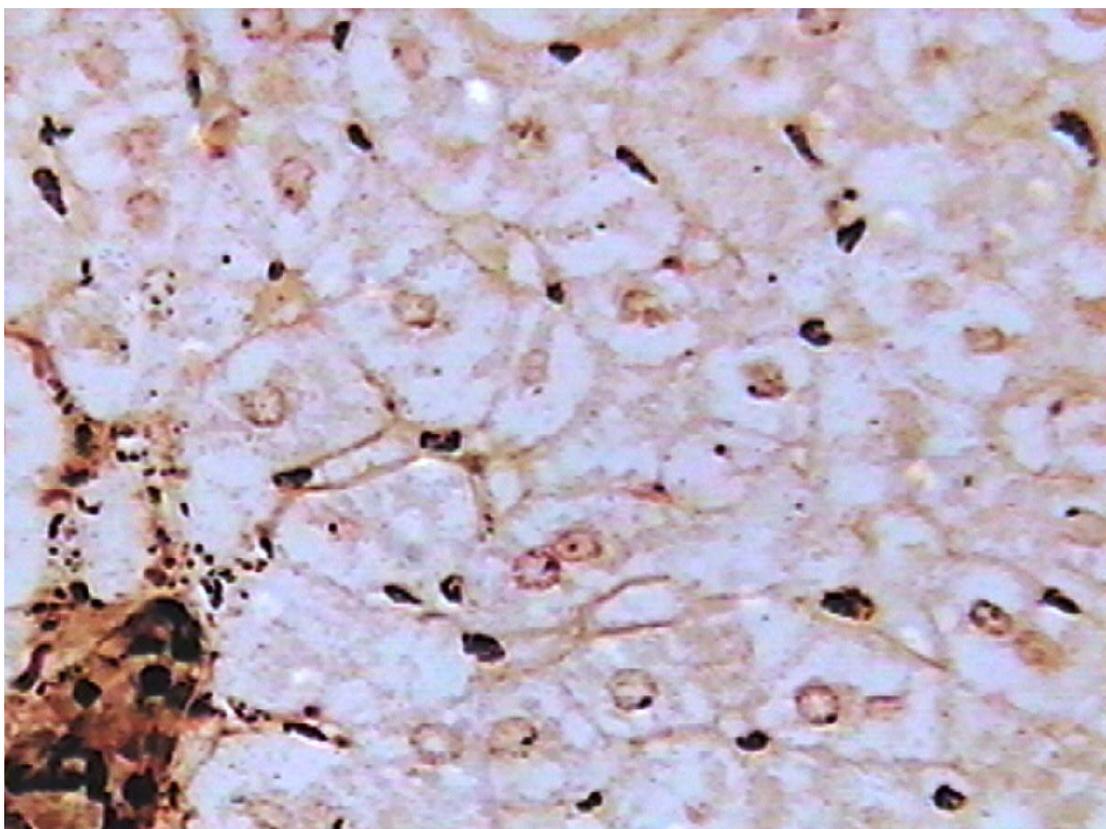


Figura 6: Fígado de hamster do grupo 1 tratado com antibiótico e o meio de cultura (EMJH-grupo controle de tratamento com antibiótico), submetidos à eutanásia no 28º dia após tratamento com antibiótico, notando-se vacuolização de citoplasma de hepatócitos próximo ao espaço porta e sem a presença de formas compatíveis com leptospiras. Coloração de WS e aumento 25x. São Paulo- 2006.

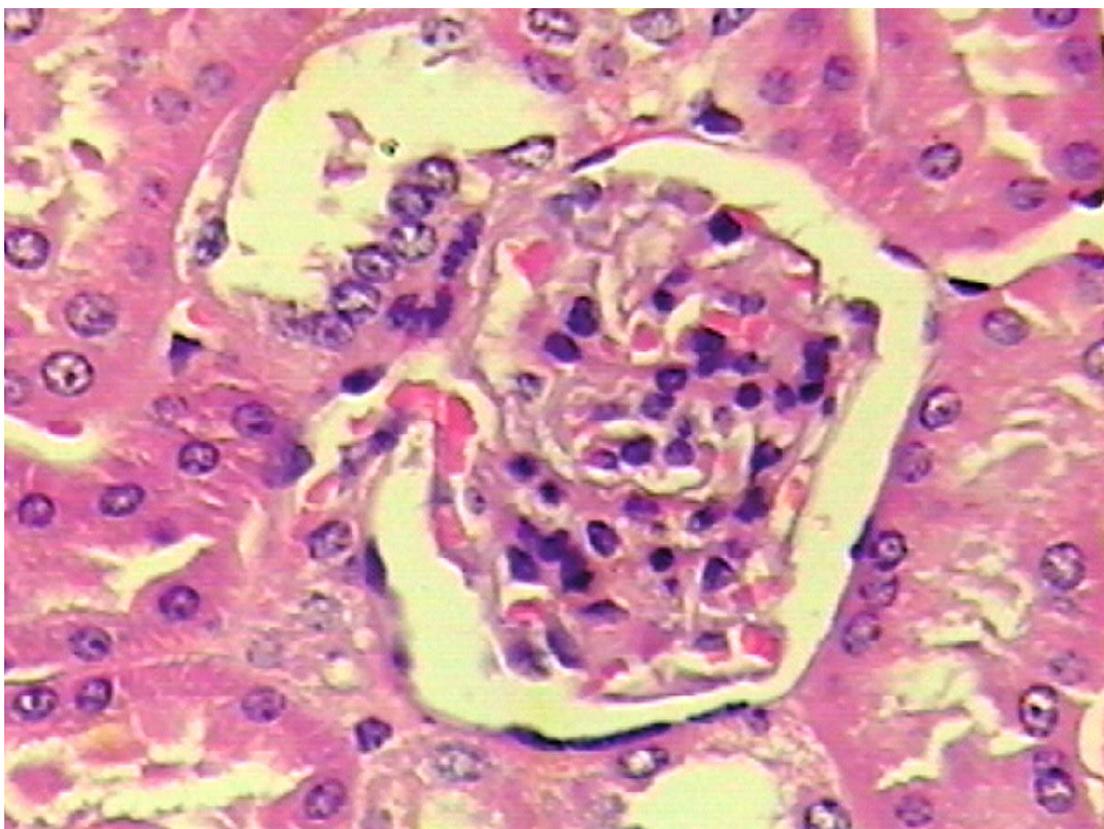


Figura 7: Rim de hamster do grupo 1 tratado com antibiótico e o meio de cultura (EMJH-grupo controle de tratamento com antibiótico), submetido à eutanásia no 28º dia após o tratamento com o antibiótico, sem alterações renais. Coloração de HE e aumento de 25x. São Paulo, 2006.

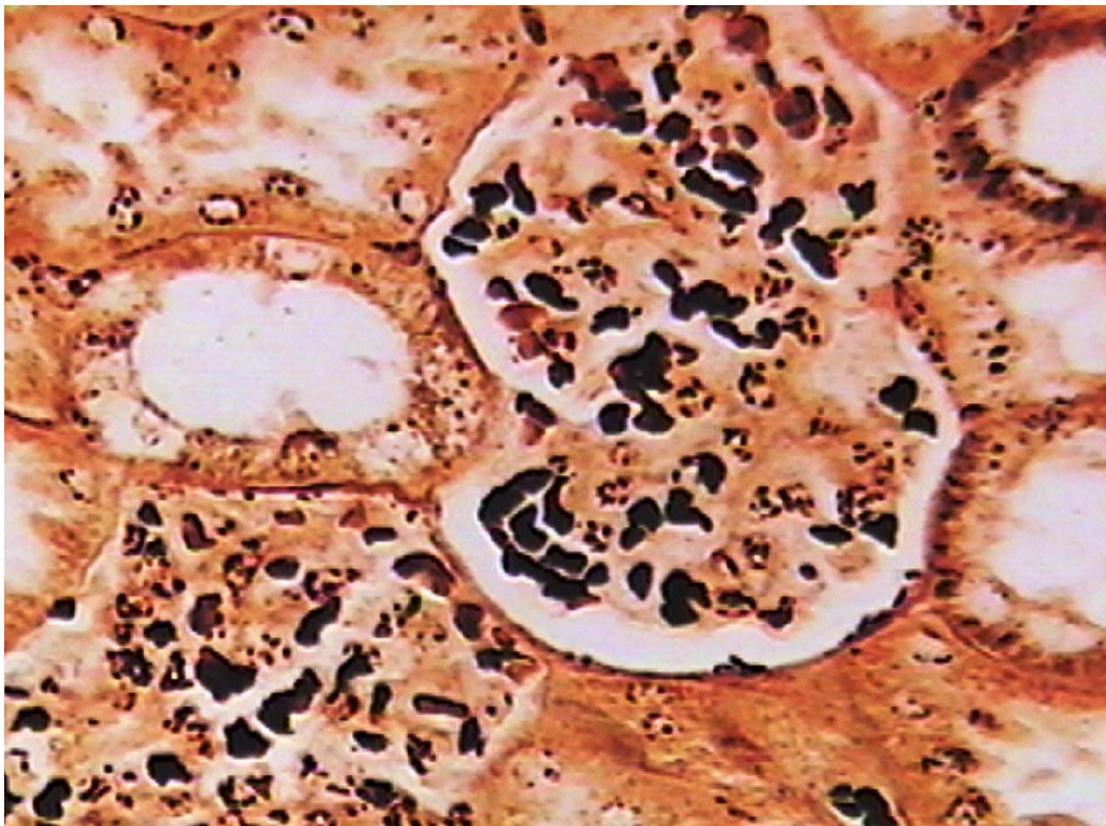


Figura 8: Rim de hamster do grupo 1 tratado com antibiótico e o meio de cultura (EMJH-grupo controle de tratamento com antibiótico), submetido à eutanásia no 28º dia após o tratamento com o antibiótico, sem alterações renais. Coloração de WS e aumento de 25x. São Paulo, 2006.

Em relação ao grupo 2, ou seja, àqueles animais infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona e tratados com o estolato de eritromicina nas doses crescentes de 10, 20, 40 e 80 mg /kg de peso vivo foram observadas lesões hepáticas e renais e inclusive a presença de formas compatíveis com leptospiros principalmente no fígado dos animais tratados com 10 mg do antibiótico acima mencionado, o que demonstra ser esta concentração insuficiente para a eliminação das leptospiros (figura 9 e 10).

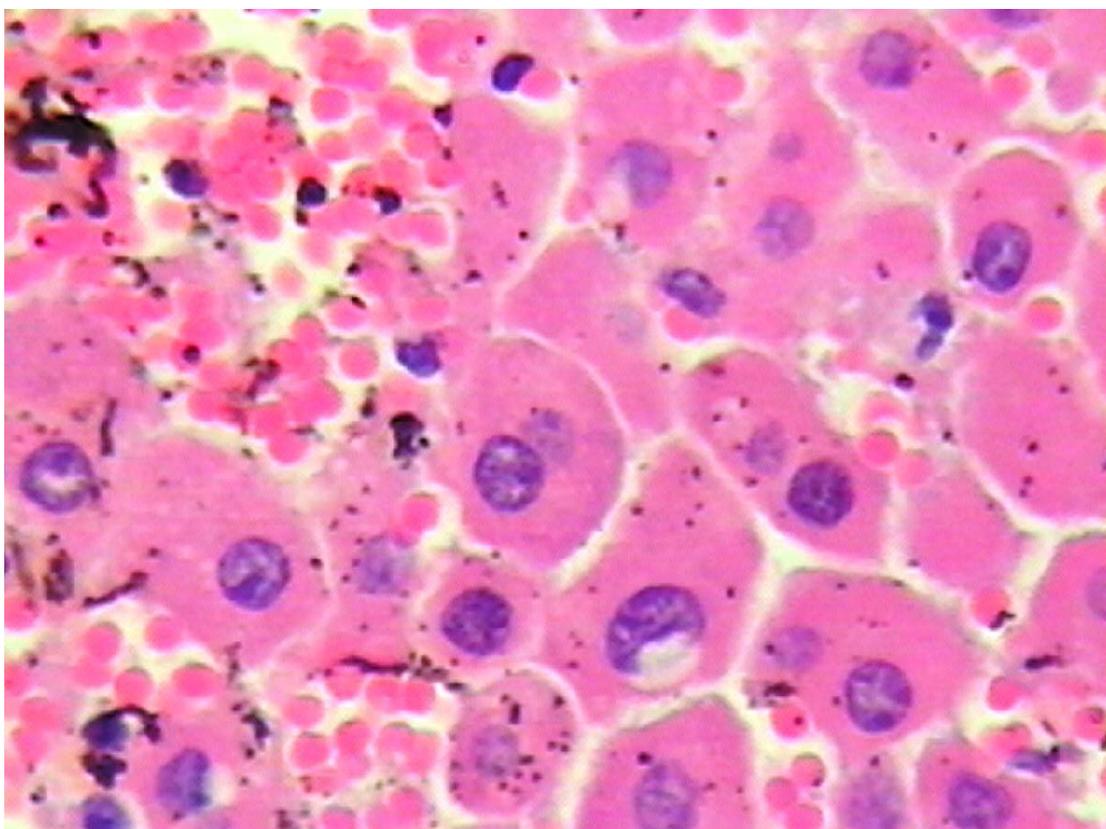


Figura 9: Fígado de hamster do grupo 2 que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 10 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção. Nota-se ligeira vacuolização em citoplasma de hepatócitos e formas compatíveis com leptospiros. Coloração de HE e aumento 40x. São Paulo-2006.

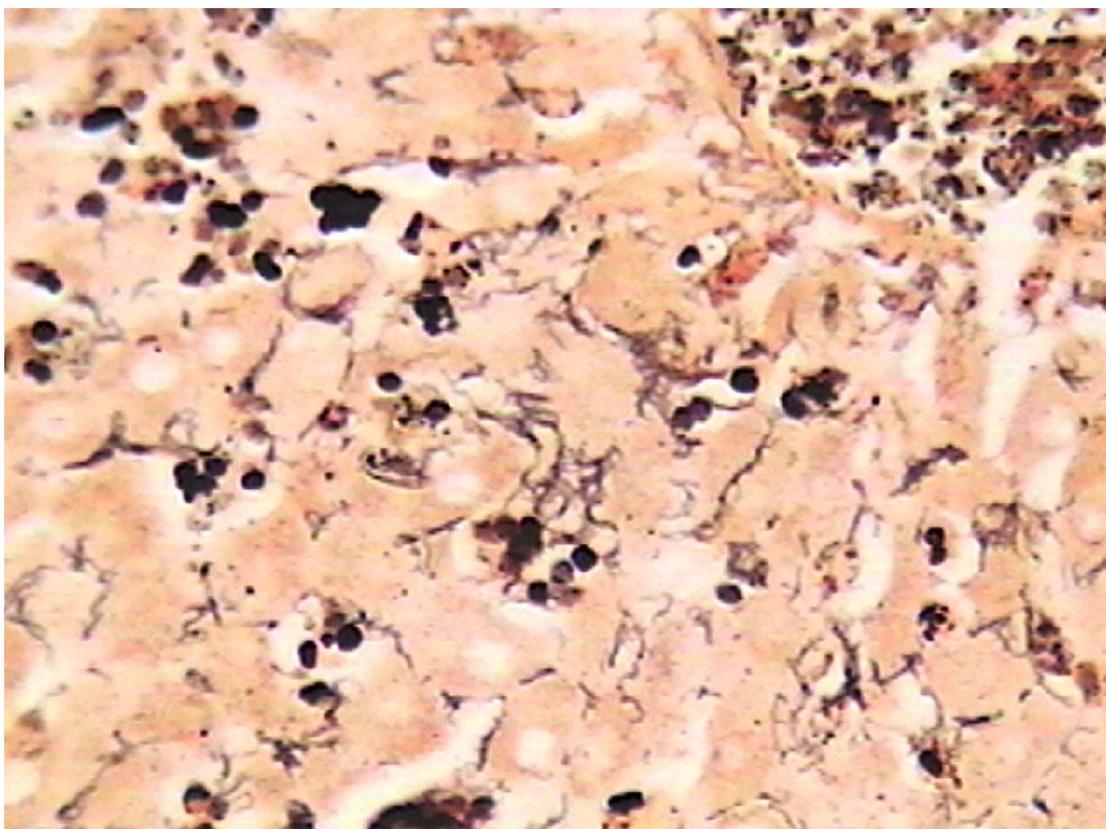


Figura 10: Fígado de hamster do grupo 2 que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 10 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção apresentando formas bacterianas compatíveis com leptospiras. Coloração WS e aumento de 25x. São Paulo- 2006

Em todos os animais do grupo 2, infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona e tratados com o estolato de eritromicina nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 mg, foram observadas alterações hepáticas constituídas por: vacuolização de hepatócitos e sangue no espaço porta (figura 11) e renais representadas por congestão glomerular (figura12).

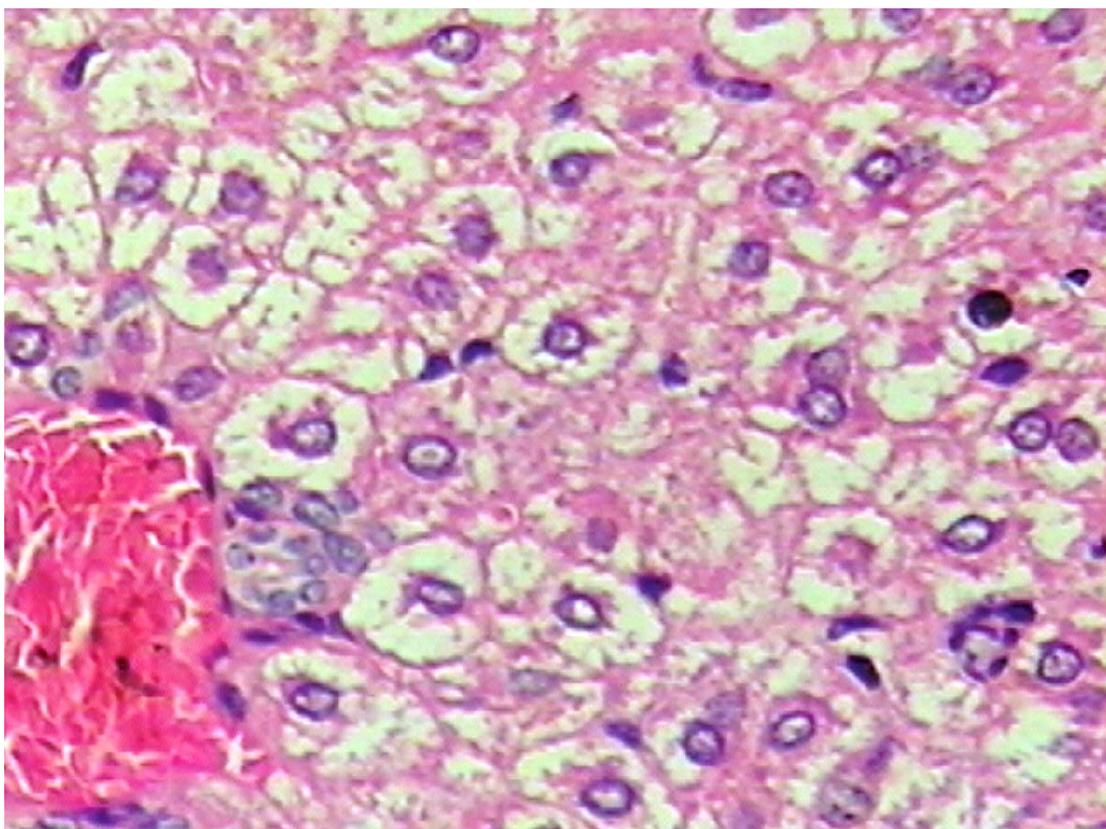


Figura 11: Fígado de hamster do grupo 2 que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 40 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção, observa-se intensa vacuolização em hepatócitos, além de congestão do espaço porta. Coloração HE e aumento de 25 x. São Paulo- 2006.

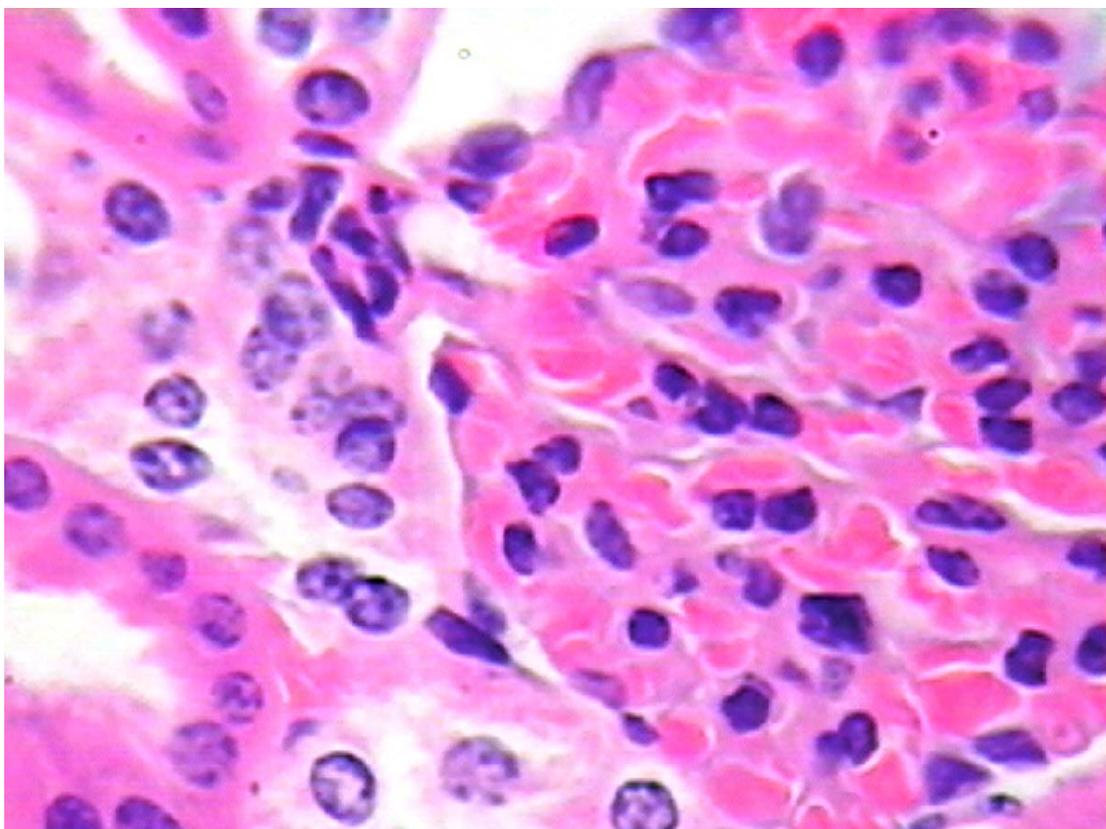


Figura 12: Rim de hamster do grupo 2 que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 40 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção, observando-se congestão glomerular. Coloração HE e aumento de 40x. São Paulo-2006.

Os animais infectados com *L. interrogans* sorovar Pomona e tratados com estolato de eritromicina (grupo 2) foram observadas leptospiros nas preparações coradas pela técnica de WS nos que receberam 40 mg/kg de peso vivo do antibiótico (figura 13), porem não foram verificadas leptospiros nos tratados com 80 mg/kg de peso vivo (figura 14) a despeito dos cultivos renais terem sido positivos para as duas concentrações (tabela 1).

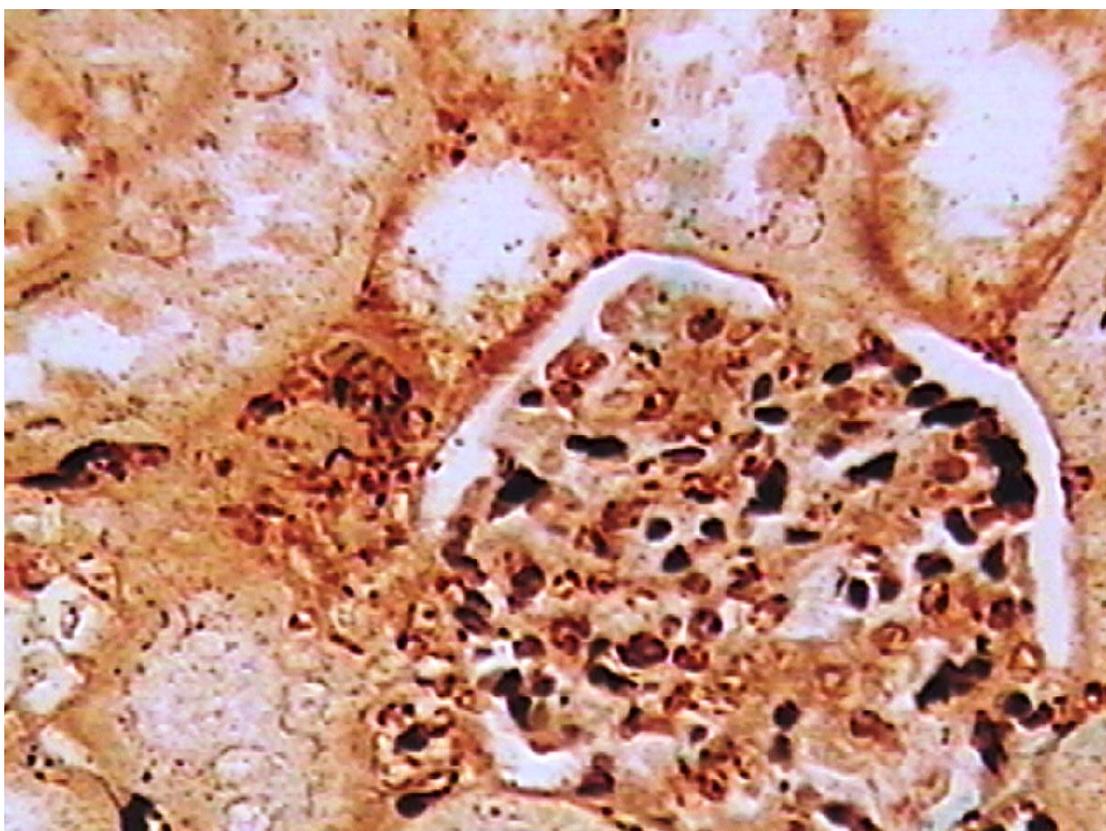


Figura 13: Rim de hamster do grupo 2 que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 40 mg/ kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção, onde se notam evidentes formas bacterianas compatíveis com leptospiros. Coloração WS e aumento de 25x. São Paulo- 2006.

Nos rins de animais que receberam 80 mg/kg de peso vivo de estolato de eritromicina e inóculo infeccioso, não foram encontradas formas compatíveis com leptospiros como se vê na figura abaixo:

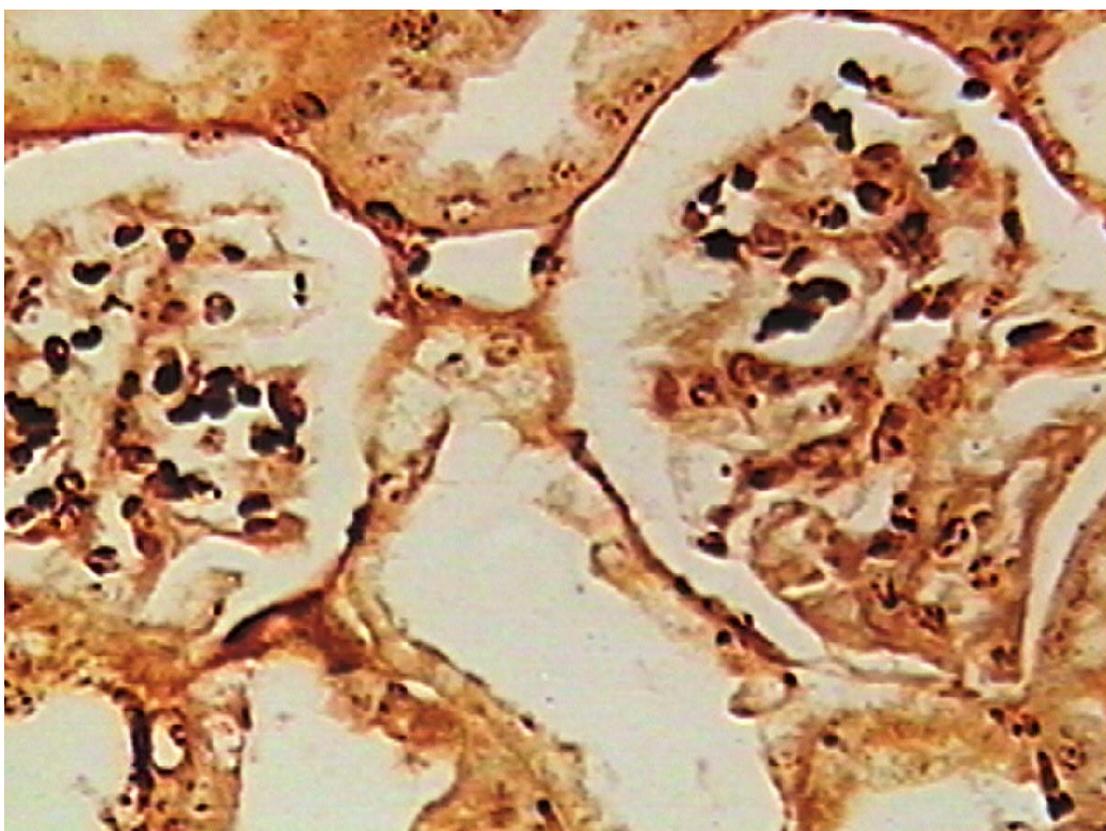


Figura 14: Rim de hamster do grupo 2 que recebeu 0,2 ml de inóculo infeccioso e 48 horas após 80 mg/kg de peso vivo de antibiótico, submetido à eutanásia no 30º dia pós infecção, não se notando a presença de formas suspeitas de leptospiros. Coloração WS e aumento de 25x. São Paulo- 2006.

Os títulos de anticorpos aglutinantes para o sorovar homólogo ao da infecção experimental dos animais induzidos a condição de portadores renais de leptospiros pelo tratamento pós-infecção com o estolato de eritromicina, expressos em logaritmo de base 10 e os resultados dos cultivos renais para isolamento de leptospiros são apresentados na tabela 23.

Tabela 23 - Hamsters do grupo 2, infectados com estirpe patogênica do sorovar Pomona e induzidos a condição de portadores renais de leptospiras pelo tratamento com estolato de eritromicina segundo o sexo, concentração de antibiótico administrada, resultado do cultivo do tecido renal e o títulos de aglutininas anti *L. interrogans* sorovar Pomona São Paulo, 2006 (continua)

Sexo	Antibiótico	Cultivo de tecido renal	Título de aglutininas	
F	10	P	800*	3,07±0,24**
F	10	P	1600	
M	20	P	600	2,92±0,32
M	20	P	400	
M	20	P	800	
M	20	P	400	
M	20	P	600	
M	20	P	600	
F	20	N	1600	3,13±0,20
F	20	P	800	
F	20	P	1600	
M	40	P	800	3,13±0,29
M	40	P	1600	
M	40	P	3200	
M	40	P	400	
M	40	P	1600	
M	40	P	1600	
M	40	P	3200	
M	40	P	800	
M	40	P	1600	
M	40	P	800	
M	40	P	800	
F	40	P	...	2,86±0,47
F	40	P	200	
F	40	P	3200	
F	40	P	400	
F	40	P	...	
F	40	N	400	
F	40	P	3200	
F	40	P	1600	
F	40	P	400	
F	40	P	400	
F	40	P	400	
M	80	P	1600	2,58±0,46
M	80	P	800	
M	80	P	...	
M	80	P	...	
M	80	P	1600	
M	80	P	800	
M	80	P	200	
M	80	N	3200	
M	80	P	...	
M	80	P	200	

Tabela 23 - Hamsters do grupo 2, infectados com estirpe patogênica do sorovar Pomona e induzidos a condição de portadores renais de leptospiros pelo tratamento com estolato de eritromicina segundo o sexo, concentração de antibiótico administrada, resultado do cultivo do tecido renal e o títulos de aglutininas anti *L. interrogans* sorovar Pomona São Paulo, 2006.

				(conclusão)
Sexo	Antibiótico	Cultura de tecido renal	Título de aglutinina	
F	80	P	100	
F	80	P	200	
F	80	P	400	
F	80	P	400	
F	80	P	400	
F	80	P	200	2,54±0,35
F	80	P	800	
F	80	P	200	
F	80	P	1600	
F	80	P	400	

* =recíproca da maior diluição com 50% de leptospiros aglutinadas por campo microscópico. / **= média aritmética e desvio padrão do logaritmo de base 10. ...= soro não disponível. P= cultura positiva. N = cultura negativa

5 DISCUSSÃO

No grupo 4, ou seja, àqueles animais que só receberam meio de cultura (Figuras: 1, 2, 3, e 4) não houve alterações clínicas e histológicas no fígado e nos rins e não foram observadas formas suspeitas de leptospiras pela coloração argêntica o que confirmou a ausência de uma infecção não controlada no transcorrer do experimento.

Os valores apresentados na tabela 1 demonstram que no 30º dia pós-infecção, independentemente do sexo, houve maior frequência de portadores renais para os animais tratados com doses iguais ou superiores a 40 mg/kg de peso vivo de estolato de eritromicina. Embora na concentração de 20 mg/ kg de peso vivo de antibiótico a proporção de portadores tenha sido em valores absolutos mais elevada para os machos, esta diferença foi destituída de significado estatístico ($p > 0,05$). Assim os resultados obtidos foram concordantes com os de Camargo et al. (1998) e a discordância com aqueles apresentados por Pinto et al. (1999) talvez possa ser atribuída a característica de virulência do inóculo infeccioso. Como os animais empregados no presente estudo foram adultos jovens as alterações hormonais relativas ao sexo são pouco evidentes.

O sucesso obtido na indução do estado de portador renal de leptospiras nos animais tratados com 40 e 80 mg de estolato de eritromicina, confirmado por 95% de cultivos renais positivos para leptospiras ressalta a importância do sistema biológico empregado e discorda das observações de Silva et al. (2005) em bovinos que isolou leptospiras na urina de cinco animais cujos cultivos de tecido renal foram negativos para este microorganismo. Talvez a concentração e distribuição de leptospiras nos rins dos hamsters seja maior que a observada nos bovinos.

A patogenicidade e virulência da estirpe do sorovar Pomona empregada no presente experimento para induzir a leptospirose em hamsters foi regular o que concorda com as observações de Camargo et al. (1998) e Pinto et al. (1999) que trabalharam com a mesma amostra. De fato Sebastian (1994) ressaltou que estas características podem variar com o sorovar empregado. A manutenção da capacidade de induzir a doença para uma determinada estirpe de leptospira é mantida por congelamento em nitrogênio líquido ou passagens permanentes e sucessivas em animais de laboratório (FAINE, 1999), contudo os fatores de virulência responsáveis por estas propriedades ainda não estão totalmente esclarecidos.

No que tange ao grupo 1, controle de antibiótico houve diferença significativa entre os membros do grupo nos valores da enzima fosfatase alcalina (tabela 9), observando-se a média mais elevada entre as fêmeas que tomaram 80 mg/kg de peso vivo de estolato de eritromicina e entre os machos que receberam 40 mg/kg de peso vivo de estolato de eritromicina, porém quando foi efetuada a comparação com os valores observados no grupo controle, houve ausência de significância entre ambos ($p > 0,05$). De fato Venkateswaran et al. (1977) em ratos submetidos à eutanásia aos dez dias pós-administração do estolato de eritromicina, e Lazarczyk e Duffy (2000) em ser humano submetido a dose terapêutica deste produto, encontraram alterações hepáticas graves, quer de ordem bioquímica e histológicas confirmando o achado nos animais controle de antibiótico (grupo 1) do presente estudo de acordo com as figuras 5, 6, 7 e 8.

Com relação ao grupo 2, ou seja, o grupo que recebeu inóculo infeccioso e estolato de eritromicina em várias dosagens, houve diferença significativa para as proteínas totais (tabela 13) entre os elementos do grupo, (sobreviventes no 30º dia da infecção experimental, tratados com 40 e 80 mg por kg de peso vivo de estolato de eritromicina) e também em relação ao grupo 4 (controle, não infectados com leptospiros e não tratados com antibiótico). Não foram consideradas as fêmeas que receberam 10 mg de estolato de eritromicina, pois houve somente

duas sobreviventes. A média das proteínas totais das fêmeas que receberam 40 mg/kg de peso vivo foi superior a do grupo controle, havendo neste caso síntese proteica, mas o que poderia estar ocorrendo seria uma maior resposta imunológica com a elaboração de imunoglobulinas ou seja a fração globulina da proteína total que não foi mensurada e seria esta fração que aparece na urina, elevando desta maneira o nível de proteínas totais (FAINE,1999).

Os valores apresentados na tabela 15, hamsters do grupo 2, machos e fêmeas infectados com leptospiras e tratados com diferentes dosagens de estolato de eritromicina, sobreviventes no 30º dia pós infecção, revelam a existência de diferenças significativas nos níveis de creatinina entre os membros do próprio grupo e destes com o grupo 4, (não infectados por leptospiras e não tratados com antibiótico). Entre as fêmeas do grupo 2, não foram consideradas as que receberam 10 mg/kg de peso vivo de estolato de eritromicina, pois houve apenas duas sobreviventes. Analisando-se as fêmeas que receberam 40 e 80 mg/kg de peso de estolato de eritromicina, a média de creatinina foi mais elevada para as que receberam 40 mg de antibiótico, concluindo-se, que no 30º dia pós-infecção persistia a insuficiência renal nestes animais o que não ocorreu entre as que tomaram 80 mg do antibiótico acima referido provavelmente em razão da cura renal conseqüente a alta dose do medicamento. Saliente-se, contudo que a despeito dos valores de creatinina indicarem a normalidade da função renal nas fêmeas que tomaram 80 mg por kg de peso vivo de estolato de eritromicina, todos estes animais foram caracterizados como portadores renais de leptospiras nos cultivos efetuados, o que sugere a persistência dos microorganismos na luz dos túbulos renais sem causar prejuízo à função dos rins. Com relação aos machos, a média mais elevada de creatinina ficou entre os animais que tomaram 80 mg de estolato de eritromicina, indicando que no 30º dia pós-infecção a função renal ainda estava comprometida entre estes animais, talvez as lesões observadas tenham sido mais intensas

que as verificadas nas fêmeas, pois quanto mais extensas são as lesões, mais elevados são os níveis de creatinina (BUSCH, 1991).

No que tange aos achados histopatológicos dos portadores (grupo 2), nota-se que somente os que receberam 10 mg/kg de peso vivo de estolato de eritromicina foram os que apresentaram lesões hepáticas e a presença de formas compatíveis com leptospiros pelo método da HE (Figura 9) e, portanto conclui-se que a dosagem de antibiótico não foi capaz de eliminar as leptospiros do fígado, no entanto, concordando com Baskerville (1986) sobre a inespecificidade da coloração por HE para leptospiros, a presença do agente deve ser sempre confirmada pelas técnicas de impregnação pela prata o que é visto pela figura 10.

Nos animais caracterizados como portadores de leptospiros (grupo 2), houve alteração hepática, em todas as concentrações de estolato de eritromicina empregadas em ambos os sexos representada por vacuolização, como registrado por Venugopal e Ratnam (1989), desorganização trabecular e congestão sinusoidal (Figura 11) o que concorda Oliva et al. (1994) e Alves et al. (1992). Nos rins dos animais deste grupo foram constatadas alterações histopatológicas pelo método da HE (Figura 12), em todos os animais contrariando as observações de Skilbeck et al (1988) em bovinos, porem concordam com as observações de Van den Ingh e Hartman (1986) em hamsters e as de Brito (1968) em humanos. De fato nos hamsters do grupo 2 que receberam até 40 mg/kg de peso vivo de antibiótico foram encontradas leptospiros pelo método de WS (Figura 13). Contudo nos que receberam 80 mg/kg de estolato de eritromicina por kg de peso vivo não foram evidenciadas leptospiros pela técnica argêntica (Figura 14), talvez a técnica não apresente sensibilidade suficiente para demonstrar a presença de uma pequena concentração de microorganismos ou os cortes histológicos efetuados tenham sido efetuados em áreas onde houvessem pequena concentração de leptospiros (ALVES, 1987; MARINHO et al. (2003); SCANZIANI; IRONI; MANDELI, 1989) .

Os testes de soroaglutinação microscópica efetuados nos animais do grupo 2, caracterizados como portadores renais de leptospiras, ou seja, aqueles que permaneceram vivos até o 30º dia pós infecção, não foram realizados em cinco animais devido a não haver quantidade de soro suficiente para realização do exame, no entanto todos os demais apresentaram resultados positivos no ponto de corte empregado (diluição 1: 100). Analisando-se estes resultados, as fêmeas que receberam 10 e 20 mg por kg de peso vivo não podem ser consideradas, pois o número de sobreviventes foi baixo dificultando uma melhor análise, mas com relação ao global, verifica-se que a media aritmética dos logaritmos de anticorpos aglutinantes foi inversamente proporcional à concentração do antibiótico como era de se esperar, pois os animais que receberam doses maiores de medicamento tiveram a infecção bloqueada mais precocemente (Tabela 23).

No grupo 3, ou seja, àqueles que somente receberam inóculo infeccioso houve dois sobreviventes. De fato como a concentração do inóculo infeccioso empregado continha 7,11 DL 50 (Anexo C) era esperado que o número de animais mortos por leptospirose fosse muito próximo de 50%.

6 CONCLUSÕES

Nas condições adotadas na execução do presente estudo foram obtidas as seguintes conclusões:

1. No 28° dia da administração do estolato de eritromicina nas concentrações de 40 ou 80 mg/kg de peso vivo, hamsters machos e fêmeas com 80 a 120 g de peso vivo podem apresentar elevação dos níveis séricos de fosfatase alcalina e vacuolização citoplasmática em hepatócitos.

2. No 30° dia pós-infecção experimental com estirpe de leptospira do sorovar Pomona, hamsters machos e fêmeas com 80 a 120 g de peso vivo, tratados no segundo dia pós infecção com o estolato de eritromicina nas concentrações de 40 ou 80 mg/kg de peso vivo apresentaram cultivos renais positivos para leptospiras e ausência de sinais clínicos da doença.

3. No 30° dia pós infecção com estirpe de leptospira do sorovar Pomona, hamsters machos e fêmeas com 80 a 120 g de peso vivo induzidos a condição de portadores renais de leptospiras pelo tratamento pós infecção com o estolato de eritromicina nas concentrações de 40 ou 80 mg/kg de peso vivo apresentaram, níveis séricos de proteínas totais e creatinina mais elevados que os obtidos em animais do grupo controle não infectados e não tratados com antibiótico.

4. No 30° dia pós-infecção com estirpe de leptospira do sorovar Pomona, hamsters machos e fêmeas com 80 a 120 g de peso vivo induzidos à condição de portadores renais de leptospiras pelo tratamento pós-infecção com estolato de eritromicina nas concentrações de 40 ou 80 mg/kg de peso vivo apresentaram, níveis séricos de albumina, uréia, ALT, AST, BD,

BI e BT iguais os obtidos em animais do grupo controle não infectados e não tratados com o antibiótico.

5. No 30° dia pós-infecção com estirpe de leptospira do sorovar Pomona, hamsters machos e fêmeas com 80 a 120 g de peso vivo induzidos à condição de portadores renais de leptospiras pelo tratamento pós-infecção com o estolato de eritromicina nas concentrações de 40 ou 80 mg/kg de peso vivo apresentaram, títulos de anticorpos aglutinantes para o sorovar homólogo ao da infecção expressos em logaritmo de base dez, maior ou igual a 1,19.

6. No 30° dia pós-infecção com estirpe de leptospira do sorovar Pomona, hamsters machos e fêmeas com 80 a 120 g de peso vivo induzidos à condição de portadores renais de leptospiras pelo tratamento pós-infecção com o estolato de eritromicina nas concentrações de 40 ou 80 mg/kg de peso vivo apresentaram, discreta degeneração vacuolar nos hepatócitos, sangue no espaço porta e congestão glomerular.

7. Aos 30 dias pós-infecção, hamsters machos e fêmeas com 80 a 120 gramas de peso vivo e induzidos à condição de portadores renais de leptospiras pelo tratamento pós-infecção com o estolato de eritromicina foi registrada a presença de leptospiras pela coloração de Warthyn Starry nos tratados com concentrações do antibiótico menores ou iguais a 40 mg/kg de peso vivo.

8. A administração de estolato de eritromicina na concentração de 40 mg/kg de peso vivo no segundo dia pós-infecção com estirpe de leptospira do sorovar Pomona, em hamsters machos e fêmeas, com 80 a 120 g de peso vivo, foi a menor concentração do antibiótico que possibilitou a indução do estado de portador renal de leptospirose.

REFERÊNCIAS

REFERENCIAS

ABDU, M. T. F.; SLEIGHT, S. D. Pathology of experimental *Leptospira pomona* infection in hamster. **Cornell Veterinary**, n. 55, p. 74-86, 1965.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales**. 2. ed. Whashington: OPS, 1986. p. 112-113.

ALEXANDER, A. D.; RULE, P. Evaluation of penicilins, cephalosporins, tetracyclines and erytromycin in treatment of experimental leptospirosis in adult hamster. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 4, p. 296-306, 1987.

ALMEIDA, G. A.; BRITO, M. G. de; ROCHA, G. L. S.; RESENDE, S. M. R.; MAROTTA, S. H. C.; RODRIGUES, L. C. G. (Ed.). **Manual de raiva e leptospirose**. Belo Horizonte. Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais: 1998. 78 p.

ALT, D. P.; BOLIN, C. A. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar pomona infection in hamsters and swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 59-62, 1996.

ALVES, C. J.; ANDRADE J. S. L. de; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; AZEVEDO, S. S.; SANTOS, F. A. dos. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães do município de Patos-PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 17-21 , 2000.

ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MACEDO, N.A.; MORAES, Z. N.; NÜRBERGER JUNIOR, R.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA NETO, J. S. Influência da estimulação inespecífica com o BCG sobre a susceptibilidade do hamster à infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 29, n. 2, p. 193-199, 1992.

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, 1996.

ALVES, V. A. F.; VIANNA, M. R.; YASUDA, P. H.; DE BRITO, T. Detection of Leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. **Journal of Pathology**, v. 159, p. 123-131, 1987.

ANDRADE, Z. A.; OLIVEIRA, J. C.; Estudos sobre a leptospirose na Bahia. **Boletim Fundação Gonçalo Muniz**, v. 3, p. 1-28, 1954.

ARAGÃO, B. H. Sobre a pesquisa do *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro. **Brasil Médico**, v. 31, p. 329-330, 1917.

ARAUJO, E. Da existência de *L. icterohaemorrhagiae* em ratos da Bahia. **Sciência Médica**, v. 6, p. 64-78, 1928.

ARZUMANYAN, Zh. R. Pathogenicity of a leptospire strain isolated in Armenia for different animals (rabbit, guinea pig, hamster, mouse, lamb, young bell). **Zhurnal. Mikrobiologii, Epidemiologii I Immunobiologii**, n.44, p. 151, 1967.

AURAN, N. E. Isolation of the outer sheath of leptospira and its immunogenic properties in hamsters. **Infection and Immunity**, v.5, n.6, p. 968-975, 1972.

BADIOLA, J.; THEIRMAN, A. B.; CHEVILLE, N. F. Pathology features of leptospirosis in hamsters caused by *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* and *szwazizak*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n.1, p. 91-99, 1983.

BALDWIN, E. W.; WHITE, F. H.; EDDS, G. T. Efficacy of certain chemical agents in the treatment of leptospirosis in hamsters. **Nacional Journal Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 863-865, 1972.

BARBOSA, M.; HIPOLITO, O. *Leptospira icterohaemorrhagiae* em ratos (*Rattus norvegicus*) em Belo Horizonte. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais**, v. 5, p. 12-15, 1952.

BARTELS, H.; BÖHMER, M.; HEIERLI, C. Serum creatinine determination without protein precipitation **Clinical Chimica Acta**, n. 37, p. 193, 1972.

BASKERVILE, A. Histopathological aspects of diagnosis of leptospirosis. In: ELLIS, W. A.; LITTLE, T.W.A. (Ed.). **The present state of leptospirosis diagnosis and control**. Northern Ireland, 1986. p. 33-43.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N. ; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLING, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Disease**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. C. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart/ Editora da USP, 1976. 241 p.

BERGMAYER, H. U. IFCC Methods for measurement of catalytic concentration of enzymes. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, p. 497-510, 1986.

BERGMEYER, H. U.; Standardization of enzymes assays. **Clinical Chemistry**, n. 18, p. 1305, 1972.

BEY, R. Immunogenicity of whole cell and outer envelope leptospiral vaccines in hamsters. **Infection and Immunity**, v. 10, n. 5, p. 1051-1056, 1974.

BLENDEN, D. C. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. In: Reunión Interamericana sobre el control de la Fiebre Aftosa y otras Zoonosis, 8, Guatemala, 1975. Washington, **Organization Panamericana de la Salud**, 1976. p. 160-168, (Publicación Científica, 316).

BRITO, M. T. P. Intestinal spirochetosis first cases reported in Brazil and the use of immunohistochemistry as an aid in histopathological diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 45-53, 1996.

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

BRUNNER, K. T. Notes on *Leptospira canicola* infection in hamsters (*Mesocricetus auratus*); pathogenesis, treatment and immunity. **California Veterinary**, v.1, n.6, p. 18-30, 1948.

BUERKI, F. Agglutination and complement fixation reaction in golden hamsters after infection with *Leptospira pomona*. **Pathological Microbiology**, n. 24, p. 977-983, 1961.

BURKI, F. Die Viruleng von *Leptospira pomona* – Strammen für den Syrischen Goldhamster. **Veterinär Medizin**, n. 9, p. 428-432, 1962.

BÜRKI, F. Zum Nachweis von Leptospiren mittels des Goldhamster –Tierversuchs-2 bl. **Bakt. I**, n. 178, p. 211-222, 1960.

BUSH, B. M. **Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Clinicians**. Londres: Blackwell, 1991. 515 p.

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

CAMARGO, C. R. A. VASCONCELLOS, S. A.; NÜRMBERGER JÚNIOR, R.; PASSOS, E. C. P.; MORAIS, Z. M.; VISINTIN, J. A. Investigação sobre a presença de leptospiros em ovários de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 1993.

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.

CHEN, S. S. P. **Case based pediatrics for medical students and residentes**. Departamentos of Pediatrics, University of Hawaii, John A. Burns School of Medicine. Disponível em: <<http://www.hawaii.edu/medicine/pediatrics/pedtext/506c28/htm>> Acesso em: 4 ago. 2005.

COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PURSELL, A. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 976-980, 1973.

COOK, J. E.; COLLES, E. H.; GARNER, F. M. Detectivity leptospires in formalin fixed hamsters tissues by fluorescent antibody techniques. **American Journal of Veterinary Research**, v.33, n.1, p. 277-282, 1972.

CORDEIRO, F.; SULZER, C. R.; RAMOS, A. A. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in Southeast, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, v.1, n. 1, p. 19-29, 1981.

CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. A.; DIAS, R. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 179-193, 2004.

COX, P. J.; TWIGG, G. I. Observations on kidney damage in hamsters following a non icterohaemorrhagic form of disease resulting from infection by *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 91, n. 1, p. 153-157, 1981.

DEANE, M. P. Verificação da infecção natural de ratos por *L. icterohaemorrhagiae* na cidade de Belém, Pará. **Revista Serviços Especiais de Saúde Pública**, v. 1, p. 261-271, 1947.

ENRIETTI, M. A. Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospirose em murídeos, caninos e suínos no Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. jubilee, p. 311-342, 2001.

EXOPOL: **Críterios para la confección de un panel de anticuerpos monoclonales para el diagnostico e identificación del gênero Leptospira** Disponível em: <[http:// www.Exopol.com/general/circular/41cirhtml](http://www.Exopol.com/general/circular/41cirhtml)>. Acesso em: 1 maio 2001.

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

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

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

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

FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, R. S.; 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**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FERNANDES, M. F. **Infectious diseases – Leptospirosis**. Disponível em: <<http://www.Medstudents.com.br/dip/dip1.htm>>. Acesso em: 16 de jul de 2001.

FERREIRA NETO, J. S.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; MORETTI, A. S.; CAMARGO, C. A.; SAKAMOTO, S. M.; MARANGON, S.; TURILLI, C.; MARTINI, M. *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae seropositivity and the reproductive performance of sows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 31, n. 1-2, p. 87-93, 1997.

FIALHO, A. Estudos sobre a espirochetose ictero-hemorrhagica no Rio de Janeiro. **Archives Hygiene**, v. 6, p. 29-35, 1936.

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

FONSECA, F.; PRADO, A. Algumas verificações parasitológicas em ratos de São Paulo. **Revista de Medicina e Cirurgia, Brasil**, v. 40, p. 65-70, 1932.

FORATTINI, O. P. Presença de leptospiras nos ratos da cidade de São Paulo. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 23, p. 5-27, 1947.

GAITEDHORSES. Disponível em: <<http://www.gaitedhorses.net/articles/Leptospirosis.html>> Acesso em 20 abr. 2001.

GALTON, M.M.; SULZER, C.R.; SANTA ROSA, C. A.; FIELDS, J. M. Aplicação de microtécnica to the agglutination test for leptospira antibodies. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 81-85, 1965.

GIORGI, W.; GENOVEZ, M. E.; TERUYA, J.; SILVA, A. S. *Leptospira interrogans*, sorotipo wolffi, isolada de camundongo capturado no porto de Santos. **Biológico, São Paulo**, v. 50, n. 12, p. 295-297, 1984

GOMES, L. S.; RIBAS, J. C.; CORRÊA, M. O. A.; JORDÃO, F. M. Incidência da leptospirose em ratos nas cidades de São Paulo e Santos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 10, p. 111-115, 1950.

GOMES, M. C. O.; HYAKUTAKE, S.; CORREA, M.O. A Investigação sobre a ocorrência de leptospiroses em trabalhadores de diversas profissões no distrito sede do município de Sorocaba. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 28, p.19-26, 1968.

GUIDA, V. O. Identificação sorológica de leptospiras e pesquisa de anticorpos em ratos (*r. norvegicus*) capturados na cidade de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 19, p. 85-92, 1949.

GUIDA, V. O.; MONICI, N. Estudo comparativo de métodos de pesquisa de leptospiras em ratos. **Boletim da Sociedade de Medicina Veterinária**, v.8, n.3, p. 133-139, 1949.

GUIMARÃES, M. C.; CORTES, J. A; VASCONCELLOS, S. A; ITO, F. H. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e seu controle terapêutico. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v 6/7, n. 1, p. 21-34, 1982/83.

HELGER, R.; RINDFREY, H.; HILGENFELD, Z. Direct estimation of creatinine in serum analysis urine without desproteinization using a modified Jaffe method. **Zeitschrift fur Klinische Chemie und Klinische Biochemie**, n. 12, p. 344, 1974.

HENRY, R. J.; CANON, D. C.; WINKELMAN, J. W. **Clinical Chemistry, Principles and Technics**. 2 ed, New York: Harper & Row, 1974.

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

HUHN, R. G.; KOKJOHN, J. L.; CARDELLA, M. A. Immunity to leptospirosis: antigens in dog and hamster. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 1, p. 67-70, 1975.

IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes- Part 5. IFCC Method for Alkaline Phosphatase. **Journal of. Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, n. 21, p. 731-747, 1983.

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

INGHT, 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, n. 4, p. 367-376, 1985.

KATZ, A. R.; MANEA, S. J.; SASAKI, D. M. Leptospirosis on Kauai: investigation of a common source waterborne outbreak. **American Journal of Public Health**, v. 81, n. 10, p. 1310-1312, October, 1991.

KMETY, E.; DIKKEN, H. Classification of species of *Leptospira interrogans* and history of its serovars. In: **International Leptospirosis**. *Leptospira Classification with History of Serovars*. Disponível em: <http://www.vet.bg.ac.yu/ils/lepto_classif/sero-lis.htm> Acesso em: 13 nov. 1977.

KO A. I.; GALVÃO, R. M.; RIBEIRO, D. C. M.; JOHSON JR, W. D.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **The Lancet**, v. 4, n. 354, p. 91-94, 2003-2004.

KRAWCZJK, M. Estimation of transmission hazard of *Leptospira* sp.; infections in 2 groups of people. **Przegl Epidemiol**, v. 58, n. 1, p. 207-212, 2004.

KRONHAUS, A. E.; BARRIOLA, J. L.; SARAVI, M. A. Isolation and detection of *Leptospira interrogans* in femoral bone marrow of experimentally inoculated hamster. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 70, n. 2, p. 82-84, 1989.

LANGONI, H.; SOUZA, L. C. de; SILVA, A. V. da; LUVIZOTTO, M. C.; PAES, A. C.; LUCHEIS, S. B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3-4, p. 271-75, 1999.

LAZARCZYK, D. A.; DUFFY, M. C. Erythromycin – Induced Primary Biliary Cirrhosis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 45, n. 6, p. 1115-1118, 2000.

LILENBAUM, W. Leptospirose em reprodução animal: IV. Achados sorológicos em éguas de seis propriedades no Rio de Janeiro, Brasil (1993-1996). **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 61-63, 1998.

LILENBAUM, W.; MONTEIRO, R. V.; RISTOW, P.; FRAGUAS, S.; CARDOSO, V. S.; FEDULLO, L. P. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zôo, Brasil. **Research Veterinary Science**, v. 73, n. 36, p. 319-21, 2002.

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

LINS, A. Novas observações sobre *L. icterohaemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro, **Brasil Médico**, v. 23, p. 243-246, 1925.

LIPSITZ, J.; LONDON, M. A rapid total bilirubin using sodium hypochlorite. **Journal of Laboratory and Clinical Medical**, v. 81, p. 625, 1973.

LONGUEVILLE, DE F.; ATIENZAR, F. A.; MARCQ, L.; DUFRANE, S.; EVRARD, S.; WOUNTERS, L.; LEROUX, F.; BERTHOLET, V.; GERIN, B.; WHOMSLEY, R.; ARNOULD, T.; REMACLE, J.; CANNING, M. Use of a Low-Density Microarray for Studying Gene Expression Patterns Induced by Hepatotoxicans on Primary Cultures os Rat Hepatocytes. **Toxicological Science**. v. 75, p. 378-392, 2003.

LORENZO, L.; SETTA, F.; DEMARIA, I. Evaluación de un método de Berthelot modificado para dosar urea. **Revista ABA**, v. 55, n. 2, p. 76, 1991.

LUCHEIS, S. B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3-4, p. 271-75, 1999.

MACEDO, N. A.; MORAIS, Z .M.;CAMARGO,C. R. A.;ALVES, C. J. A.; VASCONCELLOS, S. A.; NÜRMBERGER JÚNIOR, R. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*M.auratus*) experimentalmente infectados com *L. interrogans*, sorotipo pomona. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**.v. 41, n. 3, p. 194-200, 2004.

MAGALHÃES, H. **Hamster bibliography**. Cambridge, Massachusetts, USA Unpublished, in
WHITNEY, R. Bio-Research Institute, 1959.

MARINHO, M.; LANGONI, H.; OLIVEIRA, S.L.; CARREIRA, R.; PERRI, S. H. V.; LUVIZOTO, M. C. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e *balb/c*, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar *icterohaemorrhagiae*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 5-12, jan/mar, 2003.

MARTINS, S. V. F.; CASTINEIRAS, T. M. P. P. **Leptospirose**. In: Centro de Informação em Saúde para Viajantes (Cives) Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/leptospirose/leptiv.html>>. Acesso em: 20 abr 2001.

MC COMB, R. B.; BOWERS, JR, G. N.; UPRETTI. A. Alkaline phosphatase. **Clinical Chemistry**. n. 27, p. 135-143, 1981.

MC KENZIE, J. G. **Leptospirosis**. Last update 12 outubro 2004. Department of Emergency Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, University Hospital. Disponível em: http://www.emedicine.com/emerg/topic_856.htm. Acesso em 2 set 2005

MCMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Staining methods: histologic and histochemical**. New York , Harper & Row, 1965.

MEITES, E.; JAY, M. T.; DERESINSKI, S.; SHIEH, W. J.; ZAKI, S. R. TOMPKINS, L.; SMITH, D. S. Reemerging leptospirosis, California. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n.3, p. 406-412, 2004.

MEIRA, D. A.; SANTA ROSA, C. A. Estudo epidemiológico e clínico de leptospirose em detentos de São Paulo. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 19, p. 163-172, 1964.

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

MILLER, N.G. Observations of the carrier state in hamsters infected with *L. interrogans* serotype *pomona*. **Medical Microbiology and Immunology**, 158 (1), p. 1-8, 1972.

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

MIRAGLIA, F. Emprego da penicilina-estreptomicina, amoxicilina ou ceftiofur sódico no diluidor gema-citrato, para destruir leptospiros em sêmen bovino experimentalmente contaminados por *Leptospira santa rosai* sorovar guaicuris. 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2001.

MOCE L; MOCEL M. Estearato de eritromicina nas infecções otorrinolaringológicas em pediatria. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 43, n. 1, p.29-36, 1977.

MORGAN, J.; BORNSTEIN, S. L.; KARPATI, A. M.; BOLIN, C. A.; AUSTIN, C. C.; WOODS, C. W.; LINGAPPA, J.; LANGKOP, C.; DAVIS, B.; GRAHAM, D. R.; PROCTOR, M.; ASHFORD, D. A.; BAJANI, M.; BRAGG, S. L.; SHUTT, K.; PERKINS, B. A.; TAPPERO, J. W. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infection Diseases**, v. 34, n. 12, p. 1593-1599, 2002.

MURTI, G.S. Pathology of Leptospirae infections (*L. pomona*, *L. canicola*, *L. icterohemorrhagiae*) in the chinchilla and hamsters. **Dissertation. Abstracts**. v.22, n. 12 pt.1, p. 43-46, 1962.

NEGI, S. K.; MYERS, W. L.; SEGRE, D. F. Antibody response of cattle to *L. pomona*. Response as measured by hemagglutination, microscopic agglutination, and hamster proctetion test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32 n. 22, p. 1915-1920, 1971.

NÓBREGA, P. Sobre a incidência de *L. icterohaemorrhagiae* em ratos na cidade de São Paulo. **Boletim da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária**, v. 8, p. 31-36, 1947.

OLIVA, R.; INFANTE, M.; GONZALES, M.; PEREZ, V.; SIFONTES, S.; MARRERO, O.; VALDES, Y.; FARIÑAS, M.; ESTEVEZ, L.; GONZALES, I. Pathologic- Clinical Characterization of Leptospirosis in a Golden Syrian Hamster Model. **Archives of Medical Research**, v. 25, n. 2, p. 165-170, 1994.

OLIVEIRA, A. A.; MOTA, G. C.; LANGONI, H.; SOUZA, M. I.; NAVEGANTES, W. A.; SA M.E. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns Municipal District, Pernambuco State, Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 4, p. 275-279, 2001.

PASSOS, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; YASSUDA, P. H.; NURMBERGER JUNIOR, R. Isolamento de leptospiros a partir de tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 2, n. 25, p. 221-235, 1988.

PENNOCK C. A.; PASSANT, L. P.; BOLTON, F. G. Estimation of cerebrospinal fluid protein. **Journal of Clinical Pathology**, n. 21, p. 518, 1968.

PEREIRA, M. M.; SILVA, P. J. J.; PISSURNO, W. J.; PINTO, M. A.; SILVA, J. M.; FRANÇA, M. S.; SILVA, A. A.; SILVA, E. D.; VASCONCELLOS, F. J. M.; MACHADO, M. P.; LENZI, H. L.; MARCHEVSKY, R. *Callithrix jacchus* as a new experimental model for studying the pathogenesis of leptospirosis. INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY. Second Meeting, Austrália. p. 46, 1999.

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

POSTIC, D.; MERIEN, F.; PEROLAT, P.; BARANTON, G. **Diagnostic biologique leptospirose-borreliose de lyme**. 2. ed. França: Instituto Pasteur, 2000, 135 p.

RED, L. J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **American Journal of Hygienist**, v. 27, p. 493-497, 1938.

RODRIGUES, C. G.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Leptospirose Bovina: sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 309-314, 1999.

ROMERO, C. E.; BERNARDO, C. C. M.; YASUDA, P. H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 245-248, 2003.

SALÉM, J. C. W. Animal Models- Principles and Problems. IN----- **Handbook of laboratory animal science, Animals Models**, Washington: Ed Per Svendsen and Jann Hau, 1994. v.II, p. 1-6.

SANGER, V. L. *Leptospira pomona* infection in hamsters. **Cornell Veterinary**, n. 51, p. 489-498, 1961.

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

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; YANAGUITA, R. M.; SILVA, A. S.; Leptospirosis in wildlife in Brasil: Isolation of serovars canicola, pyrogenes and grippotyphosa. **International Journal of Zoonosis**, v. 7, p. 40-43, 1980.

SANTOS, G. O.; CARDOSO, F.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; FÁVERO, A. C. M.; MIRAGLIA, F.; PINHEIRO, S.R.; AMOS, C. A. A. Emprego do Ceftiofur sódico ou da estreptomicina para a terapia da leptospirose em hamsters experimentalmente infectados com *leptospira interrogans* sorovar *pomona*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 1-8, 2001.

SANTOS, M. A. Ocorrência de *Leptospira ictero-hemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 4, p. 424-426, 1947.

SAPP, W. J.; SIDDIQUE, I. H.; WILLIAMS, C. S.; GRAHAM, T. Histopathologic evaluation of livers of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 8, p.1288-1292, 1981.

SCANZIANI, E.; IRONI, G.; MANDELI, G. Imunoperoxidase studies on leptospiral nephritis of swine. **Veterinary Pathology**, v. 26, p. 442-444, 1989.

SCHLEBUSCH, H.; RICK, W.; LANG, H.; KNEDEL, M. Standardts in the activities of clinically important enzymes. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 99, n.15, p. 765, 1974.

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

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

SECRETARIA DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: < [Http://dtr2001.saude.gov.br/sus/epi/situacao_doenças/leptospirose.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/sus/epi/situacao_doenças/leptospirose.pdf)>. Acesso em: 22 de maio de 2005.

SEJVAR, J.; BANCROFT, E.; WINTHROP, K.; BETTINGER, J.; BAJANI, M.; BRAGG, S.; SHUTT, K.; KAISER, R.; MARANO, N.; POPOVIC, T.; TAPPEROD, A.; MASCOLA, L.; VUGIA, D.; PERKINGS, B.; ROSENSTEIN, N.; Leptospirosis in “Eco-Challenge” Athletes, Malaysian Borneo, 2000. **Emerging Infectious Disease**, v.9, n.6, p. 702-707, 2003.

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

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica (para as ciências do comportamento)**. São Paulo, Mc Graw- Hill do Brasil, 1975. 350 p.

SILVA, F. G. da. ; FREITAS, J. C. de. ; ANZAI, E. K.; HASHIMOTO, V. Y.; GIRALDI, N.; DELBEM, Á. C. B.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; REIS, A. C. F. dos.; VASCONCELLOS, S. A. Leptospire detection in kidney, liver and uterus of cow slaughtered in Paraná State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, n. 1, p. 38-42, 2005.

SKILBECK, N. M.; FORSYTH, W. M.; DOHNT, M. Bovine leptospirosis: Microbiological and histological findings in cattle at slaughter. **Australian Veterinary Journal**, n.65, p. 73-75, 1988.

SMITH, R. E.; REYNOLDS, I. M. Leptospirosis in hamsters on diets containing various levels of riboflavin. **American Journal of Veterinary Research**, n. 22, p. 800-806, 1961.

SPINOSA, H, S. Antibióticos: macrolídeos, lincosamidas, rifamicinas, frosfomicinas e novobiocina. In _____ **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 646 p.

SSCC- Comite de Enzimas da Sociedade Escandinava de Química Clínica. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, n. 36, p. 119, 1976.

TERUYA, J. M.; SANTA ROSA, C. A. SILVA, A. S.; GIORGI, W. Pesquisas de aglutininas anti-leptospira em animais aparentemente sadios abatidos em matadouro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 48, n. ¼, p. 97-99, 1981.

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

THOMPSON, J. C.; JOHSTONE, A. C. The effects of gamma irradiation on haematopoiesi and red blood cell destruction in hamsters infected with *Leptospira interrogans* serovar *ballum*.. **British Journal Experimental Pathology**, v. 68, n. 3, p. 389-398, 1987.

TIETZ, N. W. **Fundamentals of clinical chemistry**. Filadelfia: Saunders, 1970.

TIETZ, N. W.; BURTIS, C. A.; DUCAN, P. A reference method for measurement of Alkaline Phosphatase activity in human serum. **Clinical Chemistry**, n. 29, p. 751-761, 1983.

TRIPATHY, D. N.; HANSON, L.E.; Imunoperoxidase staining of leptospiras. **Journal of Applied Microbiology**. v. 27, p. 268-269, 1974.

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

TURNER, L. H. Leptospiroses III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospiras. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 623-646, 1970.

ULMANN, R.; BONITZ, K. Fully mechanized kinetic measurement of creatinine. **Medicine. Laboratory**, v. 29, n. 6, p. 137-45, 1976.

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

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

VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose Animal. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 3., 1993, Rio de Janeiro, p. 62-66.

VASCONCELLOS, S. A.; O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 1, p. 17-24, 1987.

VENKATESWARAN, S.; PARI, L.; VISWANATHAN, P.; MENON, V. P. Protective effect of Livex, a herbal formulation against erythromycin estolate induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 57, p. 161-167, 1997.

VENUGOPAL, K.; RATNAM, S. Lesions and immune responses produced in hamsters and guinea pigs inoculated with some strains of leptospiras. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 1075-1077, 1990.

VIEIRA, S. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1999. 186 p.

VYSOTSKII, B.V. Leptospirosis of the red heron. **Veterinariia N**, v. 3, n. 67, 1970.

WARTHIN, A. S.; STARRY, A. C. A more rapid and improved method of demonstrating spirochetes in tissues (Warthin and Starry's cover-glass method). **American Journal of Syphilis**, v. 4, p. 97-103, 1920.

WILLIAMS, C. S.; SIDDIQUE, I. H.; SAPP, W. J. Studies on the kidneys of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*. **British Journal Experimental Pathology**, v. 62, n. 2, p. 165-171, 1981.

WOOD, G. E.; ALEXANDER, A. D. The effect of selected antibacterial and antiprotozoal agents in treatment of leptospirosis in experimentally infected hamsters. **Antibiotic and Chemoterapy**, n. 10, p. 341-348, 1960.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leptospirosis worldwide, 1999**. New York: Wkly Epidemiol Rec; 1999, n.74, p.237-242.

YASUDA, P. H.; SANTA ROSA, C. A.; MYERS, D. M.; YANAGUITA, R. M. The isolation of leptospire from stray dogs in the city of São Paulo, Brazil. **Internacional Journal of Zoonosis**, v. 7, p. 131-134, 1980a.

YASUDA, P. H.; SANTA ROSA, C. A.; YANAGUITA, R. M. Variação sazonal na prevalência de leptospirose em cães de rua da cidade de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública, São Paulo**, v. 14, p. 589-596, 1980b.

YASUDA, P. H.; SANTA ROSA, C. A. Correlação entre soroaglutinação e isolamento de leptospiras em cães. **Revista de Microbiologia**, v. 12, p. 35-37, 1981.

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

ANEXO A-PREPARO DO INÓCULO INFECCIOSO

- a- Para o preparo do inóculo infeccioso utilizamos fígado de hamsters infectados com *Leptospiras interrogans*, sorovar *pomona*. O animal foi sacrificado aproximadamente uma ou duas horas antes da morte por leptospirose, ou seja, na fase agônica que ocorreu 80 horas pos-infecção.
- b- O hamster moribundo foi sacrificado com vapores de éter sulfúrico sendo imediatamente colocado em decúbito dorsal e o local (abdômen) desinfetado com uma solução de álcool iodado.
- c- A pele do animal foi aberta através de uma incisão na linha mediana ventral, expondo-se inicialmente a musculatura e posteriormente com outro bisturi, foi aberto a musculatura na linha alba e as vísceras abdominais foram expostas.
- d- Com um novo conjunto de bisturi e pinças esterilizadas procedeu-se a colheita asséptica de cerca de 1,0 grama de tecido hepático e colocado numa placa de Petri previamente pesada e esterilizada. A placa foi neste momento novamente pesada e adicionou-se da mesma maneira quanto tecido hepático foi necessário para obtenção de uma grama, admitindo-se uma variação de 0,01 a 0,02 gramas.
- e- O tecido hepático pesado (1,0 g) foi transferido assepticamente da placa de Petri para um almofariz. Adicionou-se nove mL de BSAD (Bovine Serum Albumin Diluent) e o tecido foi homogeneizado gentilmente, evitando-se a formação de espuma. Esta suspensão foi denominada diluição 1:10.

f- Realizou-se uma série de diluições a décima a partir da primeira, sendo que o BSAD continuou sendo utilizado como diluente conforme o que segue abaixo:

1. O que foi acima descrito, ou seja, uma g de tecido e 9.0 ml de diluente = 1:10 (10^{-1}).
2. 1.0 ml da diluição 1:10 + 9.0 ml do diluente = 1:100 (10^{-2}).
3. 1.0 ml da diluição 1:100 + 9.0 ml do diluente = 1:1000 (10^{-3}).
4. 1.0 ml da diluição 1:1000 + 9.0 ml do diluente = 1:10.000 (10^{-4}).
5. 1.0 ml da diluição 1:10.000 + 9.0 ml do diluente = 1:100.000 (10^{-5}).

Após análise em campo escuro com aumento de 400x entre lâmina e lamínula das várias diluições preparadas verificamos que a diluição 10^{-3} era a que continha em média entre 10 a 20 leptospira por campo, conforme o desejado, a partir daí foi realizada a contagem utilizando-se a Câmara de Petroff, constatando-se a concentração total de 12325 leptospiras por ml.

Fonte: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE, (1977).

**ANEXO B-CÁLCULO DO NÚMERO DE LEPTOSPIRAS EM CÂMARA DE
PETROFF – HAUSER**

$$\frac{\text{Número de leptospiiras contadas} \times \text{diluição usada} \times 20.000 \times 1000}{\text{Número de pequenos quadrados contados}}$$

$$C = 49,3 \times 0,001 \times 20000 \times 1000/80 = 12325 \text{ leptospiiras/mL}$$

ou $1,2 \times 10^4$ leptospiiras/ml.

ANEXO C-CÁLCULO DO DL 50 SEGUNDO REED & MUENCH(1938)

Tabela 34: Hamsters do grupo cinco que receberam inóculos em diluições crescentes para cálculo do DL50. São Paulo, 2005

Título do inóculo	Nº de animais	Mortos	Vivos	Mortos acumulados	Vivos acumulados	Totais	% de mortos
10 ⁻¹	6	5	1	16	1	17	94,10
10 ⁻²	6	6	0	11	1	12	91,60
10 ⁻³	6	3	3	5	4	9	55,55
10 ⁻⁴	6	1	5	2	9	11	18,20
10 ⁻⁵	6	1	5	1	14	15	6,60

$$DL\ 50 = >50\% - 50 \div >50\% - < 50\%$$

$$DL\ 50 = 55,55 - 50 \div 55,55 - 18,20$$

$$DL\ 50 = 5,55 \div 37,35 = 0,148$$

$$1\ DL\ 50 = 10^{-3,852}$$

O número de DL 50 efetivamente empregado:

$$10^{-3,852} \div 10^{-3} = 10^{-0,852}$$

O anti log de 0,852 = 7,11, portanto os animais foram expostos a 7,11 DL 50

ANEXO D-MEIO DE EMJH* MODIFICADO

Preparo:

Reagentes

1) Solução de L- asparagina a 3%	5 mL
2) Solução de cloreto de cálcio e magnésio a 1%	1 mL
3) Solução de piruvato de sódio a 1%	1 mL
4) Extrato de carne	0,25g
5) Peptona	0,30g
6) EMJH base	2,30g
7) Água destilada	900 mL
8) Soro de coelho	150mL

Filtrar as soluções 1, 2 e 3 em filtro milipore 0,45 μ , separadamente.

Inativar o soro de coelho durante 1 hora a 56°C.

Retirar a base da autoclave, esperar a atingir a temperatura de 56°C e adicionar o soro de coelho e as soluções.

* Ellinghausen, Mc Cullough, Jonhson e Harris-DIFCO (Detroit USA)

ANEXO E-SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA DE SORENSEN

Preparo

Reagente 1

Solução tamponada de Sorensen:

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| 1) Fosfato de potássio monobásico | 1,09g |
| 2) Fosfato de sódio | 8,33g |
| 3) Água destilada | 1000mL |
- pH final= 7,6

Reagente 2

Solução salina tamponada de Sorensen:

- | | |
|----------------------------------|----------|
| 1) Salina fisiológica 0,85% | 1.840 mL |
| 2) Solução tamponada de Sorensen | 160 mL |
- pH final= 7,5

Autoclavar a 120°C por 15 minutos.

ANEXO F-MEIO DE FLETCHER BASE* (semi-sólido)

Preparo

Diluir 2,5 g em 920 ml de água destilada ou deionizada. Autoclavar a 121-124°C por 15 minutos.

Deixar esfriar e quando a temperatura atingir 50°C juntar 8-10% de soro de coelho inativado, misturar bem para homogeneizar o meio, distribuir assepticamente e inativar o meio total a 56°C por 1 hora no dia do preparo. O pH deve estar entre 7,6 a 8,0.

Para prova de esterilidade o meio deve ser incubado a 37°C durante 24 horas e a temperatura ambiente por mais 24 horas.

* DIFCO LABORATORIES (Detroit USA)