

ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS A PARTIR
DO TECIDO RENAL DE HAMSTERS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM
LEPTOSPIRA INTERROGANS SOROTIPO
POMONA. EMPREGO DAS TÉCNICAS DA
PIPETA PASTEUR E A DAS DILUIÇÕES
SERIADAS EM MEIO DE CULTURA DE
FLETCHER TRATADO COM 5-FLUOR-URACIL
OU O SULFATO DE NEOMICINA*

ESTEVARO DE CAMARGO PASSOS
Pesquisador Científico
Instituto Biológico

SILVIO ARRUDA VASCONCELLOS
Professor Livre Docente
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

FUMIO HONMA ITO
Professor Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

PAULO HIDEKI YASUDA
Professor Assistente Doutor
Instituto de Ciências
Biomédicas da USP

RODOLFO NÜRMBERGER JUNIOR
Professor Assistente Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

culados com estirpes virulentas de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. Os trinta animais do grupo "A" foram inoculados com uma estirpe que apresentava 39 passagens em hamsters. O grupo "B" foi constituído por outros trinta animais inoculados com a estirpe que contemplava apenas duas passagens em hamsters. Decorridos três a sete dias da inoculação, todos os animais vieram a óbito ou foram sacrificados em estado agônico. Nesta oportunidade, a existência de leptospiros em todos os rins processados foi confirmada por pelo menos um de três métodos utilizados para a visualização do agente: exame direto em microscopia de campo escuro, coloração de Levaditi, e a reação de imunofluorescência direta. Segundo estas técnicas, os materiais provenientes do grupo "A" foram caracterizados como apresentando maior riqueza em leptospiros do que aqueles originários do grupo "B". Os resultados das provas culturais variaram conforme a estirpe de leptospira utilizada. Para o grupo "A" o método de isolamento mais sensível foi a técnica das diluições seriadas em meio tratado com o S-FU. Para o grupo "B" as diferenças observadas entre as técnicas ensaiadas foram desprovidas de valor estatístico ao nível de significância adotado ($\alpha = 0,05$), no entanto, o meio tratado com o S-FU foi o que apresentou o melhor comportamento: $p < 0,001$ e $p = 0,024$, respectivamente para as técnicas da pipeta Pasteur e a das diluições seriadas.

UNITERMOS: *Leptospira pomona*, isolamento; Tecido renal; Antimicrobianos; Fluoracila; Neomicina; Hamsters

PASSOS, E.C.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; YASUDA, P.H.; NÜRMBERGER JUNIOR, R. Isolamento de leptospiros a a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. Emprego das técnicas da pipeta Pasteur e a das diluições seriadas em meio de cultura de Fletcher tratado com 5-fluor-uracil ou o sulfato de neomicina. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 25(2): 221-235, 1988.

RESUMO: Com o objetivo de estudar comparativamente os métodos de isolamento de leptospiros, através das técnicas da pipeta Pasteur e a das diluições seriadas, em meio de cultura de Fletcher tratado com os antimicrobianos 5-fluor-uracil (S-FU) na concentração de 100 microgramas por mililitro ou o sulfato de neomicina na concentração de 2,5 microgramas por mililitro, foram examinados 60 pares de rins obtidos de hamsters jovens, experimentalmente ino-

INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial da leptospirose tem por objetivo o atendimento de três questões fundamentais: a primeira é a de confirmar ou não a suspeita clínica do caso; a segunda é a de que tal confirmação se estabeleça o mais rápido possível, a fim de orientar a terapia específica do paciente comprometido e a terceira é a da identificação do sorotipo de leptospira envolvido (8).

Se as duas primeiras questões, anteriormente citadas, podem ser esclarecidas com o emprego de provas sorológicas, entre as quais se destaca a reação de soro-aglutinação microscópica (7,

* Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

25) ou mesmo através de métodos que permitam a visualização do agente etiológico, tais como a microscopia de campo escuro (7, 25, 30), as técnicas de coloração por sais de prata (7, 25) e inclusive a reação de imunofluorescência direta (7, 30), a terceira questão só poderá ser esclarecida através do isolamento do agente em meio de cultura ou por inoculação em animais de laboratório, com a sua posterior tipificação, segundo métodos imunológicos (7, 13, 25).

A complexidade e o custo dos métodos de isolamento de patógenos em sistemas biológicos representados por animais de laboratório têm estimulado o desenvolvimento de técnicas que permitam a replicação de microrganismos em meios de cultura artificiais. Tal conduta, além de ser mais econômica, é muito mais estável do que o uso do animal de laboratório (7, 13).

De fato, na leptospirose, as provas diretas de isolamento do agente, em meio de cultura, assumem uma grande importância epidemiológica e têm sido objeto de preocupação de numerosos pesquisadores (2, 17, 22, 31); no entanto, ainda não foi encontrado um procedimento ou uma combinação de procedimentos que consiga reunir as características de sensibilidade, especificidade, facilidade de aplicação e custos desejados, particularmente para os programas massais que envolvam o exame de grandes quantidades de materiais.

A principal dificuldade observada nas técnicas disponíveis para o isolamento de leptospiros, a partir da inoculação de materiais suspeitos em meios de cultura, é a presença de microrganismos contaminantes (14, 19, 20, 27). Tais microrganismos, freqüentemente, são de rápido crescimento e, durante o seu desenvolvimento, acabam por alterar o meio de cultura, impedindo com isto, a multiplicação das leptospiros, cujo período de geração é relativamente longo com, extremos de sete a 12 horas (13).

O controle da contaminação dos inóculos suspeitos de conter leptospiros tem sido tentado pela técnica das diluições seriadas, por processos de filtração através de filtros inertes ou biológicos (25), bem como pelo emprego de meios de cultura seletivos, obtidos pela incorporação aos meios básicos, de substâncias com ação antimicrobiana que devem inibir o crescimento dos microrganismos indesejáveis e interferir o mínimo possível sobre o desenvolvimento das leptospiros (3, 14, 19, 20, 27). Entre os antimicrobianos mais estudados, em termos de meios de cultura seletivos para leptospiros, destacam-se o 5-fluoruracil (14) e o sulfato de neomicina (20) que serão objeto do presente trabalho.

Embora a técnica das diluições

seriadas seja reconhecida internacionalmente como método de escolha para o isolamento de leptospiros (7), sua execução é muito laboriosa e pouco prática, particularmente quando o exame laboratorial é encarado como um dos elementos que alimentam os serviços de vigilância epidemiológica destinados a controlar as doenças que acometem populações de animais.

As limitações referidas para a utilização da técnica das diluições seriadas fizeram com que alguns pesquisadores procurassem adotar técnicas alternativas mais simples, entre as quais se salienta a da pipeta Pasteur (10) que, devido à facilidade de emprego, passou a ser adotada rotineiramente por alguns pesquisadores (15, 21, 31); no entanto, até o presente, ainda não foi realizado um estudo comparativo que permita confirmar a eficiência deste processo com relação à técnica padrão das diluições seriadas.

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi o de estudar, comparativamente, as técnicas de isolamento de leptospiros, através da pipeta Pasteur e das diluições seriadas, em meios de cultura com os agentes antimicrobianos 5-fluor-uracil ou o sulfato de neomicina, tendo como indicador da existência de leptospira no material suspeito, os resultados das provas de visualização direta em campo escuro, Levaditi e imunofluorescência direta. Tal estudo foi realizado a partir de espécimens de tecido renal colhidos de hamsters experimentalmente infectados com duas estirpes virulentas de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona.

MATERIAL E METODOS

O meio líquido de Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris (EMJH)* foi utilizado para o crescimento dos antígenos empregados na reação de soroaglutinação microscópica. Sua preparação seguiu a indicação do fabricante com exceção da fonte de enriquecimento que foi representada por 10% de soro normal estéril de coelho, inativado a temperatura de 56 °C por 30 minutos e de L-asparagina e cloreto de cálcio e magnésio (30). Todos os lotes utilizados foram submetidos aos testes de esterilidade e de crescimento (25).

O meio semi-sólido de Fletcher* foi empregado nas provas de isolamento de leptospiros, no preparo de inóculos utilizados para provocar a infecção experimental em hamsters e também para a produção dos soros hiperimunes. O seu preparo seguiu a indicação do fabricante, sendo enriquecido com 10% de soro

* Difco

normal estéril de coelho, inativado a temperatura de 56°C por 30 minutos.

Cada lote de meio de Fletcher foi subdividido em três parcelas de igual volume, uma das quais permaneceu inalterada; à outra adicionou-se 5-fluoruracil* (14) na concentração final de 100 microgramas por mililitro de meio e à outra, sulfato de neomicina ** (20) na concentração final de dois e meio microgramas por mililitro de meio. Estes antimicrobianos foram acrescentados após a autoclavagem e resfriamento do meio básico, justamente na ocasião em que era adicionada a fonte de enriquecimento. Nesta operação a esterilização da solução de cada um dos agentes antimicrobianos utilizados foi executada pela filtração através de membranas filtrantes***, com 0,22 micrômetros de porosidade. Os meios foram distribuídos em tubos de vidro de 160 x 12 milímetros, providos de tampa plástica rosqueável, em volumes de cinco mililitros por tubo. Todos os lotes utilizados foram submetidos aos testes de esterilidade e de crescimento (25).

O diluente adotado para o preparo das suspensões de órgãos e para a diluição dos anti-soros foi representado por uma solução salina tamponada de Sorensen estéril (25).

Os inóculos utilizados foram duas estirpes virulentas de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, identificadas pela prova de absorção de aglutininas (25), obtidas, respectivamente, na Salsbury Laboratórios Ltda. (estirpe "A", com 39 passagens em hamsters), e no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (estirpe "B" com duas passagens em hamsters). A manutenção das características de virulência das duas estirpes referidas foi obtida por conservação em nitrogênio líquido (4), em ampolas de vidro contendo 85% da cultura em meio líquido (com cinco a sete dias de crescimento), 10% de soro normal estéril de coelho inativado à temperatura de 56°C por 30 minutos e 5% de glicerina neutra estéril.

Os soros hiperimunes, utilizados nas provas de soroaglutinação microscópica para identificação das amostras isoladas e também, no caso da estirpe "A", para o preparo do conjugado empregado na reação de imunofluorescência direta, foram preparados em coelhos jovens, com dois quilos de peso vivo, através de uma série de aplicações dos cultivos pela via endovenosa, na veia marginal da orelha, em doses sucessivas de 1, 2, 4, 6 e 6 mililitros de cultura viva, administrados a cada sete dias (25).

O conjugado anti-*Leptospira pomona* estirpe "A" foi preparado a partir do respectivo soro hiperimune, através de sua precipitação em solução de sulfato de amônio a 80% de saturação. Concluído

o processo de diálise para a retirada do sulfato de amônio, o teor proteico da fração globulínica obtida foi determinado através do método do Biureto (9) e, a seguir, foi adicionado o fluorocromo na proporção de 0,02 miligramas de isotiocianato de fluoresceína****, para cada miligrama de proteína do soro precipitado. Após a conjugação, houve novo processo de diálise para retirar o excesso de fluorocromo livre, não conjugado (9). A diluição ótima do conjugado para emprego na reação de imunofluorescência direta foi a de 1:40.

O método de isolamento de leptospiros através da técnica da pipeta Pasteur foi realizado como segue: com o emprego de uma espátula metálica aquecida ao rubro, procedeu-se à cauterização da superfície externa dos rins trabalhados. A seguir, as áreas tratadas foram perfuradas pela extremidade de uma pipeta Pasteur estéril, previamente partida, realizando-se alguns movimentos rotatórios a fim de facilitar a extração de um diminuto fragmento do órgão que foi imediatamente semeado, sob condições de assepsia, nos diferentes tipos de meio de cultura empregados (7, 10, 25). Para cada tubo de meio de cultura foi utilizada uma única pipeta Pasteur. Os tubos semeados foram incubados em estufas reguladas para manter a temperatura de 28°C onde permaneceram durante seis semanas, sendo as leituras realizadas semanalmente em microscópio óptico***** com ocular 10X, objetiva 40X e condensador de campo escuro.

O método de isolamento de leptospiros, através da técnica das diluições seriadas, foi executado adotando-se o seguinte procedimento: sob condições de assepsia, foram pesados e macerados os fragmentos de rins, de modo a fornecer uma suspensão a 10% (peso/volume) em solução salina tamponada de Sorensen estéril. Esta suspensão foi submetida a uma centrifugação a 2.000 rotações por minuto, durante cinco minutos, para retirada de restos celulares grosseiros; a seguir, sob condições de assepsia e com seringa e agulha estéreis, foram preparadas três diluições seriadas de razão dez, de modo a fornecer as concentrações finais de 1,0; 0,1 e 0,01% que foram semeadas nos diferentes meios de cultura ensaiados (13, 25, 30). O volume de inóculo por tubo de meio de cultura foi de 0,1 mililitro. Após a semeadura os tubos foram incubados à temperatura de 28°C, durante seis semanas, com leituras semanais em microscopia de campo escuro, conforme descrito para técnica da pipeta Pasteur.

A reação de imunofluorescência direta foi executada em impressões de fragmentos de rins, preparados em lâminas de microscopia, secas em temperatura ambiente e fixadas durante cinco minutos em acetona pura refrigerada. Para cada

* Hofman La Roche
 ** Squibb Indústria Química S.A.
 *** Millipore Indústria e Comércio Ltda.
 **** Sigma

conjunto de lâminas examinadas foram sempre incluídos os controles positivo e negativo. As impressões foram demarcadas com duas áreas de extensão aproximada de um centímetro quadrado. Na primeira fase de reação foi colocado, em uma das áreas demarcadas, o soro hiperimune puro anti-Leptospira pomona estirpe "A"; a seguir, as lâminas foram transferidas para câmara úmida e mantidas em estufa à temperatura de 37°C durante 30 minutos. Após a incubação as lâminas foram rapidamente enxaguadas e lavadas com solução salina tamponada e, a seguir, foi iniciada a segunda fase da reação que consistiu na aplicação do conjugado anti-Leptospira pomona estirpe "A" sobre as duas áreas delimitadas nas lâminas, repetindo-se todo o processo de incubação e lavagens já relatado. A leitura das reações de imunofluorescência direta foi realizada em microscópio de fluorescência* com ocular 10X, objetiva de imersão PLANAPO 40/1,0 e condensador de campo escuro.

A técnica de Levaditi foi executada conforme o procedimento descrito por McMANUS & MDWRY, 16 (1965) e a observação das preparações foi realizada em microscópio óptico** com ocular 12,5X, objetiva 47,5X e condensador de campo claro.

O exame direto em microscopia de campo escuro foi realizado através do exame de uma gota das suspensões de tecido renal a 10%, peso-volume, em microscópio óptico*** com ocular 10X, objetiva 40X e condensador de campo escuro (7, 25, 30).

A reação de soro-aglutinação microscópica (25) foi utilizada para a tipificação das estirpes virulentas de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona empregadas na infecção experimental, para a titulação dos anti-soros produzidos e para a identificação primária dos isolamentos obtidos.

O sistema biológico utilizado para a reprodução experimental da leptospirose foi representado por 60 hamsters (*Mesocricetus auratus*) jovens, sem especificação de sexo e com peso vivo variando entre 80 a 120 gramas.

Os 60 hamsters trabalhados foram aleatoriamente divididos em dois grupos de igual tamanho, inoculados, respectivamente com as estirpes "A" e "B". Cada animal recebeu o volume de 0,5 mililitro do respectivo inóculo, anteriormente referido, através da via intraperitoneal, tomando-se, nesta oportunidade, os cuidados usuais de assepsia.

Após a inoculação os animais foram mantidos em infectório com observação diária para a constatação do aparecimento dos sinais clínicos. O término da fase de observação foi estipulado ou pelo óbito natural ou pelo sacrifício do animal quando em fase agônica. Imediatamente após a morte ou sacrifício, os

hamsters foram submetidos a imersão em uma solução aquosa de Lysoform**** a 10% durante 15 minutos. A seguir, tomando-se os cuidados usuais de assepsia, procedeu-se a colheita dos rins, utilizando-se dois conjuntos de material cirúrgico estéril por animal, um para exposição das cavidades torácica e abdominal e outro para a colheita dos rins propriamente dita. Após a colheita os rins foram imediatamente transferidos para placas de Petri estéreis, sendo submetidos às provas de isolamento e de visualização das leptospiros anteriormente citadas.

O tratamento estatístico adotado para o estudo da existência de associação entre os resultados dos exames dos materiais colhidos dos animais inoculados com as duas estirpes de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona utilizadas, foi realizado através do teste de Qui-quadrado (28). Para análise dos resultados obtidos a partir dos órgãos colhidos de animais inoculados com uma mesma estirpe de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, segundo as diferentes técnicas nos diversos meios de cultura empregados, foram aplicados os testes da Binominal e de Cochran (28), respectivamente, para o estudo de associação entre dois grupos e para mais do que dois grupos. O nível de significância adotado foi o de 0,05.

RESULTADOS

Os 60 hamsters, experimentalmente inoculados com as duas estirpes virulentas de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, apresentaram sinais clínicos e morreram ou foram sacrificados em estado agônico entre o terceiro e o sétimo dia de inoculação. A sintomatologia constatada foi representada por eriçamento do pelame, incoordenação motora, taquipnéia e prostração. Após a morte ou sacrifício, os hamsters foram necropsiados e as lesões macroscópicas observadas, embora apresentando alguma variação individual, consistiram basicamente de: a) hemorragias nasais e na bexiga urinária; b) icterícia do tecido subcutâneo e mucosas; c) aumento de volume e congestão do fígado e baço.

Na Tab. 1 encontram-se os resultados dos exames realizados nos 30 hamsters inoculados com a estirpe "A" de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, tanto para as técnicas de visualização do agente quanto para as de isolamento.

Os valores apresentados na Tab. 1 revelam que, para as três técnicas de visualização de leptospiros empregadas,

* Carl Zeiss

** Bausch & Lomb

*** Wild

**** Lysoform S.A. Indústrias Químicas

a presença do agente foi confirmada em todas as oportunidades. Relativamente às técnicas de isolamento aplicadas aos diferentes meios de cultura adotados, a sensibilidade variou de 68% para a técnica da pipeta Pasteur em meio de cultura contendo neomicina, até 100% para a técnica das diluições seriadas em meio de cultura contendo o 5-fluor-uracil. Saliente-se, no entanto, que os animais de números 8 e 26 apresentaram cultivo positivo somente para a técnica das diluições seriadas.

Persistindo na apresentação dos resultados relatados na Tab. 1, pôde-se constatar que, para as técnicas de cultivo aplicadas não houve nenhum caso de isolamento apenas em meio de cultura contendo neomicina; no entanto, segundo a técnica das diluições seriadas, o animal de número 24 foi confirmado como positivo apenas através do meio de cultura contendo 5-fluor-uracil.

Na Tab. 2 encontram-se os resultados dos exames realizados nos 30 hamsters inoculados com a estirpe "B" de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, tanto para as técnicas de visualização do agente quanto para as de isolamento.

Os valores apresentados na Tab. 2 revelam que, para as três técnicas de visualização de leptospiros empregadas, pôde-se constatar que todos os animais trabalhados apresentaram resultado positivo frente a pelo menos uma delas. Houve, no entanto, variação entre os resultados observados, encontrando-se menor sensibilidade para o exame direto em microscopia de campo escuro (76,6%); a imunofluorescência direta ficou em uma situação intermediária (93,3%) e a coloração pela técnica de Levaditi foi positiva em todas as oportunidades (100%). Entre as discordâncias observadas ressalta-se o comportamento do animal de número 25, positivo apenas segundo a coloração de Levaditi; os animais de número 1, 7, 8, 11, 17 e 20, negativos no exame direto em microscopia de campo escuro e o animal de número 6, negativo para a técnica de imunofluorescência direta.

Continuando a apresentar os valores referidos na Tab. 2, pode-se observar que, para as técnicas de isolamento aplicadas aos diferentes meios de cultura empregados, constata-se que os valores de sensibilidade obtidos variaram de 43,3% para a técnica da pipeta Pasteur em meio de cultura contendo neomicina, até 90% para a técnica da pipeta Pasteur em meio de cultura contendo 5-fluor-uracil. Saliente-se, no entanto, que os animais de números 6 e 8 apresentaram resultados negativos para as duas técnicas utilizadas. Segundo a técnica da pipeta Pasteur, foram positivos apenas em meio de cultura contendo 5-fluor-uracil os animais de números 3, 5, 13, 19, 25 e 29 e, exclusivamente no meio de

cultura isento de agentes antimicrobianos, o animal de número 7. Quanto à técnica das diluições seriadas foi verificada a positividade exclusivamente em meio de cultura contendo 5-fluor-uracil para os animais de números 2, 10, 19 e 29 e apenas em meio de cultura isento de agentes antimicrobianos para o animal de número 25.

O estudo do comportamento das duas estirpes virulentas de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona frente aos diferentes métodos de cultivo, através do teste de Qui-quadrado (28), revelou serem significantes ($\alpha = 0,05$) as diferenças entre os isolamentos obtidos através da técnica das diluições seriadas, para o meio de cultura isento de agentes antimicrobianos e o meio de cultura contendo 5-fluor-uracil. A probabilidade calculada para que tais diferenças fossem decorrentes do acaso está contida no intervalo entre 0,025 a 0,04. Em contrapartida, foram não significantes ($p > 0,05$) as diferenças observadas entre os isolamentos das duas estirpes pela técnica das diluições seriadas em meio de cultura contendo neomicina e em todos os tipos de meios de cultivo testados segundo a técnica da pipeta Pasteur.

Na Tab. 3 são ressaltados os totais dos resultados apresentados nas Tab. 1 e 2, com os correspondentes valores de probabilidade associados segundo os testes de significância aplicados.

Para os ensaios realizados com a estirpe "A", foi constatada diferença significativa ($p = 0,008$) entre as técnicas de isolamento empregadas, apenas quando o meio de cultura continha 5-fluor-uracil. Para o meio de cultura isento de agentes antimicrobianos e meio de cultura contendo neomicina, embora os resultados absolutos tenham sido mais elevados, segundo a técnica das diluições seriadas, as diferenças observadas foram admitidas como casuais ao nível de significância adotado ($p \geq 0,062$).

Persistindo na apresentação dos resultados dos exames efetuados com a estirpe "A", analisando-se agora, separadamente, o comportamento de cada uma das técnicas de cultivo, conforme o tipo de meio de cultura utilizado, pode-se verificar a inexistência de significância ($0,10 < p < 0,20$) entre os resultados 76,6; 76,6 e 68%, respectivamente para os meios de cultura isento de agentes antimicrobianos, contendo 5-fluor-uracil e contendo neomicina, obtidos pelo método da pipeta Pasteur. Para a técnica das diluições seriadas houve diferença significativa ($p = 0,031$) apenas entre os meios de cultura contendo 5-fluor-uracil (100%) e meio de cultura contendo neomicina (80%).

Quanto aos resultados obtidos com a estirpe "B", embora os valores absolutos tenham sido mais elevados segundo a

técnica da pipeta Pasteur para o meio de cultura contendo 5-fluor-uracil e para a técnica das diluições seriadas frente aos outros dois tipos de meio de cultura empregados, tais diferenças foram admitidas como decorrentes do acaso ao nível de significância adotado ($p > 0,052$).

Persistindo na apresentação dos resultados dos exames efetuados com a estirpe "B", analisando-se agora, separadamente, o comportamento de cada um dos métodos de cultivo, conforme o tipo de meio de cultura utilizado, pode-se verificar a existência de significância ($p < 0,001$) entre os resultados obtidos pela técnica da pipeta Pasteur para os três tipos de meio de cultura adotados, havendo uma relação decrescente em termos de sensibilidade, respectivamente, conforme a seguinte ordem: meio de cultura contendo 5-fluor-uracil, meio de cultura isento de agentes antimicrobianos e meio de cultura contendo neomicina. Para a técnica das diluições seriadas houve diferença significativa entre os três tipos de meio de cultivo empregados ($0,02 < p < 0,025$), constatando-se, no entanto, no estudo das combinações dois a dois pelo Teste da Binomial, haver diferença significativa ($p = 0,011$) apenas entre o meio de cultura contendo 5-fluor-uracil e meio de cultura contendo neomicina.

Com o objetivo de oferecer subsídios para a avaliação dos aspectos relativos ao tempo consumido para a constatação de culturas positivas segundo as técnicas de cultivo ensaiadas, foram construídas as Fig. 1 e 2. Estas figuras apresentam os números de cultivos positivos em uma dada semana de observação sobre os totais de cultivos confirmados como positivos durante as seis semanas de observação. Na confecção das Fig. 1 e 2 foram reunidas todas as culturas positivas, segundo a técnica de isolamento e a estirpe de leptospira, sem levar em consideração o tipo de meio de cultura empregado.

A Fig. 1 representa o comportamento das duas estirpes de leptospiros empregadas conforme os resultados dos cultivos realizados segundo a técnica da pipeta Pasteur.

A Fig. 2 exprime o comportamento das duas estirpes de leptospiros utilizadas conforme os resultados dos cultivos realizados segundo a técnica das diluições seriadas.

A observação das Fig. 1 e 2 revela que, para as duas técnicas de cultivo ensaiadas, o número de culturas positivas obtidas por ocasião da primeira semana de observação foi sempre maior para *Leptospira interrogans* sorotipo pomona estirpe "A". Nas semanas subsequentes com exceção da segunda semana, para a técnica da pipeta Pasteur, os percentuais de isolamentos obtidos para a estirpe "B" foram iguais ou superiores àqueles constatados para a estirpe "A".

Cumprindo novamente ser salientada a existência de isolamentos efetuados por ocasião da sexta semana de observação para as estirpes "A" e "B", segundo as duas técnicas de isolamentos empregadas.

DISCUSSÃO

A reprodução experimental de um quadro septicêmico com desfecho fatal entre o terceiro e o sétimo dia pós-inoculação em todos os 60 hamsters experimentalmente inoculados com as duas estirpes de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona empregadas, confirma a excelência desta espécie animal como modelo experimental da leptospirose aguda (1, 5, 12, 18, 24, 26) e oferece subsídios para o estabelecimento do primeiro parâmetro a ser considerado, quanto à avaliação das técnicas culturais ensaiadas, ou seja, todos os animais trabalhados apresentaram um quadro clínico e lesões macroscópicas compatíveis com aqueles já referidos, quando do emprego de estirpes de leptospiros virulentas no sistema biológico adotado.

Os resultados das técnicas de visualização de leptospiros, apresentados nas Tab. 1 e 2, demonstram a existência de diferenças comportamentais para as duas estirpes de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona utilizadas. Se, para a estirpe "A", a quantidade de leptospiros existentes no tecido renal dos animais experimentalmente inoculados permitiu a constatação da presença de microrganismos em todos os 30 animais trabalhados segundo as três técnicas aplicadas; para a estirpe "B" houve sete resultados negativos ao exame direto em campo escuro e dois resultados negativos frente à reação de imunofluorescência direta. Por outro lado, mesmo nos exames com resultados positivos, a quantidade de leptospiros constatadas nos animais inoculados com a estirpe "B" foi sempre muito inferior àquela observada para a estirpe "A". Tal situação poderia ser interpretada como consequência das diferenças existentes nas duas estirpes testadas, quanto ao número de passagens realizadas no sistema biológico empregado. De fato, a ocorrência de modificações na virulência de amostras de leptospiros subsequente a passagens sucessivas em um determinado sistema biológico já foram aventadas (11, 29).

Particularmente, no que se refere aos resultados da reação de imunofluorescência direta, deve também ser considerada a possível influência do conjugado empregado, pois, a despeito da reação ser considerada como técnica sorogrupo específica (7), os exames de impressões de materiais obtidos de ani-

mais inoculados com a estirpe "B", empregando-se conjugado preparado com a estirpe "A", foram invariavelmente muito pobres. Esta hipótese deve ser considerada pois, PHANEUF, 22 (1970), estudando comparativamente técnicas de visualização de leptospiros, concluiu ser a reação de imunofluorescência direta mais sensível do que a técnica de coloração por sais de prata.

A despeito da constatação de diferenças nos resultados das técnicas de visualização de leptospiros aplicadas ao tecido renal dos animais trabalhados, a presença do microrganismo foi caracterizada em todas as oportunidades, através de pelo menos uma das técnicas utilizadas, segundo as duas estirpes de Leptospira interrogans sorotipo pomona empregadas.

Relativamente aos resultados das técnicas de cultivo realizadas com os materiais provenientes dos animais inoculados com a estirpe "A", que apresentava 39 passagens em hamsters, constatou-se que a técnica das diluições seriadas foi superior à da pipeta Pasteur, particularmente quando o meio de cultura continha o agente anti-metabólico 5-fluor-uracil na concentração final de 100 microgramas por mililitro de meio. Quanto ao meio de cultura acrescido de sulfato de neomicina na concentração de 2,5 microgramas por mililitro de meio, a despeito de não ter sido constatada significância estatística, os valores absolutos obtidos para o meio tratado foram sempre inferiores àqueles observados em meio de cultura isento de agentes antimicrobianos. A superioridade aqui observada para o meio de cultura acrescido do 5-fluor-uracil, contrasta com as conclusões relatadas por RIS, 23 (1974), que refere um possível bloqueio do poder de inibição de contaminantes do 5-fluor-uracil, devido ao extrato de carne presente na composição do meio de Fletcher.

Quanto aos resultados obtidos a partir dos cultivos dos materiais colhidos dos animais inoculados com a estirpe "B", que apresentava duas passagens em hamsters, constatou-se que a técnica da pipeta Pasteur foi equivalente a das diluições seriadas para os três tipos de meios de cultura utilizados, havendo no entanto um melhor comportamento para o meio de cultura adicionado de 5-fluor-uracil. Já para o meio de cultura acrescido de sulfato de neomicina constatou-se a existência de um patente efeito inibidor sobre o crescimento da estirpe de leptospira estudada, particularmente para a técnica de cultivo da pipeta Pasteur. A existência de um efeito inibidor da neomicina variável conforme a

estirpe de leptospira já foi referida (13, 20, 27). Provavelmente a concentração de trabalho do sulfato de neomicina para a estirpe "B" deveria ter sido inferior a 2,5 microgramas por mililitro de meio de cultura.

As Fig. 1 e 2 demonstram que, para as duas estirpes de leptospira utilizadas, houve uma maior frequência de isolamentos firmados por ocasião da primeira semana de cultivo, com maiores valores absolutos segundo a técnica da pipeta Pasteur; saliente-se, contudo, que na sexta semana de cultivo foram ainda registrados isolamentos para as duas amostras empregadas, frente às duas técnicas de cultivo ensaiadas. Tais resultados ressaltam a importância de não serem descartados os tubos de cultura negativos antes da sexta semana de cultivo. Não pode ser excluída a possibilidade de que alguns dos cultivos referidos como negativos, pudessem ainda revelar a presença de leptospiros, caso fosse ampliado o período de observação utilizado. Esta afirmativa apoia-se inclusive nas observações de BRUGGE & LOUW, 6 (1985) que referem isolamentos com 131 dias de cultivo.

Embora os materiais provenientes dos animais inoculados com a estirpe "B" tenham apresentado menor quantidade de leptospiros do que aqueles originários de hamsters inoculados com a estirpe "A", os resultados das duas técnicas de isolamento ensaiadas foram estatisticamente iguais. Esta constatação, aliada à precocidade e à facilidade da execução da técnica da pipeta Pasteur, subsidiam a sua indicação como alternativa para as diluições seriadas, particularmente quando do exame de grande quantidade de materiais.

As Fig. 1 e 2 também salientam que, para as duas técnicas de cultivo investigadas, houve diferença de comportamento conforme a estirpe trabalhada, constatando-se uma maior precocidade para a obtenção de isolamentos para a estirpe "A", o que poderia ser explicado pela maior riqueza em leptospiros evidenciadas nos materiais colhidos dos animais inoculados com esta estirpe, quando comparados aos exames de visualização aplicados aos materiais colhidos dos animais inoculados com a estirpe "B".

O maior número de isolamentos observados para as duas estirpes estudadas durante os primeiros 15 dias de cultivo salientam a importância da realização de maior número possível de exames, dos cultivos, durante este período, a fim de que possam ser executados repiques para novos tubos de meio de cultura, sempre que leptospiros venham a ser visualizadas.

TABELA 1 - Exames realizados no tecido renal de hamsters inoculados com a *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, estirpe "A", segundo o número do animal, o tipo de técnica empregada e a natureza do resultado. São Paulo, 1987.

TECNICA	VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE LEPTOSPIRAS			CULTIVO						
	DIRETO	COLORAÇÃO		PIPETA PASTEUR			DILUIÇÕES SERIADAS			
		LEVADITI	RIFD	I	II	III	I	II	III	
NUMERO ANIMAL										
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
6	P	P	P	P	N	NR	P	P		NR
7	P	P	P	P	N	NR	P	P		NR
8	P	P	P	N	N	NR	P	P		NR
9	P	P	P	P	N	NR	P	P		NR
10	P	P	P	P	P	NR	P	P		NR
11	P	P	P	P	P	P	P	P		N
12	P	P	P	P	P	N	P	P		P
13	P	P	P	P	P	P	N	P		P
14	P	P	P	N	P	P	P	P		P
15	P	P	P	P	P	P	P	P		P
16	P	P	P	N	P	N	P	P		P
17	P	P	P	P	P	N	P	P		P
18	P	P	P	P	P	P	P	P		P
19	P	P	P	P	N	P	P	P		P
20	P	P	P	P	P	P	P	P		N
21	P	P	P	P	P	N	P	P		P
22	P	P	P	P	N	N	P	P		P
23	P	P	P	P	P	P	P	P		P
24	P	P	P	N	P	P	N	P		N
25	P	P	P	P	P	P	P	P		P
26	P	P	P	N	N	N	P	P		P
27	P	P	P	P	P	P	P	P		P
28	P	P	P	N	P	N	P	P		N
29	P	P	P	P	P	P	P	P		P
30	P	P	P	N	P	P	P	P		N
TOTAL*	30/30	30/30	30/30	23/30	23/30	17/25	28/30	30/30	20/25	
% POSITIVOS	100	100	100	76,6	76,6	68,0	93,3	100	80,0	

- * = Positivos/Examinados
P = Positivo
N = Negativo
NR = Não realizado
"A" = Estirpe com 39 passagens em hamsters e 15, em meio de cultura
RIFD = Reação de Imunofluorescência Direta
I = Meio de cultura de Fletcher isento de agentes antimicrobianos
II = Meio de cultura de Fletcher com 5-fluor-uracil (100 microgramas/mililitro)
III = Meio de cultura de Fletcher com Sulfato de Neomicina (2,5 microgramas/mililitro)
% = Percentagem

Isolamento de leptospiros a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados

TABELA 2 - Exames realizados no tecido renal de hamsters inoculados com a *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, estirpe "B", segundo o número do animal, o tipo de técnica empregada e a natureza do resultado. São Paulo, 1987.

TECNICA	VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE LEPTOSPIRAS			CULTIVO					
	DIRETO	COLORAÇÃO		PIPETA PASTEUR			DILUIÇÕES SERIADAS		
		LEVADITI	RIFD	I	II	III	I	II	III
NUMERO ANIMAL									
1	N	P	P	P	P	N	P	P	P
2	P	P	P	P	P	N	N	P	N
3	P	P	P	N	P	N	P	P	N
4	P	P	P	P	P	P	P	P	N
5	P	P	P	N	P	N	P	P	N
6	P	P	N	N	N	N	N	N	N
7	N	P	P	P	N	N	P	P	P
8	N	P	P	N	N	N	N	N	N
9	P	P	P	P	P	N	P	N	P
10	P	P	P	P	P	N	N	P	N
11	N	P	P	P	P	P	P	P	P
12	P	P	P	P	P	P	P	P	P
13	P	P	P	N	P	N	P	P	N
14	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	P	P	P	N	P	P	P	P	P
16	P	P	P	P	P	N	P	P	P
17	N	P	P	P	P	P	N	P	P
18	P	P	P	P	P	P	N	P	P
19	P	P	P	N	P	N	N	P	N
20	N	P	P	P	P	N	P	P	N
21	P	P	P	P	P	P	P	P	P
22	P	P	P	P	P	P	P	P	P
23	P	P	P	P	P	P	P	P	P
24	P	P	P	P	P	P	P	P	P
25	N	P	N	N	P	N	P	N	N
26	P	P	P	P	P	P	P	P	P
27	P	P	P	P	P	P	P	P	P
28	P	P	P	P	P	N	P	P	P
29	P	P	P	N	P	N	N	P	N
30	P	P	P	P	P	N	P	P	P
TOTAL*	23/30	30/30	28/30	21/30	27/30	13/30	22/30	26/30	18/30
% POSITIVOS	76,6	100	93,3	70,0	90,0	43,3	73,3	86,6	60,0

* = Positivos/Examinados

P = Positivo

N = Negativo

"B" = Estirpe com duas passagens em hamsters e sete, em meio de cultura

RIFD = Reação de Imunofluorescência Direta

I = Meio de cultura de Fletcher isento de agentes antimicrobianos

II = Meio de cultura de Fletcher com 5-fluor-uracil (100 microgramas/mililitro)

III = Meio de cultura de Fletcher com Sulfato de Neomicina (2,5 microgramas/mililitro)

% = Percentagem

TABELA 3 — Isolamentos de leptospiras efetuados em tecido renal de hamsters experimentalmente inoculados com *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*, segundo a técnica de isolamento, o tipo de meio de cultura, a estirpe de leptospira utilizada e os valores de probabilidade casual conforme o teste estatístico empregado. São Paulo, 1987.

ESTIRPE TIPO DE MEIO DE CULTURA	A						B					
	PIPETA PASTEUR		DILUIÇÕES SERIADAS		TESTE BINOMIAL		PIPETA PASTEUR		DILUIÇÕES SERIADAS		TESTE BINOMIAL	
	POS/EX	%	POS/EX	%	POS/EX	(p)	POS/EX	%	POS/EX	%	POS/EX	(p)
I	23/30	76,6	28/30	93,3	0,062	NS	21/30	70,0	22/30	73,3	0,500	NS
II	23/30	76,6	30/30	100,0	0,008	S	27/30	90,0	26/30	86,6	0,500	NS
III	17/25	68,0	20/25	80,0	0,274	NS	13/30	43,3	18/30	60,0	0,062	NS
TESTE DE COCHRAN (p)	p = 0,183		p = 0,0425				p < 0,001		p = 0,024			
DECISÃO	NS		S				S		S			S

POS/EX = Positivos/Examinados

S = Significante

NS = Não Significante

"A" = Estirpe com 39 passagens em hamsters e 15, em meio de cultura

"B" = Estirpe com duas passagens em hamsters e sete, em meio de cultura

p = Probabilidade do resultado observado ser decorrente do acaso

I = Meio de Cultura de Fletcher isento de agentes antimicrobianos

II = Meio de Cultura de Fletcher com 5-fluor-uracil (100 microgramas/mililitro)

III = Meio de Cultura de Fletcher com Sulfato de Neomicina (2,5 microgramas/mililitro)

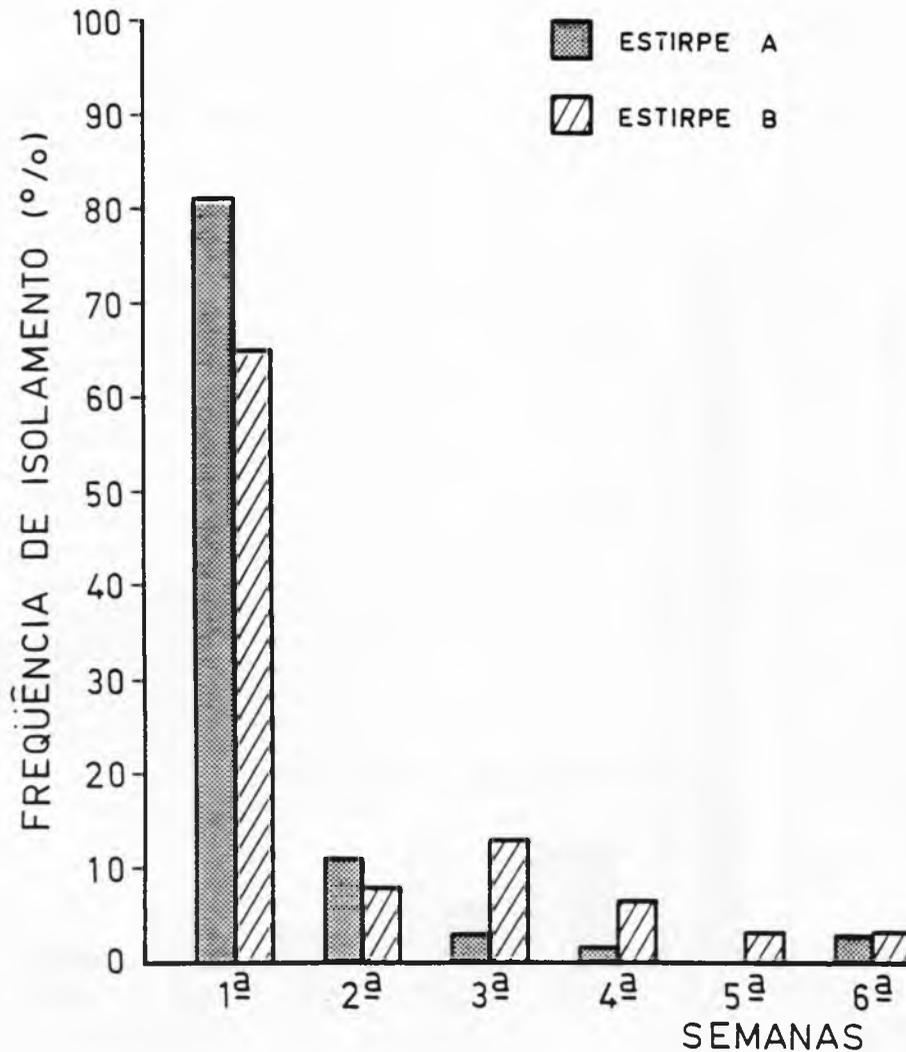


FIGURA 1 – Isolamentos de leptospiros através da técnica da pipeta Pasteur, a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente inoculados com *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*, segundo a estirpe e o momento da observação expresso em semanas após a sementeira. São Paulo, 1987.

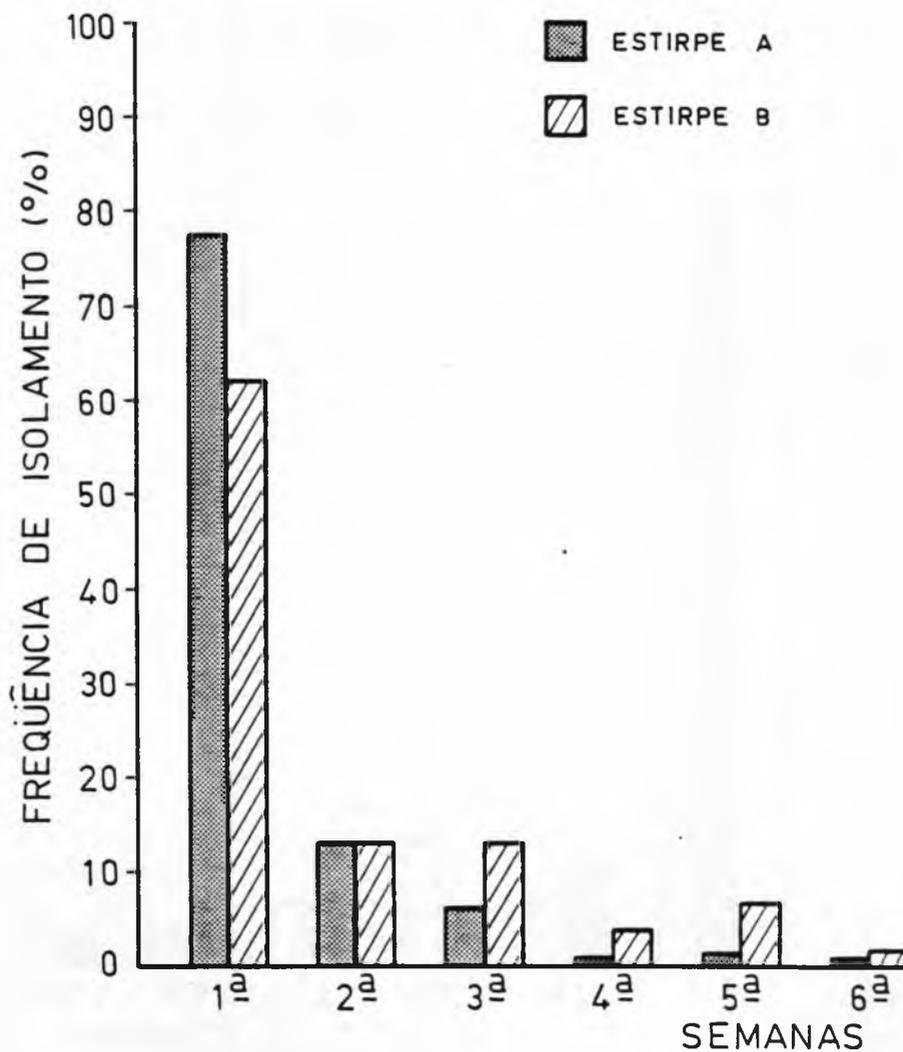


FIGURA 2 — Isolamento de leptospiras através da técnica das diluições seriadas, a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente inoculados com *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*, segundo a estirpe e o momento da observação expresso em semanas após a sementeira. São Paulo, 1987.

PASSOS, E.C.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; YASUDA, P.H.; NÜRMBERGER JUNIOR, R. Isolation of leptospires from the renal tissues of hamsters experimentally infected by *Leptospira interrogans* serovar pomona. Use of the Pasteur pipette and the serial dilution techniques and their cultivation in Fletcher's medium added with 5-fluor-uracil or neomycin sulfate. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 25(2):221-235, 1988.

SUMMARY: In order to comparatively study the methods of "in vitro" isolation of leptospires, the Pasteur's pipette and the serial dilution techniques were performed on the renal tissue samples of 60 hamsters experimentally infected either by two strains of *Leptospira interrogans* serovar pomona, using the Fletcher's medium added with 100 micrograms/ml of 5-fluor-uracil or 2.5 micrograms/ml of neomycin sulfate. The hamsters were divided into groups A and B, the 30 animals of group A were inoculated with a strain of leptospira that was passed 39 times in hamsters, and the remaining 30 animals, inoculated with a field isolate of leptospira with only 2 passages in hamsters. The hamsters died three to seven days after the inoculation, or sacrificed in agonic

state, and the presence of leptospires in the renal tissue was confirmed by at least one of the three microscopic examination procedures: direct examination of the renal tissue suspension with dark field microscopy, Levaditi's histologic staining and the direct fluorescent antibody technique. The specimens taken from the group A were found to be richer in the number of leptospires than the materials of group B. The results of "in vitro" cultivation of leptospires varied according to the strain of leptospires tested. For the group A, the serial dilution technique was the most sensitive, combined with the use of 5-fluor-uracil. For the group B, there was not found any statistical difference at the $\alpha = 0,05$ among the isolation techniques, however, the medium added with 5-fluor-uracil showed better results ($p < 0,001$ and $p = 0,024$), respectively for the Pasteur's pipette and for the serial dilution technique.

UNITERMS: *Leptospira pomona*, isolation; Renal tissue; Antimicrobial agents; Fluoracil; Neomycin; Hamsters

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - ABDU, M.T.F. & SLEIGHT, S.D. Pathology of experimental *Leptospira pomona* infection in hamsters. *Cornell Vet.*, 55:74-86, 1965.
- 2 - ABUCHAIM, D.M. Comparação entre quatro técnicas de isolamento de leptospiros de rim de suínos. *Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. R.G. Sul*, 10/11:25-28, 1982/83.
- 3 - ADLER, B.; FAINE, S.; CHRISTOPHER, W.L.; CHAPPEL, R.J. Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet. Microbiol.*, 12:377-381, 1986.
- 3 - ALEXANDER, A.D.; LESSEL, E.F.; EVANS, L.B.; FRANCK, E.; GREEN, S.S. Preservation of leptospires by liquid-nitrogen refrigeration. *Int. J. System. Bact.*, 22:165-169, 1972.
- 5 - BADIOLA, J.; THIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F. Pathologic features of leptospirosis in hamsters caused by *Leptospira interrogans* servars hardjo and szwajizak. *Amer. J. vet. Res.*, 44:91-99, 1983.
- 6 - BRUGGE, L.A.T. & LOUW, H.N. Addition of rabbit serum to EMJH medium improves isolation of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *The Onderstepoort J. vet. Res.*, 52:53-54, 1985.
- 7 - FAINE, S. Guidelines of the con-

- trol of leptospirosis. Geneva, World Health Organization, 1982. (WHO offset publication, 67)
- 8 - GOCHENOUR, W.S. Laboratory diagnosis of leptospirosis: demonstration of leptospire. *Vet. Med.*, 52:562, 570, 1957.
- 9 - GOLDMAN, M. Fluorescent antibody methods. New York, Academic Press, 1968.
- 10 - GUIDA, V.O. Estudos sobre a leptospirose canina. IV. Pesquisas sobre os caracteres antigênicos de uma cepa isolada de cão. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 19:149-152, 1949.
- 11 - HAMDY, A.H. & FERGUSON, L.C. Virulence of *Leptospira pomona* in hamsters and cattle. *Amer. J. Vet. Res.*, 18:35-42, 1957.
- 12 - INGH, T.S.G.A.M. & HARTMAN, E.G. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype icterohaemorrhagiae infection in the syrian hamster. *Vet. Microbiol.*, 12:367-376, 1986.
- 13 - JOHNSON, R.C. Aerobic spirochetes: the genus *Leptospira*. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G., eds. *The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Berlin, Springer-Verlag, 1981. p.582-591.
- 14 - JOHNSON, R.C. & ROGERS, P. 5-fluorouracil as a selective agent for growth of leptospirae. *J. Bact.*, 87:422-426, 1964.
- 15 - LARSSON, C.E.; YASUDA, P.H.; SANTA ROSA, C.A.; COSTA, N.O. Leptospirose suína. Inquérito sorológico e bacteriológico em municípios de São Paulo, do Paraná e de Santa Catarina. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 21:43-50, 1984.
- 16 - McMANUS, J.F.A. & MOWRY, R.W. Staining methods: histologic and histochemical. New York, Harper & Row, 1965.
- 17 - MENGES, R.W. & GALTON, M.M. Direct cultural methods for the isolation of leptospire from experimentally infected guinea pigs. *Amer. J. Vet. Res.*, 22:1085-1092, 1961.
- 18 - MOULTON, J.E. & HOWARTH, J.A. The demonstration of *Leptospira canicola* in hamster kidneys by means of fluorescent antibody. *Cornell Vet.*, 47:524-532, 1957.
- 19 - MYERS, D.M. Efficacy of combined furazolidone and neomycin in the control of contamination in leptospira cultures. *Antimicrobial Agents Chemoter.*, 7:666-671, 1975.
- 20 - MYERS, D.M. & VARELA-DÍAZ, V.M. Selective isolation of leptospiras from contaminated material by incorporation of neomycin to culture media. *Appl. Microbiol.*, 25:781-786, 1973.
- 21 - OLIVEIRA, S.J.; FALLAVENA, L.C. & PIANTA, C. Leptospirose em suínos no Rio Grande do Sul. Isolamento e caracterização dos agentes. Estudos em suínos abatidos em frigoríficos e em granjas com problemas de reprodução. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 35:641-650, 1983.
- 22 - PHANEUF, J.B. Leptospirose et lésions rénales chez le porc. *Inform. Vét.*, 12:1-104, 1970.
- 23 - RIS, D.R. Limitations of the use of 5-fluorouracil as a selective agent for the isolation of leptospirae. *Appl. Microbiol.*, 27:270-271, 1974.
- 24 - SANGER, V.L.; HAMDY, A.H.; FIZETTE, W.B.; BOHL, E.H.; FERGUSON, L.C. *Leptospira pomona* infection in hamster. *Cornell Vet.*, 51:489-498, 1961.
- 25 - SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 1:97-109, 1970.
- 26 - SAPP, W.J.; SIDDIQUE, I.H.; WILLIAMS, C.S.; GRAHAM, T. Histo-pathologic evaluation of livers

Isolamento de leptospiros a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados

- of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*. Amer. J. Vet. Res., 41:1288-1292, 1980.
- 27 - SCHÖNBERG, A. Studies on the effect of antibiotic substance on leptospire and their cultivation from material with a high bacterial count. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 249A:400-406, 1981.
- 28 - SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1975.
- 29 - TRIPATHY, D.N. & HANSON, L.E. Pathogenicity of *Leptospira grippotyphosa* for gerbils, hamsters, and voles. Amer. J. vet. Res., 35:547-549, 1974.
- 30 - TURNER, L.H. Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 64:623-646, 1970.
- 31 - YASUDA, P.H. & SANTA ROSA, C.A. Correlação entre sorologia e isolamento de leptospiros em cães. Rev. Microbiol., 12:35-37, 1981.

Recebido para publicação em 09/12/87
Aprovado para publicação em 05/05/88