
AGLUTININAS ANTILEPTOSPIRAS EM SUÍNOS ABATIDOS PARA CONSUMO E ASSOCIAÇÃO AO COMPROMETIMENTO HEPÁTICO E PULMONAR

Ângela Piauilino Campos,¹ Larissa Maria Feitosa Gonçalves,¹ Simone Mousinho Freire,¹ Layana Mauriz Leal,² Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro³ e Francisco Assis Lima Costa⁴

RESUMO

As leptospiroses são zoonoses cosmopolitas causadas por espiroquetas do gênero *Leptospira*. Os suínos, entre os animais domésticos, têm sido apontados como importantes portadores de leptospiroses, portanto transmitem a doença ao homem e a outros animais. O estudo objetivou pesquisar aglutininas antileptospiroses em suínos abatidos para o consumo e associar a soropositividade ao comprometimento hepático e pulmonar. Foram examinados soros de 150 suínos por meio da prova de soraglutinação microscópica (SAM). Destes, apenas sete (4,7%) reagiram a um ou mais sorovares de *Leptospira* spp. Em virtude da perda de uma amostra soropositiva, para as avaliações histológica e imunoistoquímica foram colhidos fragmentos de pulmão e fígado de seis animais soropositivos e de seis soronegativos. Quanto ao infiltrado inflamatório pulmonar, verificou-se diferença entre animais soropositivos e soronegativos, mas não entre os diversos lobos pulmonares avaliados. No fígado, as lesões foram mais discretas, mas observou-se diferença entre os animais soropositivos e soronegativos. A avaliação imunoistoquímica detectou a presença de antígeno de *Leptospira* spp. nos tecidos pulmonar e hepático tanto nos animais soropositivos quanto nos soronegativos. Nos pulmões, o antígeno localizava-se em células fagocíticas do septo interalveolar, endotélio vascular e epitélio alveolar. No fígado, estavam presentes nos hepatócitos, no endotélio vascular e nas células de Kupffer. Os resultados permitem concluir que suínos abatidos para o consumo humano nos municípios de Teresina-PI e Timon-MA estão infectados por *Leptospira* spp., o que sugere que esses animais podem constituir fonte de infecção para o homem.

DESCRIPTORIOS: Leptospirose. Pulmão. Fígado.

1 Alunas do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Universidade Federal do Piauí (UFPI).

2 Médica Veterinária Autônoma.

3 Professora Assistente I do Departamento de Morfofisiologia Veterinária. UFPI.

4 Professor Associado II do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. UFPI.

Endereço para correspondência: Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, Setor de Patologia Animal, Universidade Federal do Piauí, Campus Agrícola da Socopo, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.
Email: fassisle@gmail.com

Recebido para publicação em: 11/11/2009. Revisto em: 28/7/2010. Aceito em: 25/5/2011.

INTRODUÇÃO

As leptospiroses são doenças infectocontagiosas e cosmopolitas (2) que acometem os animais domésticos, silvestres e o homem. São causadas pela infecção por qualquer espécie patogênica de bactérias do gênero *Leptospira* (18). Provocam impacto na saúde pública, pois constituem zoonoses associadas a catástrofes ambientais, como enchentes e alagamentos das cidades, e são enfermidades de elevado custo, especialmente pelos gastos com o tratamento dos seres humanos (4). São doenças de risco ocupacional, uma vez que atingem várias categorias profissionais, como médicos veterinários, trabalhadores de abatedouros e de saneamento público e tratadores de animais (6, 28). Além disso, têm impacto econômico na criação de animais de produção, como bovinos, ovinos, caprinos, suínos e equinos, porque a infecção pode causar sérios problemas reprodutivos nestas espécies (4).

Entre os animais domésticos, os suínos têm sido apontados como um dos principais portadores de leptospiroses, sendo, portanto, responsáveis por ocorrências epidêmicas no homem e em outras espécies domésticas (27). No Brasil, a infecção já foi registrada nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro, Ceará, Pernambuco e Piauí (12, 31). Entre os sorovares de leptospiroses que mais frequentemente infectam e causam a doença nesses animais, destacam-se: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Canicola, Gryppotyphosa, Bratislava e Muenchen; os quatro primeiros já foram isolados de suínos no Brasil (30).

A Organização Mundial da Saúde Animal classifica a leptospirose suína como uma doença de notificação obrigatória comum a várias espécies (22), grupo ao qual pertencem as doenças transmissíveis de grande importância do ponto de vista socioeconômico e/ou sanitário, com considerável repercussão no comércio internacional de animais e produtos de origem animal (1, 26). Esta doença é uma importante causa de prejuízos em rebanhos de reprodução e ocorre em suínos de todas as partes do mundo (20).

As lesões provocadas por *Leptospira* spp. são observadas sobretudo nos rins, fígado e pulmões, porém outros órgãos, especialmente os do sistema reprodutivo, também são acometidos (19). Na fase de leptospirose, o fígado é um dos primeiros locais de acometimento (10). A sorologia (microaglutinação microscópica) é o exame preconizado pelo Ministério da Saúde para avaliar a infecção por leptospiroses (4). Constitui uma ferramenta importante de diagnóstico que, associada a análises microscópicas de órgãos de animais abatidos para consumo, permite identificar e conhecer a disseminação da infecção e avaliar as alterações precoces *in situ* em animais que ainda não apresentam manifestações. Estas avaliações podem orientar os profissionais médicos-veterinários no reconhecimento da doença e na prevenção dos riscos advindos da manipulação durante o abate dos animais sem os cuidados higiênico-sanitários adequados.

Este estudo teve como objetivos pesquisar aglutininas antileptospiras em suínos abatidos para o consumo e associar a infecção às ocorrências de comprometimento hepático e pulmonar.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de setembro de 2007 a maio de 2008, foram colhidas amostras de sangue, fígado e pulmão de 150 suínos adultos, de ambos os sexos e aparentemente saudáveis, sendo 75 animais sem raça definida (SRD), provenientes de criação extensiva e abatidos em Timon-MA e Teresina-PI, e 75 mestiços de Landrace, Large White e/ou Duroc, de criação intensiva, mantidos e abatidos no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), em Teresina-PI.

As amostras de sangue foram colhidas durante a sangria na linha de abate, utilizando-se tubos de 10 mL sem anticoagulante, mantidas em repouso em temperatura ambiente por uma hora para retração do coágulo e enviadas sob refrigeração ao laboratório. O sangue foi então centrifugado a 10.000g, por 10 minutos, para a obtenção do soro que foi acondicionado em microtubos e armazenado a -20°C até o processamento.

As aglutininas antileptospira no soro foram pesquisadas por meio da prova de soroadesão microscópica (SAM), no Laboratório de Zoonoses da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG. Para a técnica foi utilizada uma coleção de antígenos composta dos sorovares Autumnalis, Ballum, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo bovis, Hardjo CTG, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes e Tarassovi, com 4 a 14 dias de crescimento, diluídas na proporção de 1:3 em solução salina tamponada pH 7,2. Foi considerado reagente o soro com 50% de leptospiras aglutinadas por campo microscópico em aumento de 100 vezes. O sorovar registrado foi aquele que apresentou maior título, sendo as demais aglutinações consideradas reações cruzadas.

Durante o procedimento de abate dos suínos, também foram colhidos fragmentos de fígado e dos lobos pulmonares apical, cardíaco e diafragmático, todos em lateralidade direita e esquerda. O material foi fixado em formalina a 10%, neutra e tamponada, durante 48 horas. Para as avaliações histológica e imunoistoquímica, foi processado e incluído em parafina apenas o material dos animais soropositivos e do mesmo número de soronegativos para a composição do grupo controle.

Para a avaliação histológica, foram confeccionados cortes de 5 µm de espessura, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio de campo claro. As alterações histomorfológicas foram classificadas levando em consideração a natureza do processo patológico (infiltrado inflamatório, edema, congestão, hemorragia e hiperplasia), as características do processo inflamatório (especificação do tipo celular presente) e a distribuição da lesão em uma escala de 0 a 3, em que: 0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = acentuado.

Para a técnica de imunistoquímica, cortes de 5 µm foram distendidos sobre lâminas silanizadas (Silane A174, Pharmacia, USA), desparafinados, hidratados e submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂ diluída a 3% em metanol) durante 30 minutos. Em seguida, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com solução Tris-Hcl pH 1,0, em forno de microondas na potência máxima durante 10 e 5 minutos, sucessivamente. Após lavagem com solução salina fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal anti-*Leptospira* spp., produzido no Laboratório de Patologia Animal da UFPI (17), diluído em PBS nas concentrações de 1:200 e 1:400 para os cortes de pulmão e fígado, respectivamente, e em câmara úmida durante 18 horas e a 4°C. Como anticorpo secundário e amplificador de sinais, empregou-se o sistema EnVision (Dako Comporation Carpinteria CA, USA, código K4002), em câmara úmida e temperatura ambiente por 30 minutos. A revelação da reação foi realizada com 0,3mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em PBS e 0,06% de H₂O₂ e contracoloração com hematoxilina de Harrys. Em seguida, as lâminas foram lavadas, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina sintética (10796 Novo Entellan®, Merck).

Foi realizada a análise morfométrica (Leica Qwin D-1000, versão 4.1) para mensurar o número de focos de infiltrado inflamatório e a marcação imunistoquímica para o anticorpo antileptospira, sendo avaliados 30 campos por corte de tecido hepático e pulmonar.

Os resultados quantitativos foram analisados pelos programas estatísticos Sigma Stat e GraphPad Prism 4, sendo empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a análise de variância. Quando se verificou diferença significativa, foram aplicados os testes de Student-Newman-Keuls, para a comparação múltipla de grupos, e de Mann-Whitney para a comparação entre dois grupos, adotando-se o nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Dos 150 soros analisados pela prova de SAM, 7 foram positivos para um ou mais sorovares de *Leptospira* spp., constatando-se a presença de anticorpos antileptospiras em 4,7% dos animais. Todos os soropositivos faziam parte do grupo de animais de criação extensiva, sendo seis provenientes do abate em Timon-MA e um do abate em Teresina-PI.

Entre os sete soropositivos, quatro (57,14%) reagiram a um único sorovar, observando-se três (75%) ao Icterohaemorrhagiae, na titulação 1:100, e um (25%) ao Canícola na titulação 1:800. As outras três amostras soropositivas aglutinaram com dois ou mais sorovares, sendo considerado infectante apenas a que apresentou maior titulação. Destas, uma reagiu ao sorovar Autumnalis na titulação de 1:400, uma ao Pomona na titulação de 1:6400 e outra ao Pyrogenes na titulação de 1:51200.

A comparação entre os dois sistemas de criação quanto à predisposição para contrair infecção por *Leptospira* spp. revelou que a suscetibilidade é maior

nos animais criados extensivamente do que nos animais de criação confinada (Teste χ^2 , $p=0,02$).

No exame histológico das amostras pulmonares de todos os animais soropositivos e soronegativos, observou-se infiltrado inflamatório constituído por macrófagos e linfócitos (Figura 1) que, em todos os lobos, localizava-se nas regiões peribronquial e peribronquiolar.

Na análise quantitativa (Figura 2), foi observado maior número de focos inflamatórios nos lobos pulmonares dos animais soropositivos quando comparados aos soronegativos (Mann-Whitney, $p=0,0087$), não havendo diferença em relação aos lobos apical, cardíaco e diafragmático (Kruskall-Wallis, $p=0,989$).

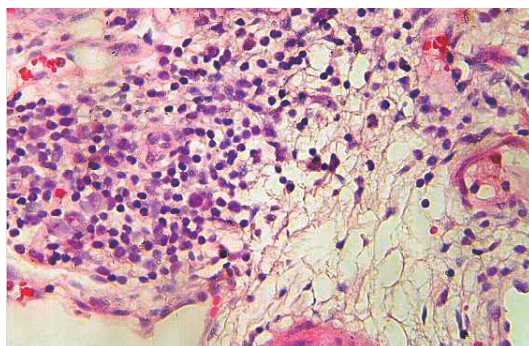
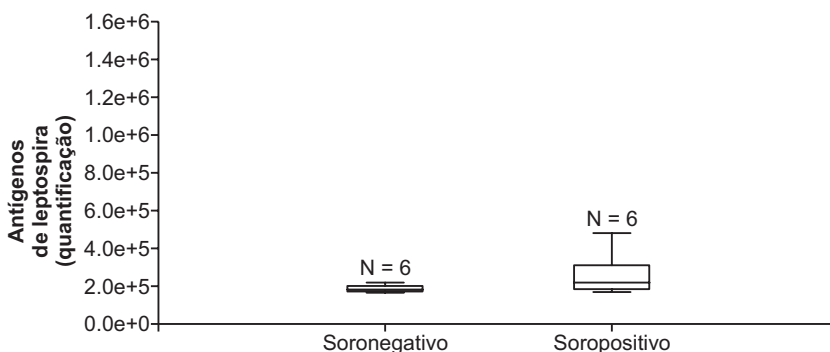


Figura 1. Pulmão de suíno infectado naturalmente por *Leptospira* spp. Infiltrado inflamatório mononuclear. HE, 140x.



N = N° de animais por grupo. * $p=0,0087$.

Figura 2. Análise quantitativa do número de focos inflamatórios em pulmão de suínos naturalmente infectados por *Leptospira* spp. e controle negativo.

Outras alterações teciduais observadas nos pulmões foram: espessamento do septo interalveolar (em consequência do infiltrado inflamatório mononuclear,

fibroblastos e congestão) de distribuição focal ou difusa, hemorragia, edema pulmonar (Figura 3), presença de exsudato celular no lúmen de brônquios e bronquíolos, hiperplasia do tecido linfoide associado ao brônquio (em dois casos se mostrava evidente a presença de numerosas mitoses) e hiperplasia de células calciformes de brônquios e bronquíolos. Em um animal foram encontrados calcificação e abscesso.

No fígado as lesões foram mais discretas. Havia infiltrado inflamatório periportal também constituído por macrófagos e linfócitos (Figura 4) em todos os animais soropositivos e em três animais soronegativos, porém sem diferença significativa entre ambos (Mann-Whitney, $p = 0,5246$). Outras lesões foram observadas, como hiperplasia de células de Kupffer em quatro animais soropositivos e dois soronegativos e degeneração gordurosa em quatro soropositivos e um soronegativo (Figura 5).

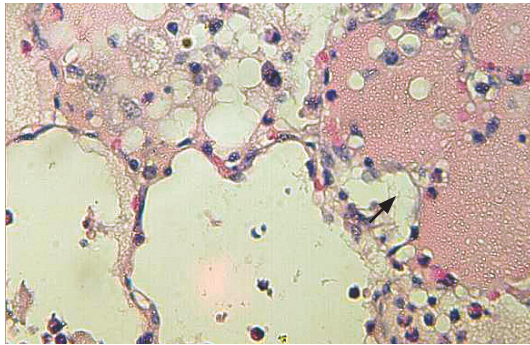


Figura 3. Pulmão de suíno infectado naturalmente por *Leptospira* spp. Edema pulmonar. HE, 140x.

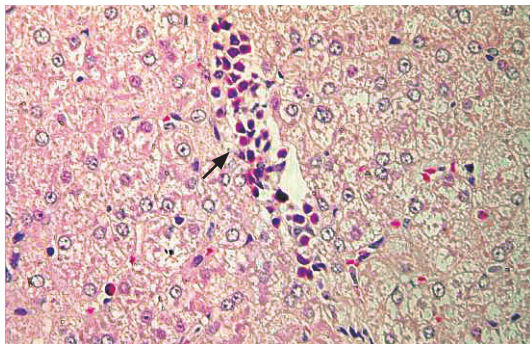


Figura 4. Fígado de suíno infectado naturalmente por *Leptospira* spp. Infiltrado inflamatório mononuclear. HE, 140x.

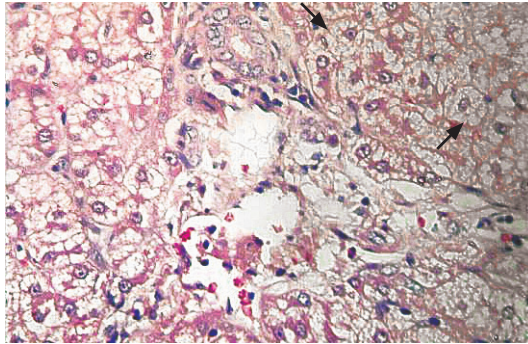
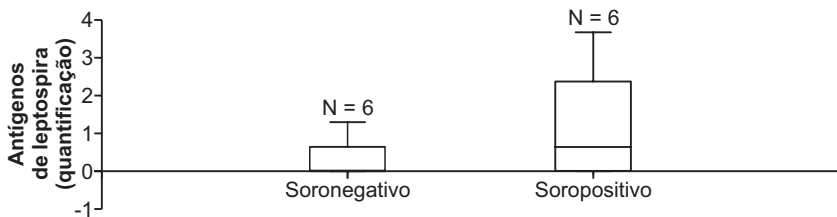


Figura 5. Fígado de suíno infectado naturalmente por *Leptospira* spp. Degeneração gordurosa. HE, 140x.



N = Nº de animais por grupo. * $p=0,1320$.

Figura 6. Análise quantitativa da presença de antígenos de leptospira em tecido pulmonar de suínos naturalmente infectados por *Leptospira* spp. e controle negativo.

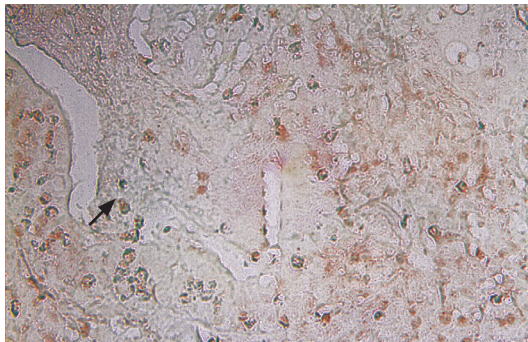
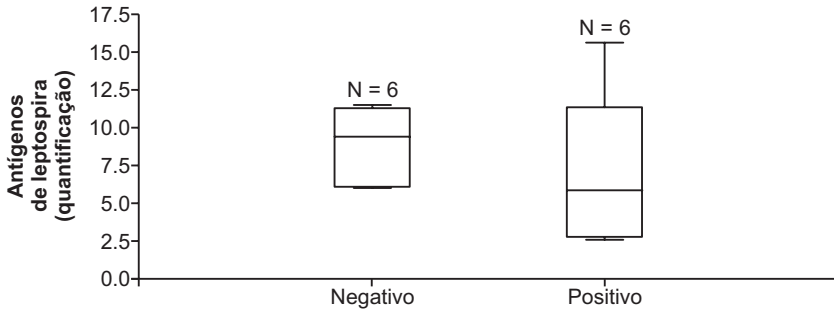


Figura 7. Pulmão de suíno infectado naturalmente por *Leptospira* spp. Antígeno de leptospira. IHQ, 140x.

Pela técnica de imunistoquímica foi constatada a marcação de antígenos de leptospiras nos tecidos pulmonar e hepático. No pulmão, a marcação foi

observada em quatro animais soropositivos e em um animal soronegativo, embora sem diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney, $p = 0,1320$) (Figura 6). Os antígenos localizavam-se em células fagocíticas do septo interalveolar (Figura 7), no endotélio vascular e no epitélio alveolar. No tecido hepático, foi visualizada marcação de antígenos em todos os animais soropositivos e soronegativos, sem diferença significativa entre eles (Mann-Whitney, $p = 0,2403$) (Figura 8). Os antígenos estavam presentes nos hepatócitos (Figura 9), no endotélio vascular e nas células de Kupffer.



N = N° de animais por grupo. * $p=0,2403$.

Figura 8. Análise quantitativa da presença de antígenos de leptospira no tecido hepático de suínos naturalmente infectados por *Leptospira* spp. e controle negativo.

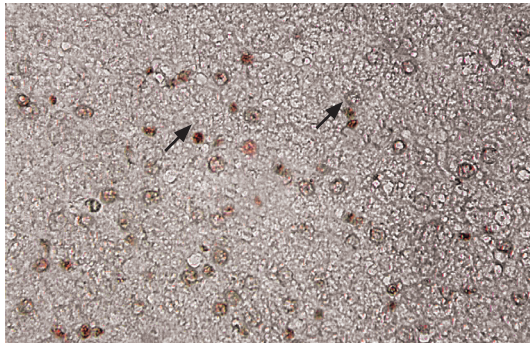


Figura 9. Fígado de suíno infectado naturalmente por *Leptospira* spp. Antígeno de leptospira. IHQ, 140x.

DISCUSSÃO

A amostragem deste estudo não foi feita com base estatística, portanto não representa a prevalência da leptospirose suína nas populações ou nas regiões

estudadas, nem reflete a situação da doença dentro de uma granja. No entanto, indica a circulação do agente e os sorovares de *Leptospira* spp. que têm maior ocorrência na região de origem dos animais (29).

O índice de apenas sete (4,7%) animais soropositivos para leptospira na população estudada, em especial entre os animais provenientes de Teresina, pode ser considerado baixo, comparado aos percentuais de 7,7% em suínos de Viçosa e Ponte Nova-MG (11), 55,8% no Rio Grande do Sul (24), 27,3% em São Paulo (15), 65,2% em Goiás (30), 26,6% no Ceará e 45% em Pernambuco (12) e 36,6% na região de Botucatu-SP (29). A baixa frequência observada provavelmente esteja relacionada ao tempo de duração da infecção. Muitos animais em fase crônica de infecção provavelmente já não apresentam títulos de anticorpos em níveis suficientes para serem detectados pela técnica de soroaglutinação microscópica (10).

Em relação aos dois sistemas de criação, observou-se maior predisposição dos animais criados extensivamente para contrair infecção por *Leptospira* spp. do que os animais de criação confinada, o que tem sido confirmado também em estudos de sistema de criação de animais ao ar livre (SISCAL) (25). A maior predisposição dos animais criados extensivamente provavelmente seja decorrente das precárias condições higiênico-sanitárias adotadas na criação extensiva, na qual os animais são expostos a uma grande variedade de patógenos para os quais não recebem nenhum tipo de imunização, especialmente para leptospiroses. Este tipo de sistema de criação favorece o contato dos animais com fontes de infecção de leptospiroses e com materiais contaminados.

Neste estudo, apesar do pequeno número de sororreagentes, o sorovar Icterohaemorrhagiae foi o de maior ocorrência (n=3). Cada um dos sorovares – Canicola, Autumnalis, Pomona e Pyrogenes – foi identificado em apenas um animal. Os suínos podem ser hospedeiros definitivos dos sorovares Pomona, Bratislava e Tarassovi, e ainda hospedeiros acidentais quando infectados por outros sorovares (8). No Brasil, o Pomona é considerado o sorovar de maior importância em criações de suínos (5, 11, 16), o que, neste estudo, em particular, não foi verificado. Poucos estudos têm demonstrado a importância do sorovar Autumnalis detectado em uma amostra de soro examinado, embora em alguns tenha sido o de maior ocorrência (3). Tanto Autumnalis quanto Icterohaemorrhagiae são sorovares cujos principais reservatórios são os roedores sinantrópicos (13), portanto são prováveis fontes de infecção nas criações de suínos.

As lesões pulmonares e hepáticas não constituem achados específicos nas leptospiroses, podendo estar presentes em qualquer outra infecção. Entretanto, sugere-se ter sido causada pelas leptospiroses, visto que a quantidade de focos inflamatórios nos animais soropositivos foi maior. As alterações histológicas do pulmão encontradas neste estudo estão de acordo com o quadro patológico pulmonar observado na leptospirose humana (14). As lesões no fígado apresentaram-se mais discretas, embora alguns autores afirmem ser este o órgão que sofre as maiores alterações (9). Matrizes suínas infectadas por leptospiroses apresentaram infiltrado inflamatório periportal (7), à semelhança do que foi observado no presente estudo.

Na espécie canina, lesões hepáticas e pulmonares semelhantes às observadas no presente estudo, em suínos, também já foram encontradas (23). Tais lesões observadas nos animais deste estudo provavelmente resultaram da multiplicação do microrganismo, na fase de leptospiremia, com danos maiores nos pulmões (onde a lesão endotelial é responsável (14) por alterações graves de hemorragia) do que no parênquima hepático.

Os resultados da avaliação imunoistoquímica possibilitaram associar as lesões à presença de antígenos e demonstraram também ser esta uma técnica mais sensível que a sorologia (21), pois as marcações positivas nos animais soronegativos provavelmente decorreram do fato de ter sido utilizada, na prova de SAM, uma coleção de antígenos vivos composta por apenas 12 sorovares de leptospiros patogênicas, as que mais comumente infectam suínos. Além disso, os animais analisados no presente estudo possivelmente tiveram contato prévio com um sorovar que não fazia parte da coleção de antígenos, o qual foi detectado pela avaliação imunoistoquímica, que não é sorovar específica.

CONCLUSÃO

Suínos abatidos para o consumo humano, nos municípios de Teresina-PI e Timon-MA, são soropositivos para diferentes sorovares de *Leptospira* spp. A presença de antígeno de leptospiros está associada à resposta inflamatória no pulmão e no fígado.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ABSTRACT

Leptospiral agglutinins in pigs slaughtered for consumption and their association with hepatic and pulmonary impairment

Leptospiroses are cosmopolitan zoonosis caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. Over the past years, pigs have been implicated as reservoirs. This study aimed to investigate anti-*Leptospira* spp. agglutinins in pig and the association of lung and liver lesions in seropositive animals. We examined sera from 150 pigs by microscopic agglutination test (MAT). Out of these, only seven were seropositive to one or more *Leptospira* spp. serovar. Fragments of lung and liver of seropositive animals and of the same number of seronegative animals were submitted for histopathological evaluation and stained with hematoxylin-eosin (HE) and immunoperoxidase technique (IPX). In the lungs, there was a significant difference in the inflammatory infiltrate between seropositive and seronegative animals, but

no differences were detected between lung lobes. Liver lesions were more discrete, however, there was a significant difference between seropositive and seronegative animals. Immunohistochemistry detected antigen of *Leptospira* spp. in lung and liver tissues in both seropositive and seronegative animals. In the lungs, the antigen was located in phagocytic cells of the interalveolar septum, vascular endothelium, and alveolar epithelium. At the liver, antigen was present in hepatocytes and vascular endothelial and Kupffer cells. The results indicate that pigs slaughtered for human consumption in the Brazilian cities of Teresina (Piauí State) and Timon (Maranhão State) are infected with *Leptospira* spp. suggesting that these animals may be a source of infection for humans.

KEY WORDS: Leptospirosis. Lung. Liver.

REFERÊNCIAS

1. Blaha T. *Applied veterinary epidemiology*. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 95-103.
2. Blenden DC. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. In: *Reunion Interamericana sobre el Control de La Fiebre Aftosa y Otras Zoonosis*, 8., Guatemala, 1975. Washington, Organización Panamericana de La Salud, 1976, p.160-168, (Publicación Científica, 316).
3. Boqvist S, Thu HTV, Vagsholm I, Magnusson ULF. The impact of leptospira seropositivity on reproductive performance in sows in southern Viet Nam. *Theriogenology* 58: 1.327-1.335, 2002.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de controle de zoonoses e animais peçonhentos. *Manual de Leptospirose*. 2 ed. Brasília, DF, 1995. p. 98.
5. Chappel RJ, Prime RW, Millar BD, Jones RT, Cutler RS, Adler B. Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona slaughtered in abattoir in Victoria, Australia. *Vet Microbiol* 62: 235-242, 1998.
6. Crevatin D, Banfi E, Crotti D, Ruaro E, Cinco M. Serosurvey on the presence of leptospiral agglutinins in humans in Northern Italy. *Eur J Epidemiol* 2: 44-47, 1986.
7. Delbem ACB, Freitas JC, Bracarense APFRL, Muller EE, Oliveira RC. Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. *Braz J Microbiol* 33: 174-177, 2002.
8. Ellis, WA. Leptospirosis in pig. *Pig Veterinary J* 28: 24-34, 1992.
9. Enrietti MA. Contribuição ao Conhecimento da Incidência de Leptospiras em Murídeos, Caninos e Suínos no Paraná. *Braz Arch Biol Technol* 9: 21-72, 1954.
10. Faine S, Alder B, Perolat P. *Leptospira and Leptospirosis*. 2.ed. Melbourne: Australia, MediSci, 1999. p.272.
11. Faria JE, Ribeiro MFB, Santos JL. Frequência de aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de suínos das microrregiões de Viçosa e Ponte Nova. MG. *Arq Bras Med Vet Zootec* 41: 381-388, 1989.
12. Favero ACM, Pinheiro SR, Vasconcellos AS, Moraes ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. *Cien Rural* 32: 613-619, 2002.
13. Heath SE, Johnson R. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc* 205: 1.518-1.523, 1994.
14. Huttner MD, Pereira HCP, Takana RM. Pneumonia por Leptospirose. *J Pneumologia* 28: 229-232, 2002.
15. Langoni H, Cabral KSM, Jacobi H. Inquérito soropidemiológico para leptospirose suína. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 7 ed. Anais. Blumenau, 1995. p.153.
16. Larsson CE, Yasuda PH, Santa Rosa CA. Leptospirose suína. Inquérito sorológico e bacteriológico em municípios dos Estados de São Paulo, do Paraná e de Santa Catarina. *Rev Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo* 21: 43-50, 1984.

17. Leal LM. Produção de anticorpo policlonal anti-Leptospira. <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0419-3.pdf>. Acesso em 14/03/2009.
18. Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* sorovar lai. *Gene* 254: 19-28, 2000.
19. Lin CL, Wu MS, Yang CW, Huang CC. Leptospirosis associated with hypokalaemia and thick ascending limb dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 14: 193-195, 1999.
20. Mailloux M. Leptospiroses=Zoonoses. *Int J Zoonoses* 78: 1.158-1.159, 2001.
21. Nakane PK, Pierce GB. Enzyme labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 14: 929-931, 1966.
22. OIE 2011. World organisation for animal health <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2011/>. Acesso em 06/04/2011.
23. Oliveira RC, Freitas JC, Silva FG, Souza EM, Delbem ACB, Alves LA, Muller EE, Balarim MS, Reis ACF, Batista TN, Vasconcellos SA. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. *Arq Inst Biol* 72: 111-113, 2005.
24. Oliveira SJ, Lima PCR, Barcellos DESN, Borowski SM. Sorologia para diagnóstico de leptospirose em suínos no Rio Grande do Sul: Resultados obtidos de granjas com e sem problemas de reprodução. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha* 1: 263-267, 1995.
25. Osava CF, Salaberry SRS, Nascimento CCN, Lima-Ribeiro AMC, Moreira RQ, Castro JR, Rigo VHB. Ocorrência de anticorpos anti-leptospira spp. em diferentes sistemas de criação de suínos. *Biosci J* 26: 202-207, 2010.
26. Perry G, Hearty RA. *Scientific Review of Leptospirosis and implications for quarentene policy*. Austrália: Editora Canberra, 2000. p.115.
27. Ramos AA, Cordeiro F, Guida HG. Inquérito sociológico de leptospirose em suínos no Estado do Rio de Janeiro e região limítrofe. *Pesq Vet Bras* 1: 81-83, 1981.
28. Sakata EE, Yasuda PH, Romero EC. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 34: 217-221, 1992.
29. Shimabukuro FH, Domingues PF, Langoni H, Silva AV, Pinheiro JP, Padovani CR. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospirose pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. *Braz J Vet Res Anim Sci* 40: 243-253, 2003.
30. Sobestiansky J, Barcellos D, Mores N, Carvalho LF, Oliveira S. *Clinica e patologia suína*. 2 ed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1999. p.464.
31. Soto FRM, Vasconcellos SA, Pinheiro SR, Bernarsi F, Camargo SR. Artigo de revisão: Leptospirose suína. *Arq Inst Biol* 74: 379-395, 2007.
32. Souza AS. Estudo da prevalência de *Leptospira interrogans* em reprodutores suínos em produção e aspectos epidemiológicos da infecção em Goiás. [Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás], Escola de Veterinária, Goiânia, 2000. 74 f.