

INVESTIGAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE LEPTOSPIRAS NOS OVÁRIOS DE HAMSTERS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Leptospiras interrogans* SOROTIPO POMONA*

INVESTIGATION ON THE PRESENCE OF LEPTOSPIRES IN OVARIES OF HAMSTERS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Leptospiras interrogans* SEROVAR POMONA

Claudio Roberto de Almeida CAMARGO¹; Silvio Arruda VASCONCELLOS²; Rodolfo NÜRMBERGER JÚNIOR³;
Estevão de Camargo PASSOS⁴; Zenaide Maria de MORAIS⁵; José Antonio VISINTIN³

RESUMO

De 90 hamsters primíparas com 80 a 120 gramas de peso vivo, 75 foram inoculadas com a dose individual de 0,5 ml de estirpe virulenta do sorotipo pomona (30 a 40 leptospiras ativas por campo microscópico, no aumento de 200 vezes) e as 15 remanescentes constituíram o grupo testemunho não infectado. Todos os animais tratados com leptospiras apresentaram os sinais da infecção (prostração, taquipnéia, eriçamento do pelame, icterícia e hemorragias nasal, bucal e perineal) e foram sacrificados por ocasião da fase agônica da doença, situada entre o quarto e o sétimo dia da inoculação. Nesta oportunidade, os ovários foram colhidos em condições assépticas e submetidos à técnica de visualização de leptospiras (exame direto em microscopia de campo escuro, coloração argêntica de Levaditi e reação de imunofluorescência direta), cultivo em meio de Fletcher e exame histopatológico (coloração de hematoxilina e eosina). A ocorrência de uma possível contaminação estabelecida durante a retirada dos ovários foi investigada através da lavagem em solução salina tamponada estéril. As leptospiras foram demonstradas em todos os ovários do grupo de animais experimentalmente inoculados (lavados e não lavados), através da coloração de Levaditi, reação imunofluorescência direta e também no cultivo em meio de Fletcher. O exame direto em microscopia de campo escuro mostrou ser uma técnica muito pouco sensível. O exame das preparações submetidas à coloração argêntica possibilitou a visualização de leptospiras em diferentes estruturas dos ovários, incluindo: o interstício, a zona pelúcida e o interior dos óvulos. Os exames histopatológicos permitiram observar as alterações morfológicas típicas de um processo inflamatório agudo em 57% dos ovários examinados.

UNITERMOS: Leptospirose; *Leptospira interrogans*, isolamento; Ovários, hamster

INTRODUÇÃO

A leptospirose tem como principal mecanismo de contágio a exposição à água ou solo contaminado (BLOOD et al.⁵, 1983); no entanto a sua transmissão venérea já foi amplamente confirmada tanto na monta natural como na inseminação artificial (SLEIGHT; WILLIAMS²⁴, 1961; KIKTENKO et al.¹³, 1976).

A presença de leptospiras na uretra de doadores de sêmen infectados ressalta a importância do controle sanitário de tais animais (SLEIGHT; WILLIAMS²⁴, 1961); entretanto o crescente desenvolvimento dos procedimentos de transferência de embriões (MARPLETOFT¹⁵, 1986) tem despertado a preocupação para a possível existência de leptospiras em estruturas do aparelho reprodutor das fêmeas dos animais domésticos.

SANGER et al.¹⁹ (1961) relataram a presença de pequena quantidade de leptospiras nos ovários e na parede uterina de hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans*

sorotipo pomona, porém, nesta oportunidade, não houve a preocupação com a verificação da estrutura do órgão envolvido, bem como se o microrganismo observado poderia ser consequência de uma contaminação externa estabelecida durante a colheita do material.

ELLIS; THIERMAN¹⁰ (1986) isolaram *L. interrogans* sorotipo hardjo do útero e oviduto de vacas não prenhes. ELLIS et al.⁹ (1986) relataram o isolamento do sorotipo australis do útero e ovidutos de porcas com histórico de abortamento.

CHEN SHISONG; WRATHALL⁷ (1989) divulgaram uma microfotografia eletrônica obtida por Bailey, na qual é apresentada a *L. interrogans* sorotipo bratislava, aderida à zona pelúcida de um embrião de suíno. Estes autores referiram que o microrganismo não foi removido mesmo após a realização de dez lavagens sucessivas.

1-Pesquisador Científico - Instituto Butantã

2-Professor Associado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

3-Professor Doutor - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

4-Pesquisador Científico - Instituto Biológico

5-Bióloga - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

* Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Trabalho conduzido com o apoio da FAPESP. Processo 90/0267-3.

Tendo em vista a importância da obtenção de maiores conhecimentos sobre as doenças transmitidas pelos materiais de multiplicação animal, foi delineado o presente estudo que teve por objetivo investigar a presença de leptospiros e de alterações histológicas nos ovários de hamsters sacrificados durante a fase agônica da leptospirose experimentalmente induzida pela inoculação de *L. interrogans* sorotipo pomona.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 90 hamsters* (*Mesocricetus auratus*) fêmeas primíparas, com 80 a 120 gramas de peso vivo, clinicamente sadias, mantidas em infectório com temperatura ambiental não climatizada, no interior de caixas plásticas, forradas com maravalha esterilizada, trocada diariamente, recebendo água comum da rede pública e ração comercial peletizada "ad libitum".

O inoculum foi representado por estirpe de *L. interrogans* sorotipo pomona^a, tipificada pela prova de absorção de aglutininas (SANTA ROSA²⁰, 1970), cuja virulência foi preservada através da armazenagem em nitrogênio líquido (ALEXANDER et al.², 1972), em ampolas contendo 85% de cultura com 10 dias de crescimento em meio líquido, 5% de glicerina neutra estéril e 10% de soro estéril de coelho, inativado a 56°C positivos por 40 minutos. O conteúdo de tais ampolas foi semeado em tubos com o meio semi-sólido de Fletcher, que foram incubados à temperatura de 28°C positivos durante 10 dias. Nesta ocasião, as culturas foram examinadas em microscopia de campo escuro a fim de serem confirmadas as características de riqueza, motilidade e ausência de contaminantes. As amostras utilizadas apresentavam de 30 a 40 leptospiros ativas por campo microscópico no aumento de 200 vezes. Cada animal recebeu 0,5 mililitro deste inoculum via intraperitoneal.

O meio de cultura utilizado para isolamento e preparo do inoculum foi o meio semi-sólido de Fletcher^c, enriquecido com 10% de soro estéril de coelho, inativado à temperatura de 56°C positivos por 40 minutos. O meio completo foi inativado a 56°C positivos por 40 minutos e submetido aos controles de esterilidade e de crescimento (SANTA ROSA²⁰, 1970).

O diluente para o preparo das suspensões de tecido ovariano foi representado pela solução salina tamponada com o tampão fosfatado de Sorensen, preparada como preconizado por SANTA ROSA²⁰ (1970).

O fixador para técnicas histopatológicas foi a solução aquosa de formol^d diluída a 10%.

A técnica de isolamento de leptospira em meio de cultura foi o procedimento das diluições seriadas proposto por FAINE¹¹ (1982), com as seguintes particularidades: as suspensões do tecido ovariano, preparadas assepticamente em solução salina tamponada de Sorensen, foram examinadas nas concentrações de 10,0; 1,0 e 0,1% (peso/volume); o volume de inoculum por tubo de meio de cultura foi o de 0,1 ml; foram utilizados

dois tubos de meio de cultura para cada concentração de tecido; os tubos semeados foram incubados à temperatura de 28°C positivos. A verificação do crescimento de leptospiros foi efetivada pelo exame dos cultivos em microscopia de campo escuro no terceiro, sexto e décimo dia de inoculação.

A técnica de Levaditi para a evidenciação de leptospiros em cortes de tecido foi executada conforme o procedimento descrito por McMANUS; MOWRY¹⁴ (1965). O exame das preparações foi realizado em microscópio de luz óptica^e com ocular 10 e objetivas 40 e 100 (imersão) com o condensador de campo claro.

O exame direto das suspensões de tecido ovariano em microscopia de campo escuro foi realizado em microscópio de luz óptica^e com ocular 10, objetiva 40 e condensador de campo escuro de imersão.

A técnica de coloração pela hematoxilina - eosina foi executada segundo o procedimento preconizado por BEHMER et al.⁴ (1976), para coloração de materiais fixados em formol, incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo.

A reação de imunofluorescência direta foi realizada em decalques de tecido ovariano, preparados através da compressão do órgão em lâminas de microscopia do tipo extra fina^g. Todos os demais procedimentos foram executados conforme a técnica descrita por PASSOS et al.¹⁷ (1988). As leituras foram realizadas em microscópio de luz ultra-violeta^h com ocular 10, objetiva de imersão plana e condensador campo escuro de imersão.

O conjugado anti *L. interrogans* sorotipo pomona foi produzido com amostra homóloga à utilizada para a infecção experimental apresentando a diluição ótima de trabalho de 1:40ⁱ.

Os 90 (noventa) hamsters utilizados foram subdivididos em 18 grupos experimentais com cinco indivíduos cada, constituídos com base no princípio da homogeneização na variação do peso vivo dos seus componentes. Quinze grupos foram utilizados para as inoculações experimentais e os três remanescentes não receberam nenhum tipo de inoculação, servindo como controles.

As inoculações foram iniciadas após um período de adaptação com 15 dias de duração. A condução do experimento contemplou a utilização de um grupo experimental por semana.

Os animais inoculados foram observados a cada 12 (doze) horas, atentando-se para a presença dos sinais clínicos descritos por PASSOS et al.¹⁷ (1988).

A eutanásia foi executada quando os hamsters encontravam-se na fase agônica da doença, utilizando-se para tanto uma câmara com vapores de clorofórmio.

A extração dos ovários foi realizada imediatamente após o sacrifício, tomando-se os cuidados usuais de assepsia (PASSOS et al.¹⁷ 1988).

* = Fomecidos pelo Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; b = Obduo junto a Salsbury Laboratório Ltda; c = Difco; d = Merck; e = Carl Zeiss; f = Wild - M-20; g = Perfecta; h = Carl Zeiss; i = Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

O processamento dos ovários dos cinco componentes de cada grupo experimentalmente inoculado adotou a seguinte conduta: os ovários de duas fêmeas foram destinados à técnica de isolamento de leptospiros por cultivo, sendo um dos pares de órgãos submetido a uma lavagem pr -cultivo com 10 minutos de duração e três trocas de solução salina tamponada estéril; para os outros três representantes do grupo, a análise do efeito da lavagem foi obtida a partir dos órgãos colhidos de um mesmo animal, aplicando-se tal procedimento apenas para o ovário direito.

Para cada conjunto de materiais provenientes de cinco hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, foram incluídos os ovários provenientes de um animal do grupo controle não infectado, destinado à técnica de coloração pela hematoxilina-eosina.

A análise dos resultados obtidos empregou os testes não paramétricos de Qui Quadrado e Mc Nemar, (SIEGEL²³, 1981). O nível de significância adotado foi o de 0,05.

RESULTADOS

Os 75 hamsters experimentalmente inoculados com a estirpe virulenta de *L. interrogans* sorotipo pomona, manifestaram os sinais clínicos da doença (prostrac o, taquipnéia, ericamento do pelame, icterícia e hemorragias localizadas no focinho e na região perineal) e foram sacrificados por ocasião do quarto ao sétimo dia pós-inoculação (estágio ag nico). A necrópsia de tais animais possibilitou a evidenciac o de alterações macroscópicas caracterizadas por: a) hemorragias nos rins, ovários e pulmões; b) hipertrofia e congestão do fígado e baço; c) icterícia do tecido subcutâneo e das mucosas.

Os 15 animais do grupo controle não demonstraram qualquer alteração de saúde e quando necropsiados não foi evidenciada qualquer alteração macroscópica.

Na Tab.1 são apresentados os resultados dos cultivos em meio de Fletcher dos ovários de 30 animais experimentalmente inoculados com *L. interrogans* sorotipo pomona, segundo a natureza do resultado obtido, o momento da realização do exame e a condi o de lavagem prévia do  rg o. A observação dos valores apresentados nesta tabela revela que no décimo dia de cultivo foi confirmada a presença de leptospiros em todos os materiais exa-

minados, não havendo qualquer influência da condi o de lavagem sobre os valores encontrados. No entanto, por ocasião do terceiro dia de cultivo verifica-se um  ndice de positividade mais elevado para o grupo de ovários lavados 14/15 (94,0%) contra 11/15 (74,0%) entre os ovários não lavados. Saliente-se contudo que esta aparente diferença foi destituída de significado estatístico ($0,05 < p < 0,10$, teste de Qui-Quadrado).

Os exames das 30 suspensões de ovários de hamsters infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, submetidas à pesquisa direta em microscopia de campo escuro, apresentaram resultado negativo em todas as oportunidades; os resultados das técnicas que possibilitam a visualização de leptospiros através de métodos de coloração (rea o de imunofluorescência direta e Levaditi), confirmaram aqueles achados clínicos e dos cultivos com 100% de positividade. No entanto, as preparações tratadas pela coloração argêntica de Levaditi têm permitido a verificação de leptospiros localizadas em diferentes estruturas dos ovários, merecendo especial destaque as constatações a nível do interstício, dos vasos sang neos e linfáticos e principalmente o registro dos espiroquetas na altura da zona pelúcida e no interior de óvulos. A documentação fotográfica de tais observações é apresentada na Fig.1.

A Tab.2 apresenta os resultados dos exames histológicos dos ovários de 15 hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, segundo a condi o de lavagem prévia do  rg o. A observação dos valores referidos em tal tabela revela a existência de 17 ovários caracterizados como portadores de alterações estruturais, dos quais nove submetidos ao processo de lavagem e 13 órgãos isentos de alterações morfológicas, incluindo sete não lavados. O estudo dos 14 valores discordantes através do teste Mc Nemar demonstrou a inexistência de associação estatística entre o processo utilizado para lavagem e a presença de alteração estrutural no exame do ovário. (Qui-Quadrado observado = 0,072; Qui-Quadrado crítico = 3,84). Dentre os 17 materiais com presença de alteração estrutural, a morfologia de tais lesões incluiu as manifestações típicas de um processo inflamatório de evolução aguda com hemorragias, congestão e edema e algumas alterações degenerativas como a retração da zona pelúcida dos folículos ovarianos.

O exame histopatológico dos ovários dos 15 animais do grupo controle não revelou a existência de qualquer tipo de lesão microscópica.

TABELA 1

Freq ncia de hamsters experimentalmente inoculados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, segundo a natureza dos resultados dos cultivos dos ovários em meio de Fletcher, o momento da leitura expresso em dias e a condi o de lavagem prévia do  rg o. São Paulo, 1992.

Resultado das Culturas	Lavagem Prévia		S I M				N � O			T O T A L	
	Momento da Leitura (dias)		3	6	10	3	6	10	3	6	10
Positivos (%)	14 (94)	14 (94)	15 (100)	11 (74)	14 (94)	15 (100)	25 (84)	28 (94)	30 (100)		
Negativos (%)	01 (06)	01 (06)	0 (0)	04 (26)	01 (06)	0 (0)	05 (16)	02 (06)	0 (0)		
Total (%)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	30 (100)	30 (100)	30 (100)		

TABELA 2

Freqüência de ovários de hamsters experimentalmente inoculados com *Leptospira Interrogans* sorotipo pomona, segundo a pesquisa de alterações estruturais, através da coloração de hematoxilina-eosina e a condição de lavagem prévia do órgão. São Paulo, 1992

Alterações Estruturais dos Ovários	Lavagem Prévia		TOTAL
	SIM	NÃO	
Presentes	9	8	17
Ausentes	6	7	13
Total	15	15	30

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos realçaram aspectos cuja discussão é apresentada a seguir:

A confirmação da indução da leptospirose aguda em todos os 75 animais experimentalmente infectados com sintomatologia e lesões à necrópsia compatíveis com as descrições de MOUTON; HOWARTH¹⁶ (1957); SANGER et al.¹⁹ (1961); ABDU; SLEIGHT¹ (1965); SAPP et al.²² (1980); BADIOLA et al.³ (1983); INGH; HARTMAN¹² (1986); PASSOS et al.¹⁷ (1988), caracteriza a virulência da amostra utilizada e assegura o primeiro parâmetro assentado no delineamento da investigação que foi o de estabelecer uma população de animais que tivessem um contato efetivo com o microorganismo.

O segundo resultado obtido que confirma a validade do delineamento experimental empregado foi a inexistência de sinais clínicos nos animais não infectados o que demonstra a qualidade das medidas adotadas no ambiente em que foi conduzida a investigação, com especial destaque aos aspectos ligados às instalações e ao manejo sanitário.

Os resultados apresentados na Tab.1 configurando 100% de positividade no décimo dia de cultivo dos materiais originários dos animais experimentalmente infectados, além de consolidarem os informes clínicos e necroscópicos, são também muito precoces, tendo em vista as constatações de BRUGGE; LOUW⁶ (1985); PASSOS et al.¹⁷ (1988) que referem a confirmação da presença de leptospiros em alguns materiais por volta de 40º ao 60º dia de cultivo. A constância e a precocidade dos resultados dos cultivos do presente experimento são indicadores de que a concentração de leptospiros nos materiais examinados foi muito elevada e que os cuidados adotados para o controle de contaminação foram bem sucedidos.

A verificação da ausência de influência do processo de lavagem dos ovários sobre os resultados dos cultivos sugere dois caminhos. 1) As leptospiros estavam presentes na intimidade do tecido ovariano e portanto não foram removidas pelo procedimento de lavagem empregado; 2) as leptospiros aderiram à superfície externa do ovário, por ocasião de sua remoção da cavidade abdominal e subseqüentemente não foram retiradas pelo processo de lavagem utilizado. Caso esta última situação viesse a ser verdadeira é lícito pressupor-se que nos ovários lavados deveria existir uma maior duração no período de tempo necessário para a confirmação dos cultivos, o que não foi constatado.

Os resultados dos exames diretos em microscopia de campo escuro em completo desacordo aos referidos na Tab.1, salientam a baixa sensibilidade desta técnica, o que no entanto está de acordo com as afirmações de SANTA ROSA²⁰ (1970); ELLIS et al.⁹ (1986); ELLIS; THIERMANN¹⁰ (1986) que se referem às limitações de tal metodologia. Em contrapartida, os valores observados nas colorações de Levaditi e na reação de imunofluorescência direta destacam a alta eficácia de tais métodos, para revelar a presença de leptospiros como referido por PHANEUF¹⁸ (1970) e FAINE¹¹ (1982).

Persistindo na discussão dos resultados das preparações coradas pelas técnicas de Levaditi e de imunofluorescência direta, cumpre ser salientado que embora os dois métodos tenham tido igual sensibilidade para revelar a presença do microorganismo, a coloração pelos sais de prata foi mais rica em informações, pois possibilitou a visualização do tipo de estrutura do ovário onde as leptospiros estavam localizadas (Fig.1). Tais observações reforçam a hipótese de que durante a fase de leptospirose existe a localização de leptospiros na intimidade do tecido ovariano, incluindo o interstício, a zona pelúcida e inclusive o interior dos óvulos.

Os resultados dos exames histológicos dos ovários dos animais experimentalmente infectados com a demonstração de lesões típicas de um processo inflamatório (SMITH; JONES²⁵, 1962; SANTOS²¹, 1979), com riqueza de alterações vasculares, estão de acordo com as observações de CRUZ⁸ (1986) que atribui ao comprometimento do endotélio vascular à causa primária das lesões verificadas na leptospirose aguda. Este tipo de patologia a nível do ovário pode inclusive explicar o encontro de lesões degenerativas com a perda de substância intracitoplasmática de ovócitos que seriam conseqüência do bloqueio do aporte sanguíneo.

Dentre os valores apresentados na Tab.2, merece ser ressaltada a inexistência de lesões estruturais em 13 dos 30 ovários examinados. Embora a ausência de lesão no exame de uma preparação histológica de um órgão não garanta que todo o órgão esteja isento de alterações morfológicas, o encontro de 43% dos ovários (13/30) em tal condição constitui um fato digno de nota. Este aspecto assume ainda maior importância se forem considerados os 100% de positividade para a demonstração de leptospiros segundo os cultivos e os métodos de coloração.

De fato, se é pouco provável que ovários com alterações inflamatórias possam produzir óvulos férteis que venham a ser fecundados e finalmente transformados em embriões, nos ovários de animais infectados por leptospiros, porém livres de alterações inflamatórias (portadores são ou convalescentes) (FAINE¹¹, 1982; VASCONCELLOS²⁶, 1987) torna-se muito provável a hipótese de serem observados embriões infectados por leptospiros.

Persistindo na discussão da Tab.2, cabe ainda ser ressaltada a constatação da inexistência de significado estatístico entre a ocorrência de alterações estruturais e o processo de lavagem a que os ovários foram submetidos. Tal resultado fundamenta a afirmação de que as alterações estruturais em 30% (9/30) dos casos não poderiam ser entendidas como artefatos de técnica decorrentes do processo de lavagem utilizado.

CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente estudo foi realizado foi possível a obtenção das seguintes conclusões:

1. Nos ovários de hamsters experimentalmente infectados por *L. interrogans* sorotipo pomona foi confirmada a presença de leptospiros tanto a nível de interstício como também na zona pelúcida e no interior dos óvulos;
2. as leptospiros presentes nos ovários de hamsters experimentalmente infectados por *L. interrogans* sorotipo pomona não foram removidas através de três lavagens sucessivas em solução salina com 15 minutos de duração;
3. apenas uma parcela dos ovários de hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona apresentou alterações estruturais típicas de um processo inflamatório agudo.

SUMMARY

After inoculating *L. interrogans* serovar pomona in 75 primiparous hamsters (*Mesocricetus auratus*), the invasiveness of leptospires into the ovaries and the ability in causing ovary morphologic alterations were investigated by means of microscopic examination and bacterial isolation. For this purpose, 75 hamsters were inoculated with 0.5 ml of virulent strain containing 30-40 leptospires by the microscopic field and the other 15 hamsters were held as the uninfected controls. Signs and symptoms (prostration, tachypnea, ruffled hair, jaundice, and nasal, bucal and perineal hemorrhage) were detected in all inoculated animals. The animals were killed in the agonic state of the illness, which were done through 4th and 7th day post inoculation. The ovaries were taken aseptically during the necropsies, thoroughly washed using the sterile phosphate buffered saline, in order to eliminate the possible external contamination. The fresh ovary samples were submitted to the dark field direct microscopic examination. After the formalin fixation, the specimens were stained by means of histopathologic techniques using the Levaditi and Hematoxylin Eosin stains. The ovary smears were also examined by the direct fluorescent antibody technique and the bacterial isolation was carried out in the Fletcher's medium. The dark field direct microscopic examination was found to be less sensitive in demonstrating the presence of leptospires in the ovaries. In those specimens stained by the Levaditi technique, leptospires were visualized in different ovary internal structures, involving the interspace, pellucid zone and in the inner ovules. Through the histopathologic examination, typical morphologic alterations resembling acute inflammatory process were found in 57% of ovaries examined.

UNITERMS: Leptospirosis; *Leptospira interrogans*, isolation; Ovaries, hamsters

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-ABDU, M.T.F.; SLEIGHT, S.D. Pathology of experimental *Leptospira pomona* infection in hamsters. *Cornell Vet.*, v.55, p.74-86, 1965.
- 02-ALEXANDER, A.D.; LESSEL, E.F.; EVANS, L.B.; FRANCK, E.; GREEN, S.S. Preservation of leptospires by liquid-nitrogen refrigeration. *Int. J. syst. Bacteriol.*, v.22, p.165-9, 1972.
- 03-BADIOLA, J.; THIERMANN, A.B.; CHEVELLE, N.F. Pathologic features of leptospiroses in hamsters caused by *Leptospira interrogans* serovar hardjo ans szwayizak. *Amer. J. vet. Res.*, v.44, p.91-9, 1983.
- 04-BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.C. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica.* São Paulo, Edart/EDUSP, 1976.
- 05-BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A.; RODOSTITS, O.M. *Clínica veterinária.* 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983. p.554-63.
- 06-BRUGGE, L.A.T.; LOUW, H.N. Addition of rabbit serum to EMJH medium improves isolation of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Onderstepoort J. vet. Res.*, v.52, p.53-4, 1985.
- 07-CHEN SHISONG; WRATHALL, A.E. The importance of the zona pellucida for disease control in livestock by embryo transfer. *Brit. vet. J.*, v.145, p.129-40, 1989.
- 08-CRUZ, J.B. Leptospirose nos animais. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 1., Salvador, 1986. *Anais.* p.41-3.
- 09-ELLIS, W.A.; McPARLAND, P.J.; BRYSON, D.G.; THIERMANN, A.B.; MONTGOMERY, J. Isolation of leptospires from the genital tracts and kidneys of aborted sows. *Vet. Rec.*, v.118, p.294-5, 1986.
- 10-ELLIS, W.A.; THIERMANN, A.B. Isolation of leptospires from the genital tracts of Iowa cows. *Amer. J. vet. Res.*, v.47, p.1694-6, 1986.
- 11-FAINE, S. *Guidelines for the control of leptospirosis.* Geneva, World Health Organization, 1982. (Who Offset Publications, 67)
- 12-INGH, T.S.G.A.M. ven den; HARTMAN, E.G. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype icterohaemorrhagiae infection in the syriam hamsters. *Vet. Microbiol.*, v.12, p.367-76, 1986.
- 13-KIKTENKO, V.S.; BALASHOW, N.G.; RODINA, V.N. Leptospirosis infection through insemination of animals. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, v.20, p.207-13, 1976.
- 14-McMANUS, J.F.A.; MOWRY, R.W. *Staining methods: histologic and histochemical.* New York, Harper & Row, 1965.
- 15-MARPLETOFT, R.J. Embryo transfer and genetic engineering. In: MORROW, D.A. *Current therapy in theriogenology.* 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1986. p.51-8.
- 16-MOUTON, J.E.; HOWARTH, J.A. The demonstration of *Leptospira canicola* in hamsters kidneys by means of fluorescent antibody. *Cornell Vet.*, v.47, p.524-32, 1957.
- 17-PASSOS, E.C.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; YASUDA, P.H.; NÜRMBERGER JUNIOR, R. Isolamento de leptospiros a partir de tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v.25, p.221-35, 1988.
- 18-PHANEUF, J.B. Leptospirose et lésions rénales chez le porc. *Inf. Vet.*, v.12, p.1-104, 1970.
- 19-SANGER, V.L.; HAMDY, A.H.; FIZETTE, W.B.; BOHL, E.H.; FERGUSON, L.C. *Leptospira pomona* infection in hamsters. *Cornell Vet.*, v.51, p.489-98, 1961.
- 20-SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, V.1, p. 97-109, 1970.
- 21-SANTOS, J.A. *Patologia geral dos animais domésticos.* Rio de Janeiro, Interamericana, 1979.

- 22-SAPP, W.I.; SIDDIQUE, I.H.; WILLIAMS, C.S.; GRAHAN, T. Histopathologic evolution of livers of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*. *Amer. J. vet. Res.*, v.41, p.1288-92, 1980.
- 23-SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo, Mc Graw Hill, 1981.
- 24-SLEIGHT, S.D.; WILLIAMS, J.A. Transmission of bovine leptospirosis by coition and artificial insemination. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, v.138, p.151-2, 1961.
- 25-SMITH, N.A.; JONES, T.C. *Patologia veterinária*. México, D.F., Union Tipografica Editorial Hispano Americana, 1962.
- 26-VASCONCELLOS, S.A. O papel dos reservatórios na manutenção de leptospirose na natureza. *Comun. cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v.11, p.17-24, 1987.

Recebido para publicação em 01/07/92
Aprovado para publicação em 02/07/93

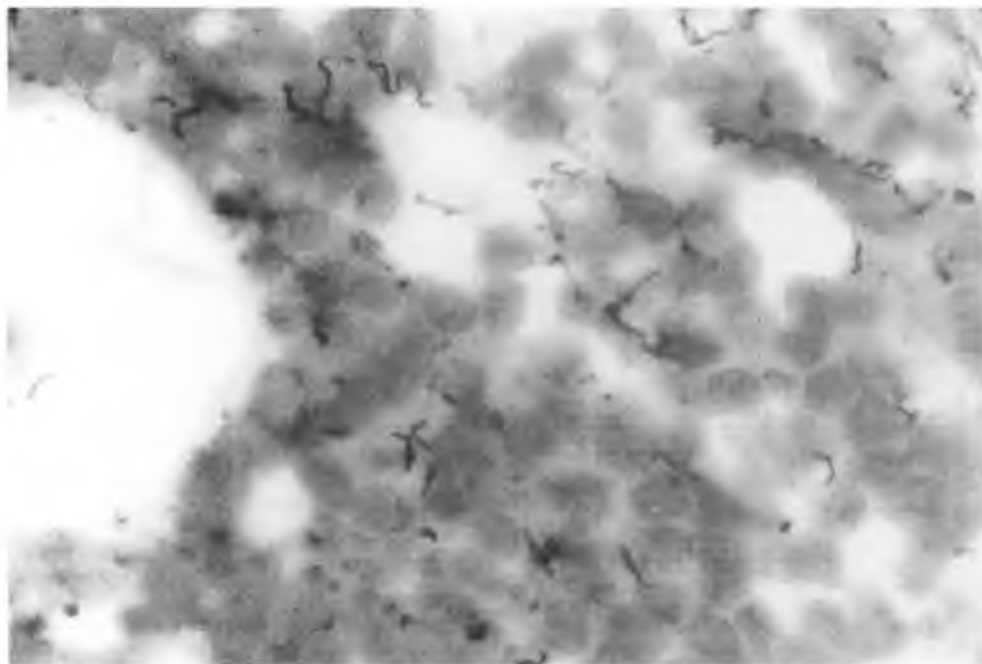


FIGURA 1

Fotomicrografia de ovário de hamster corado pela Técnica de Levaditi (aumentado originalmente em 1650 vezes). Microscópio Olympus BH2.