

PATOLOGIA DA LEPTOSPIROSE. ANÁLISE CRÍTICA DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS RELEVANTES PARA A COMPREENSÃO DA PATOGENIA

Venâncio Avancini Ferreira ALVES *
Sheila Aparecida Coelho SIQUEIRA *
Cynthia Bomfim PESTANA *

RIALA6/662

ALVES, V.A.F.; SIQUEIRA, S.A.C. & PESTANA, C.B. – Patologia da leptospirose. Análise crítica dos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos relevantes para a compreensão da patogenia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1)75-80, 1989.

RESUMO: Essa revisão que se concentra nos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos da leptospirose humana e experimental analisa as principais possibilidades patogênicas. O fígado pode apresentar hepatite colestática com destrabeculação de hepatócitos nas fases de máxima gravidade. O acometimento renal varia desde nefrite intersticial até necrose tubular aguda. Miosites com predomínio de mononucleares são descritas em vários músculos, especialmente na panturrilha. Miocardites e coronarites são relacionadas aos casos de morte súbita. De fato, a vasculite pode ser considerada sistêmica e multifocal. Os pulmões podem ter focos pneumônicos e até extensas hemorragias alveolares e pleurais. A detecção de antígenos de leptospira em biópsias e autópsias permite o diagnóstico etiológico, favorecendo também hipóteses patogênicas que propõem que as principais lesões decorram de ação direta, sobre membranas de células parenquimatosas e endoteliais, inicialmente da leptospira íntegra e a seguir de produtos de sua degradação por macrófagos.

DESCRIPTORIOS: leptospirose, histopatologia, imuno-histoquímica, patogênese.

INTRODUÇÃO

A leptospirose compreende extenso grupo de infecções humanas e animais de caráter septicêmico causadas por espiroquetas do gênero *Leptospira*. Na classificação atual²⁰ inclui-se na família *Leptospiraceae*, da ordem *Spirochetales*. YASUDA et alii²⁵ reconhecem a existência de três espécies: *L. interrogans*, *L. biflexa* e *L. parva*. SCHMID et alii²⁷ adicionam uma quarta, *L. inadai*. Na *L. interrogans*, em que se situam as leptospiros patogênicas, já são conhecidos mais de 170 sorotipos, organizados em 19 sorogrupos²⁰. Recentemente, YASUDA et alii²⁵ através de estudos de hibridização molecular de DNA propuseram nova classificação com 7 espécies neste gênero.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição universal. Os roedores são os principais vetores, como destaca ENRIETTI¹⁶, que obteve 78% de positividade em ratos capturados no centro de Curitiba. Em países desenvolvidos, esta entidade é citada como risco ocupacional acometendo principalmente trabalhadores de serviços de água e esgoto, mineiros e agricultores. Em nosso meio, entretanto, a água contaminada, particularmente em inundações, é o principal veículo de infecção humana^{7,9}. Somente no Estado do Rio de Janeiro, 1.062 casos foram relatados após as inundações do verão de 1988, com 52 óbitos relatados à Secretaria Estadual de Saúde.

A presente revisão concentra-se nos aspectos morfológicos da leptospirose humana e experi-

* Da Divisão de Patologia do Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

mental, vistos à microscopia óptica comum e eletrônica, bem como na distribuição de antígenos nos tecidos, através de métodos imuno-histoquímicos. A integração entre os achados visa a análise dos aspectos patogênicos mais relevantes.

Entre as primeiras descrições anatomopatológicas da leptospirose humana estão as de BEITZKE⁸ e PICK²⁵, até hoje aceitas e que caracterizam o fígado e o rim como órgãos de intenso acometimento. À macroscopia verifica-se hepatomegalia com intensa congestão e graus variáveis de colestase caracterizada por tonalidade esverdeada do parênquima hepático^{4,10,18}.

À microscopia óptica, BEITZKE⁸ e PICK²⁵ já notaram preservação da arquitetura lobular, sendo as lesões mais acentuadas nas regiões centrilobulares, observando-se pleomorfismo de hepatócitos, ora tumefeitos, balonizados e abarrotados de pigmento biliar, ora com degeneração acidofílica. Outros hepatócitos apresentam significativa atividade regenerativa. O encontro de hepatócitos em mitose é dado marcante e de importância diagnóstica na leptospirose, sendo raro em outras hepatopatias^{4,11}. A destrabeculação, com perda da coesão entre as células dando origem aos "hepatócitos perdidos", é relatada com destaque nos estudos de necrópsias. Em material obtido de biópsias, alguns autores registram este achado^{10,2}, enquanto outros não o confirmam considerando estes que tal alteração ocorreria em períodos agônicos da doença.

Em recente trabalho experimental¹, tal lesão foi demonstrada como genuína, porém vista na fase terminal da infecção resultando da progressiva tumefação ou necrose acidofílica dos hepatócitos, decorrentes de ação tóxica direta da leptospira e de seus produtos de degradação sobre as membranas celulares.

O pigmento biliar é encontrado tanto no citoplasma de hepatócitos como no das células de Kupffer, sendo também demonstrados cilindros pigmentares nos canalículos biliares^{4,11,21}. As células de Kupffer mostram-se hipertróficas e em maior número, por vezes formando agrupamentos na luz dos sinusóides⁸. Nos espaços-porta os principais achados são edema e infiltrado inflamatório variando de discreto a moderado, com predomínio de linfócitos, macrófagos e raros polimorfonucleares eosinófilos. A placa limitante mantém-se preservada. A esteatose é observada em raros casos.

À microscopia eletrônica, DE BRITO et alii¹¹ encontraram distorções no polo sinusoidal de

alguns hepatócitos, muitas vezes acompanhadas do desaparecimento de microvilosidades, imputando estes achados à ação de eventuais toxinas circulantes. Detectaram ainda distorção ou desaparecimento de microvilosidades de capilares biliares, alteração esta inespecífica, que também é detectada em formas intra e extra-hepáticas de colestase¹⁵. Os principais estudos, visando detecção de leptospirose em tecido^{4,13,14}, empregaram impregnação argêntica adaptada a cortes de parafina, segundo a técnica de Whartin e Starry, com encontro de espiroquetas em 25 a 30% dos casos¹⁶. O método de Levaditi é menos utilizado por se basear na impregnação de sais de prata em tecido não incluído.

Recentemente, a aplicação de técnica imuno-histoquímica⁹ a cortes de tecido hepático humano obtidos de necrópsias e biópsias permitiu a identificação de antígenos de leptospira, que assumem aspecto alongado ou granular, em todos os 15 casos testados. O antígeno foi detectado no interstício edemaciado na periferia dos espaços-porta, no lúmen de sinusóides e de ramos venosos portais, e também fagocitado no citoplasma de células de Kupffer e de macrófagos portais². A demonstração do antígeno foi predominante, nas células de Kupffer, nos casos de biópsias que espelham fase de regressão anatomopatológica da doença².

Experimentalmente, após uma fase inicial, septicêmica, as leptospirose visualizadas como antígeno filiforme atravessam a parede dos vasos, atingindo o interstício hepático¹. A partir daí, são fagocitadas pelos macrófagos ou acolam-se às membranas de hepatócitos. Nas fases mais avançadas da infecção, tornam-se proeminentes as formas granulosas de antígeno de leptospira, provavelmente expressando degradação parcial das espiroquetas pelos macrófagos.

Os rins, à macroscopia, mostram-se aumentados, amolecidos, pálidos e com estrias esverdeadas por impregnação biliar. São freqüentes os focos de hemorragia, muitas vezes subcapsulares.

À microscopia, chama a atenção o acometimento multifocal, encontrando-se néfrons destruídos ao lado de outros íntegros. O quadro varia de nefrite intersticial inespecífica até franca necrose tubular aguda, nos casos que cursam com insuficiência renal.

Os glomérulos estão em geral preservados¹⁶, havendo alguns relatos de alterações leves e focais¹³, incluindo hiperplasia de células mesangiais e tumefação endotelial. SITPRIJA et alii²⁰ apresentam raros casos com glomerulite bem instalada,

com proliferação de células mesangiais e endoteliais e permeação por polimorfonucleares.

No interstício edemaciado encontram-se agrupamentos de macrófagos, linfócitos e plasmócitos e poucos polimorfonucleares eosinófilos, notando-se em alguns campos concentração periglomerular e perivascular^{9,13}. As hemorragias podem ser minúsculas e focais nos casos leves, tornando-se volumosas nos casos de Síndrome de Weil.

As principais evidências de lesão renal concentram-se nos túbulos contornados, com acometimento difuso nos néfrons, ressaltando alguns autores o predomínio de distúrbios morfofuncionais nos túbulos proximais⁸. São descritos todos os estádios de degeneração, incluindo tumefação epitelial, dilatação tubular com aplainamento das células e até verdadeira necrose tubular aguda, com cariólise e coagulação hialina do citoplasma. Células epiteliais necróticas são eliminadas para o lúmen tubular, formando cilindros em conjunto com proteínas coaguladas. Também são frequentes os cilindros biliares e mesmo os formados por hemoglobina ou mioglobina. Além da degeneração celular, são sempre encontradas alterações atribuíveis à regeneração, caracterizadas por fileiras de células epiteliais cúbicas baixas com citoplasma mais basófilo com mitoses presentes. Vários autores salientam a dificuldade de se confirmar, através de métodos como o de Warthin-Starry, a presença de leptospiros no interstício e nos túbulos renais. PENA et alii²⁴ relatam positividade em 4 dentre 13 pacientes submetidos a biópsia renal, enquanto AREANY apresenta 65% de positividade no interstício renal em necrópsias humanas.

Estudos histoquímicos¹⁹ comprovam, em células tubulares lesadas, redução significativa da atividade enzimática da desidrogenase succínica e fosfatases ácida e alcalina. À microscopia eletrônica^{19,14}, foram observados aumento do número de citosomas e citossegregosomas nas células alteradas e lesões da borda em escova com redução e distorção das microvilosidades. O desaparecimento da coloração da borda em escova pelo PAS, verificado à microscopia óptica comum, da fosfatase alcalina à histoquímica enzimática e a redução e distorção das microvilosidades à microscopia eletrônica seriam um mesmo fenômeno detectado em abordagens diferentes, atestando lesão de membrana das células dos túbulos proximais. As alterações mitocondriais são muito significativas, compreendendo retração, tumefação e até o aparecimento de mitocôndrias gigantes com redução da densidade da matriz ou disposição anômala de suas cristas. Pode haver redução dos grânulos de ribonucleoproteína no citoplasma, com significativa dilatação das cisternas do retículo endoplasmático liso. O complexo de Golgi,

geralmente preservado, em algumas células apresenta vesículas irregularmente dilatadas. As lesões glomerulares a nível ultra-estrutural confirmam os achados da microscopia óptica, podendo ainda ser encontrada fusão local de podócitos e espessamento irregular, edematoso, da membrana basal glomerular^{13,14,22,29}.

À imunofluorescência, LAI et alii²² encontram, em 1 dentre 4 pacientes biópsiados, deposição de frações C_{1q} e C₃ do complemento em região mesangial de glomérulos e em arteríolas. Em experimentos com cobaias, YASUDA et alii³ também registraram encontro de depósitos de complemento, detectando ainda grandes acúmulos de antígeno de leptospira no interstício e nos túbulos.

À imunohistoquímica com amplificação pelo método da peroxidase - antiperoxidase encontram-se antígeno de leptospira em tecido renal em 5 dentre 8 autópsias de casos humanos². Predominaram os depósitos no interstício, no endotélio de vasos dilatados e no epitélio dos túbulos contornados, sendo também detectados no citoplasma de alguns macrófagos. A pesquisa nos glomérulos resultou negativa.

Infecções experimentais estudadas sequencialmente à microscopia eletrônica²³, à imunofluorescência³⁰, e à imunohistoquímica³ demonstram que as leptospiros, inicialmente encontradas na luz de capilares, permeando suas paredes, atingem o interstício, em direta relação com o surgimento de edema e de infiltrado inflamatório. Mais tardiamente, fragmentos de leptospira são encontrados na parede e luz dos túbulos, coincidindo com as alterações de suas células epiteliais. Estudos de outras localizações mostram que a lesão mais característica é da musculatura da panturrilha, sendo também destacados os acometimentos de músculos peitorais, dorsais e deltóides²⁶. Há dissociação das fibras musculares, com vacuolização, tumefação, perda da estriação e hialinização das células musculares, permeadas por macrófagos, alguns polimorfonucleares e plasmócitos. A rotura de fibras pode dar origem à deposição de material hialino no interstício¹⁹. O encontro de leptospira em tais lesões é tido como muito raro⁶. Entretanto, estudos à imunofluorescência revelam ocasionais depósitos antigênicos junto às fibras lesadas²⁸. UIP³¹ encontrou positividade imuno-histoquímica para antígeno de leptospira em 34 dentre 36 biópsias de panturrilha em pacientes oriundos do Estado de São Paulo.

Os pulmões podem se mostrar normais ou com múltiplos focos de hemorragia, também encontrados na pleura.

Analisando 2 casos necropsiados, ASHE et alii⁶ destacaram a existência de numerosos focos de hemorragia, notando pronunciado edema e exsudação de fibrina em muitos alvéolos. Nos focos de hemorragia foram encontrados agrupamentos de polimorfonucleares neutrófilos, linfócitos e macrófagos, compondo em ambos os casos, quadro de pneumonia hemorrágica multifocal, em fase inicial, sendo o aporte dos leucócitos provavelmente secundário ao extravazamento de hemácias. A pesquisa de leptospirosas pelo método de Levaditi resultou negativa⁶. Achados similares foram obtidos por AREAN⁴ em 33 necrópsias de casos humanos fatais. Neste estudo, foram ainda encontrados quatro casos com padrão histológico característico de broncopneumonia e outros quatro com lesões sugestivas de infarto hemorrágico.

Dentre as alterações cardíacas, relata-se principalmente a lesão de fibras miocárdicas semelhante à descrita em musculatura esquelética. Também são relatadas miocardites, vistas segundo AREAN⁴, em 60% dos casos de leptospiroses. DRÄGERT¹⁷ descreveu dois casos de endocardite vegetante com demonstração de leptospira na lesão. Recentemente DE BRITO et alii¹² descreveram lesão coronariana focal com depósitos locais de antígeno de *L. interrogans* identificados à imuno-histoquímica. Estas lesões, descritas como arterite coronariana aguda, foram encontradas em 70% dos casos de necrópsias de pacientes com leptospirose, observando-se nesta mesma população aortite em 57,8% daqueles.

Em correspondência aos quadros clínicos neurológicos, a meningite leptospirótica é tida como freqüente, mas com grau discreto, com pequenos agregados de macrófagos e linfócitos nos espaços e ao redor de pequenos vasos. Por vezes, tais fenômenos se acompanham de edema cerebral^{6,21}.

Nos demais órgãos, as lesões são menos significativas, geralmente decorrentes de micro-hemorragias associadas à capilarite, que é sistêmica e multifocal.

As hipóteses mais atuais para a patogênese das lesões sistêmicas na leptospirose propõem que as lesões dos órgãos mais intensamente acometidos decorram da ação direta, sobre membranas das células parenquimatosas, inicialmente da leptospira íntegra e a seguir também de produtos granulados de sua degradação por macrófagos, incluindo a glicolipoproteína descrita por VINH et alii^{22,23}. Num primeiro momento, tal ação levaria a distúrbios funcionais dessas membranas, só acarretando necrose em fases tardias. A lesão dos vasos decorreria do mesmo processo ocorrendo nas células endoteliais. Tal dano vascular seria responsável direto pela diátese hemorrágica e indiretamente, através da hipóxia, pelo agravamento das lesões parenquimatosas dos órgãos acometidos.

RIALA6/662

ALVES, V.A.F.; SIQUEIRA, S.A.C. & PESTANA, C.B. – Pathology of leptospirosis. A critical analysis of morphological and immunohistochemical features relevant to pathogenesis of systemic lesion. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):75-80, 1989.

ABSTRACT: Focus on morphology and immunohistochemistry of human and experimental leptospirosis, including a discussion on pathogenesis of major systemic injuries is revised. Liver involvement results in cholestatic hepatitis with cell-plate disarray in severe stages. Renal picture varies from interstitial nephritis up to acute tubular necrosis. Mononuclear myosites are seen in several muscles, notably in calves. Myocarditis and coronaritis are also described, perhaps related to sudden death. Indeed, leptospiral vasculitis can be considered a systemic and multifocal phenomenon. The lungs may show pneumonic foci or extense haemorrhage. Leptospiral antigen detection in biopsies and autopsies lead to the aetiological diagnosis, favoring also pathogenetic possibilities of a direct effect, first of intact leptospires and afterwards of their degrading substances, on membranes of parenchymal and endothelial cells.

DESCRIPTORS: leptospirosis, histopathology, immunohistochemistry, pathogenesis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, V.A.F. – *Leptospirose experimental em coiba: Contribuição de dados morfológicos e imuno-histoquímicos para a compreensão de sua patogênica*. São Paulo, 1988. [Tese - Faculdade de Medicina, USP.
2. ALVES, V.A.F.; VIANNA, M.R.; YASUDA, P.H.; & DE BRITO, T. – Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J.Pathol.*, 151:125-31, 1987.
3. ALVES, V.A.F.; YASUDA, P.H.; YAMA SHIRO, E.H.; SANTOS, R.T.M.; YAMAMOTO, L.U. & DE BRITO, T. – An immunohistochemic assay to localize leptospire in tissue specimens. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 28(3): 170-3, 1986.
4. AREAN, V. – The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Amer. J. Pathol.*, 40:393-423, 1962.
5. ARRIAGA, A.J.D.; ROCHA, A.S.; YASUDA, P. & DE BRITO, T. – Morpho-functional patterns of kidney injury in the experimental leptospirosis of the guinea-pig (*L. ictero-haemorrhagiae*). *J. Pathol.*, 138:145-61, 1982.
6. ASHE, W.M.F.; PRATT-THOMAS, H.P. & KUMPE, C.S. – Weil's disease - A complete review of American literature and an abstract of the world literature. Seven case reports. *Medicine*, Baltimore, 20: 145-210, 1941.
7. AZEVEDO, R. & CORREA, M.O.A. – Considerações em torno da epidemia de leptospirose na cidade de Recife em 1966: aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28: 85-111, 1968.
8. BEITZKE, H. – Veber die pathologische anatomie der ansteckenden gelbsucht (weil'sche krankheit). *Berl. klin. Wochenschr.*, 53: 188-91, 1916.
9. CAMARGO, M.C.C.; FIGUEIREDO, G.M.; VENEZIANI, P. & OKI, S. – Leptospirose. *Rev. paul. Med.*, 101(2): 74-6, 1983.
10. CORREA LIMA, M.B.C. – *Contribuição ao estudo do fígado na leptospirose*. Rio de Janeiro, 1971. [Tese-Escola de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro].
11. DE BRITO, T.; MACHADO, M.M.; MONTANS, S.D.; HOSHINO, S. & FREYMULLER, E. – Liver biopsy in human leptospirosis: a light and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, 342 61-9, 1967.
12. DE BRITO, T.; MORAIS, C.F.; YASUDA, P.H.; LANCELLOTTI, C.P.; SHIMIZU, S.; YANASHIRO, E. & ALVES, V.A.F. – Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 81: 207-14, 1987.
13. DE BRITO, T.; PENNA, D.O.; PEREIRA, V.G. & HOSHINO, S. – Kidney biopsies in human leptospirosis: a biochemical and electron microscopy study. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, 343: 124-35, 1967.
14. DE BRITO, T.; PENNA, D.; SANTOS, H.; FREYMULLER, E.; ALMEIDA, S.S.; GALVÃO, P.A.A. & PEREIRA, V. – Electron microscopy of human leptospirosis (kidney biopsies). *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 14(3): 397-403, 1965.
15. DESMET, V.J. – Morphologic and histochemical aspects of cholestasis. *Prog. Liver Dis.*, 4: 97-132, 1972.
16. DOOLEY, J.R. & ISHAK, K.G. – Leptospirosis. In: BINFORD, C.H. & CONNOR, D.H. – *Pathology of tropical and extraordinary disease*. Washington, D.C., 1976. p. 101-6.
17. DRÄGERT, E. – Beitrag zur pathologischen anatomie der weilscher Erkrankung. *Virchow's Arch. Pathol. Anat. Phys.*, 292: 452-64, 1934.
18. ENRIETT, M.A. – *Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospiras em murideos, caninos e suínos, no Paraná*. Curitiba, 1949. [Tese - Escola Superior de Agricultura e Veterinária do Paraná].
19. JEGHER, H.R.; HOUGHTON, J.D. & FOLEY, J.A. – Weil's disease: report of a case and review of recent literature. *Arch. Pathol.*, 20: 447-76, 1935.
20. JOHNSON, R.C. & FAINE, S. – Genus I. Leptospiranoguchi 1917 755 Al. In: - BERGEY's manual of systematic bacteriology, edited by N.R. Krieg and J.G. Holt. Baltimore, Williams and Wilkins, 1984. p. 62-7.
21. KOPPISCH, E. & BOND, W.M. – The morbid anatomy of human leptospirosis: a report of thirteen fatal cases. In: SYMPOSIUM ON LEPTOSPIROSIS, 1952. Washington, Government Printing Office, 1953. p. 83-105. (Medical Science Publ. n° 1).
22. LAI, K.K.; AARONS, I.; WOODROFFE, A.J. & CLARKSON, A.R. – Renal lesions in leptospirosis. *Aust. N.Z. J. Med.*, 12: 276-9, 1982.
23. MARSHALL, R.B. – The route of entry of leptospire into the kidney tubule. *J. med. Microbiol.*, 9: 149-52, 1976.
24. PENNA, D.; DE BRITO, T.; PUPO, A.A.; MACHADO, M.M.; GALVÃO, P. A.A. & ALMEIDA, S.S. – kidney biopsy in human leptospirosis. *Amer. J. trop. Med.*, 12:896-901, 1963.
25. PICK, L. – Zur pathologischen anatomie des infektiösen icterus. *Berl. klin. Wochenschr.*, 19: 451-5, 1917.
26. SAN JUAN, F.; DUARTE, F.; TREIGER, M. & GONÇALVES, A.J.R. – Aspectos histológicos e funcionais do fígado na leptospirose ictero-hemorrágica. *Hospital*, 74(4): 95-118, 1968.

27. SCHMID, G.P.; STEERE, A.C.; KORNBLATT, KAUFMANN, A.F.; MOSS, C. S.; JOHNSON, R.C.; HOVIND-HOUGEN, K. & BRENNER, D.J. – Newly recognized *Leptospira* species (“*Leptospira inadai*” serovar lyme) isolated from human skin. *J. clin. microbiol.*, 24(3): 484-6, 1986.
28. SHELDON, W.H. – Leptospiral antigen demonstrated by the fluorescent antibody technic in human muscle lesions of leptospirosis icterohemorrhagiae. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 84: 165-7, 1953.
29. SITPRIJA, V. & EVANS, H. – The kidney in human leptospirosis. *Am. J. Med.*, 49: 780-8, 1970.
30. SITPRIJA, V.; PIPATANAGUL, V.; MERTORID-JOJO, R.; BOONPUCKNAVIG V. & BOONPUCKNAVIG, S. – Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: clinical and experimental studies. *Kidney int.*, 17: 827-36, 1980.
31. UIP, D. – *Diagnóstico precoce da leptospirose por biópsia do músculo da panturrilha*. São Paulo, 1989. [Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina, USP].
32. VINH, T.; ADLER, B. & FAINE, S. – Glycolipoproteins cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. gen. Microbiol.*, 132: 111-123, 1986.
33. VINH, T.; ADLER, E. & FAINE, S. – Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J. gen. Microbiol.*, 132: 103-9, 1986.
34. YASUDA, P.H.; SHIMIZU, S.H.; YAMASHIRO, E.H. & DE BRITO, T. – Experimental leptospirosis (*L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*) of the guinea pig: leptospiral antigen, gamma globulin and complement c3 detection in the kidney. *Exp. Pathol.*, 29: 35-43, 1986.
35. YASUDA, P.H.; STEIGERWALT, A.G.; SULZER, K.R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F. & BRENNER, D.J. – Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. system. Bacteriol.*, 37(4): 407-15, 1987.

Recebido para publicação em 13 de fevereiro de 1989.