

FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

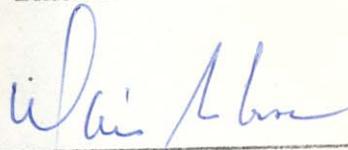
FREQUÊNCIA DE AGLUTININAS ANTI-LEPTOSPIRAS EM SOROS
E PESQUISA DE LEPTOSPIRAS EM RINS DE SUÍNOS DE
MINAS GERAIS

Tese apresentada ao Departamento
de Medicina Veterinária Preven
tiva da Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária.

Belo Horizonte
MINAS GERAIS - BRASIL
1 976

Tese apresentada em:

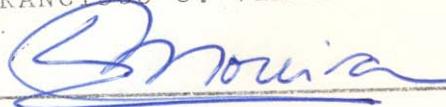
BANCA EXAMINADORA:



MÁRIO BARBOSA



FRANCISCO C. VIANA



ÉLVIO CARLOS MOREIRA

O autor apresenta sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma contribuíram para que esta pesquisa se realizasse.

De modo especial, agradece:

ao Professor ÉLVIO CARLOS MOREIRA, mestre, amigo e orientador;

aos Professores do Curso de pós-graduação do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

- JOSÉ DIVINO LIMA,

- FRANCISCO CECÍLIO VIANA,

- RONALDO REIS e

- JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO, pela contribuição científica prestada;

aos colegas do Curso de Mestrado, pela convivência amigável e constante colaboração;

à Dra. MARIA DAS DORES FERREIRA e ao Sr. MOACIR DUARTE, pelo permanente incentivo;

à FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E AGRONOMIA DE JABOTICABAL, pela oportunidade concedida;

à Srta. VERA REGINA DELGADO, Sra. OLÍVIA MOREIRA, Sr. ANTONIO BENJAMIN DE PAULA, Srta. MARÍLIA DA CONCEIÇÃO NOGUEIRA, Sr. SEBASTIÃO FERNANDES DE OLIVEIRA e demais funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pela colaboração no presente trabalho.

O presente trabalho contou com o apoio financeiro da FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA, Belo Horizonte, Minas Gerais.

	<u>Página</u>
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	4
3. Material e Métodos	17
1. Origem e colheita do material	18
2. Antígenos	19
3. Métodos	21
3.1. Microaglutinação rápida	21
3.2. Imunofluorescência direta	22
3.2.1. Preparo do conjugado	22
3.2.2. Preparo das lâminas	23
3.3. Isolamento	24
3.4. Sensibilidade e especificidade	24
4. Resultados	27
5. Discussão	37
6. Conclusões	48
7. Resumo	51
8. Summary	54
9. Referências Bibliográficas	57

As leptospiroses dos suínos despertaram interesse em nosso meio após os trabalhos de GUIDA(1947/48). A doença tem sido responsabilizada por grandes prejuízos financeiros à suinocultura não só em decorrência de abortos, esterilidade e natimortos como também pelo nascimento de animais fracos (GUIDA & cols., 1959; SANTA ROSA & cols., 1962 b).

No Brasil, estudos sorológicos e/ou bacteriológicos sobre leptospirose suína têm sido feitos por vários pesquisadores em São Paulo (SANTA ROSA & cols., 1962a; CASTRO & cols., 1962 e SANTA ROSA & cols., 1973b); Minas Gerais (BARBOSA, 1962; ARAÚJO & cols., 1973 e REIS & cols., 1973); Santa Catarina(SANTA ROSA & cols., 1973a) e Paraná (ENRIETTI, 1954 e DUTRA, 1974).

Não sendo uma doença de notificação compulsória, em nosso meio, torna-se difícil conhecer sua prevalência no rebanho suíno, bem como quais os sorotipos responsáveis pela infecção e também os prejuízos que

ela acarreta aos rebanhos brasileiros.

Para o diagnóstico das leptospiroses a prova de aglutinação microscópica é, sem dúvida, a mais amplamente usada, embora exigindo pessoal, equipamento e técnica especializados.

O isolamento de *Leptospira* da urina ou de rins de animais infectados é difícil por necessitar de animais de laboratório, por ser muito demorado e o material apresentar-se sempre contaminado com outras bactérias. Em consequência, o uso de várias técnicas torna-se necessário para o estudo completo das leptospiroses.

Por isso, o presente trabalho, realizado em suínos de Minas Gerais, abatidos em vários matadouros de Belo Horizonte, tem os seguintes objetivos:

- determinar a frequência de aglutininas anti-leptospiras em soros através do teste de microaglutinação rápida;
- pesquisar leptospiras em cortes de congelação de rins através da imunofluorescência direta;
- isolar leptospiras em rins;
- verificar a utilização da *L. patoc* amostra *Patoc I* como antígeno de triagem no diagnóstico sorológico das leptospiroses suína.

1. Isolamento e pesquisa de aglutininas

A primeira referência encontrada na literatura sobre leptospira em suínos é a de SANDER (1935) que descreveu, na Alemanha, a transmissão da doença ao homem através do contato direto com urina e sangue de suíno infectado. Posteriormente, MOCHTAR (1940) na Batávia, isolou seis amostras de *Leptospira pomona* de rins de 104 suínos aparentemente normais.

GUIDA (1947/48) examinando 50 rins de suínos procedentes de várias localidades do interior de São Paulo, isolou três amostras de *Leptospira* que tinham caracteres culturais e antigênicos semelhantes, mas diferiam sorologicamente da *L. canicola* e da *L. icterohaemorrhagiae*.

GUIDA (1952) relata que as três amostras isoladas de suínos, pareciam tratar-se de novas espécies de *Leptospira*.

Na Tchecoslovaquia KMETY & cols. (1956) isolaram *Leptospira sejore* e *Leptospira ballum* de rins de

suínos após examinarem 460 animais aparentemente sadios abatidos em matadouro.

Evidência sorológica de infecção em suínos para os sorotipos *L. australis* A e B foi demonstrado por KEAST & cols. (1956), para *L. bataviae* por KISZEL & FUZI (1957); SALMINEN (1958); BABUDIARI (1959) e para *L. autumnalis*, *L. pyrogenes*, *L. grippotyphosa* e *L. poi* por ALSTON & BROOM (1958).

GUIDA (1958) identificou sorologicamente as três amostras de *Leptospira* isoladas de rins de suínos, citadas anteriormente, como pertencentes ao sorotipo *L. hyos* (*L. tarassovi*).

De acordo com VAN DER HOEDEN (1958) os três mais comuns sorotipos patogênicos de leptospiros para suínos são, em ordem de importância: *L. pomona*, *L. hyos* e *L. icterohaemorrhagiae*.

MICHNA (1959) demonstrou em rins de porcos, naturalmente infectados com *L. canicola*, que as leptospiros permanecem móveis sete dias *post mortem* quando o macerado de rim é estocado à temperatura de 0°C a 4°C. Quando o material macerado é colocado à temperatura ambiente as leptospiros permanecem ativamente móveis por um a três dias.

GUIDA & cols. (1959) pesquisando as causas de abortos em uma criação de suínos, no município de São Paulo, isolaram de feto abortado uma amostra de *L. canicola*. Foram também examinados soros sanguíneos de 30 suínos e dez indivíduos tratadores de porcos. Dois tratadores e 17 animais foram positivos para *L. canicola* com títulos acima de 1:200 no teste de aglutinação-lise.

FENNESTAD & BORG-PETERSEN (1961) inocularam *L. saxkoebing* por via intra-uterina, em três fetos bovinos com 132 a 168 dias de idade. Verificaram produção de aglutininas anti-*L. saxkoebing* nos três fetos, 32 a 62 dias após à inoculação e somente conseguiram isolar leptospiras de dois deles.

SANTA ROSA & cols. (1962a) isolaram *L. icterohaemorrhagiae* (4) e *L. hyos* (1) de 283 rins de suínos de várias regiões do Estado de São Paulo, aparentemente normais e abatidos em matadouro. De cada amostra de rim foi examinado o soro sanguíneo do animal correspondente, através do teste de aglutinação microscópica, tendo encontrado 119 reações positivas tais como: *L. icterohaemorrhagiae* 58, *L. hyos* 17, *L. pomona* 14, *L. canicola* 13, *L. sejroe* 7, *L. grippotyphosa* 6, *L. australis* 3 e *L. bataviae* 1.

SANTA ROSA & cols. (1962b) estudando as causas de um surto de abortos numa fazenda no município de Campinas, isolaram uma amostra de *L. pomona* da urina de uma porca que havia abortado. De 165 soroaglutinações efetuadas no rebanho, 132 foram positivas para os sorotipos *L. pomona* 78, *L. icterohaemorrhagiae* 37, *L. canicola* 12, *L. sejroe* 4 e *L. grippotyphosa* 1. Os títulos aglutinantes variaram de 1:200 até 1:102.400.

CASTRO & cols. (1962) isolaram uma amostra de *L. canicola* de 165 amostras de rins de suínos aparentemente normais, procedentes de várias regiões do Estado de São Paulo, abatidos em matadouro. Na mesma oportunidade, examinaram 117 amostras de soros sanguíneos de suínos, através do teste de microaglutinação. O sorotipo mais predominante foi *L. icterohaemorrhagiae*, com 26 reações positivas, seguido da *L. canicola* 11, *L. hyos* 7, *L. grippotyphosa* 4, *L. sejroe* 4, *L. pomona* 2, *L. australis* 2 e *L. bataviae* 1.

BAIBOSA (1962) pesquisando a ocorrência de aglutininas e lisinas anti-leptospiras em 86 soros de suínos em Minas Gerais, encontrou 29,1% positivos para os seguintes sorotipos: *L. icterohaemorrhagiae*, *L.*

pomona, *L. canicola*, *L. mitis*, *L. grippotyphosa* e *L. autumnalis*.

BRAVO & cols. (1968) na Colômbia, isolaram cinco amostras de *L. pomona* de 113 amostras de rins de suínos abatidos para consumo público.

MICHNA & CAMPBELL (1969) estudaram a prevalência da leptospirose suína e o processo natural da doença renal, no oeste da Escócia. De 695 amostras de soros suínos examinados pelo teste de aglutinação-lise, 42,4% foram positivos para *L. canicola* e *L. icterohaemorrhagiae*. Observaram, ainda, que a doença renal é usualmente uma nefrite intersticial subclínica com aspecto citológico que sugere resposta imunológica local.

SANTA ROSA & cols. (1969/70) relataram os estudos sobre leptospirose reavaliados em São Paulo num período de nove anos. Foram examinados 3.242 soros de suínos, com uma taxa de positividade de 19,5% (697 soros) predominando o sorotipo *pomona*.

CESSI & SOLDATI (1970) estudaram sorologicamente 1.460 suínos tipo carne da província de Modena. Verificaram que 381(26%) eram positivos para *Leptospira*, sendo o sorotipo *L. pomona* o mais prevalente.

LICERAS DE HIDALGO & HIDALGO (1970) demonstraram a presença de leptospira através de isolamento e aglutininas anti-*L. pomona* em 98 suínos da cidade de Tumbes, Perú.

RYU & cols. (1972) examinaram 143 soros sanguíneos de varrões pelo teste de microaglutinação rápida para *Leptospira*. Onze animais foram positivos para *L. icterohaemorrhagiae* e cinco para *L. canicola*. Nove amostras de sêmen de varrões soropositivos foram testadas pelo mesmo procedimento. Encontraram três amostras positivas para *L. icterohaemorrhagiae* e seis para *L. canicola*.

McERLEAN (1973a) estudando 236 rins de suínos abatidos em uma fábrica de banha, isolou *Leptospira* em dois casos. Uma amostra pertencia ao sorogrupo *L. icterohaemorrhagiae* enquanto a outra dava reações com os sorogrupos *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* e *L. pyrogenes*, não sendo pois, identificada.

McERLEAN (1973b) realizou estudo sorológico em porcos desmamados, porcos tipo banha e porcas, mostrando aumento da incidência de anticorpos contra leptospira com a idade. Infecção por *L. icterohaemorrhagiae* pareceu ser responsável pela maioria das reações.

REIS & cols. (1973) estudaram a presença de aglutininas anti-leptospira em suínos em Minas Gerais pelo teste de microaglutinação rápida. Das 124 amostras de soros suínos estudadas 16 foram positivas para *L. hebdomadis* e *L. pomona*. (27)

SANTA ROSA & cols. (1973a) isolaram duas amostras de leptospira pertencentes ao sorotipo *L. pomona* de "pool" de órgãos e conteúdo estomacal de fetos suínos abortados em duas criações no Estado de Santa Catarina.

SANTA ROSA & cols. (1973b) estudaram 275 amostras de soros e rins de suínos aparentemente normais, abatidos em São Paulo. Foram isoladas três (1%) leptospiras pertencentes ao sorotipo *L. pomona*, 47 (17%) amostras de soros foram positivas, sendo 23 para *L. pomona*, 10 para *L. canicola*, 9 *L. icterohaemorrhagiae*, 2 *L. guirdae* e 3 para *L. javanica*, *L. pyrogenes* e *L. bataviae*. Os títulos aglutinantes dos soros positivos variavam de 1:200 a 1:6400.

2. Demonstração de *Leptospira* através da imunofluorescência direta

SHELDON (1953) usando a técnica de imuno-

fluorescência, demonstrou a presença de *L. icterohaemorrhagiae* em lesão muscular de um paciente com doença de Weil.

MOULTON & HOWARTH (1957) demonstraram, em cortes de congelação de rins de hamsters, a especificidade do método de imunofluorescência em corar *L. canicola*, após tratamento dos cortes com vários soros imunes anti-leptospira, diferentes do conjugado.

WHITE & RISTIC (1959) demonstraram *L. pomona* em urina e rins de cobaias experimentalmente infectadas, usando a técnica de imunofluorescência. Afirmam, ainda, os autores, ser a técnica mais eficiente que a microscopia de campo escuro para detectar leptospiras na urina de bovinos e que a reação não é sorotipo específico.

BOULANGER & ROBERTSON (1961) usaram a técnica de imunofluorescência para demonstrar leptospira em cultura pura, urina e tecido renal de bovinos. Observaram que quando o microrganismo está presente em grande número no material a ser examinado, a imunofluorescência é tão eficiente quanto os métodos culturais para demonstrar leptospiras. Entretanto, quando este encontra-se em pequeno número, existe dificuldade em dife-

rencia-los de artefatos.

DACRES (1961) verificou que diferentes sorotipos de leptospiras presentes em cultura podem ser diferenciados pela imunofluorescência quando se usa vapor de ácido ósmico como fixador.

COFFIN & MAESTRONE (1962) mostraram que a técnica de imunofluorescência, usada para demonstrar leptospiras, é mais eficiente que o exame em campo escuro e isolamento. Observaram que usando material fresco e sem contaminação, os resultados obtidos são melhores do que quando se usa material refrigerado, congelado e contaminado. Verificaram, ainda, que o organismo pode ser detectado em material seco e estocado à temperatura ambiente por um ano e em fluídos e tecidos conservados em formalina por até dois anos.

MAESTRONE (1963) verificou que a imunofluorescência é tão eficiente quanto os métodos sorológicos, cultural, inoculação em animal e impregnação de prata para demonstrar leptospiras em tecidos de animais infectados natural e experimentalmente.

SMITH & cols. (1966) compararam os métodos cultural, histopatológico e imunofluorescente, aplica-

dos em materiais fetal e placentário para demonstração de leptospiros. Os materiais foram colhidos de ovelhas gestantes experimentalmente infectadas com *L. pomona*. A imunofluorescência mostrou ser superior aos outros métodos quando o material examinado estava autolizado.

SEUK & SEO (1973) mostraram que a técnica de imunofluorescência é mais eficiente que os métodos cultural e microscopia de campo escuro em demonstrar leptospira no sangue, urina e vários tecidos de ratos experimentalmente infectados com *L. icterohaemorrhagiae* e *L. australis*.

3. *Leptospira patoc* como antígeno de triagem

GALTON & cols. (1958) utilizaram como teste de triagem no diagnóstico de leptospirose quatro grupos de "pool" de antígenos, três sorotipos em cada grupo. Este teste é feito com antígenos formolados que têm a vantagem de serem estáveis por longo período.

STURDZA & ELIAN (1961) descreveram um gênero específico, antígeno fixador do complemento presente em algumas amostras saprófitas de leptospiros (*L. patoc* I e *L. são paulo*) o qual podem ser usadas como antígenos

de triagem no diagnóstico de leptospirose humana.

TORTEN & cols. (1966) utilizaram uma amostra saprófita de leptospira, *L. patoc* I, como antígeno de triagem no diagnóstico da leptospirose humana através da imunofluorescência indireta. A utilização desta amostra como antígeno, elimina a necessidade de grande número de sorotipos para diagnóstico das leptospiroses.

ADDAMIANO & BABUDIERI (1968) desaconselham a uso da amostra *L. patoc* I como antígeno de triagem na soroaglutinação para diagnóstico de leptospirose animal.

CORREA (1969/70) usando a *L. Semarang Patoc* I como antígeno de triagem, no teste de aglutinação microscópica, em soros de pacientes suspeitos de leptospiroses, comparou os resultados com outros encontrados quando empregou leptospiras patogênicas. Em 5942 amostras de soros houve concordância em 98,7%, o que confirma o considerável valor prático deste sorotipo como triagem no diagnóstico sorológico das leptospiroses humanas.

PINTO & cols. (1974) utilizaram a *L. patoc* I como antígeno de triagem na reação de fixação de complemento em estudo comparativo com a soroaglutinação

microscópica, para diagnosticar leptospirose humana e animal. Devido a baixa concordância, os autores desaconselham o uso deste sorotipo como antígeno de triagem na reação de fixação do complemento para diagnóstico de leptospirose animal.

SANTA ROSA & PINTO (1974) compararam as reações de fixação do complemento e soroaglutinação microscópica no diagnóstico de leptospirose animal (cão, muar, eqüino). Na reação de soroaglutinação microscópica usaram diversas amostras de leptospiras patogênicas enquanto na fixação do complemento usaram apenas a amostra *L. patoc* I. A irregularidade da concordância entre as reações e baixos títulos na reação de fixação do complemento levaram os autores a não aconselharem esse tipo de antígeno para esta reação com soros animais.

1. Origem e colheita do material

Foram colhidas 770 amostras de sangue e 100 rins de suínos provenientes de 26 municípios de Minas Gerais e abatidos em vários matadouros de Belo Horizonte, no período de 1974/75.

As amostras de sangue e rins foram colhidas durante o abate. De cada animal, colhia-se o sangue em frascos de 100 ml previamente esterilizados e o rim em sacos plásticos devidamente identificados. No laboratório, as amostras de sangue foram mantidas à temperatura de 4°C por duas horas a fim de se obter maior quantidade de soro.

Os soros obtidos foram centrifugados sob refrigeração a 1.500 r.p.m., durante 15 minutos. Em seguida, foram colocados em frascos esterilizados, tipo penicilina de 20 ml e armazenados em congelador a -20°C até o momento do uso.

2. Antígenos

Como antígenos para a prova de microaglutinação rápida, foram usadas culturas vivas de leptospiros, fornecidas pelo Centro Panamericano de Zoonoses, Argentina, e indicados pelo grupo de técnicos da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1967) com pequenas alterações (Quadro I).

As culturas recebidas, mantidas em meio semi-sólido de FLETCHER (1928) foram repicadas para o meio de STUART (1946). Os antígenos usados, culturas de leptospiros de 4-14 dias incubadas à temperatura de 28°C, eram examinadas antes dos testes a fim de se verificar quantidade de bactérias, motilidade e presença de auto-aglutinação.

O autor agradece ao Centro Panamericano de Zoonoses, Argentina, pelo fornecimento das amostras de Leptospiros usadas como antígenos no presente trabalho.

QUADRO I

Sorotipos de *Leptospira* usados como antígeno no teste de microaglutinação rápida (MAR) fornecidos pelo Centro Panamericano de Zoonoses

SOROGRUPO	SOROTIPO	AMOSTRA
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>	Veldrat Batavia 46
<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>	Hond Utrecht VI
<i>Ballum</i>	<i>ballum</i>	Mus 127
<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	Salinem
<i>Cynopteri</i>	<i>butembo</i>	Butembo
<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
<i>Australis</i>	<i>australis</i>	Ballico
<i>Australis</i>	<i>bratislava</i>	Jez bratislava
<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	Pomona
<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	Moskva
<i>Hebdomadis</i>	<i>wolffi</i>	3705
<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>	Van Tienen
<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i> *	Perepelicin
<i>Panama</i>	<i>panama</i>	CZ 214 K
<i>Semarangae</i>	<i>patoc</i>	Patoc I

* Anteriormente chamado *hyos*

3. Métodos

3.1. Microaglutinação rápida (MAR)

Foram submetidos à prova de microaglutinação rápida (MAR) soros de suínos e hamsters, segundo a técnica descrita por RYU (1970) com algumas modificações e que constituiu no seguinte:

a) diluía-se 0,2 ml de cada soro em 0,8 ml de salina tamponada, pH 7,2-7,4 (1:5);

b) a 0,2 ml da diluição anterior de cada soro eram adicionados 1,8 ml de salina tamponada obtendo, assim, uma diluição 1:50;

c) em uma placa de porcelana com 21 escavações eram distribuídos uma gota destes soros diluídos. Em seguida, adicionava-se uma gota de antígeno em cada escavação e misturava-se bem (diluição final = 1:100);

d) deixava-se a placa cinco minutos à temperatura ambiente;

e) por meio de uma alça de platina, 12 misturas eram distribuídas em uma lâmina e examinadas ao microscópio de campo escuro, sem lamínula, usando ocular 10X e objetiva 16X. Com a utilização do micrométri-

co, a presença de aglutinação bacteriana era observada em vários planos focais;

f) o grau de aglutinação era lido com 1+ (menos de 50% de leptospiras aglutinadas), 2+ (cerca de 50% de aglutinação) e 3+ (acima de 50% de aglutinação).

Os soros positivos na diluição de 1:100, eram retestados com a finalidade de se encontrar o título final. Uma série de diluições ao dobro era preparada com o soro e salina tamponada desde 1:200 até 1:12.800.

3.2. Imunofluorescência direta (IFD)

Para as provas de imunofluorescência direta (IFD) duas lâminas foram preparadas para cada rim, cortados em micrótomo de congelação na espessura de 4 μ e realizadas segundo a técnica descrita por HODGES & EKDAHL (1973).

3.2.1. Preparo do conjugado

Os soros hiperimunes foram obtidos através da imunização de coelhos com *L. pomona* e *L. icterohaemorrhagiae*. As culturas, cultivadas em meio de Stuart por quatro a seis dias a 28°C foram mortas pela

adição de formalina a 0,3%. As leptospiras foram removidas do meio através de centrifugação e resuspensas em salina tamponada estéril pH 7,2-7,4. Foram dadas em coelhos normais sucessivas inoculações intravenosas de 1 ml, 4 ml, 4 ml e 6 ml da suspensão em intervalos de cinco a sete dias. Sete dias após a última inoculação os coelhos foram sangrados por punção cardíaca.

As globulinas foram extraídas e marcadas com isotiocianato de fluoresceína segundo técnica de COONS & KAPLAN (1950).

3.2.2. Preparo das lâminas

Utilizou-se lâminas especiais de 1,5mm de espessura nas quais eram colocados dois cortes de rins e fixados em acetona na temperatura de -15°C, durante 15 minutos. Após a fixação as lâminas eram secadas à temperatura ambiente e os cortes delimitados em forma de círculo com esmalte branco. Com o conjugado, diluído a 1:10 em solução a 20% de rim de camundongo normal, cobria-se os cortes e as lâminas eram colocadas em câmara úmida à temperatura de 37°C por 30 minutos. Após várias lavagens em salina tamponada pH 7,2 e água

destilada, as lâminas eram montadas com glicerina tamponada pH 7,2 e lamínulas e examinadas em microscópio fluorescente. Para cada leitura foram feitas lâminas controle positiva e negativa.

3.3. Isolamento

Fragmentos dos rins de suínos foram triturados separadamente com areia estéril e macerados em solução fisiológica estéril. Um ml de cada macerado era inoculado por via intraperitoneal em hamsters adultos* e parte semeada diretamente em meio semi-sólido de Fletcher, seguindo-se a técnica de diluição preconizada por GALTON & cols. (1962).

Os hamsters inoculados, foram sangrados e sacrificados 30 dias após. Os soros obtidos foram armazenados em congelador a -20°C e os rins semeados em meio de Fletcher conforme técnica citada anteriormente.

* somente 36 rins de suínos foram inoculados em hamsters sorologicamente negativos para leptospiras

3.4. Sensibilidade e especificidade

Para determinação da sensibilidade e especificidade os dados foram registrados em tabela e fórmulas de cálculo de acordo com o preconizado por THORNER & REMEIN (1961).

QUADRO II

Tabela de cálculo da sensibilidade e especificidade de métodos de diagnóstico

Resultados da <i>L. patoc</i> como triagem	Diagnóstico		Total
	Doente	Não Doente	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Nota: a= indivíduos doentes detectados pelo teste;

b= falsos positivos para o teste;

c= falsos negativos para o teste;

d= indivíduos não doentes negativos para o teste.

Sensibilidade é calculada por $\frac{a}{a+c} \times 100$. É a percentagem de indivíduos com a doença que foram detectados pelo teste.

Especificidade é calculado por $\frac{d}{b+d} \times 100$. Corresponde à percentagem de indivíduos não doentes que foram negativos para o teste.

O exame de 770 soros de suínos provenientes de 26 municípios de Minas Gerais através do teste de MAR, revelou 635 (82,4%) reações positivas para um ou mais sorotipos de leptospiras com títulos de 1:100 ou maior. Os sorotipos predominantes por municípios estão descritos no Quadro III e Figura 1.

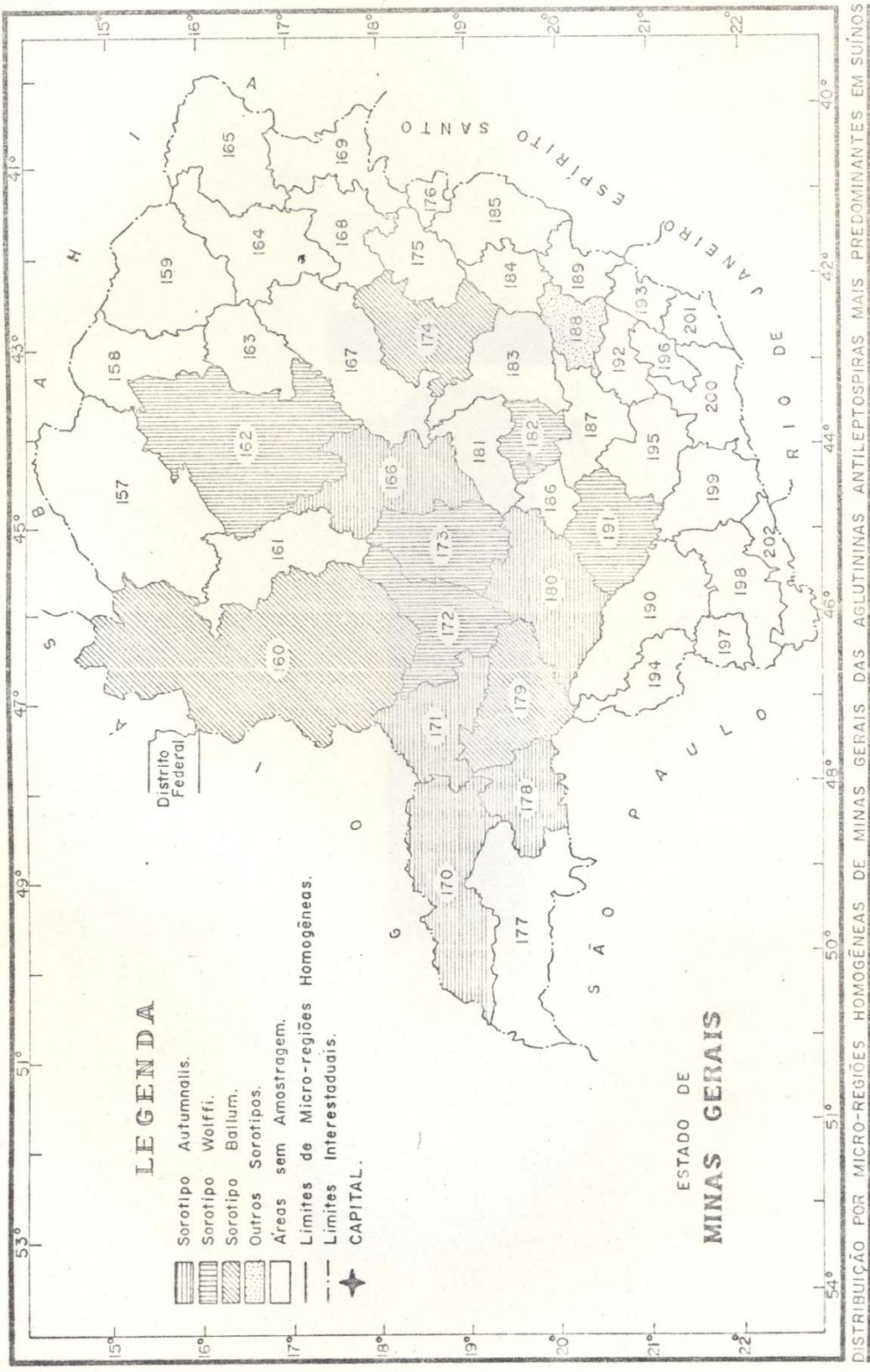
A frequência de soros reagentes positivos aos sorotipos utilizados, está registrada no Quadro IV. Neste quadro nota-se que o sorotipo *autumnalis* (38,5%) foi o de maior frequência, seguido de *wolffi* (33,5%), *ballum* (32,9%), *butembo* (27,5%), *bratislava* (22,6%), *bataviae* (16,4%), *javanica* (13,9%), *icterohaemorrhagiae* (12,8%) e *pomona* (10,6%).

A determinação do título final de cada soro de suíno foi feita pelo teste de MAR e os resultados estão registrados no Quadro V. Pode-se verificar que os títulos aglutinantes mais elevados foram encontrados em três soros reagentes para o sorotipo *pomona* nas dilui-

ções 1:6400, 1:3200 e 1:1600, respectivamente. Outros quatro soros reagiram para o sorotipo *autumnalis* na diluição a 1:800.

Das 100 amostras de rins 19 (19%) foram positivas para leptospiros através de IFD conforme mostram o Quadro VI. As tentativas de isolamentos através de inoculações de macerados de rins de suínos em hamsters e sementeiras em meio semi-sólido de Fletcher foram negativas. Entretanto, três hamsters inoculados apresentaram títulos aglutinantes no teste de MAR(1:100) para os sorotipos *ballum*, *autumnalis* e *pomona*. Dois soros de hamsters inoculados com macerados de rins de suínos, positivos para leptospira através da IFD, foram negativos aos testes de MAR. Outros cinco rins de suínos, cujos soros dos animais correspondentes apresentaram-se negativos para leptospiros através dos testes de MAR, foram positivos à IFD.

O Quadro VII mostra os resultados da sensibilidade e especificidade da *L. patoc* amostra *Patoc I* como antígeno de triagem, quando confrontada com outras leptospiros patogênicas utilizadas na execução das reações de MAR dos 770 soros de suínos.



LEGENDA

-  Sorotipo Autumnalis.
-  Sorotipo Wolffi.
-  Sorotipo Ballum.
-  Outros Sorotipos.
-  Áreas sem Amostragem.
-  Limites de Micro-regiões Homogêneas.
-  Limites Interstaduais.
-  CAPITAL.

ESTADO DE
MINAS GERAIS

DISTRIBUIÇÃO POR MICRO-REGIÕES HOMOGÊNEAS DE MINAS GERAIS DAS AGLUTININAS ANTIPTOSPIRAS MAIS PREDOMINANTES EM SUINOS

QUADRO III

Freqüência de reações positivas em soros de suínos pelo teste de MAR com leptospiras e predominância de sorotipos por municípios do Estado de Minas Gerais, no período de 1974/75

Municípios	Soros			Predominância	
	Examinados	Positivos		Sorotipos	%
	Nº	Nº	%		
Araxá	18	18	100,0	<i>ballum</i>	61,1
Betim	25	23	92,0	<i>wolffi</i>	60,0
Carmo Paranaíba	38	36	94,7	<i>tarassovi</i>	63,1
Conceição das Alagoas	37	22	59,4	<i>autumnalis</i>	35,1
Contagem	3	3	100,0	<i>ballum</i>	66,6
Corinto	32	24	75,0	<i>autumnalis</i>	50,0
Coromandel	43	25	58,1	<i>icterohaemorrhagiae</i>	23,2
Cruzeiro de Fortaleza	18	17	94,4	<i>autumnalis</i>	44,4
Esmeraldas	58	54	93,1	<i>wolffi</i>	34,4
Felixlândia	38	36	94,7	<i>wolffi</i>	68,4
Formiga	28	28	100,0	<i>wolffi</i>	78,5
Guimarânia	21	20	95,2	<i>wolffi</i>	76,1
Ituiutaba	72	45	62,5	<i>autumnalis</i>	26,3
Jequereí	10	7	70,0	<i>bratislava</i>	40,0
João Pinheiro	17	15	88,2	<i>ballum</i>	58,8
José de Melo	16	14	87,5	<i>bratislava</i>	56,2
Lagoa Formosa	25	23	92,0	<i>wolffi</i>	52,0
Luz	10	5	50,0	<i>autumnalis</i>	50,0
Montes Claros	25	24	96,0	<i>wolffi</i>	68,0
Pains	26	24	92,3	<i>butembo</i>	50,0
Patos de Minas	22	9	40,9	<i>autumnalis</i>	31,8
Ponte Nova	10	3	30,0	<i>pomona</i>	66,6
Ribeirão das Neves	49	43	87,7	<i>wolffi</i>	40,8
Santa Luzia	20	12	60,0	<i>autumnalis</i>	25,0
Santa Vitória	83	79	95,1	<i>autumnalis</i>	51,8
São Pedro do Suassuí	26	26	100,0	<i>ballum</i>	57,6
Total	770	635	82,4	-	-

QUADRO IV

Percentagens de reagentes à MAR para *Leptospira* em 770 soros de suínos em Minas Gerais abatidos em Belo Horizonte, no período de 1974/75.

Sorotipos	Positivos	
	Nº	%
<i>patoc</i>	595	77,2
<i>autumnalis</i>	297	38,5
<i>wolffi</i>	258	33,5
<i>ballum</i>	245	32,9
<i>butembo</i>	212	27,5
<i>bratislava</i>	174	22,6
<i>bataviae</i>	127	16,4
<i>javanica</i>	107	13,9
<i>icterohaemorrhagiae</i>	99	12,8
<i>pomona</i>	82	10,6
<i>tarassovi</i>	77	16,4
<i>canicola</i>	67	8,7
<i>gryppotyphosa</i>	57	7,4
<i>australis</i>	39	5,0
<i>pyrogenes</i>	38	4,9
<i>panama</i>	11	1,4

QUADRO V

Títulos finais dos soros de suínos de Minas Gerais abatidos em Belo Horizonte no período de 1974/75 positivos ao teste de MAR

Sorotipos	Títulos								Total
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400		
<i>icterohaemorrhagiae</i>	83	11	5	-	-	-	-	-	89
<i>javanica</i>	60	21	26	-	-	-	-	-	107
<i>canicola</i>	55	6	6	-	-	-	-	-	67
<i>balum</i>	209	12	24	-	-	-	-	-	245
<i>pyrogenes</i>	38	-	-	-	-	-	-	-	38
<i>butembo</i>	160	42	10	-	-	-	-	-	212
<i>autumnalis</i>	135	84	74	4	-	-	-	-	297
<i>australis</i>	36	3	-	-	-	-	-	-	39
<i>bratislava</i>	174	-	-	-	-	-	-	-	174
<i>pomona</i>	55	16	8	-	1	1	1	1	82
<i>grippotyphosa</i>	52	4	1	-	-	-	-	-	57
<i>wolffi</i>	117	103	38	-	-	-	-	-	258
<i>bataviae</i>	98	26	3	-	-	-	-	-	127
<i>tarassovi</i>	68	9	-	-	-	-	-	-	77
<i>panama</i>	11	-	-	-	-	-	-	-	11
<i>patoc</i>	-	167	337	89	2	-	-	-	595

QUADRO IV

Resultados dos testes de MAR em soros de suínos, de soros de hamsters inoculados com triturados de rins de suínos positivos à IFD

nº suíno	Títulos dos soros suínos				Títulos dos soros de hamsters inoculados com rim suíno (1)					
	L.ict.	L.bal.	L.aut.	L.brat.	L.pom.	L.grip.	L.wolf.	L.bal.	L.aut.	L.pom.
1 L1	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-
3 L1	-	1:200	1:100	-	-	1:100	1:100	1:100	-	-
9 L2	-	1:200	1:800	1:100	-	-	-	NI	NI	NI
1 L3	1:100	1:400	1:200	-	-	1:100	1:100	NI	NI	NI
5 L3	-	-	1:200	1:100	1:100	-	-	NI	NI	NI
13 L3	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI
15 L3	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI
1 L4	1:100	1:100	1:100	-	-	-	-	-	-	-
5 L4	-	-	1:200	1:100	-	-	-	-	1:100	-
6 L4	1:100	-	1:100	-	-	-	1:200	NI	NI	NI
9 L4	-	-	-	-	1:100	-	-	NI	NI	NI
15 L4	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI
1 L5	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI
8 L5	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI
2 L6	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI
1 L7	1:100	-	1:400	-	-	-	-	NI	NI	NI
4 L7	1:200	-	1:400	-	-	-	-	NI	NI	NI
6 L7	-	-	1:200	-	-	-	-	NI	NI	NI
2 L8	-	-	-	-	1:6400	-	-	-	-	1:100

L.ict. = *L.ictetohaemorrhagiae*; L.bal. = *L.balrum*; L.aut. = *L.autumnalis*; L.brat. = *L.bratislava*; L.pom. = *L.pomona*; L.grip. = *L.grippyphosa*; L.wolf. = *L.wolffi*.

(1) Os soros de hamster foram obtidos 30 dias após à inoculação com triturado de rim suíno

NI = Não foram inoculados

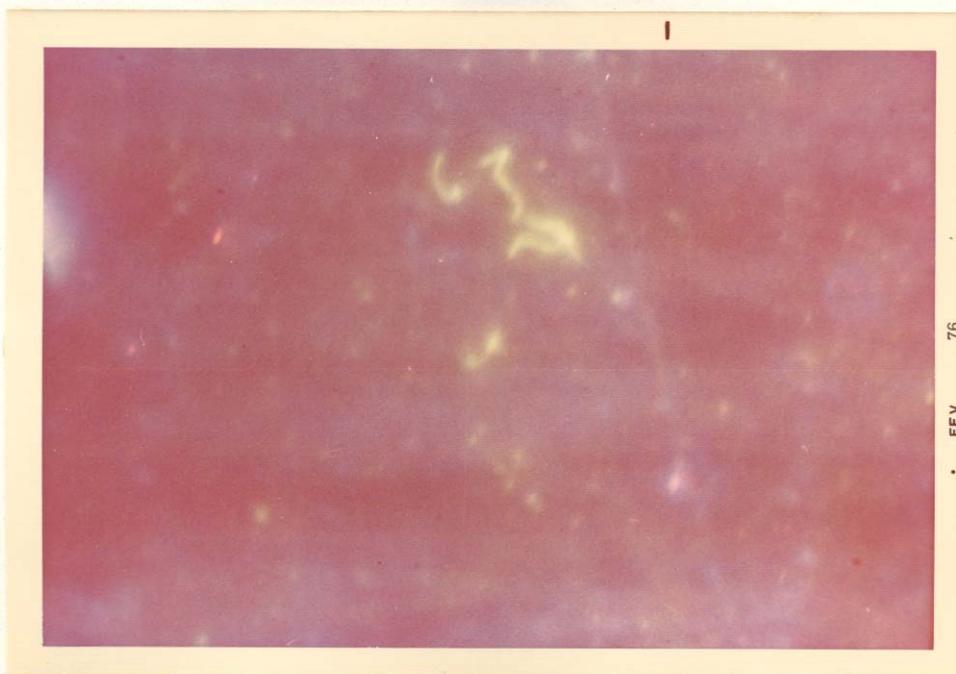


Fig. 2 - Leptospiras em corte de congelação de rim de suíno através da imunofluorescência direta. Aumento de 400X e dois minutos de exposição.

QUADRO VII

Sensibilidade e especificidade da *L. patoc* amostra Patoc I como antígeno de triagem pelo teste de MAR para suínos, calculados em 770 soros

Sorotipos	Sensibilidade %	Especificidade %
<i>icterohaemorrhagiae</i>	93,9	25,1
<i>javanica</i>	96,2	25,7
<i>canicola</i>	95,3	24,3
<i>ballum</i>	93,8	30,4
<i>pyrogenes</i>	97,3	23,7
<i>butembo</i>	89,1	27,2
<i>autumnalis</i>	87,5	29,1
<i>australis</i>	82,0	22,9
<i>bratislava</i>	89,6	26,3
<i>pomona</i>	92,4	24,4
<i>grippotypbosa</i>	96,4	24,2
<i>wolffi</i>	94,1	38,8
<i>bataviae</i>	94,4	26,1
<i>tarassovi</i>	75,3	22,5
<i>panama</i>	81,8	22,7
\bar{x}	90,6	26,2

Pelos resultados encontrados no presente trabalho, observa-se que as infecções em suínos por leptospiros são bastante difundidas no Estado de Minas Gerais, pois dos 26 municípios de origem dos soros, todos apresentaram animais reagentes ao teste de MAR. Dentre 770 soros examinados, 635 (82,4%) mostraram-se positivos para um ou mais sorotipos, com títulos aglutinantes variando de 1:100 até 1:6400.

A alta frequência (82,4%) de aglutininas anti-leptospira comparado com 29,1% encontrado por BARBOSA (1962) em 86 soros de suínos e 11,9% por REIS & cols. (1973) em 124 suínos, pode ser atribuído a diferenças de local, título mínimo das reações, tipo de amostra e método de microaglutinação.

O sorotipo *autumnalis*, com 297(38,5%) reações positivas, foi predominante. (Quadro IV). Como pode ser observado no Quadro III ocorreu variações de sorotipos entre os diversos municípios estudados. Esta variação de frequência para cada sorotipo depende da área pes-

quisada. Por exemplo, os dados europeus de ALSTON & BROON (1958) demonstraram que a *L. autumnalis* foi responsável por grande número de infecções em suínos. Já em São Paulo, em duas épocas diferentes em condições de matadouros, SANTA ROSA & cols. (1962a) e SANTA ROSA & cols. (1973b) encontraram, respectivamente, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona* como espécies mais prevalentes.

Também no Quadro IV pode ser verificado que o sorotipo *wolffii* foi muito frequente, apresentando 258 (33,5%) reações positivas em 770 soros testados. Chama a atenção da possibilidade da existência de suínos em promiscuidade com bovinos, por ser este sorotipo comum nesta espécie animal (SANTA ROSA & cols., 1969/70).

O sorotipo *ballum*, o terceiro em frequência no presente inquérito (Quadro IV) foi isolado de suínos por KMETY & cols. (1956) na Tchecoslováquia e responsabilizado por infecções humanas na França, Espanha, Iugoslávia e Porto Rico como relataram ALSTON & BROON (1958). É importante notar que os suínos usados neste trabalho eram aparentemente normais, porém, poderiam estar funcionando como fontes de infecção. De fato, este

seria, ainda, o papel mais importante destes suínos na saúde pública pois, na qualidade de portadores de *L. ballum*, poderiam infectar os homens que com eles lidaram.

Ainda no Quadro IV verifica-se que o sorotipo *butembo* com 212 (27,5%) reações positivas com títulos de até 1:400, deve participar como uma das espécies importantes provocando infecção de suínos em Minas Gerais. A inexistência ou as raras atribuições a *L. butembo* como causa de infecção nos suínos, talvez se deva ao fato da maioria dos autores não incluírem este sorotipo em suas baterias de antígenos.

Os sorotipos *bratislava* e *australis* pertencentes ao sorogrupo *australis*, têm sido responsabilizado em vários levantamentos sorológicos como causa de infecção em suínos (KEAST & cols., 1956; CASTRO & cols., 1962; SANTA ROSA & cols., 1962a). No presente trabalho, a baixa frequência de reações positivas para o sorotipo *australis* e os baixos títulos apresentados pelo sorotipo *bratislava*, possivelmente poderiam ser atribuído a infecções esporádicas ou afinidades antigênicas.

A participação dos sorotipos *bataviae* e *java-*

nica foi bastante expressiva apresentando 127 (16,4%) e 107 (13,9%) reações positivas, respectivamente. Embora não sejam habitualmente considerados importantes na epidemiologia da leptospirose suína são encontrados, às vezes, em levantamentos sorológicos apesar de serem em menores percentagens (KISZEL & FUZI, 1957; SALMINEN, 1958; BABUDIARI, 1959; SANTA ROSA & cols., 1973b). Os dados encontrados sugerem um aumento do número de portadores de *L. bataviae* e *L. javanica* em nosso meio.

A *L. icterohaemorrhagiae* não muito frequente na espécie suína, já foi isolada e evidenciada através de provas de soroaglutinação por SANTA ROSA & cols. (1962a), MICHNA & CAMPBELL (1969), RYU & cols. (1972), McERLEAN (1973a) e McERLEAN (1973b). Com uma frequência de 99 (12,8%) reações positivas, sugere que este sorotipo tem aumentado de importância nas criações de suínos, como também em saúde pública, pois é o agente etiológico da conhecida "doença de Weil".

Nas infecções dos suínos por leptospiras o sorotipo *pomona* tem sido observado desde longa data através de provas sorológicas (VAN DER HOEDEN, 1958; BRAVO & cols., 1968; LICERAS DE HIDALGO, 1970; SANTA

ROSA & cols., 1973b). O índice de 82 (10,6%) reagentes positivos na presente investigação, com títulos aglutinantes até 1:6400 para esse sorotipo, permite equilar a importância do mesmo na epidemiologia das leptospiroses suína. Sabe-se hoje que, animais infectados com este sorotipo, representam uma fonte de disseminação para outros rebanhos suínos. Este fato se reveste de importância, pois em nossas condições, por exemplo, este sorotipo já foi isolado em surtos de abortos suíno no Estado de São Paulo (SANTA ROSA & cols., 1962b e SANTA ROSA & cols., 1973a), zona de criação exportadora de reprodutores. Existe, portanto, razões para se pensar na necessidade de exames para leptospira de animais que serão importados de outros estados.

Outros sorotipos como a *L. tarassovi* e *L. canicola* têm sido responsabilizados por infecções em suínos através de pesquisas sorológicas (MICHNA & CAMPBELL, 1969 e SANTA ROSA & cols., 1962a) como também isolados em casos de abortos e suínos aparentemente normais (GUIDA, 1958; GUIDA, 1959 e SANTA ROSA & cols., 1962a). A frequência de reações positivas dos sorotipos *tarassovi* 77 (10,0%) e *canicola* 67 (8,7%) no presente

trabalho se assemelha às frequências encontradas pelos autores citados anteriormente. Diante destas considerações pode-se salientar a importância desta zoonose, particularmente a produzida pela *L. canicola*, como alerta às autoridades sanitárias da possibilidade de se tornar problema de saúde pública, principalmente para os indivíduos que trabalham em contato direto com carcaças de suínos.

Os sorotipos *grippotyphosa*, *pyrogenes* e *panama*, apresentaram baixos índices de reações positivas, possivelmente em decorrência de infecções esporádicas. Vale lembrar, entretanto, que estes sorotipos já foram diagnosticados em outros inquéritos sorológicos (SANTA ROSA & cols., 1962b; CASTRO & cols., 1962; SANTA ROSA & cols., 1973b).

As tentativas de isolamentos através de inoculação em hamster e semeadura em meio semi-sólido de Fletcher foram negativas. A dificuldade encontrada na presente investigação e também pela maioria dos autores em se conseguir isolar leptospiros, talvez se deva aos seguintes fatos: infecção provocada por um número pequeno de bactérias, leptospiros mortos devido a idade

dos animais ou uma reação imunológica local (MICHNA & CAMPBELL, 1969) que no ato de trituração dos fragmentos de rins facilitaria uma combinação antígeno-anticorpo, diminuindo com isto, a chance de se encontrar leptospiras livres e vivas para o isolamento. O tempo gasto da colheita do material até a inoculação em animais ou em meios de cultura, não é de grande importância, pois foi demonstrado por MICHNA (1959), que em material macerado à temperatura ambiente as leptospiras permanecem ativamente móveis e viáveis por um a três dias.

Dos hamsters inoculados com macerados de rins, três apresentaram, 30 dias após, títulos aglutinantes (1:100) para os sorotipos *autumnalis*, *ballum* e *pomona* no teste de MAR. Este fato de se conseguir demonstrar aglutininas anti-leptospira no soro sanguíneo de animais inoculados, serve como demonstração da presença de bactéria, apesar do insucesso no isolamento (FENNESTAD & BORG-PETERSEN, 1961). Todavia, é necessário um número mínimo de microrganismo capaz de estimular no animal inoculado uma resposta imunológica. Isto pode ser observado, pois dois soros de hamsters inoculados com rins de suínos positivos à IFD (Figura 2) foram negati-

vos aos testes de MAR (Quadro VI).

No presente trabalho observou-se a não especificidade apresentada pela técnica de IFD, relatada por MOULTON & HOWARTH (1957); WHITE & RISTIC (1959) e DACRES (1961) uma vez que foram coradas leptospi^ras diferentes das usadas na preparação do conjugado. As leptospi^ras coradas pela IFD conservaram a mesma morfologia filiforme, apenas um pouco mais espessadas, soltas nos interstícios celulares, nunca em vasos ou tubos renais, Figura 2. A dificuldade em diferenciar as leptospi^ras, quando em pequeno número, de artefatos (BOULANGER & ROBERTSON, 1961) foi, também, observado em algumas preparações no presente trabalho, pois em cinco casos em que os soros de suínos eram negativos ao teste de MAR, seus rins correspondentes foram positivos à IFD. Este fato poderia ser atribuído também a infecções recentes ou a reações cruzadas com outros microrganismos. Os 19% de reações positivas demonstrados pela técnica de IFD neste trabalho, evidenciam a eficiência da mesma, fato já relatado por SHELDON (1953); COFFIN & MAESTRONE (1962) MAESTRONE (1963); SMITH & cols. (1966) e SEUK & SEO (1973), para demonstrar leptospi^ras em tecidos animais,

Vários autores relataram a eficiência do uso da *L. patoc* amostra *Patoc I* como antígeno de triagem no diagnóstico das leptospiroses humanas, através de imunofluorescência indireta (TORTEN & cols., 1966); a glutinação microscópica (GALTON & cols., 1957 e CORREA, 1969/70) ou fixação de complemento (STURDZA & ELIAN, 1961 e PINTO & cols., 1974) eliminando, desta forma, a necessidade de uso de grande número de sorotipos pa ra fins de diagnóstico.

A *L. patoc* amostra *Patoc I* apresentou, neste trabalho, 90,6 % de sensibilidade e 26,2 % de espe cificidade em média. Devido a esta diferença, isto é, alta percentagem de sensibilidade e baixa de especi ficidade, o uso desta leptospira como antígeno de tria gem, poderia acarretar um número muito grande de fal sos positivos e falsos negativos no diagnóstico de lep tospirose em suínos. Esta diferença existente entre a sensibilidade e especificidade torna a *L. patoc* ina dequada para uso no teste de MAR como antígeno poliva lente, o que concorda com ADAMIANO & BABUDIERI (1968)

e SANTA ROSA & PINTO (1974) que desaconselham o uso des
ta leptospira como antígeno de triagem no diagnóst^ostico
de leptospirose animal.

1. Os sorotipos de *Leptospira* mais frequentes em suínos de Minas Gerais foram *autumnalis* (38,5%), *wolffi* (33,5%), *ballum* (32,9%), *butembo* (27,5%), *bratislava* (22,6%), *bataviae* (16,4%), *javanica* (13,9%), *icterohaemorrhagiae* (12,8%) e *pomona* (10,6%);
2. dos 26 municípios de Minas Gerais estudados, todos apresentaram animais reagentes à leptospira, o que demonstra a grande difusibilidade deste microrganismo, entre os suínos, neste Estado;
3. não se isolou leptospiros, entretanto, demonstrou-se aglutininas anti-leptospiros no soro sanguíneo de hamsters inoculados com macerados de rins de suínos;
4. a técnica de IFD não apresentou especificidade em corar os diversos sorotipos de leptospiros;
5. a técnica de IFD é de elevada eficiência em demonstrar leptospiros em cortes de congelação de rim de suíno;

6. a *L. patoc* amostra *Patoc I* foi inadequada como antígeno de triagem no teste de MAR para diagnóstico das leptospiroses suína.

Exames de 770 soros de suínos provenientes de 26 municípios de Minas Gerais, feitos através do teste de microaglutinação rápida (MAR) revelaram 635 (82,4%) reações positivas para um ou mais sorotipos de leptospiras com títulos de 1:100 ou maior. Pela frequência de soros reagentes positivos aos sorotipos utilizados, foi observado que o sorotipo *autumnalis* (38,5%) foi o de maior frequência, seguido de *wolffi* (33,5%), *ballum* (32,9%), *butembo* (27,5%), *bratislava* (22,6%), *bataviae* (16,4%), *javanica* (13,9%), *icterohaemorrhagiae* (12,8%) e *pomona* (10,6%).

Das 100 amostras de rins de suínos examinadas pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) 19(19%) foram positivas para leptospiras. As tentativas de isolamentos foram negativas. Entretanto, três hamsters inoculados com macerados de rins de suínos, apresentaram títulos aglutinantes (1:100) no teste de microaglutinação rápida para os sorotipos *ballum*, *autumnalis* e *pomona*.

O estudo comparativo entre as reações de microaglutinação rápida com leptospiros patogênicas e a *L. patoc* amostra *Patoc* I no diagnóstico das leptospiroses suínas revelou uma irregularidade estatística entre a sensibilidade (90,6%) e especificidade (26,2%) desta amostra, não sendo aconselhado o uso da *L. patoc* amostra *Patoc* I como antígeno de triagem no diagnóstico das leptospiroses suína.

Sera obtained from 770 swine in 26 counties of the State of Minas Gerais, Brazil, were examined by the rapid microscopic agglutination test. There were 635 (82.4%) positive reactions for one or more leptospiral serotypes at dilutions of 1:100 or higher. Based on the frequency of positive reacting sera for the utilized serotypes, the serotype *autumnalis* (38.5%) was the most frequent, followed by *wolffi* (33.5%), *ballum* (32.9%), *butembo* (27.5%), *bratislava* (22.6%), *bataviae* (16.4%), *javanica* (13.9%), *icterohaemorrhagiae* (12.8%) and *pomona* (10.6%).

Of the swine kidney samples examined by the direct immunofluorescence technique 19% were positive for inoculated with ground samples from swine kidneys had agglutinating titers (1:100) in the rapid microscopic agglutination test for the serotypes *ballum*, *autumnalis* and *pomona*.

The comparative study between the rapid

microscopic agglutination reactions with pathogenic leptospiras and with the *L. patoc* strain *Patoc* I in the diagnosis of swine leptospirosis revealed a statistic irregularity between the sensitivity (90.6%) and specificity (26.2%) of this strain, as a screening antigen. Based on these results, *L. patoc* strain *Patoc* I would not be recommended as a screening antigen for the diagnosis of swine leptospirosis.

- ADAMIANO, L. & BABUDIARI, B. 1968. Water strains of *Leptospira* in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. Bull. W.H.O., Genève, 39:925-943.
- ALSTON, J.M. & BROOM, J.C. 1958. Pigs, cattle, sheep, goats, horse. In: Leptospirosis in man and animals. Edinburgh, E. & S. Livington. p. 237-254.
- ARAÚJO, R.F.; REIS, R.; RYU, E. 1973. Avaliação clínica do uso de oxitetraciclina em leptospirose suína. Arq. Esc. Vet. U.F.M.G., Belo Horizonte, 25:127-30.
- BABUDIARI, B. 1959. *Leptospira* and leptospirosis in Italy. Sci. Med. Ital., 5:658-702.
- BARBOSA, M. 1962. Aglutininas e lisinas anti-leptospira em soros de bovinos, eqüinos e suínos em Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. U.F.M.G., Belo Horizonte, 14: 1-26.
- BOULANGER, P. & ROBERTSON, A. 1961. Fluorescein labeled antibody technique for the demonstration of *Leptospira pomona*. Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., Gardenvale, 25:299-306.

- BRAVO, C.; RESTREPO, M.; ROBLEDO, M.; PEREZ, J. 1968. Leptospirosis in Antioquia, Colombia. I - Isolation of *L. pomona* from pigs. Antioquia Med., 18:475-81 apud Biol. Abstr., 50, 11800, 1969.
- CASTRO, A.F.P.; SANTA ROSA, C.A.; CALDAS, A.D. 1962. Isolamento de *L. canicola* de suínos abatidos em matadouro. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 29:193-7.
- CESSI, D. & SOLDATI, G. 1970. Leptospirosi suína: indagine sierologica in suine da carne della Provincia di Modena. Atti Soc. Ital. Sci. Vet., Faenza, 24:620-1.
- COFFIN, D.L. & MAESTRONE, G. 1962. Detection of leptospirosis by fluorescent antibody. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 23:159-64.
- COONS, A. H. & KAPLAN, M. H. 1950. Localization of antigen in tissue cells. Improvements in a method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med., New York, 91:1-13.
- CORREA, M.O.A. 1969/70. Leptospiroses em São Paulo, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 29/30: 29-37.

- DACRES, W. G. 1961. Fluorescein-labeled antibody technique for the identification of leptospiral serotypes. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 22:570-2.
- DUTRA, M.J. 1974. Incidência de leptospirose em suínos no Paraná. Arq. Biol. Tecnol., Curitiba, 17:70-4.
- ENRIETTI, M.A. 1954. Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospirosas em murídeos, caninos e suínos no Paraná. Arq. Biol. Tecnol., Curitiba, 9: 21-72.
- FENNESTAD, K.L. & BORG-PETERSEN, C. 1962. Antibody and plasma cells in bovine fetuses infected with *Leptospira saxkoebing*. J. Infect. Dis., Chicago, 10: 63-9.
- FLETCHER, W. 1928. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 21:265-87. In: Manual sobre métodos de laboratório para leptospiroses. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota técnica, nº 9, 60 p.
- GALTON, M.M.; POWERS, D.K.; HALL, A.D.; CORNELL, R.G. 1958. A rapid macroscopic-slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 19:505-12.

- GALTON, M.M.; MENGES, R.W.; SHOTTS Jr., E.B.; NAHMIAS, A.J. & HEATH, C.W. 1962. Leptospirosis. Epidemiology, clinical manifestation in man and animals, and methods in laboratory diagnosis. Public Health Serv., Washington, 951.
- GUIDA, V.O. 1947/48. Sobre a presença de *Leptospira* em suínos no Brasil. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 18:285-7.
- GUIDA, V.O. 1952. Pesquisa sorológica de uma amostra de *Leptospira* isolada de porcos. Arq. Biol. Tecnol., Curitiba, 7:21-2.
- GUIDA, V.O. 1958. Identificação sorológica de amostras de *Leptospira* (*L. hyos*) isolada de suínos. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 25:73-5.
- GUIDA, V.O.; CINTRA, M.L.; SANTA ROSA, C.A.; CALDAS, A. D.; CORREA, M.O.; NATALE, V. 1959. Leptospirose suína provocada pela *L. canicola* em São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 26:49-54.
- HODGES, R.T. & EKDAHL, M.O. 1973. Use of fluorescent antibody technique for the serological serotypes in cultures and in bovine urine. N.Z. Vet. J., Wellington, 21:109-15.

- KEAST, J.; FORBES, B.; WANNAN, J.S. 1956. Serological survey of pigs in New South Wales for leptospirosis and the incidence of swine abortion. Aust. Vet. J., Sydney, 32:11-6.
- KMETY, E.; PLESKO, I.; CHYLO, E. 1956. Epidemiological significance of pigs as reservoirs of leptospirosis. Ceskoslav. Epidemiol., Mikrobiol., Immunol., Prague, 5:301-4. In: WOODS, G.T.; GUSTAFSON, D.P.; HANSON, L. E.; ALBERTS, J.O. 1962. Experimental infection of swine with *Leptospira ballum*. Zoonoses Res., New York, 1:165-84.
- KISZEL, J. & FUZI, M. 1957. Investigation of leptospiral infection among domestic animals in a district in Southeast Hungary. Acta Microbiol., Budapest, 4:377-89. In: WOODS, G.T.; GUSTAFSON, D.P.; HANSON, L.E.; ALBERTS, J.D. 1962. Experimental infection of swine with *Leptospira ballum*. Zoonoses Res., New York, 1:165-84.
- LICERAS DE HIDALGO, J. & HIDALGO, R. R. 1970. Leptospirosis en el ganado y matarifes de tumbes, Peru. Bol. Of. Sanit. Panam., Washington, 68:297-306.

- MAESTRONE, C. 1963. The use of an improved fluorescent antibody procedure in demonstration of leptospira in animal tissues. Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., Gardenvale, 27:108-12.
- McERLEAN, B.A. 1973a. The isolation of leptospirae from the kidneys of bacon pigs. Irish. Vet. J., Dublin, 27:185-6.
- McERLEAN, B.A. 1973b. Leptospirosis in pigs: a serological survey. Irish. Vet. J., Dublin, 27:157-60.
- MICHNA, S.W. 1959. The survival of *Leptospira canicola* in the renal tissue of pig. Vet. Rec., London, 71: 549-52.
- MICHNA, S.W. & CAMPBELL, R.S.F. 1969. Leptospirosis in pigs: epidemiology, microbiology and pathology. Vet. Rec., London, 84:135-8.
- MOCHTAR, A. 1940. *Leptospira* in Batavia pigs. Geneesk. Tijdsch. Ned. Ind., 80:2334-45 apud Vet. Bul., Weybridge, 12:147, 1942.
- MOULTON, J.E. & HOWARTH, J.A., 1957. The demonstration of *Leptospira canicola* in hamster kidneys by means of fluorescent antibody. Cornell Vet., Ithaca, 47: 524-32.

- PINTO, A.A.; SANTA ROSA, C.A.; SAUDATSUNE, T.; FLEURY, G.C. 1974. Comparative study between complement fixation and microscopic agglutination test for leptospiral diagnosis. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 16:28-31.
- REIS, R.; RYU, E.; PENA, C.M. 1973. Pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em bovinos e suínos em Minas Gerais, Brasil. Arq. Esc. Vet. U.F.M.G., Belo Horizonte, 25:11-4.
- RYU, E. 1970. Rapid Microscopic Agglutination test for leptospira based on 400 X magnification of dark field examination. Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husb., Taipei, 17:1-9.
- RYU, E.; CHEN, C.Y.; TSAO, A.T.; MA, C.H. 1972. (Investigation of leptospira in boar semen). Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husb., Taipei (21):48-51.
- SALMINEN, A. 1956. Studies on the occurrence of various leptospiral types in Finland. Ann. Med. Exper. Biol., Fenniae, 34, suppl. 5 In: WOODS, G.T.; GUSTAFSON, D. P.; HANSON, L.E.; ALBERTS, J.O. 1962. Experimental infection of swine with *Leptospira ballum*. Zoonoses Res., New York, 1:165-84.

- SANDER, F. 1935. The transmission of Weil's disease by swine. Arch. Hvg., Berlin, 113:279-82 apud Vet. Bul., Weybridge, 5:622-3, 1935.
- SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; CALDAS, A.D. 1962a. Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* e *Leptospira hyos* de suínos abatidos em matadouro. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 20:285-92.
- SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; TROISE, C. 1962b. Isolamento de *Leptospira pomona* de suíno em São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 29:165-74.
- SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; SILVA, A.S.; TERUYA, J.M. 1969/70. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 29/30:19-27.
- SANTA ROSA, C.A.; SILVA, A.S.; GIORGI, W.; MACHADO, A. 1973a. Isolamento de leptospira, sorotipo *pomona* e *Brucella suis*, de suínos do Estado de Santa Catarina. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 40:29-32.
- SANTA ROSA, C.A.; CAMPADELLI FILHO, O.; CASTRO, A.F.P. 1973b. Suínos como reservatório de leptospiras no Brasil. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 40:243-6.

- SANTA ROSA, C.A. & PINTO, A.A. 1974. Reação da fixação do complemento no diagnóstico de leptospirose animal. Emprego de um antígeno de amostra apatogênica. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 41:19-23
- SEUK, H.B. & SEO, I.S. 1973. Detection of leptospirosis experimentally infected mice, using fluorescent antibody technique. Korean J. Vet. Res., Seoul, 13: 39-46.
- SHELDON, W.H. 1953. Leptospiral antigen demonstrated the fluorescent antibody technique in human muscle lesions of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., New York, 84:165-7.
- SMITH, A.E.; HENCH, E.C.; REYNOLDS, I.M. 1966. Experimental leptospirosis in pregnant ewes. Immunofluorescence in the diagnosis of fetal leptospirosis. Cornell Vet., Ithaca, 56:640-7.
- STUART, R.D. 1946. The preparation and use of a simple culture medium for leptospirae. J. Pathol. Bacteriol., London, 58:343-9.
- STURDZA, N. & ELIAN, M. 1961. Comparative study on different strains of *L. biflexa* as antigen for the complement fixation test in leptospirosis. Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., Bucuresti, 20:33-41.

- THORNER, R.M. & REMEIN, Q. 1961. Principles and procedures in the evaluation of screening for disease. Washington, United States Government Printing Office. 24 p. (Public Health Monograph, 67).
- TORTEN, M.; SHENBERG, E.; VAN DER HOEDEN, J. 1966. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus-specific antigen. J. Infect. Dis., Chicago, 116:537-43.
- VAN DER HOEDEN, J. 1958. Epizootiology of leptospirosis. In: WOODS, G.T.; GUSTAFSON, D.P.; HANSON, L.E.; ALBERTS, J.O. 1962. Experimental infection of swine with *Leptospira ballum*. Zoonoses Res., New York, 1: 165-84.
- WHITE, F.H. & RISTIC, M. 1959. Detection of *Leptospira pomona* in guine pig and bovine urine with fluorescein-labeled antibody. J. Infect. Dis., Chicago, 105:118-23.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION 1967. Current problems in leptospirosis research. Report of a W.H.O. expert group. Wld. Health Org. Techn. Rep. Serv. 380.