

1683  
B2423  
L222

Universidade Federal de Minas Gerais  
Conselho de Pós-Graduação  
Escola de Veterinária



DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE: COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE TRIAGEM  
EM BOVINOS E CAPRINOS

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
1988

Theomar de Figueiredo e Silva Barcellos

DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE: COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE TRIAGEM  
EM BOVINOS E CAPRINOS

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



000240228906 000

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

Belo Horizonte

Minas Gerais

1988

*Ex 103/1/100*

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRI

16.08.89

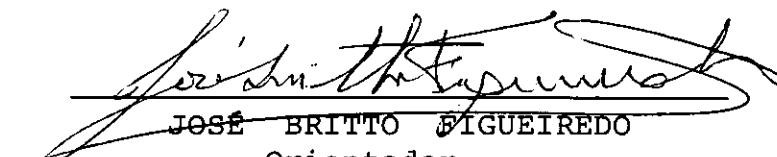
B242d Barcellos, Theomar de Figueiredo e Silva, 19  
Diagnóstico da leptospirose: comparação de técnicas  
de triagem em bovinos e caprinos/  
Theomar de Figueiredo e Silva Barcellos. - Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1988.

50 p. : il.-

Tese, Mestre em Medicina Veterinária  
1. Leptospirose em bovinos - Diagnóstico. 2. Leptospiro  
se em caprinos - Diagnóstico. I. Título.

636.089 692

Aprovada em 02/09/1988

  
\_\_\_\_\_  
JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO  
- Orientador -

  
\_\_\_\_\_  
MIDELVIRSON OLIVEIRA

  
\_\_\_\_\_  
EULÓGIO MOREIRA CALDAS

  
\_\_\_\_\_  
JOSÉ EURICO DE FARIA

Aos meus pais, Edir e Aparecida,  
ao meu marido, Celso,  
ao meu filho, Pedro,

dedico.



### AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Britto Figueiredo, pela orientação, estímulo e compreensão.

Ao Professor Nivaldo da Silva, pela orientação na iniciação científica.

Aos Professores Rômulo Cerqueira Leite e José Ailton da Silva pela ajuda prestada.

Ao Professor Rabindranah Loyola Contreras, ao estatístico Toshiyuki Tanaka e, especialmente ao colega Henrique Nunes de Oliveira, pelas sugestões nas análises estatísticas.

Aos demais professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, pelos ensinamentos oferecidos.

Ao LANARA, pela doação dos soros de caprinos.

Aos Professores Eulógio Moreira Caldas, da Escola de Veterinária da UFBA e Paulo Hideki Yasuda, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo fornecimento de sorotipos de Leptospira.

Ao funcionário Antônio Benjamim de Paula, pela colaboração nas atividades de laboratório e, principalmente, pela amizade.

Ao funcionário Luis André de Lima, pela atenção demonstrada.

Aos colegas dos cursos de mestrado, pelo companhei-

rismo e agradável convivência.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

E a todos que, embora não citados nominalmente, contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.



### AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha mãe, Aparecida, pelo apoio e grande desprendimento.

Ao meu marido, Celso, pela colaboração dedicada em diversas etapas da pesquisa e constantes carinho e estímulo, fundamentais para a conclusão deste trabalho.



## RESUMO

Neste trabalho foram pesquisados antígenos para testes de triagem no diagnóstico da leptospirose em bovinos e caprinos. Para tal, foram testados sorotipos apatogênicos e antígeno termo-resistente (ATR), os quais foram confrontados com uma bateria de sorotipos de *Leptospira interrogans*, tendo sido empregada a prova de micro-aglutinação rápida, considerada como padrão (RYU, 1970). As estirpes apatogênicas Buenos aires, Patoc e Rufino foram empregadas vivas, no teste da micro-aglutinação rápida, em 325 soros, sendo 138 de bovinos e 187 de caprinos. Os sorotipos *patoc*, com sensibilidades de 3,33% e 5,71% e o *rufino*, sensibilidades de 10,00% e 5,71%, respectivamente para bovinos e caprinos, confirmaram a impraticabilidade da utilização como antígenos para o diagnóstico. A estirpe Buenos aires apresentou melhor desempenho, mas os índices de sensibilidade, de 40,00% para bovinos e 31,42% para caprinos, foram insuficientes para justificar o emprego dela como antígeno único para triagem nestas espécies animais. O antígeno termo-resistente, preparado a partir da amostra Hond Utrecht IV, do sorotipo *canicola*, foi utilizado em prova de aglutinação macroscópica em 90 soros de bovinos e 90 de caprinos, dos quais 30 reagentes e 60 não reagentes à prova padrão com antígenos patogênicos de *Leptospira*. A sensibilidade de 93,33% e a especificidade de 75,00%, aliados à significância estatística dos resul-

tados, indicaram a possibilidade de utilização do antígeno termo-resistente como triagem para o diagnóstico da leptospirose em caprinos. Em bovinos, apesar da significância estatística, a sensibilidade de 93,33% e a baixa especificidade de 30,00%, epidemiologicamente de pouca expressão, não foram suficientes para recomendar sua utilização como antígeno único na triagem do diagnóstico da leptospirose.



## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Classificação.....	04
2.2. Leptospirose em bovinos e caprinos.....	05
2.3. Diagnóstico.....	08
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material.....	14
3.1.1. Amostragem.....	14
3.1.2. Avaliação estatística.....	15
3.2. Metodologia.....	16
3.2.1. Preparo dos antígenos vivos.....	16
3.2.2. Antígeno termo-resistente (ATR).....	16
3.2.3. Provas de hemo-soro-aglutinação.....	19
3.2.3.1. Microscópica.....	19
3.2.3.2. Macroscópica.....	19
3.2.4. Análises estatísticas.....	20
4. RESULTADOS.....	21

	Página
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÕES.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40



## LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA I - Soros de bovinos reagentes à prova de micro-aglutinação rápida (MAR), frente a sorotipos patogênicos. Minas Gerais, 1988.....	22
TABELA II - Soros de caprinos reagentes à prova de micro-aglutinação rápida (MAR), frente a sorotipos patogênicos. Minas Gerais, 1988....	23
TABELA III - Reações comparativas de soros de bovinos e caprinos, frente à micro-aglutinação rápida com sorotipos de <i>Leptospira interrogans</i> e <i>Leptospira biflexa</i> . Minas Gerais, 1988.....	24
TABELA IV - Sensibilidade e especificidade do antígeno <i>buenos aires</i> , em bovinos e caprinos, avaliadas pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR). Minas Gerais, 1988.....	25
TABELA V - Soros de bovinos analisados pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e o antígeno apatogênico <i>buenos aires</i> . Minas Gerais, 1988.....	26

TABELA VI	- Soros de caprinos analisados pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e o antígeno apatogênico <i>buenos aires</i> . Minas Gerais, 1988.....	28
TABELA VII	- Reações comparativas de soros de bovinos e caprinos frente ao teste de micro-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e ao teste macroscópico com antígeno termo-resistente (ATR). Minas Gerais, 1988.....	29
TABELA VIII	- Soros de bovinos analisados pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e pelo teste macroscópico com o antígeno termo-resistente (ATR). Minas Gerais, 1988.....	30
TABELA IX	- Soros de caprinos analisados pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e pelo teste macroscópico com o antígeno termo-resistente (ATR). Minas Gerais, 1988.....	31
TABELA X	- Sensibilidade e especificidade do antígeno termo-resistente (ATR), em bovinos e caprinos, avaliadas pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR). Minas Gerais, 1988....	32

## LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Algumas pesquisas sobre a presença de aglutininas anti-leptospiras em soros de bovinos, em diferentes estados brasileiros - 1988.....	06
QUADRO 2 - Algumas pesquisas sobre a presença de aglutininas anti-leptospiras em soros de caprinos, em diferentes países - 1988.....	07
QUADRO 3 - Sorotipos de <i>Leptospira interrogans</i> usados como antígenos no teste de micro-aglutinação rápida (MAR) em soros de bovinos - Minas Gerais - 1988.....	17
QUADRO 4 - Sorotipos de <i>Leptospira interrogans</i> usados como antígenos no teste de micro aglutinação rápida (MAR) em soros de caprinos - Minas Gerais - 1988.....	18



## 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é importante zoonose, de ampla distribuição geográfica, capaz de interferir significativamente no bem estar das populações urbanas e rurais. Assim, merece consideração especial sob o ponto de vista de saúde pública e, também, no que se refere aos aspectos econômicos (SAIZ MORENO, 1976). Apesar de todos os esforços para seu combate, permanece afetando a saúde dos rebanhos e, conseqüentemente, a disponibilidade de proteína animal para as populações (BLENDEN, 1976).

O agente etiológico se enquadra na Ordem *Spirochaetales*, família *Spirochaetaceae* e gênero *Leptospira* (BUCHANAN & GIBBONS, 1975), que compreende duas espécies: *Leptospira interrogans*, patogênica para o homem e os animais, e *Leptospira biflexa*, saprófita, encontrada comumente na água e no solo (MYERS, 1985).

A leptospirose acomete o homem e, praticamente, todos os animais domésticos, tendo no rato seu portador sadio universal (SILVA et alii, 1974). O cão, esgoto, água, lama e lixo contaminados constituem as outras principais fontes de infecção (CALDAS, 1976). Suas manifestações clínicas variam de acordo com o sorotipo infectante, a espécie animal infectada e as condições ambientais (SANTA ROSA, 1977). A presença da infecção não pode ser detectada, com segurança, somente com base nos sinais clínicos. Por este motivo, o diagnóstico deve ser estabelecido, com certeza, através da demonstração da presença



do agente, seja por isolamento e identificação, ou por procedimentos sorológicos (MYERS, 1985).

Dentre as técnicas laboratoriais existentes para diagnosticar a leptospirose, os testes de soro-aglutinação são os mais utilizados. A aglutinação microscópica desenvolvida por Schuffner e Mochtar em 1926/27, é o procedimento de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde-OMS (MYERS, 1985). Este exame, no entanto, não pode ser executado sem equipamentos especiais, pessoal habilitado, e utilização de vários antígenos patogênicos vivos, o que torna o processo laborioso oferecendo risco de contaminação. Neste sentido, vários estudiosos vem tentando desenvolver técnicas e antígenos capazes de, sem expor ao risco os manipuladores, fornecerem diagnósticos de triagem confiáveis. Estes testes seriam especialmente úteis em países de grande extensão territorial, sem razoável quantidade de laboratórios especializados, como ocorre no Brasil. Em assim sendo, o tempo gasto entre a suspeita clínica e a confirmação laboratorial pode ser estendido em demasia, ocasionando perdas econômicas para a indústria animal, mesmo sendo, geralmente, uma doença de evolução lenta.

Existem, atualmente, várias técnicas para a demonstração de anticorpos anti-leptospira. Resultados divergentes têm sido obtidos quando os mesmos soros são examinados em laboratórios diferentes. Deste modo, BROWN (1978); MARSHAL et alii (1978) e STOENNER (1972) chamam a atenção para a padronização de testes para o diagnóstico desta zoonose.

As espécies bovina e caprina foram escolhidas como alvos deste trabalho. A bovina, devido a indiscutível importância no fornecimento de carne e leite para a população brasileira, e a caprina, por sua expressão no norte e nordeste brasileiros e por encontrar-se em fase de incremento, especialmente na região sudeste do país, com destaque na produção comercial de leite e, ainda, por ser fonte alternativa de proteína animal às populações de baixa renda, localizadas nas periferias dos grandes centros urbanos.

Os objetivos deste trabalho são apresentados, resumidamente, em dois itens: 1º) verificação da viabilidade do uso de algumas leptospiros apatogênicas para o diagnóstico de triagem da leptospirose em bovinos e caprinos; 2º) produção e avaliação de antígeno termo-resistente para utilização em diagnóstico de triagem a nível de campo.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Classificação

O gênero *Leptospira* foi criado por Noguchi em 1917, 30 anos após a leptospirose clínica ser descrita por Weil, em 1886 (TORTEN, 1979).

Este gênero compõe, juntamente com outros quatro (*Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema* e *Borrelia*), a família *Spirochaetaceae*, pertencente à ordem *Spirochaetales* (BUCHANAN & GIBBONS, 1975). Está atualmente dividido em duas espécies: *L. interrogans* e *L. biflexa*. A espécie *L. interrogans* compreende as leptospirosas patogênicas para o homem e os animais; a *L. biflexa*, saprófita, encontrada principalmente na água, avirulenta para os animais de laboratório e raramente associada à infecção no homem ou animais (MYERS, 1985).

A diferenciação entre as espécies é baseada na capacidade de infectar animais, na composição do DNA, na resistência à variação de temperatura de crescimento, na susceptibilidade à 8-azaguanina e à cátiões divalentes e em características sorológicas (FAINE, 1982).

Cada espécie é composta por diversos sorotipos, que constituem a unidade taxonômica básica. Estes sorotipos são agrupados em sorogrupos de acordo com as características sorológicas. A OMS reconhece, atualmente, 100 sorotipos e 20 soro-

grupos pertencentes à *L. interrogans*, e quatro sorotipos e dois sorogrupos da espécie *L. biflexa* (MYERS, 1985).

Vários pesquisadores, entretanto, relatam a existência de outros sorogrupos e sorotipos ainda não classificados oficialmente (BABUDIARI, 1972; SANTA ROSA, 1977; TORTEN, 1979; VIEGAS, 1985). De acordo com FAINE (1982), existem mais de 180 sorotipos de *L. interrogans*, e VIEGAS (1985), relata a existência de aproximadamente 60 tipos sorológicos de *L. biflexa*.

## 2.2. Leptospirose em bovinos e caprinos

A leptospirose foi primeiramente descrita, em bovinos, na União Soviética, em 1935 (MICHNA, 1970). Os primeiros isolamentos do agente ocorreram em 1946 na União Soviética e Israel, com o sorotipo *grippotyphosa* (FAINE, 1982).

A leptospirose bovina está espalhada por diversos países, enumerados por AMATREDJO & CAMPBELL (1975) em trabalho de revisão.

HANSON (1982) estima que 15% do rebanho dos Estados Unidos da América está afetado, assim como 25% do rebanho dos países das Américas Central e do Sul.

Alguns índices de prevalência da leptospirose bovina no Brasil estão configurados no QUADRO 1.

Em caprinos, a infecção foi descrita pela primeira vez em Israel, por VAN DER HOEDEN (1953). WILLIAMS (1981) afirma que os casos de leptospirose aguda natural são raros, embora sempre associados a grandes perdas; e que a infecção crônica ou subclínica está, muito provavelmente, espalhada em cabras.

Contrariamente à doença em bovinos, a leptospirose caprina tem sido pobremente investigada, como salienta VIEGAS (1985).

Alguns levantamentos sobre a presença de aglutininas anti-leptospiras, em caprinos, em diferentes países, estão apresentados no QUADRO 2.

QUADRO 1 - Algumas pesquisas sobre a presença de aglutininas anti-leptospiras em soros de bovinos, em diferentes estados brasileiros - 1988

Local	Autor (es)	Número de soros		Sorotipos mais prevalentes	
		Total	+		
Amazonas	MOREIRA (1982)	880	407	<i>hardjo</i>	(30,32%)
				<i>wolffi</i>	(22,50%)
Bahia	DORIA & SANTANA (1976)	520	221	<i>wolffi</i>	(100,00%)
Mato Grosso	MADRUGA et alii (1980)	670	498	<i>harjo</i>	(42,77%)
				<i>sejroe</i>	(40,00%)
Minas Gerais	BARBOSA (1962)	120	22	<i>pomona</i>	(40,90%)
	MOREIRA et alii (1979)	6429		<i>icterohaemorrhagiae</i>	(31,81%)
				<i>wolffi</i>	(18,34%)
	REIS et alii (1973)	720	39	<i>hardjo</i>	(14,57%)
				<i>hebdomadis</i>	(89,80%)
	RIBEIRO (1974)	84	44	<i>australis</i>	(5,10%)
<i>pomona</i>				(5,10%)	
Pará	MOREIRA (1982)	1470	577	<i>wolffi</i>	(81,63%)
				<i>icterohaemorrhagiae</i>	(8,16%)
Rio de Janeiro	CORDEIRO (1973)	1562	312	<i>hardjo</i>	(21,72%)
				<i>wolffi</i>	(15,46%)
Rio Grande do Sul	OLIVEIRA (1977)	184	99	<i>wolffi</i>	(10,88%)
	WILLIAMS et alii (1975)	63	17	<i>tarassovi</i>	2,62%
São Paulo	OLIVEIRA (1977)	184	99	<i>sejroe</i>	(100,00%)
	WILLIAMS et alii (1975)	63	17	<i>wolffi</i>	(38,26%)
				<i>sejroe</i>	(100,00%)
	GUIDA et alii (1959)	763	57	<i>wolffi</i>	(76,47%)
				<i>icterohaemorrhagiae</i>	(52,63%)
	SANTA ROSA et alii (1961)	279	79	<i>pomona</i>	(24,56%)
<i>icterohaemorrhagiae</i>				(44,30%)	
SANTA ROSA et alii (1969/70)	15080	3561	<i>grippotyphosa</i>	(36,70%)	
			<i>wolffi</i>	(53,80%)	
TERUYA (1974)	1420	307	<i>pomona</i>	(16,37%)	
			<i>wolffi</i>	(71,33%)	
Roraima	ZELADA (1981)	1488	1407	<i>wolffi</i>	(71,33%)
				<i>pomona</i>	(16,93%)
				<i>hardjo</i>	(26,08%)
				<i>hardjo</i>	(14,92%)

QUADRO 2 - Algumas pesquisas sobre a presença de aglutininas anti-leptospiras em soros de caprinos, em diferentes países - 1988

Países	Autor (es)	Número de soros		Sorotipos mais prevalentes
		Total	+	
Bolívia	LIMPIAS & SHERMAN (1973)	53	4	<i>ballum</i> , <i>pomona</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>autumnalis</i> , <i>paidjan</i>
Egito	MARONPOT & BARSOUJ (1972)	195	82	
Guyana	MOTIE & MYERS (1986)	417	377	<i>hardjo + wolffi</i> (34,20%) <i>pyrogenes</i> (34,20%)
India	ARORA & BAXI (1978)	162	8	<i>grippotyphosa</i> (45,4%) <i>pomona</i> , <i>pyrogenes</i> (100,00%)
	NIGAN et alii (1974)	84	2	<i>pyrogenes</i>
	RAJESSEKHAR & NANJIAH (1971)	108	25	<i>pomona</i>
	TRIPATHY (1977)	138	69	<i>autumnalis</i> (27,53%) <i>pomona</i> (14,49%) <i>pomona</i> (26,56%) <i>autumnalis</i> (9,37%)
Marrocos	UPADHYE et alii (1980)	64	23	<i>pomona</i> <i>pomona</i> <i>autumnalis</i>
	MAILLOUX (1969)	388	105	<i>icterohaemorrhagiae</i> <i>ballum</i>
Peru	LICERAS DE HIDALGO et alii (1971)	98	0	
Tchecoslováquia	SEBEK (1961)	330	110	<i>sejroe</i> (33,33%) <i>icterohaemorrhagiae</i> (23,63%)

Com relação ao Brasil, o primeiro levantamento de aglutininas anti-leptospira em caprinos foi feito em São Paulo por SANTA ROSA & CASTRO (1963), que pesquisaram 127 soros encontrando 55,12% de positividade. Nesse mesmo estado, SANTA ROSA et alii (1969/70), ao examinarem 277 soros, encontraram 27,43% de positivos. O sorotipo mais freqüentemente envolvido em ambas as pesquisas foi o *canicola*, respectivamente com 27,14% e 35,59%.

Na Bahia, CALDAS et alii (1977) encontraram 17,89% de positividade com predomínio do sorotipo *fort-bragg* (41,17%); e VIEGAS et alii (1980) observaram 30,00% de soros positivos, predominando os sorotipos *autumnalis* (48,27%) e *castellonis* (17,24%); CALDAS (1985) encontrou 31,00% de positividade em 500 soros de caprinos, citando os sorotipos *autumnalis* e *butembo* como os mais freqüentes; VIEGAS (1985) obteve 46,68% de positivos, sendo *autumnalis* o sorotipo mais prevalente (18,91%), seguido de *celledoni* (17,56%) e *castellonis* (14,18%).

Em Minas Gerais, SILVA et alii (1984) analisaram 368 soros de caprinos e encontraram 11 positivos (2,98%). O sorotipo mais prevalente foi o *pomona* (27,27%).

ABREU et alii (1984), no Rio de Janeiro, examinaram 386 soros de caprinos, e todos se mostraram negativos à aglutinação microscópica para leptospirose.

### 2.3. Diagnóstico

Devido às dificuldades do diagnóstico clínico da leptospirose, é necessário o auxílio de exames laboratoriais (VASCONCELLOS, 1979), através da demonstração das leptospiras (campo escuro ou coloração especial), isolamento e identificação ou a pesquisa de anticorpos (ALSTON & BROOM, 1958).

Tanto a visualização como o isolamento das leptospiras são de uso limitado, pois dependem da presença do agente nos fluídos ou tecidos, no momento da colheita das amostras. FAINE (1982) cita a dificuldade encontrada no diagnóstico da

doença por estes métodos, podendo levar a resultados erroneamente negativos.

A pesquisa de anticorpos tem sido largamente utilizada em todo o mundo, tanto para confirmar casos clínicos suspeitos, como para inquéritos epidemiológicos (HAGIWARA, 1979).

Com tal finalidade, muitas são as provas empregadas e algumas delas, como a fixação de complemento, a imunofluorescência e a hemaglutinação, não são práticas para pequenos laboratórios, o que restringe sua utilização especialmente no diagnóstico da leptospirose animal (SANTA ROSA, 1970).

A reação sorológica recomendada pela OMS é o teste da aglutinação microscópica, no qual é utilizada bateria de antígenos constituída por leptospiros patogênicas vivas (MYERS, 1985). Este teste foi desenvolvido por Schuffner e Mochtar (1926/27), a partir das observações de Martin e Petit (1918) de que o soro de pacientes com a doença de Weil aglutinava uma suspensão de leptospiros (TURNER, 1968). Esta prova tem as vantagens de ser bastante segura e confiável e de tornar possível a utilização de bateria de antígenos variável em concordância com sua importância na região (SANTA ROSA, 1977). Contudo, alguns inconvenientes dos testes de soro-aglutinação estão ligados ao tempo relativamente longo necessário à execução (CALDAS, 1985), além dos repiques constantes para manter a bateria de antígenos, e a freqüente manipulação de leptospiros patogênicas vivas (VASCONCELLOS, 1979). RYU (1970 b) modificou, ligeiramente, a prova, tornando-a rápida e sem reações inespecíficas.

A pesquisa de antígenos apatogênicos que pudessem substituir a bateria de leptospiros patogênicos iniciou-se com COMBIESCU et alii (1958), que empregaram a amostra *patoc 1* em soros humanos, através do teste de fixação de complemento. Observaram que o antígeno reagia positivamente em mais de 50,00% dos pacientes, independente do sorotipo infectante.

ADAMIANO (1962), utilizando a soro-aglutinação microscópica, encontrou 78% de concordância entre o sorotipo *patoc* e os sorotipos patogênicos empregados no diagnóstico da leptos



pirose humana.

NICOLESCU & LELUTIU (1967), empregaram os sorotipos *patoe* e *são paulo* em soros de leporinos (36), de bovinos (331), de suínos (371), de eqüinos (73) e de caninos (42), todos positivos à micro-aglutinação com antígenos patogênicos. Os autores sugeriram que uma boa concordância entre os antígenos patogênicos e os saprófitas indicaria infecção recente, e a ausência de concordância, infecção antiga.

MAILLOUX (1967), obteve 98% de concordância com o sorotipo *patoe* em testes de aglutinação com soros de cães.

Na Argentina, CACCHIONE et alii (1971), empregaram leptospiros *biflexa* em 364 soros positivos de diferentes espécies animais. Foi observada concordância de 97,83% entre o *rufino* e antígenos patogênicos em 206 soros de bovinos, e 100,00% em 14 soros de caprinos.

SANTA ROSA (1977), no Brasil, empregou as estirpes *rufino*, *buenos aires*, *patoe* e *são paulo* em soros de animais. Obteve 85,00% de concordância com relação a soros de bovinos, 90,00% para suínos, 77,50% e 80,00% para caninos, contendo anticorpos, respectivamente, anti-*wolffi*, *pomona*, *canicola* e *icterohaemorrhagiae* com a estirpe *buenos aires*, o que o levou a recomendar sua utilização como antígeno único no diagnóstico da leptospirose nestas espécies animais. Os demais sorotipos apresentaram fraco desempenho, não havendo nenhuma reação entre soro bovino e os antígenos *patoe* ou *rufino*.

ÁVILA et alii (1977), testaram a *Leptospira patoe* em soros de suínos pela aglutinação, obtendo sensibilidade de 90,60% e especificidade de 26,20%, desaconselhando sua utilização como antígeno único.

CALDAS et alii (1978), empregaram as leptospiros *patoe* e *rufino* na sorologia de bovinos, caprinos, suínos, bubalinos, eqüinos e caninos. De 164 soros bovinos testados, 85 (51,83%) foram positivos à *Leptospira interrogans*, dos quais 5 (5,88%) também o foram à *patoe* e 9 (10,58%) à *rufino*. Em caprinos, de 95 soros testados, 17 (17,89%) reagiram à bateria patogênica,

sendo sete soros (41,17%) positivos a *patoc* e um soro (5,88%), positivo a *rufino*.

HAGIWARA (1979) avaliou as estirpes *rufino*, *patoc* e *buenos aires* como antígenos, em testes de aglutinação, em cãs inoculados com leptospiros patogênicas. Concluiu que a *patoc* (sensibilidade média de 43,33%) e a *rufino* (sensibilidade média de 49,99%) não se prestam ao diagnóstico, porém, obteve 86,66% e 80,00% de sensibilidade quando a estirpe aquícola *buenos aires* foi confrontada com soros contendo anticorpos contra os sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *canicola*, respectivamente.

CALDAS (1985) pesquisou nas espécies bovina, equina, suína, caprina e ovina a utilização dos antígenos *buenos aires* e *são paulo* para o diagnóstico através da soro-aglutinação. O sorotipo *buenos aires* reagiu com 90,41% dos soros de bovinos positivos à bateria patogênica, e com 58,06% dos soros positivos de caprinos. Estatisticamente, os resultados indicaram o uso deste antígeno como apto à triagens para a espécie bovina, porém, o mesmo não ocorreu para a espécie caprina.

GENOVEZ (1985) avaliou a eficiência de leptospiros apatogênicas na aglutinação microscópica em soros de bovinos, suínos, bubalinos, equinos e caninos. Dos soros bovinos estudados, obteve sensibilidades de 19,68%, 26,7% e 51,18%, e especificidades de 90,38%, 96,15% e 96,15%, respectivamente, para os antígenos *buenos aires*, *patoc* e *rufino*.

VIEGAS (1985) empregou várias leptospiros *biflexa* no soro-diagnóstico de caprinos e ovinos em comparação à sorotipos de *Leptospira interrogans*. Verificou que, em caprinos, os sorotipos *jequitaiá* e *buenos aires* obtiveram melhor desempenho, com sensibilidades de 74,00% e 60,00%, respectivamente. O antígeno *patoc 1* apresentou sensibilidade de 50,00% e o *rufino* 22,00%. Os resultados com soros de ovinos foram semelhantes.

VASCONCELLOS (1986) investigou a utilização do antígeno *buenos aires* em soroaglutinação com grupos de suínos controlados. A concordância observada de resultados foi de 53,31%, sensibilidade de 14,34% e especificidade de 96,61%.

MAZZONELLI et alii (1975) colocaram em evidência a existência de antígeno termo-resistente (ATR) que, tratado a 80°C por 10 minutos, foi capaz de evidenciar aglutininas produzidas contra os diferentes sorotipos do gênero *Leptospira*. A partir dessas observações, TRAP & GAUMONT (1980) prepararam o ATR com amostra saprófita, empregando-o no teste de 445 soros de bovinos, suínos, eqüinos e caninos. Este antígeno foi utilizado na prova de aglutinação macroscópica, apresentando resultados positivos ou suspeitos em 232 oportunidades, de 252 soros positivos à soro-aglutinação microscópica.

TRAP & GAUMONT (1981) trataram os soros pelo 2-mercaptoetanol e pelo calor, visando destruir as imunoglobulinas tipo M. Os resultados mostraram claramente que o ATR reage com os anticorpos do tipo IgM.

Em humanos, NICOLESCU et alii (1982 b) experimentaram a aglutinação macroscópica com antígenos termo-tratados *patoc 1* e *andamana* para diagnosticar a leptospirose usando 2799 soros de pacientes hospitalizados ou expostos ao risco profissional, comparando-a à soroaglutinação microscópica e à fixação de complemento. Os autores observaram maior precocidade de reação com os antígenos termo-tratados e afirmaram que "além da simples execução, o teste fornece resultado rápido, podendo ser utilizado em inquéritos epidemiológicos e permitindo o diagnóstico de casos de infecção recente".

Com relação a animais domésticos, o antígeno *patoc 1*, termo-tratado, foi também empregado por NICOLESCU et alii, (1982 a) para o diagnóstico em 574 soros de animais suspeitos de leptospirose, dos quais 162 eram de bovinos. Entre os soros positivos, os autores obtiveram concordância entre as provas macroscópica e microscópica de 69,13% para suínos, 77,08% para bovinos, 63,10% para eqüinos, 12,50% para caninos e 37,50% para ovinos, levando-os a preconizar a aglutinação macroscópica com este antígeno como o método de escolha para triagens de soros no diagnóstico da leptospirose animal.

GUTIERREZ et alii (1984), também através da macro-

aglutinação, testaram o antígeno termo-resistente obtido do sorotipo *canicola*, a partir da amostra Hond Utrecht IV em soros de ovinos (2), suínos (19), eqüinos (26), bovinos (12) e aní-de laboratório (58), todos com diagnóstico clínico de leptospirose. Os resultados, comparados aos obtidos pela aglutinação microscópica com antígenos vivos, foram concordantes em 101 dos 107 soros positivos (94,39%). Dos soros bovinos, 12 (100,00%) foram positivos ao ATR, e 9 (75,00%) à micro-aglutinação.

YANAGUITA (1987) utilizou os sorotipos de *Leptospira biflexa*, *patoc*, *são paulo*, *buenos aires* e *rufino*, mortos pela adição de mertiolato, em testes de soroaglutinação macroscópica. Obteve, com relação à espécie bovina, sensibilidades relativas de 90,00% para o antígeno *buenos aires*, 25,00% para o *patoc* e 47,50% para o *rufino*.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Amostragem

A população estudada compreendeu 138 (42,46%) bovinos e 187 (57,53%) caprinos, perfazendo o total de 325 animais.

Os soros de bovinos eram provenientes de fazendas do Estado de Minas Gerais onde havia suspeita clínica de leptospirose ou daquelas nas quais o exame sorológico para leptospirose constituía procedimento de rotina. Ao chegarem ao Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, após a realização dos testes solicitados, eram estocados em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Os soros de caprinos foram colhidos por técnicos do Ministério da Agricultura com a finalidade de estudar a ocorrência de micoplasmose, no Laboratório Nacional de Referência Animal - LANARA, e, posteriormente, cedidos para a realização deste experimento. Sem conotação com a origem, tópico não essencial neste trabalho, os soros foram sorteados para que configurasse amostragem aleatória. Foram mantidos em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das provas.

### 3.1.2. Avaliação estatística

O tamanho da amostra utilizada foi determinado através da fórmula:

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot S^2}{\delta}$$

onde:

$Z_{\alpha}$  = desvio relativo padronizado normal correspondente ao nível de significação a ser utilizado.

$Z_{\beta}$  = desvio relativo padronizado normal correspondente à probabilidade de duas "caudas".

$S^2$  = variância.

$\delta$  = diferença postulada ou suposta (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

A amostra escolhida, com alta probabilidade ( $p'=0,9$ ) de detectar uma diferença  $\geq$  a 15% entre ambas as provas diagnósticas sobre a base de uma variância de 0,16, e com um nível de significância de 0,05 deve ter o tamanho  $n = 75$  soros.

A variância foi estimada com base em trabalhos que se assemelharam com a presente pesquisa. Para a comparação do comportamento de estirpes apatogênicas na espécie caprina, foram considerados os trabalhos de CALDAS et alii (1978), CALDAS (1985) e VIEGAS (1985), tendo sido obtida variância média de 0,1665. Para a mesma comparação na espécie bovina, foram considerados os resultados obtidos por CALDAS et alii (1978) e CALDAS (1985), variância média de 0,1673. Na verificação do comportamento do antígeno termo-resistente nas duas espécies estudadas, foi utilizada a variância média obtida dos trabalhos de NICOLESCU et alii (1982 a) e GUTIERREZ et alii (1984), com bovinos, sendo de 0,1637. Não foi encontrado trabalho semelhante com relação a caprinos. Como em todos os casos foram obti-

das variâncias muito próximas, foi adotado o critério de estudar, no mínimo, 80 soros de cada espécie animal.

### 3.2. Metodologia

#### 3.2.1. Preparo dos antígenos vivos

Todos os antígenos vivos (AV) utilizados, patogênicos e apatogênicos, eram culturas de leptospiras de quatro a 14 dias. Estas amostras foram mantidas no meio semi-sólido de Fletcher\* e transplantadas para o meio líquido Albumina bovina polisorbato 80\*\*, no qual eram semanalmente repicadas e colocadas em estufa a 30°C, por sete dias, posteriormente sendo mantidas em temperatura ambiente. As baterias foram baseadas em recomendações da OMS (MYERS, 1985) para bovinos (QUADRO 3), com ligeiras modificações para caprinos (QUADRO 4) representando so r grupos mais frequentemente detectados no Brasil (CALDAS et alii, 1977; SANTA ROSA et alii, 1969/70; SILVA et alii, 1984; 1980).

Os antígenos eram examinados ao microscópio de campo escuro, a seco, com aumento de 60 vezes, antes da realização dos testes, a fim de ser verificada a mobilidade, ausência de auto-aglutinação e contaminação, assim como a concentração desejada de, aproximadamente, 100 microrganismos por campo.

#### 3.2.2. Antígeno termo-resistente (ATR)

O ATR foi preparado com o sorotipo *canicola*, amostra Hond Utrecht IV, conforme a técnica de GUTIERREZ et alii (1984), após 21 dias de crescimento no meio Korthof\*\*\* a 30°C. A padro

---

\* Bacto-Fletcher Medium Base, Code 0987 - Difco Laboratories. Detroit, Michigan, USA.

\*\* Preparado de acordo com MYERS (1985).

\*\*\* Leptospiren-Bouillon KORTHOF (Basis) 5403 - Merck.



QUADRO 3 - Sorotipos de *Leptospira interrogans* usados como antígenos no teste de micro-aglutinação rápida (MAR) em soros de bovinos - Minas Gerais - 1988

Sorogrupo	Sorotipo	Amostra
Australis	<i>australis</i>	Ballico
Autumnalis	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
Ballum	<i>castellonis</i>	Castellon 3
Bataviae	<i>bataviae</i>	Van Tienen
Canicola	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>	Moska V
Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
Pomona	<i>pomona</i>	Pomona
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Salinem
Sejroe	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitno
	<i>sejroe</i>	M 84
	<i>wolfii</i>	3705
Tarassovi	<i>tarassovi</i>	Perepelicin



QUADRO 4 - Sorotipos de *Leptospira interrogans* usados como antígenos no teste de micro-aglutinação rápida (MAR) em soros de caprinos - Minas Gerais - 1988

Sorogrupo	Sorotipo	Amostra
Australis	<i>australis</i>	Ballico
	<i>bratislava</i>	Jez bratislava
Autumnalis	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
	<i>fort-bragg</i>	Fort-bragg
Ballum	<i>castellonis</i>	Castellon 3
Bataviae	<i>bataviae</i>	Van Tienen
Canicola	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
Celledoni	<i>celledoni</i>	Celledoni
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
Javanica	<i>javanica</i>	Veldrat Bataviae 46
Panama	<i>panama</i>	CZ 214 K
Pomona	<i>pomona</i>	Pomona
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Salinem
Sejroe	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitno
	<i>wolffi</i>	3705
Tarassovi	<i>tarassovi</i>	Perepelicin

nização foi feita através de diluições de até 1:4, testadas frente a soros de leporinos, bovinos e caprinos, comprovadamente positivos para leptospirose pelo teste da micro-aglutinação rápida (MAR) sugerido por RYU (1970 a). A maior diluição do antígeno que reagiu com estes soros, apresentando boa visibilidade a olho nũ, foi eleita como a de trabalho. Foi determinada, então, a densidade ótica por fotocolorimetria\* tendo sido obtida, em onda 620 nm, transmitância igual a 30.

### 3.2.3. Provas de hemo-soro-aglutinação

#### 3.2.3.1. Microscópica

O teste considerado padrão foi o da micro-aglutinação rápida (MAR), de RYU (1970 a), com pequenas modificações descritas por ZELADA (1981). Os antígenos utilizados foram sorotipos vivos de *Leptospira interrogans* (QUADROS 3 e 4) e os apatogênicos *buenos aires*, *patoc*, e *rufino*. As culturas das leptospiros *buenos aires* e *rufino* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Eulógio Moreira Caldas, da Escola de Veterinária da UFBA e as *castellonis* e *fort-bragg* pelo Dr. Paulo Hideki Yasuda, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. As demais foram fornecidas pelo Centro Panamericano de Zoonoses - Buenos Aires - Argentina.

#### 3.2.3.2. Macroscópica

A prova macroscópica empregando antígeno termo-resistente, foi executada em 180 soros, sendo 90 de cada espécie animal, dos quais 30 reagentes e 60 não reagentes ao teste padrão. A técnica usada foi a seguinte: soro e antígeno eram colocados, em partes iguais (0,02 ml), numa placa de vidro semelhante a utilizada para o diagnóstico de brucelose e homogenei

---

\* Spectrophotometer PM 4 - Carl Zeiss.

zados com estiletes descartáveis. A placa era movimentada por quatro minutos, manualmente, de tal modo que permitisse a rotação da mistura antígeno-soro. A reação era lida sobre fundo escuro, a olho nũ, com luz indireta. O aparecimento de grumos classificava a reação como positiva. Era negativa quando a mistura soro-antígeno permanecia inalterada. O controle negativo do antígeno era feito com solução salina tamponada, pH = 7,2.

#### 3.2.4. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o teste do qui-quadrado, ao nível de 5%.

Na comparação entre a estirpe *buenos aires* e o teste padrão (MAR) para caprinos, foi encontrada uma frequência esperada inferior a 5,00%, sendo portanto, necessária a aplicação do teste de Fisher (SIEGEL, 1981).

As hipóteses formuladas foram: hipótese da nulidade ( $H_0$ ) - os testes não estão associados, isto é, não há diferença significativa entre os atributos positivo e negativo na prova de triagem, sendo as diferenças ocorridas devidas ao acaso; hipótese alternativa ( $H_1$ ) - os testes estão associados, isto é, há diferença significativa ente os atributos positivo e negativo na prova de triagem, sendo as diferenças ocorridas devidas à precisão da prova.

Os cálculos de sensibilidade e especificidade dos antígenos testados, relativas ao teste padrão (MAR) estão de acordo com THORNER & REMEIN (1961).

#### 4. RESULTADOS

Nas TAB. I e II estão relacionados somente os soros de bovinos e caprinos reagentes à prova de micro-aglutinação rápida (MAR), frente à bateria de antígenos patogênicos, contendo respectivamente, 14 e 18 sorotipos.

A TAB. III apresenta o total de reagentes em ambas as espécies animais frente a bateria de antígenos patogênicos e apatogênicos *buenos aires*, *patoc 1* e *rufino*, com amplitude de positividade de um a 30 para bovinos e dois a 35 para caprinos.

Os índices de sensibilidade relativos ao teste padrão, deduzidos da TAB. III, para o sorotipo *patoc* foram de 3,33% e 8,57%; para *rufino*, 10,00% e 5,71%, respectivamente, para bovinos e caprinos.

Para o antígeno *buenos aires* os índices de sensibilidade e especificidade relativos ao teste padrão, estão apresentados na TAB. IV.

A análise estatística entre os achados do teste padrão com os antígenos patogênicos e o sorotipo apatogênico *buenos aires*, na espécie bovina (TAB. V), revelou qui-quadrado de 8,46, superior ao valor crítico adotado (3,84), demonstrando que foi rejeitada a hipótese de nulidade e aceita a hipótese alternativa, segundo a qual há associação entre os antígenos.

O comportamento do sorotipo *buenos aires* frente aos

TABELA I - Soros de bovinos reagentes à prova de micro-aglutinação rápida (MAR), frente a sorotipos patogênicos. Minas Gerais, 1988

S o r o t i p o s	Soros reagentes	
	Número	%
<i>autumnalis</i>	2	4,00
<i>bataviae</i>	6	12,00
<i>castellonis</i>	7	14,00
<i>grippotyphosa</i>	2	4,00
<i>hardjo</i>	14	28,00
<i>hebdomadis</i>	1	2,00
<i>sejroe</i>	1	2,00
<i>tarassovi</i>	5	10,00
<i>wolffi</i>	12	24,00
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>100,00</b>



TABELA II - Soros de caprinos reagentes à prova de micro-aglutinação rápida (MAR), frente a sorotipos patogênicos. Minas Gerais, 1988.

S o r o t i p o s	Soros reagentes	
	Número	%
<i>autumnalis</i>	5	10,64
<i>bataviae</i>	1	2,13
<i>canicola</i>	1	2,13
<i>castellonis</i>	4	14,89
<i>celedoni</i>	7	8,51
<i>fort-bragg</i>	23	48,93
<i>grippotyphosa</i>	1	2,13
<i>icterohaemorrhagiae</i>	1	2,13
<i>panama</i>	2	4,25
<i>pomona</i>	1	2,13
<i>pyrogenes</i>	1	2,13
Total	47	100,00

TABELA III - Reações comparativas de soros de bovinos e caprinos, frente à micro-aglutinação rápida com sorotipos de *Leptospira interrogans* e *Leptospira biflexa*. Minas Gerais, 1988

Espécie animal	Examinados	R e a g e n t e s							
		<i>L. interrogans</i>		<i>L. biflexa</i>					
		Número	%	buenos aires		patoc		rufino	
Número	%	Número	%	Número	%	Número	%		
Bovinos	138	30	21,74	28*	20,29	1	0,72	3	2,17
Caprinos	187	35	18,71	14**	7,49	3	1,60	2	1,07
Total	325	65	20	42	12,92	4	1,23	5	1,54

\* 16 não foram positivos à *L. interrogans*.

\*\* 3 não foram positivos à *L. interrogans*.

TABELA IV - Sensibilidade e especificidade do antígeno *buenos aires*, em bovinos e caprinos, avaliadas pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR)\*. Minas Gerais, 1988

Espécie animal	Sensibilidade	Especificidade
Bovinos	40,00%	85,18%
Caprinos	31,42%	98,02%

\* Prova padrão executada com sorotipos da *L. interrogans*.



TABELA V - Soros de bovinos analisados pelo teste de micro-a-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e o antígeno apatogênico *buenos aires*. Minas Gerais, 1988

<i>Buenos aires</i>	P a t o g ê n i c o s		Total
	Reagentes	Não reagentes	
reagentes	12	16	28
não reagentes	18	92	110
Total	30	108	138

soros reagentes e não reagentes ao teste padrão com sorotipos patogênicos, na espécie caprina, está apresentado na TAB. VI. A análise estatística destes resultados pelo teste exato de Fisher, forneceu o valor de  $p = 6,92 \times 10^{-7}$ , que determina a aceitação da hipótese da nulidade, ou seja, não há associação entre os antígenos.

Com relação ao antígeno termo-resistente, é observado pela TAB. VII que, em bovinos, houve reação de aglutinação com 70 soros, e em caprinos, com 43 soros, respectivamente com valores percentuais de 77,77% e 47,77%.

O comportamento deste antígeno em relação ao teste padrão está demonstrado nas TAB. VIII e IX, respectivamente para bovinos e caprinos. A análise estatística destes dados demonstrou, para bovinos, qui-quadrado de 6,61 e para caprinos, qui-quadrado de 37,43, superiores ao valor crítico adotado (3,84), levando a rejeição da hipótese da nulidade e aceitação da hipótese alternativa, segundo a qual há associação entre os antígenos.

Os índices de sensibilidade e especificidade obtidos dos resultados do ATR com soros de bovinos e caprinos, frente ao teste padrão com antígenos patogênicos, estão apresentados na TAB. X.



TABELA VI - Soros de caprinos analisados pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e o antígeno apatogênico *buenos aires*. Minas Gerais, 1988

<i>Buenos aires</i>	P a t o g ê n i c o s		Total
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	11	03	11
Não reagentes	24	149	173
Total	35	152	187

TABELA VII - Reações comparativas de soros de bovinos e caprinos frente ao teste de micro-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e ao teste macroscópico com antígeno termo-resistente (ATR). Minas Gerais, 1988

Espécie Animal	Examinados	R e a g e n t e s			
		Número	%	Número	%
Bovinos	90	30	33,33	70*	77,77
Caprinos	90	30	33,33	43**	47,77
Total	180	60	33,33	113	62,77

\* 42 não foram reagentes ao teste MAR.

\*\* 15 não foram reagentes ao teste MAR.

TABELA VIII - Soros de bovinos analisados pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e pelo teste macroscópico com o antígeno termo-resistente (ATR). Minas Gerais, 1988

Macroscópico (ATR)	Microscópico (MAR)		Total
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	28	42	70
Não reagentes	02	18	20
Total	30	60	90



TABELA IX - Soros de caprinos analisados pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR) com antígenos patogênicos e pelo teste macroscópico com o antígeno termo-resistente (ATR). Minas Gerais, 1988

Macroscópico (ATR)	Microscópico (MAR)		
	Reagentes	Não reagentes	Total
Reagentes	28	15	43
Não reagentes	02	45	47
Total	30	60	90

TABELA X - Sensibilidade e especificidade do antígeno termo-resistente (ATR), em bovinos e caprinos, avaliadas pelo teste de micro-aglutinação rápida (MAR)\*. Minas Gerais, 1988

Espécie animal	Sensibilidade	Especificidade
Bovinos	93,33%	30,00%
Caprinos	93,33%	75,00%

\* Prova padrão executada com sorotipos da *L. interrogans*.



## 5. DISCUSSÃO

Os testes de soro-aglutinação com a bateria de antígenos patogênicos em soros de bovinos (TAB. I), demonstraram que os sorotipos mais freqüentemente detectados foram o *hardjo* e o *wolffi*. Resultados aproximados, em diferentes estados brasileiros, foram encontrados por ÁVILA et alii (1978), CORDEIRO (1973), DORIA & SANTANA (1976), MADRUGA et alii (1974), MOREIRA (1982), MOREIRA et alii (1979), RIBEIRO (1974), SANTA ROSA et alii (1969/70), TERUYA et alii (1974) e ZELADA (1981). Nenhum dos soros de bovinos testados reagiu com o sorotipo *pomona* e *icterohaemorrhagiae*, também freqüentemente indicados nos trabalhos citados no QUADRO 1. As variações devem estar ligadas à epidemiologia da doença, a qual depende, entre outros fatores, do ecossistema da região (ELDER et alii, 1986; ELLIS, 1986).

Em caprinos, da bateria de antígenos patogênicos, o sorotipo *fort-bragg* reagiu com 48,93% dos soros e o *castellonis* com 14,89% (TAB. II). O sorotipo *fort-bragg*, mais prevalente neste estudo, também o foi na pesquisa de CALDAS et alii (1977). O mesmo não ocorreu em outros trabalhos, provavelmente por não haver sido incluído na bateria de antígenos utilizados por CALDAS (1985), SANTA ROSA & CASTRO (1963), SANTA ROSA et alii (1969/70), SILVA et alii (1984), VIEGAS (1985), e VIEGAS et alii (1980). A inclusão do sorotipo *fort-bragg* foi sugerida por CALDAS (1977) que registrou sua ocorrência em caprinos no estado da Bahia.



Embora pertencente ao sorogrupo *Autumnalis* as reações positivas foram 4,60 vezes mais frequentes do que as da espécie-tipo. O sorotipo *castellonis* também foi encontrado com frequência nos trabalhos de VIEGAS (1985) e VIEGAS et alii (1980). Pela não citação de elevada frequência em outros trabalhos, o sorotipo *butembo* (sorogrupo *Butembo*), indicado por CALDAS (1985) como dos mais prevalentes em caprinos na Bahia, não foi incluído na bateria de antígenos.

Na TAB. III, pode ser verificado que, dos três antígenos de *Leptospira biflexa* utilizados, o sorotipo *buenos aires* foi o que apresentou maior frequência de aglutinação em soros de bovinos e caprinos. Resultados semelhantes foram obtidos por SANTA ROSA (1977) que comparou estes mesmos antígenos em bovinos, suínos e caninos, e por CALDAS (1985), em estudo comparativo entre os antígenos *buenos aires* e *são paulo*, em várias espécies animais.

Neste estudo, as estirpes *patoc* e *rufino* apresentaram baixos índices de sensibilidade, deduzidos da TAB. III, contrariamente aos obtidos por CACCHIONE et alii (1971) com relação ao antígeno *rufino* em várias espécies animais, inclusive bovinos e caprinos. Tais resultados, entretanto, são semelhantes aos obtidos por SANTA ROSA (1977) que, assim como CALDAS et alii (1978), descartaram a possibilidade da utilização destas estirpes no diagnóstico da leptospirose em animais, de modo geral.

Do mesmo modo, ÁVILA et alii (1977), trabalhando com suínos, não recomendaram a utilização do sorotipo *patoc* no diagnóstico da doença nesta espécie. Apesar de não aconselhar o uso, VIEGAS (1985) considerou estáveis os resultados obtidos com este sorotipo em soros de caprinos e ovinos, tendo obtido resultados pouco satisfatórios com o sorotipo *rufino*. HAGIWARA (1979), trabalhando com soros de cães, também obteve desempenho irregular do antígeno *patoc*.

A TAB. IV oferece os índices de sensibilidade relativa da amostra *buenos aires*, inferiores aos obtidos por CALDAS (1985), HAGIWARA (1979), SANTA ROSA (1977), VIEGAS (1985) e

YANAGUITA (1987), e superiores aos observados por GENOVEZ (1985) e VASCONCELLOS (1986). Estas diferenças poderiam ser explicadas pela oscilação da resposta imunológica ao estímulo do antígeno patogênico em diferentes espécies animais (TURNER, 1968). Nos casos de coincidência de espécies, algumas hipóteses podem ser aventadas.

Como resposta à infecção leptospírica aparecem inicialmente as imunoglobulinas do tipo M (IgM) e posteriormente as do tipo G (IgG). Ambas produzem reações de soro-aglutinação microscópica (HAGIWARA, 1979). PALIT & GULASEKHARAM (1973), em experimentos com antígenos gênero-específicos, observaram que apenas os anticorpos IgM tomam parte nestas reações. Assim, pode ser esperado que animais possuindo predominância de IgM, como acontece com os recentemente infectados, reajam positivamente para antígenos gênero-específicos, e o mesmo não ocorra em infecções antigas nas quais os anticorpos predominantes são da classe IgG. Nesta linha de raciocínio, a sensibilidade inferior do antígeno *buenos aires* (TAB. IV) em relação à maioria das outras pesquisas, poderia ser atribuída ao fato de a amostragem ter aleatoriamente correspondido a animais em fase adiantada de infecção. A ausência de dados clínicos impede a confirmação ou rejeição da hipótese.

Há que ser considerado, também, que a sensibilidade do antígeno *buenos aires* pode ter variado em resposta a infecção por diferentes sorotipos, tal como ocorre com o sorotipo *patoe* em infecções humanas cuja sensibilidade é alta nas infecções determinadas pelos sorotipos *pomona*, *canicola* *icterohaemorrhagiae* e mais baixa quando causadas por outros sorotipos (FUCHS, 1969; HERGT, 1976).

Outra possibilidade seria devido a diferenças metodológicas. De acordo com RYU (1970 b), idealizador do teste aqui considerado como padrão, reações inespecíficas e aglutinação espontânea tendem a ocorrer quando soro e antígeno permanecem em contacto por períodos maiores, o que possivelmente ocorreu com os métodos de diagnóstico utilizados nas pesquisas citadas.

Hipótese alternativa a ser considerada, embora mais remota, é a de que as amostras podem variar quanto a capacidade de reação ou sensibilidade (COMBIESCU et alii, 1960). Tal fato pode ter ocorrido com a referida estirpe, mantida em diferentes laboratórios e, evidentemente, com tratamentos diferenciados.

Apesar destas variações nos índices de sensibilidade relativa, vale ressaltar que, na análise estatística dos resultados obtidos com antígeno *buenos aires* em 138 soros de bovinos testados pelo MAR, houve significância a nível de 5%, demonstrando haver associação entre o teste realizado com o referido antígeno e a bateria patogênica (TAB. V). O mesmo não ocorreu com a espécie caprina onde a falta de significância a nível de 5%, demonstrou não haver associação entre os antígenos (TAB. VI). CALDAS (1985) encontrou resultados semelhantes, em ambas as espécies animais.

Quanto ao teste macroscópico com o ATR (TAB. VII e VIII), foi observado que, tanto em bovinos como em caprinos, houve significância estatística a nível de 5% entre os resultados obtidos com este teste e o microscópico (MAR). Desta forma, foi rejeitada a hipótese da nulidade, tendo sido aceita a existência de associação entre as duas provas, em ambas as espécies.

Através das TAB. VII, VIII e IX, pode ser observado que ocorreram mais reações positivas ao ATR do que aos antígenos patogênicos, em bovinos e caprinos.

GUTIERREZ et alii (1984) também obtiveram resultados semelhantes trabalhando com bovinos e outras espécies animais. Estes pesquisadores ainda observaram que, após tratamento dos soros pelo 2-mercaptoetanol, capaz de destruir os IgM, as reações macroscópicas desapareceram, sendo mantidas apenas as microscópicas. Este fato reforça a tese de que os anticorpos IgM estão envolvidos nas reações de aglutinação com antígenos gênero-específicos, como é o caso do ATR.

No presente estudo, os soros poderiam ser provenientes de animais em fase inicial de infecção e neste caso, o

teste macroscópico detectaria infecções nas quais os IgM estariam em maior quantidade. Novamente a ausência de dados clínicos e principalmente as compreensíveis dificuldades para classificar a duração das infecções não experimentais, impedem a afirmação consubstanciada.

Dependendo, sem dúvida, de confirmação, há a hipótese de outras infecções estarem acarretando falsas reações positivas. Foi demonstrado que as reações cruzadas ocorrem devido a presença dos anticorpos IgM (CHANG & FAINE, 1974), que são os detectáveis pelo ATR.

De acordo com TURNER (1968) os antígenos usados em reações macroscópicas tem tendência a formar flocos que podem dar idéia errônea de reação positiva. Tal fato é importante e agravado, especialmente, nos casos em que sejam encontradas nos soros partículas em suspensão, hemácias por exemplo, que os tornam algo mais opacos, donde a denominação usual, não tecnicamente perfeita, de "sujos". Nesta pesquisa foi evitada ao máximo a utilização deste tipo de soro.

A sensibilidade relativa do ATR (TAB. X) foi de 93,33% em soros de bovinos e caprinos, resultado superior ao encontrado por NICOLESCU et alii (1982 a) em suínos, bovinos e eqüinos. Tais variações podem ser explicadas pela diversificação das espécies animais trabalhadas e das diferentes metodologias empregadas.

Os bons índices de sensibilidade e especificidade, aliados à significância estatística dos resultados, em caprinos, levam a aceitação do ATR pelo menos como teste de triagem para o diagnóstico da leptospirose (TAB. X). Esses achados estão de acordo com os de GUTIERREZ et alii (1984), que trabalharam com outras espécies animais. Pesquisas posteriores baseadas na estabilidade da preparação, deverão dizer sobre a duração da validade das partidas do ATR. Neste estudo, observações feitas durante três meses mostraram a validade da preparação. A tudo isto, deve ser considerada a simplicidade da execução do teste macroscópico com ATR.

Se aplicada como prova de triagem em bovinos, a baixa especificidade obtida é compensada pelo alto índice de sensibilidade (TAB. X). Sem dúvida, em triagem, os animais falso positivos são de menor importância que os falso-negativos, cuja permanência na população, como sadios, constitui grave risco para os demais.

Apesar destas considerações e da significância estatística obtida também com a espécie bovina, que induz à aceitação de relação de associação entre as duas provas, isto é, MAR com sorotipos patogênicos e ATR, estes resultados devem ser interpretados com cautela. Novos estudos são necessários, com maior número de soros e com acompanhamento clínico, ou, se possível, inoculação experimental, a fim de que seja verificado o acerto, valor ou conveniência da aplicação em rotina dos achados da presente pesquisa.

## 6. CONCLUSÕES

. Pela freqüência encontrada neste trabalho, o sorotipo *fort-bragg*, pertencente ao sorogrupo *Autumnalis*, deve ser incluído em baterias de antígenos utilizadas para testes sorológicos visando diagnosticar a leptospirose caprina.

. Os sorotipos apatogênicos *patoe* e *rufino*, empregados vivos na micro-aglutinação rápida, não deram resultados satisfatórios para o diagnóstico da leptospirose bovina e caprina.

. Dos sorotipos apatogênicos, utilizados com metodologia análoga, o *buenos aires* apresentou melhor resultado para o diagnóstico da leptospirose em bovinos e caprinos.

. Todos os antígenos apatogênicos utilizados na prova de micro-soro-aglutinação rápida, realizada nesta pesquisa, apresentaram baixa sensibilidade.

. O antígeno termo-resistente, preparado com o sorotipo *canicola*, utilizado em prova macroscópica, forneceu resultados satisfatórios quando empregado para o soro-diagnóstico de triagem da leptospirose caprina.

. O mesmo antígeno termo-resistente apresentou resultados pouco satisfatórios quando aplicado em testes de aglutinação macroscópica, tipo triagem, para a espécie bovina.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, V.L.V.; LEITE, R.C.; GOUVEIA, A.M.G.; MAGALHÃES, H. H. Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em caprinos do Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19, Belém, 1984. *Resumos*. Belém, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária & Sociedade dos Médicos Veterinários do Pará, 1984. p.175.
2. ADDAMIANO, L. La utilizzazione di *Leptospira biflexa* nella sierodiagnosi di leptospirosi. In: SIMPÓSIO NAZIONALE SULLA LEPTOSPIROSI 1., Pisa, 1962 apud VIEGAS, E.A. *Estudo de novos sorotipos de leptospiroses apatôgenicas na prova de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose caprina e ovina*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1985. p.9. (Tese, Mestrado).
3. ALSTON, J.M. & BROOM, J.C. *Leptospirosis in man and animals*. Edinburg, E. & S Livingstone, 1958. 367p.
4. AMATREDJO, L.E. & CAMPBELL, R.S.F. Bovine leptospirosis. *The Veterinary Bulletin*, Farnham Royal, 45(12):875-91, 1975.
5. ARORA, B.M. & BAXI, K.K. A note on the sero-evidence of leptospiral antibodies in domestic animals in Punjab State. *Indian Journal Animal Science*, New Delhi, 48(11):836-8, 1978.

6. ÁVILA, F.A.; MOREIRA, E.C.; VIANA, F.C. *Leptospira patoc* amostra *Patoc I* como antígeno de triagem no diagnóstico sorológico das leptospiroses suína. *Científica, Jaboticabal*, 5(3):352-5, 1977.
7. ÁVILA, J.A.; COSTA, A.J.; MORAES, F.R.; PINHEIRO, L.E. L.; MANGERONA, A.C.S. Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em soros de bovinos no Município de Jaboticabal, Brasil. *Científica, Jaboticabal*, 6(33):451-3, 1978.
8. BABUDIARI, B. List of *Leptospira* Kept in the WHO/FAO. Leptospire Reference Laboratory in Rome. *Annali dele Istituto Superiore di Sanita, Roma*, 8:159-96, 1972.
9. BARBOSA, M. Aglutininas e lisinas anti-leptospira em soros de bovinos, eqüinos e suínos em Minas Gerais. *Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte*, 14: 1-26, 1962.
10. BLENDEN, D.C. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. In: REUNION INTERAMERICANA SOBRE EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ZONOSIS, 8., Guatemala, 1975. Washington, Organizacion Panamericana de la Salud, p. 160-8, 1976.
11. BROWN, A.L. Standardization of leptospiral testing. *Proceedings United States Animal Health Association, Richmond*, 82:191-204, 1978.
12. BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. ed. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1975. 1268p.
13. CACCHIONE, B.A.; CASCELLI, E.S.; MARTINEZ, E.S. *Leptospira biflexa* Rufino. Su uso en el diagnóstico de leptospirosis animal. *Revista de Investigaciones Agropecuárias, Buenos Aires*, 8(1):29-35, 1971.
14. CALDAS, E.M. *Investigação comparativa de estirpes apatogênicas para o diagnóstico sorológico de leptospirose animal*. Salvador, Escola de Medicina Veterinária da UFBA, 1985. 37p. (Tese, Professor Titular).



15. CALDAS, E.M. *Leptospirose na cidade de Salvador. Estudo e epidemiológico, com alguns aspectos sorológicos, clínicos e laboratoriais*. Salvador, Universidade Federal da Bahia, 1976. 102p. (Tese, Mestrado em Saúde Comunitária).
16. CALDAS, E.M.; SAMPAIO, M.R.; COSTA, E.; TISCHENKO, L. M. *Patoc I and rufino strains of Leptospira biflexa, as screening antigens in the diagnosis of leptospirosis*. *International Journal of Zoonoses*, Taipei, 5:91-6, 1978.
17. CALDAS, E.M.; TISCHENKO, L.M.; PEREIRA FILHO, M.; CÂMARA, J.Q.; SAMPAIO, M.B.; CUNHA, J.B.; SANTOS, M.L. *Aglutininas antileptospira em hemo-soro de animais*. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA*, Salvador, 2(1): 83-98, 1977.
18. CHANG, A. & FAINE, S. *Relative specificities of immunoglobulins reacting with axial filament antigen of Leptospira*. *Australian Journal of Experimental Biology Medical Science*, Adelaide, 52:639-46, 1974.
19. COMBIESCU, D.; STURDZA, N.; KLIPPER, A. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie*, 19: 201-9, 1960 apud TURNER, L.H. *Leptospirosis. II. Serology*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, 62, 1968. p.890.
20. COMBIESCU, D.; STURDZA, N.; SEFER, M.; RADU, I. *Recherches sur les leptospiroses*. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie*, Bucaresti, 17:245-50, 1958.
21. CORDEIRO, F. *Aglutininas antileptospira em soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1973. 58p. (Tese, Mestrado).
22. DORIA, J.D. & SANTANA, E.C. *Leptospirose IV. Aglutininas antileptospira em soros de bovinos no estado da Bahia*. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA*, Salvador, 1(1):74-9, 1976.

23. ELDER, J.K.; McKEON, G.M.; DUNCALFE, F.; WARD, W.H.; LEUTTON, R.D. Epidemiological studies on ecology of *Leptospira interrogans* serovars *pomona* and *hardjo* in Queensland, *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, 3(6):501-21, 1986.
24. ELLIS, W.A. Leptospirosis. *Journal of Small Animal Practice*, London, 27(10):683-92, 1986.
25. FAINE, S. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, World Health Organization, 1982, 171p. (WHO Offset Publication, 67).
26. FUCHS, G.H. Experience with *L. biflexa* antigens in laboratory diagnosis of suspect cases of leptospirosis. *Zentralblatt Bakteriologie Parasitenkunde*, Stuttgart, 209:261-7, 1969 apud HAGIWARA, M.K. *Estudo comparativo entre as reações de soro-aglutinação microscópica e de fixação do complemento na leptospirose canina experimental pelos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, 1979. p.9. (Tese, Doutorado).
27. GENOVEZ, M.E. *Avaliação da eficiência de estirpes de Leptospira biflexa no diagnóstico sorológico de triagem da leptospirose animal*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1985. 59p. (Tese, Mestre).
28. GUIDA, V.O.; SANTA ROSA, C.A.; D'APICE, M.; CORREA, M.D.A.; NATALE, V. Pesquisa de aglutininas anti-leptospira no soro de bovinos do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 26:109-18, 1959.
29. GUTIERREZ, J.; PEREIRA, G.; AMADOR, C.; NAVARRO, N.; TORAÑO, R.; LEON, E. Elaboración y utilización de un antígeno termorresistente para el sorodiagnóstico rápido de la leptospirosis animal. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, Havana, 15(2):101-9, 1984.
30. HAGIWARA, M.K. *Estudo comparativo entre as reações de soroaglutinação microscópica e de fixação do complemento na*

*leptospirose canina experimental pelos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, 1979. 56p. (Tese, Doutorado).

31. HANSON, L.E. Leptospirosis in domestic animals: The public health perspective. *Journal of American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, 181(12):1505-9, 1982.
32. HERGT, B. Meaning of serotype *patoc* (*biflexa* complex) for the diagnosis of leptospirosis by microscopic agglutination. *Zentralblatt Bakteriologie Parasitenkunde*, 235:506-11, 1976 apud HAGIWARA, M.K. *Estudo comparativo entre as reações de soro-aglutinação microscópica e de fixação do complemento na leptospirose canina experimental pelos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, 1979. p.9. (Tese, Doutorado).
33. LICERAS DE HIDALGO, J.; HIDALGO, R.; AZNARÁN, G. Leptospirosis en animales beneficiados en Chimbote, Perú. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, Washington, 50(5): 429-34, 1971.
34. LIMPIAS, E.V. & SHERMAN, M.J. Encuesta serologica de la leptospirosis en Santa Cruz, Bolivia. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, Washington, 75(2):139 - 45, 1973.
35. MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; PUTT, N. Frequência de aglutininas antileptospira em bovinos de corte da região sul do cerrado do Estado do Mato Grosso. *Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG*, Belo Horizonte, 32(2):245-9, 1980.
36. MAILLOUX, M. *Bulletin de la Societ  Pathologie Exotique*, Paris, 62:508-16, 1969 apud WILLIAMS, C.S.F. Diseases. In: GALL, C. ed. *Goat Production*. London, Academic Press, 1981. p.435.
37. MAILLOUX, M. Utilit  de l'antigene *Leptospira biflexa patoc* dans les s rodiagnostics de leptospiroses. *Annales de l'Institut Pasteur*, Paris, 112-5, 1967.

38. MARONPOT, R.R. & BARSOUM, I.S. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, Lawrence, 21:467-72, 1972 apud WILLIAMS, C.S.F. Diseases. In: GALL, C.ed.. *Goat Production*, London, Academic Press, 1981. p.435.
39. MARSHALL, R.B.; MANKTELOW, B.M.; SCHOLLUM, L.M. Standardization of serology for leptospirosis. *New Zealand Veterinary Journal*, Wellington, 30(8):126, 1982. (Abstract).
40. MAZZONELLI, I.; DORTA DE MAZZONELLI, G.; MAILLOUX, M. Recherches sur les antigens des leptospires. *Tropenmedizin und Parasitologie*, Stuttgart, 26(1):35-42, 1975.
41. MICHNA, S.W. Leptospirosis. *The Veterinary Record*, London, 86:484-96, 1970.
42. MOREIRA, E.C.; SILVA, J.A.; VIANA, F.C.; SANTOS, W. L.M.; ANSELMO, F.P.; LEITE, R.C. Leptospirose bovina: I. Aglutininas anti-leptospiras em soros sangüíneos de bovinos de Minas Gerais. *Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG*, Belo Horizonte, 31(3):375-88, 1979.
43. MOREIRA, T.M.S. *Prevalência de aglutininas anti-leptospiras em soros sangüíneos de bovinos dos estados do Pará e Amazonas - Brasil*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1982. 43p. (Tese, Mestrado).
44. MOTIE, A. & MYERS, D.M. Leptospirosis in sheep and goats in Guyana. *Tropical Animal Health Production*, Edingburg, 18:113-4, 1986.
45. MYERS, D.M. *Manual de metodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis*. Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985. 46p. (Nota técnica, 30).
46. NICOLESCU, M.; ANDREESCU, N.; LUPAN, E.; POP, A. The serological diagnosis of leptospirosis in domestic animals by the macroscopic agglutination test with *patoc* antigen. *Archives Roumaines Pathologie Experimentale Microbiologie*, Bucaresti, 41(1):11-3, 1982a.

46. NICOLESCU, M. & LELUTIU, C. Diagnostic par la réaction de fixation du complément à l'aide d'un antigène unique dans le décellement des leptospiroses animales. *Archives Roumaines Pathologie Experimentale Microbiologie*, Bucaresti, 26(3): 557-64, 1967.
47. NICOLESCU, M.; POP, A.; ANDEESCU, N.; MARINCA, F. L. The macroscopic agglutination reaction with *Leptospira biflexa* antigens used as a screening test for the human leptospirosis. *Archives Roumaines Pathologie Experimentale Microbiologie*, Bucaresti, 41(1):5-10, 1982b.
48. NIGAM, S.K.; SHUKLA, V.; RANAT, R. Abortions in goats probably due to *Leptospira* infection in a sheep farm in Madhya Pradesh. *Indian Journal of Animal Health*, Calcutta, (6), 1974.
49. OLIVEIRA, S.J. Presença de aglutininas antileptospira em suínos e bovinos, com e sem sinais de infecção no Rio Grande do Sul. *Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor*, Porto Alegre, (4):57-64, 1977.
50. PALIT, A. & GULASEKHARAN, J. Genus specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *Journal Clinical Pathologie*, London, 26:7-16, 1973.
51. RAJESSEKHAR, M. & NANJIAH, R.D. *Indian Veterinary Journal*, 48:1087-95, 1971. apud WILLIAMS, C.S.F. Diseases. In: GALL, C. ed.. *Goat Production*, London, Academic Press, 1981. p.435.
52. REIS, R.; RYU, E.; PENA, C.M. Pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em bovinos e suínos em Minas Gerais, Brasil. *Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG*, Belo Horizonte, 25(1):11-4, 1973.
53. RIBEIRO, J.L. *Verificação da frequência e vias de eliminação de Leptospira ssp. em rebanho leiteiro da fazenda federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1974. 37p. (Tese, Mestrado).

54. RYU, E. Rapid microscopic agglutination test for *Leptospira* based on 400x magnification of darkfield examination. *Taiwan Journal of Veterinary Medicine & Animal Husbandry*, 17:1-9, 1970a.
55. RYU, E. Rapid microscopic agglutination test for *Leptospira* without non-specific reaction. *Bulletin Office International Epizoties*, Paris, 73(1/2):49-58, 1970b.
56. SAIZ MORENO, L. *Las Zoonosis*. Barcelona, Aedos, 1976. 371p.
57. SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 1(2):97-109, 1970.
58. SANTA ROSA, C.A. *Estudo comparativo de algumas estirpes de leptospiras apatogênicas para o diagnóstico da leptospirose animal*. São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 1977. 31p. (Tese, Livre Docência).
59. SANTA ROSA, C.A. & CASTRO, A.F.P. Presença de aglutininas anti-leptospira em soros de ovinos e caprinos no Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 30:93-8, 1963.
60. SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; SILVA, A.S.; TERUYA, J.M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. *Revista do Instituto Biológico de São Paulo*, São Paulo, 29/30:19-27, 1969/70.
61. SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; TROISE, C. Leptospirose bovina. Inquérito sorológico na região de Campinas. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 28:169-73, 1961.
65. SEBEK, Z. *Veterinarski Casopis*, Bratislava, 10:271-81, 1961 apud WILLIAMS, C.S.F. Diseases. In: GALL, C. ed.. *Goat Production*, London, Academic Press, 1981. p.435.
66. SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo, McGraw-Hill, 1981. 350p.
67. SILVA, A.R.M.B.; QUADRA, A.A.F.; QUADRA, J.A.F.; CORDEIRO, H.A. Aspectos epidemiológicos das leptospiroses humanas

- no Grande Rio, Brasil. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*, Washington, 77(2):122-33, 1974.
68. SILVA, J.A.; VIANA, F.C.; MACHADO, T.M.M.; MOREIRA, E. C.; MODENA, C.M. Aglutininas anti-leptospiras e anti-bruce-  
las em soros de caprinos de diferentes sistemas de pro-  
dução do Estado de Minas Gerais. *Arquivos Brasileiros de  
Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, 36(5):  
539-48, 1984.
69. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6. ed.  
Ames, Iowa State University Press, 1967. 593p.
70. STOENNER, H.G. Application of serologic findings to the  
diagnosis of leptospirosis. *Proceedings United States An-  
imal Health Association*, Richmond, 76:622-34, 1972.
71. TERUYA, J.M.; SILVA, A.S.; CASTRO, A.F.P.; GIORGI, W. So-  
ro-aglutinação para leptospirose realizadas no Instituto  
Biológico de São Paulo durante o ano de 1973. *O Biológi-  
co*, São Paulo, 40(8):228-32, 1974.
72. THORNER, R.M. & REMEIN, Q.R. *Principles and procedures in  
the evaluation of screening for disease*. Washington, U.S.  
Government Printing Office, 1961. 24p. (Public Health  
Monograph, 67).
73. TORTEN, M. Leptospirosis. In: STOENNER, H.; KAPLAN, W.;  
TORTEN, M. *Bacterial, rickettsial and mycotic diseases*.  
Boca Raton, CRC Press, 1979. V.1. p.363-421. (CRC Hand-  
book Series in Zoonoses, Section A).
74. TRAP, D. & GAUMONT, R. Diagnostic sérologique de la lep-  
tospirose. Comparasion des résultats obtenus par une é-  
preuve d'agglutination sur lame avec ceux de l'agglutina-  
tion-lyse. *Annales de Recherches Veterinaires*, Paris, 11  
(3):241-4, 1980.
75. TRAP, D. & GAUMONT, R. L'preuve d'agglutination-lyse et  
l'epreuve d'agglutination macroscopique sur lame dans le

- diagnostic serologique de la leptospirose animale. *Bulletin Mensuel Societe Vétérinaire Pratique de France*, Paris, 65(9):663-72, 1981.
76. TRIPATHY, S.B. Serological prevalence of leptospirosis in cattle, sheep and goats. *Indian Veterinary Journal*, Madras, 54(7):584-5, 1977.
77. TURNER, L.H. Leptospirosis. II. Serology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, 62:880-9, 1968.
78. UPADHYE, A.S.; KRISHNAPPA, G.; AHMED, S.N.; KESHAVAMURTHY, B.S. Leptospiral antibodies in sheep and goats in Karnataka State an epidemiological survey. *Indian Veterinary Journal*, Madras, 57(12):968-70, 1980.
79. VAN DER HOEDEN, 1953 apud ALSTON, J. M. & BROOM, J. C. *Leptospirosis in man and animals*. Edinburg, E. & S. Livingstone, Edinburg, 1958. p.248.
80. VASCONCELLOS, S.A. *Diagnóstico da leptospirose em suínos experimentalmente infectados com Leptospira interrogans sorotipo pomona. Emprego da reação de soro aglutinação microscópica tendo como antígeno a Leptospira biflexa es tirpe Buenos Aires*. São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 1986. 55p. (Tese, Professor Livre-Docente).
81. VASCONCELLOS, S.A. *Diagnóstico laboratorial da Leptospir<sub>o</sub>se. Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP*, São Paulo, 3(3/4):189-95, 1979.
82. VIEGAS, E.A. *Estudo de novos sorotipos de leptospi<sub>r</sub>as a-patogênicas na prova de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose caprina e ovinos*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1985. 63p. (Tese, Mestrado).
83. VIEGAS; L.A., VIEGAS, S.A.R.A.; CALDAS, E.M. Aglutininas



- antileptospira em hemo-soro de caprinos e ovinos, no Estado da Bahia. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA*, Salvador, 5(1):20-34, 1980.
84. WILLIAMS, C.S.F. Diseases. In: GALL, C. ed.. *Goat Production*, London, Academic Press, 1981. p.434-87.
85. WILLIAMS, H.A.; OLIVEIRA, S.J.; RIBEIRO, L.A.O. Leptospirose como causa de aborto em um rebanho bovino no Rio Grande do Sul. *Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor*, Guaíba, 1(3):73-81, 1975.
86. YANAGUITA, R.M. *Diagnóstico rápido da leptospirose animal pela soroaglutinação macroscópica com antígenos de Leptospira biflexa*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1987. 68p. (Tese, Professor Livre-Docente).
87. ZELADA, H.M. *Prevalência de aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos do Território Federal de Roraima-Brasil*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1981. 43p. (Tese, Mestrado).