MITIKA KURIBAYASHI ^{me} HAGIWARA

Dn 69

Ø

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS
REAÇÕES DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA
E DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NA
LEPTOSPIROSE CANINA EXPERIMENTAL PELOS
SOROTIPOS *icterohaemorrhagiae* E *canicola***

Tese apresentada à
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo,
Departamento de Prática de Saúde Pública,
para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Gil Vianna Paim

São Paulo
1979

BIBLIOTECA
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SP - 8

À minha mãe,

exemplo de dignidade,

dedicação e perseverança.

Ao Susumu,

Jun e

Yumi.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gil Vianna Paim, pela acolhida, confiança e orientação que nos foram dispensadas, durante todo o período de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Carlos Almeida Santa Rosa, pela dedicação, estímulo e amizade com que nos acompanhou na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto, pela inestimável colaboração na execução das reações de fixação do complemento.

Ao Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel, pelo constante estímulo, sugestões apresentadas e revisão dos originais.

Aos colegas Carlos Eduardo Larsson e Maria Helena M. A. Larsson, pela valiosa colaboração.

Ao Dr. Paulo Hideki Yassuda, pelo fornecimento das amostras do sorotipo icterohaemorrhagiae e canicola, utilizadas na inoculação experimental.

A Dra. Maria de Lourdes Aguiar Bonadia Reichmann, do Biotério do Hospital do Servidor Público Estadual, pela doação do soro de cobaias, imprescindível na reação de fixação do complemento.

Ao Dr. Antonio Roberto Correa, do Laboratório Biovet Ltda, pela doação das vacinas de cinomose e hepatite.

À Organização Granja Seleta Ltda, pela doação de sangue de coelho utilizado no enriquecimento dos meios de cultura.

Ao Serviço Médico Cirúrgico e Hospitalar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelas facilidades concedidas na obtenção e manutenção dos animais experimentais.

A Sra. Maria Luiza Rigo Pasquarelli e Srta. Daisy Pires Noronha, pela colaboração na revisão e ordenação das Referências Bibliográficas.

A Sra. Regina Mieko Sakata Mirandola e Srta. Magda Nunes, pelo inestimável auxílio prestado na execução técnica deste trabalho.

Ao Sr. Francisco Vieira de Camargo e Sra. Altiva Lima Rodrigues, pelos serviços prestados.

RESUMO.

Com a finalidade de se analisar a dinâmica da evolução dos anticorpos na fase aguda da infecção, através das reações de soroaglutinação microscópica e de fixação do complemento, trinta animais foram inoculados experimentalmente com leptospiras patogênicas, sendo quinze com o sorotipo icterohaemorrhagiae e quinze com o sorotipo canicola. Procurou-se também avaliar a potencialidade do emprego dos antígenos preparados com amostras de leptospiras aquícolas estirpes Patoc I, Rufino e Buenos Aires, em ambas as reações.

Os anticorpos fixadores do complemento foram observados na circulação sanguínea a partir do 4º dia após a inoculação em ambos os grupos de animais, enquanto as aglutininas foram detectadas a partir do 7º dia. Estas persistem durante um período maior de tempo, pois 50% dos animais inoculados com o sorotipo icterohaemorrhagiae apresentaram anticorpos circulantes no 56º dia após a inoculação e 80% dos cães inoculados com o sorotipo canicola, no 63º dia pós-infecção. Nessa oportunidade, os anticorpos fixadores do complemento não foram observados nos soros dos animais de ambos os grupos.

As estirpes Patoc I e Rufino não foram eficientes em revelar anticorpos circulantes em ambos os grupos experimentais tanto pela reação de soroaglutinação microscópica como pela reação de fixação do complemento, em proporções que justifiquem seu emprego como antígeno único. Entretanto, 87% dos cães inoculados com o sorotipo icterohaemorrhagiae e 80% dos cães inoculados com o sorotipo canicola foram reagentes quando se empregou a estirpe Buenos Aires nas reações de soroaglutinação microscópica e de fixação do complemento.

SUMMARY.

In order to evaluate the antibody response to pathogenic leptospira from both serotypes icterohaemorrhagiae and canicola, dogs were experimentally inoculated with these two serotypes. Each of the serotypes were inoculated in 15 dogs and the antibody response in the acute phase of infection was followed using agglutination, and complement fixation tests. These tests were also performed using non pathogenic leptospira such as Patoc I, Rufino and Buenos Aires.

Complement fixing antibodies were detected in both groups, at the 4th day post-infection and agglutinins only appeared in circulation at the 7th day post-infection when homologous antigens were used.

On the 63rd day post-infection with canicola serotype and on the 56th day post-infection with the serotype icterohaemorrhagiae complement fixing antibody could no longer be detected but, in both experimental groups, specific agglutinins were present in significant titres.

The antigens Patoc I and Rufino were inefficient to detect circulating antibodies in experimentally infected animals. However, when the Buenos Aires antigen was used 87 per cent of the animals infected with the serotype icterohaemorrhagiae and 80 per cent of the animals infected with the serotype canicola showed significant titres of antibody.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. LITERATURA	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Inoculação experimental	14
3.1.1. Seleção dos animais	14
3.1.2. Inóculo	14
3.1.3. Constituição dos grupos	15
3.1.4. Coleta de sangue e de urina	16
3.2. Reação de soroaglutinação microscópica	17
3.2.1. Antígenos	17
3.2.2. Técnica da soroaglutinação microscópica	17
3.3. Reação de fixação do complemento	19
3.3.1. Hemácias de carneiro	19
3.3.2. Hemolisina anti-hemácias de carneiro ...	19
3.3.3. Complemento	19
3.3.4. Antígenos	20
3.3.5. Soros hiperimunes	20
3.3.6. Soros	21
3.3.7. Técnica da reação de fixação do complemento	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Reação de soroaglutinação microscópica e de fixação do complemento frente aos antígenos homólogos	23
4.2. Reações de soroaglutinação microscópica e fixação do complemento frente aos antígenos heterólogos	24
4.2.1. Estirpe Patoc I	24
4.2.2. Estirpe Rufino	25
4.2.3. Estirpe Buenos Aires	25
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO.

A leptospirose é uma infecção largamente disseminada entre os animais domésticos e silvestres, assumindo considerável importância como problema econômico e de saúde pública. É causada por um espiroqueta do gênero Leptospira do qual se conhecem pouco mais de 150 sorotipos, com características morfológicas, biológicas e culturais idênticas ³³. A distribuição dos sorotipos na natureza depende do ecossistema regional, existindo assim, de acordo com a área geográfica, focos naturais de determinados sorotipos e uma certa especificidade de hospedeiro ⁴⁷.

Praticamente todos os animais domésticos, silvestres e o homem são suscetíveis, manifestando ou não os sintomas decorrentes da infecção. Inúmeros animais domésticos, principalmente os suínos, bovinos e caninos, bem como a maioria dos espécimes silvestres, entre os quais pode-se destacar os carnívoros, roedores e marsupiais tornam-se, após a infecção, portadores, disseminando o microrganismo na natureza. A eliminação deste espiroqueta pela urina dos portadores ocorre por períodos que podem variar de poucas semanas até muitos meses entre os animais domésticos e por toda a vida nos roedores ⁴.

A susceptibilidade do cão às infecções pelos diferentes sorotipos de leptospira já é conhecida de longa data, principalmente a que se refere aos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola ⁴. Este último apresenta uma real adaptação ao tecido renal do hospedeiro, tornando-se o cão portador e eliminando o espiroqueta pela urina, durante um grande período de tempo. A infecção pelos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola pode determinar o aparecimento de sintomas perfeitamente caracterizados, embora a gravidade da doença possa sofrer interferência de fatores individuais. Muitos dos animais infectados são assintomáticos. Outros sorotipos também podem infectar os cães, determinando quadros mórbidos semelhantes, como também in

fecções benígnas. Muitos sorotipos de leptospiros do complexo interrogans já foram isolados de cães doentes ou portadores sa dios, além dos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola, poden do ser relacionados: australis, pomona, hebdomadis, autumnalis, javanica, saxkoebing, seijoe, tarassovi, medanensis, bangkok, pyrogenes, grippotyphosa, gem, paidjan e wewak ^{26, 27}. Existem tam bém evidências sorológicas de infecção por outros sorotipos co mo mitis, bratislava, poi, australis e butembo ¹⁹.

Inquéritos sorológicos e isolamento do agente e tiológico demonstram haver predominância dos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola, principalmente o último, embora o cão seja suscetível à infecção por uma variedade muito grande de so rotipos. YASSUDA ⁵⁵ (1979), em amplo estudo epidemiológico, a brangendo 1415 cães de rua de São Paulo, isolou 35 amostras de leptospiros das quais 32 eram do sorotipo canicola, 2 do soroti po copenhageni e 1 amostra do sorotipo pomona.

A alta suscetibilidade do cão à infecção pelas leptospiros, aliada à frequência com que ocorre a condição de portador renal apresentam particular interesse em saúde pública, devido ao convívio muito próximo desse animal com o homem. A leptospirose humana, durante muitos anos, considerada uma doen ça profissional própria de determinados grupos de indivíduos que, pelas características ocupacionais tinham, em comum, o contato com os animais domésticos, silvestres ou seus excrementos ⁴⁹, a tualmente tem-se tornado mais frequente em crianças, estudantes e donas de casa, transmitida pelo contato com os cães ⁵³.

O diagnóstico etiológico da infecção ou da doen ça é feito normalmente através da determinação de anticorpos no sangue circulante e, mais raramente, pelo isolamento do agente em materiais biológicos como sangue, líquido cefalorraquidiano ou urina ⁴². Após a morte do animal, pode-se conseguir o isola mento do espiroqueta, cultivando-se fragmentos dos rins.

A reação sorológica padrão, recomendada pela Or ganização Mundial de Saúde ³³ e utilizada rotineiramente no diag

nóstico da leptospirose é o teste de aglutinação microscópica. Entretanto, este teste só pode ser realizado em poucos laboratórios, devido à necessidade de equipamentos especiais e de pessoal experiente, além de haver a necessidade da manutenção de culturas vivas de leptospiras dos sorotipos representativos de cada um dos sorogrupos patogênicos e de alguns sorogrupos de leptospiras aquícolas. O ideal, então, seria uma reação de fácil execução e com um mínimo de sorotipos como antígenos, ou a utilização de um antígeno único, que permitisse estabelecer o diagnóstico da infecção com facilidade e segurança, independente dos sorotipos envolvidos.

Nos últimos 20 anos, inúmeros trabalhos tem sido desenvolvidos^{16, 13, 1, 17, 37}, procurando-se um antígeno com as características acima citadas. Observou-se que algumas amostras de leptospiras aquícolas podem ser aglutinadas pelos soros de indivíduos reagentes às leptospiras patogênicas. Entre estas, destacam-se as cepas Patoc I e São Paulo, sendo a primeira largamente utilizada no diagnóstico laboratorial da leptospirose humana nas reações de aglutinação microscópica^{17, 28, 15}, ou fixação de complemento^{13, 45, 38}. Embora ambas produzem uma reação satisfatória com soros humanos, tal não acontece com o soro dos animais domésticos^{2, 13, 31, 44, 40}. As razões dessa diferença no comportamento não são conhecidas, sugerindo-se entretanto que, estaria relacionada às características imunobiológicas de cada espécie animal. Além do mais, cabe destacar que, a maioria dos soros animais positivos para leptospiras patogênicas é obtida em inquéritos epidemiológicos, desconhecendo-se assim, o período de tempo decorrido após a infecção.

A utilização da amostra Patoc I para o diagnóstico sorológico da leptospirose em cães forneceu resultados contraditórios de acordo com os autores que se dedicam ao assunto, 28, 32, 43, sugerindo-se entretanto que, uma boa concordância entre os resultados da soroaglutinação utilizando antígenos representados por leptospiras patogênicas e os obtidos com o uso de linhagens saprófitas indicaria infecções recentes e a ausência desta concordância indicaria infecção antiga³². O emprego

de outras cepas de leptospiras aquícolas com a mesma finalidade tem também fornecido resultados controversos, considerados bons por uns ^{9, 10}, e contestados por outros ⁴³. Deve-se ressaltar todavia que na maioria das vezes, a interpretação dos resultados não tem sido suficientemente clara por se desconhecer as informações relativas ao estágio da doença ou o período de tempo decorrido após a infecção.

A reação de fixação de complemento é uma reação mais laboriosa do que a reação de aglutinação microscópica, mas parece ser mais específica para revelar infecções recentes, pois os anticorpos fixadores de complemento são observados mais precocemente, desaparecendo da circulação sanguínea em um curto período de tempo que, segundo alguns autores ^{23, 24}, gira em torno de 60 a 90 dias. Ao contrário, os anticorpos aglutinantes podem ser observados na circulação por um período longo de tempo, persistindo às vezes durante toda a vida do animal ⁴. Assim, reações de microaglutinação positiva, principalmente em baixos títulos, podem indicar infecção recente em evolução ou uma infecção mais antiga, não permitindo desta forma, estabelecer o diagnóstico de infecção ativa ⁵⁰.

Para os profissionais é de grande interesse ter informações mais precisas em relação ao estágio da infecção ou da doença, fato que lhes daria melhores possibilidades de tratar o animal com sucesso, evitando que o paciente se torne um portador, com risco de contaminação do meio ambiente. O conhecimento da dinâmica da evolução dos anticorpos em cães recentemente infectados e a possibilidade do emprego de um antígeno único poderiam trazer subsídios para o diagnóstico precoce da leptospirose, minimizando o risco de infecção humana pelo contacto com esses animais.

O presente trabalho tem como propósito acompanhar a dinâmica da evolução dos anticorpos durante as primeiras semanas de infecção em animais experimentalmente infectados com os sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola. Para tanto, serão

utilizadas as reações de aglutinação microscópica e fixação de complemento, realizando-se um estudo comparativo entre ambas e avaliando-se também a verdadeira potencialidade do uso das es tirpes aquícolas Patoc I, Rufino e Buenos Aires como antígeno único nas citadas reações.

2. LITERATURA.

A partir de 1917, quando o gênero Leptospira foi criado por NOGUCHI, sua sistemática tem sofrido inúmeras modificações, aceitando-se porém como bactérias da ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae, gênero Leptospira⁵. Em 1962, o subcomitê taxonômico para o estudo do gênero⁵² concordou com uma subdivisão em duas espécies: Leptospira biflexa, representando as saprófitas ou aquícolas, encontradas em coleções líquidas, terrenos lamacentos e mesmo na água potável e; a Leptospira interrogans ou icterohaemorrhagiae, englobando as formas parasitárias, isoladas de animais e do homem. A diferenciação das espécies foi baseada na capacidade de infectar animais, resistência aos íons cobre bivalentes, características imunológicas e crescimento em meio de cultura livre de soro animal. A estes, foram anexados outros critérios, tais como a resistência a 8-azaguanina ao verde malaquita e à fucsina básica, atividade lipolítica, a reação de oxidase, tolerância ao cloreto de sódio e à temperatura e habilidade em provocar efeito citopático em culturas de células³².

Estudos realizados com leptospiros isoladas do homem e de animais vieram revelar entretanto, que, muitas amostras tendiam a se enquadrar na espécie biflexa. Em virtude de tais fatos, o Grupo de Peritos em Leptospirose, da Organização Mundial de Saúde³³, passou a recomendar que fosse considerada apenas uma espécie no gênero Leptospira até que houvesse possibilidade de diferenciar perfeitamente as espécies, recomendando também a utilização do termo interrogans, mais apropriado do que icterohaemorrhagiae ou biflexa. Passou-se também a utilizar o termo "complexo interrogans", englobando os dois grupos de leptospiros já referidos e compostos por amostras sorologicamente distintas. Dentro deste complexo estão os sorogrupos, constituídos por uma reunião de sorotipos, tendo como base suas relações antigênicas. Atualmente são considerados 18 sorogrupos com aproximadamente 150 sorotipos, dentro do gênero Leptospira. O sorotipo é definido como a unidade taxonômica básica.

A aglutinação de uma suspensão de leptospi^{ras} pe^{lo} soro de pacientes com a molêstia de Weil foi observada nos primórdios do século e a partir dessas observações, MARTIN & PETIT²⁹ desenvolveram em 1918 um método de aglutinação que, em linha gerais, serviu de base para a reação de aglutinação microscópica recomendada pela Organização Mundial de Saúde³³, sendo largamente utilizada em todo o mundo para fins de diagnósticos e para a realização de inquéritos epidemiológicos.

A reação de fixação de complemento para o diagnóstico da leptospirose humana foi descrita inicialmente por BESSEMANS & NELIS⁶ (1928), utilizando como antígeno uma suspensão de leptospi^{ras} do sorotipo icterohaemorrhagiae. A partir da padronização desta técnica, o preparo dos antígenos sofreu inúmeras modificações, desde as mais simples até as mais complicadas, como por exemplo, os antígenos inativados quimicamente ou pelo calor, extraídos pelo álcool ou ainda, sonicados⁵⁰.

Alguns dos antígenos preparados com amostras patogênicas apresentam alta especificidade, reagindo apenas com os anticorpos homólogos, enquanto outros apresentam reações cruzadas com anticorpos heterólogos, sendo portanto considerados gênero - específicos⁴¹. Diversos pesquisadores procuraram aumentar o espectro de ação, possibilitando assim o encontro de maior número de reagentes para os diferentes sorotipos, através da utilização de um "pool" de antígenos^{7, 41, 21}.

De um modo geral, observou-se concordância de 80 a 100% entre os resultados obtidos nas reações de aglutinação microscópica e fixação do complemento pelo emprego de antígenos preparados com uma mesma amostra de leptospira patogênica em soros humanos^{39, 50, 21, 38}, bovinos^{36, 41}, suínos²³ e caninos³⁴.

O conhecimento de que antígenos preparados a partir de certas linhagens aquícolas de leptospi^{ras} são às vezes aglutinadas pelos soros de indivíduos infectados por sorotipos patogênicos de Leptospira induziu muitos pesquisadores a procu

rarem, entre as diversas cepas apatogênicas uma amostra que apresentasse uma reação cruzada com a maioria dos sorotipos patogênicos. KMETZ ²⁵ (1958), observou que leptospiros da estirpe Patoc I eram frequentemente aglutinadas em altas diluições pelo soro de pacientes com leptospirose, algumas vezes mais precocemente do que quando se utilizava antígenos produzidos com o sorotipo patogênico responsável pela doença.

A primeira tentativa real de utilização de leptospiros aquícolas no diagnóstico da leptospirose foi feita por COX e col., ¹⁶ (1958). Estes autores extraíram de uma cepa apatogênica um antígeno solúvel, capaz de sensibilizar hemácias de carneiro, as quais eram lisadas quando testadas com complemento e soro humano contendo anticorpos para leptospiros patogênicos. Embora tivessem obtido bons resultados com soros humanos positivos, a reação foi considerada pouco prática para fins diagnósticos.

A partir dessas observações, outros pesquisadores procuraram testar diversas estirpes de leptospiros aquícolas, através das reações de fixação de complemento e aglutinação microscópica.

COMBIESCO e col., ¹³ (1958), em um estudo epidemiológico da leptospirose humana abrangendo os anos de 1950 a 1957, haviam observado que, leptospiros da cepa Patoc I eram aglutinadas em elevadas proporções pelo soro de pacientes com leptospirose. Prepararam então, um antígeno concentrado da mesma amostra, para ser empregado na reação de fixação do complemento. Em uma série de estudos subsequentes, pesquisadores do mesmo grupo rumeno ^{45, 46} conseguiram demonstrar que os resultados da fixação do complemento com esse antígeno coincidem em aproximadamente 90% dos casos com os do teste de aglutinação microscópica empregando-se antígenos homólogos. Observaram também que os testes gênero - específicos tornam-se negativos após 2 a 6 meses, prestando-se para o diagnóstico dos casos recentes de leptospirose humana. A especificidade e sensibilidade da cepa Patoc I foram maiores do que as das outras cepas não patogênicas como Madida, Velurats Semarang 173, Peschiera e Ancona ⁴⁶.

ADDAMIANO ¹ (1962) também procurou empregar o antígeno Patoc I no diagnóstico da leptospirose pela reação de aglutinação microscópica, observando que a sensibilidade e a especificidade eram altas o suficiente para recomendá-lo como antígeno de triagem nos casos suspeitos de leptospirose. Em 1968, ADDAMIANO & BABUDIERI ² analisaram o comportamento das estirpes Patoc I e São Paulo nas reações de aglutinação microscópica e de fixação de complemento, obtendo uma sensibilidade de 74,4% e 81% respectivamente, com o antígeno Patoc I, nos casos positivos de leptospirose humana por diferentes sorotipos de leptospi^{ras} patogênicas. O antígeno produzido com a cepa São Paulo apresentou atividade ligeiramente inferior.

Os resultados obtidos por FUCHS ¹⁸ (1968) pelo emprego da cepa Patoc I foram parcialmente discordantes pois obser^{vou} uma concordância de apenas 59.7% em casos positivos de lep^{tospirose} causada por diversos sorotipos de leptospi^{ras} patogê^{nica}s e de 96.8% quando se tratava especificamente de infecções determinadas pelos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola. Re^{sultados} semelhantes foram obtidos por HERGT ²² (1976), que, pes^{quisando} a sensibilidade e especificidade do antígeno Patoc I, na reação de aglutinação microscópica observou haver concordância de 50% entre os resultados assim obtidos e os encontrados com o emprego de sorotipos patogênicos. Mesmo assim, sugeriu a necessidade da inclusão dessa estirpe aquícola na bateria de antígenos utilizados no diagnóstico sorológico da leptospirose, pois permitiria revelar os reagentes de forma mais precoce do que os antígenos de amostras patogênicas.

Anticorpos aglutinantes para leptospi^{ras} aquíco^{las} também foram observados no soro de diversas espécies ani^{mais}. Segundo ADDAMIANO & BABUDIERI ² (1968), essas observações foram feitas em soros de cobaios inoculados com o sorotipo icterohaemorrhagiae que aglutinavam a estirpe Vinzenti; em soros de cavalos, cães, ratos e cobaios que reagiam com as estirpes Tokio, Erlangen e Vinzenti; e em soros de frangos que apresentavam aglutininas para o sorotipo andamana.

COX e col., ¹⁶ (1958) procuraram testar o antíge no extraído da linhagem CDC de leptospira aquícola, com soros de bovinos e equinos positivos para leptospirosas patogênicas, com a finalidade de avaliar a potencialidade do seu emprego para fins diagnósticos da leptospirose animal, não tendo obtido porém, resultados satisfatórios como ocorreu com os soros humanos. COMBESCO e col., ¹³ (1958) também obtiveram resultados quase nulos pela utilização da cepa Patoc I na reação de fixação do complemento com soros bovinos e equinos, enquanto observavam positividade da ordem de 85.7% com os soros hiperimunes de coelhos para diversos sorotipos de leptospirosas patogênicas.

NICOLESCO & LEBUTIU³² (1967), na tentativa de utilizar um antígeno único na reação de fixação do complemento com a finalidade de detectar a leptospirose nos animais domésticos, prepararam um antígeno concentrado com a cepa Patoc I, testando-o com soros de leporinos, caninos, suínos, bovinos e equinos positivos na prova de aglutinação microscópica realizada com antígenos preparados com sorotipos patogênicos. Os resultados obtidos foram pouco conclusivos, pois das 42 amostras de cães reagentes ao sorotipo canícola, 76% forneceram resultados positivos com o antígeno homólogo na reação de fixação do complemento 66% com o antígeno Patoc I e 9% com o antígeno São Paulo. Verificaram também que, os resultados eram diferentes conforme o lote de animais estudados, sugerindo assim que uma boa concordância entre os resultados da seroaglutinação microscópica com leptospirosas patogênicas e os obtidos com o emprego de linhagens saprófitas indicaria infecções recentes e a ausência de concordância, infecções antigas.

JÉ MAILLOUX ²⁸ (1967), obteve resultados bastante promissores pela utilização das cepas apatógenicas na reação de aglutinação microscópica com soros caninos e murinos, pois observou que, em 98% dos casos, havia concordância entre os resultados dos testes de aglutinação microscópica com leptospirosas patogênicas e os obtidos com o emprego de linhagens saprófitas. Ainda, segundo o mesmo autor, soros hiperimunes preparados com leptospirosas patogênicas aglutinavam as amostras saprófitas. Pa

toc I, São Paulo e Saada, enquanto imune-soros das duas primeiras estirpes aquícolas, aglutinavam leptospiros pertencentes a 12 diferentes sorotipos patogênicos.

Para ADDAMIANO & BABUDIERI ² (1968), os resultados foram pouco satisfatórios com soros de bovinos, equinos, suínos, ovinos, caninos e leporinos utilizando-se as estirpes Patoc I e São Paulo. A maior concordância obtida foi de 68.8% entre os soros de equinos e a estirpe São Paulo. Por outro lado, observaram também que, muitos soros negativos aglutinavam leptospiros da estirpe Patoc I.

PETELIN e col., ³⁷ (1970), estudando várias estirpes de leptospiros saprófitas visando ao diagnóstico da leptospirose humana, incluíram em seu trabalho soros de animais positivos para leptospiros, concluindo que, a proporção de resultados positivos era muito pequena para se aconselhar a prova com tais antígenos no diagnóstico da leptospirose animal.

A inconstância dos resultados obtidos pelo emprego da estirpe Patoc I como antígeno único nas reações de fixação do complemento ou aglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose animal, estimulou outros pesquisadores a testarem diferentes cepas de leptospiros aquícolas. Assim, CACCHIONE e col., ⁹ (1971) utilizaram várias cepas de leptospiros aquícolas isoladas na Argentina e verificaram que a estirpe Rufino apresentava reações cruzadas com vários sorotipos patogênicos. Em relação ao diagnóstico da leptospirose canina resultados realmente promissores foram obtidos por esses autores, pois observaram uma concordância de 100% nas infecções determinadas pelos sorotipos icterohaemorrhagiae, canicola, ballum, bratislava, butembo e pyrogenes. Em 1972, CACCHIONE e col., ¹⁰ ampliaram os estudos iniciados com a estirpe Rufino, obtendo resultados semelhantes com os soros de cães reagentes para outros sorotipos de leptospiros patogênicos. Entretanto, esses resultados não foram confirmados por SANTA ROSA ⁴³ (1977), pois este autor verificou que, pelo emprego dos antígenos Patoc I e Rufino na reação de aglutinação microscópica, os resultados eram praticamente ne

gativos com os soros de bovinos, suínos e caninos positivos para leptospiplas patogênicas. Esse mesmo autor preconizou o emprego da estirpe Buenos Aires no diagnóstico da leptospirose animal, pois obteve uma proporção de 77,5% de reações positivas com os soros de cães reagentes ao sorotipo icterohaemorrhagiae e de 80% no caso de cães positivos ao sorotipo canicola. Nos outros espécimes considerados, a sensibilidade dessa estirpe aquícola foi próxima a 100%.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Inoculação experimental.

3.1.1. Seleção dos animais.

Foram utilizados 30 animais da espécie canina, adultos, sem raça definida e considerados sadios. Os animais foram previamente imunizados contra cinomose e hepatite e receberam tratamento antihelmíntico (mebendazole na dose de 20mg//kg/dia, durante 3 dias). Antes de serem incluidos no experimento procedeu-se ao exame clínico, hematológico e de urina de cada animal, bem como à pesquisa de anticorpos antileptospiras pela técnica de soroaglutinação microscópica,utilizando-se como antígenos os sorotipos representativos de 18 sorogrupos patogênicos do complexo Leptospira interrogans e os 3 sorotipos de leptospiras aquícolas a serem estudados no presente experimento (TABELA 1). Procurou-se ainda, investigar o estado de portador renal através da cultura de urina em meio de Fletcher.

Foram incluídos nos 2 lotes experimentais apenas os animais que se apresentavam clinicamente normais, sem alterações no exame hematológico e de urina, livres de anticorpos contra qualquer um dos antígenos empregados e que não se caracterizavam como portadores renais.

3.1.2. Inóculo.

As amostras dos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola utilizadas na inoculação dos cães provieram do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da

Universidade de São Paulo* e haviam sido recentemente isoladas de rim de um rato de esgoto (amostra R 10) e de um cão de rua (amostra CCZ 8). Culturas de 15 a 20 dias em meio semi-sólido foram inicialmente inoculadas em cobaios jovens por via intraperitoneal, reisolando-se desta maneira as leptospiras do rim 21 dias após e a seguir, novamente inoculadas em outros cobaios. Após a 2a. passagem, as leptospiras foram cultivadas durante 5 dias a 28°C em meio líquido (EMJH - Difco), enriquecido de soro de coelho a 10% e usadas como inóculo.

3.1.3. Constituição dos grupos.

O grupo I foi composto de 15 animais dos quais 14 eram machos e 1 fêmea, previamente selecionados e preparados da forma anteriormente citada. Cada animal foi inoculado com 2,0 ml da cultura de 5 dias da amostra R 10 do sorotipo icterohaemorrhagiae, (aproximadamente 2×10^9 leptospiras), por via sub-cutânea.

O grupo II foi também constituído por 15 animais, sendo 12 machos e 3 fêmeas, selecionados e preparados de maneira idêntica aos animais do 1º grupo e inoculados com 2,0 ml da cultura de 5 dias da amostra CCZ 8 do sorotipo canicola, (aproximadamente 2×10^9 leptospiras), também por via sub-cutânea.

Após a inoculação, os animais foram controlados diariamente durante os primeiros 14 dias, observando-se as alterações clínicas, dando-se destaque às variações da temperatura retal. Após esse período de tempo, o exame clínico do animal foi realizado em intervalos semanais.

---

* Gentilmente cedidas pelo Dr. Paulo Hideki Yassuda.

Decorridos 56 dias para o 1º grupo e 63 dias para o 2º grupo, todos os animais sobreviventes foram sacrificados, observando-se as alterações macroscópicas e microscópicas dos rins, fígado e pulmão. Um fragmento do rim de todos os animais foi coletado assepticamente, por meio de uma pipeta Pasteur e cultivado em meio de Fletcher adicionado de 10% de soro de coelho, para isolamento de leptospiras.

3.1.4. Coleta de sangue e de urina.

Amostras de sangue para os exames hematólogicos e sorológicos foram coletadas das veias periféricas (safena, radial ou jugular), procedendo-se antes aos devidos cuidados de assepsia, imediatamente antes da inoculação e decorridos 4, 7, 10, 14, 21, 28, 25, 42, 49, 56 e 63 dias.

A amostra que se destinava ao exame hematólogico foi coletada em frascos contendo EDTA (sal de ácido etileno diamino tetracético) como anticoagulante e o restante do sangue foi colocado em tubos de vidro umedecidos com salina fisiológica. Após a retração do coágulo, a amostra foi centrifugada a 1.500 rpm durante 15 minutos, separando-se a seguir o soro que, foi mantido a -4° C até o momento do seu uso.

As amostras de urina foram coletadas através de cateterismo vesical utilizando-se sondas descartáveis munidas de coletores para os machos e sondas metálicas esterilizadas para as fêmeas. Imediatamente após a coleta, foram semeadas 3 gotas de urina pura, diluída a 1:10, 1:100 e 1:1000 com solução salina fisiológica em meio de Fletcher, o qual foi mantido a 28° C durante 30 dias.

TABELA 1 - Antígenos utilizados na reação de soroaglutinação microscópica para a seleção dos animais experimentais. São Paulo, 1979.

Antígeno Nº	Sorotipos	Cepa
1	<u>icterohaemorrhagiae</u>	RGA
2	<u>canicola</u>	Hond Utrecht IV
3	<u>pomona</u>	Pomona
4	<u>grippytyphosa</u>	Moskva V
5	<u>tarassovi</u>	Perepelicin
6	<u>australis</u>	Ballico
7	<u>bataviae</u>	Van Tienen
8	<u>castellonis</u>	Castellón 3
9	<u>wolffi</u>	3705
10	<u>panama</u>	CZ 214 K
11	<u>pyrogenes</u>	Salinem
12	<u>javanica</u>	Veldrat Bat. 46
13	<u>autumnalis</u>	Akiyami A
14	<u>butembo</u>	Butembo
15	<u>andamana</u>	CH 11
16	<u>whitcombi</u>	Whitcomb
17	<u>shermani</u>	Lt 821
18	<u>brasiliensis</u>	An 776
19	<u>patoc</u>	Patoc I
20	-	Rufino
21	-	Buenos Aires

3.2. Reação de soroaglutinação microscópica.

3.2.1. Antígenos^{*}.

Os antígenos empregados na reação de soroaglutinação microscópica para a seleção dos animais experimentais, em número de 21, estão relacionados na TABELA 1. O meio de cultura empregado para o preparo dos antígenos foi EMJH (Difco), onde se acrescentou 10% de soro de coelho livre de anticorpos antileptospiras e previamente inativado a 56°C durante 45 minutos. Cada tubo contendo o meio foi semeado com a amostra, na proporção de 10% e incubado a temperatura de 28°C durante 6 dias. Antes de serem usados, eram examinados quanto a sua pureza, densidade, presença de autoaglutinação e densidade microbiana. Os antígenos foram considerados adequados quando se apresentavam livres de contaminação, de autoaglutinação e com densidade correspondente a 100 leptospiras por campo microscópico no exame em microscopia de campo escuro, usando-se um aumento de 450 x.

Nas reações de aglutinação microscópica com as amostras de soro coletadas após a inoculação foram utilizados os antígenos homólogos icterohaemorrhagiae, para o 1º grupo de animais, e canicola para os animais do 2º grupo e os antígenos preparados com as amostras das estirpes aquícolas Patoc I, Rufino e Buenos Aires.

3.2.2. Técnica da soroaglutinação microscópica.

Os soros foram inicialmente diluídos a 1:50 em solução fisiológica com tampão de Sørensen, de acordo com SANTA ROSA⁴² (1970). Desta diluição, ali

---

* Pertencentes à coleção do Prof.Dr. Carlos Almeida Santa Rosa, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina na Veterinária e Zootecnia da USP, e gentilmente cedidos pelo mesmo.

quotas de 0,2 ml foram distribuídas em 21 tubos de ensaio, adicionando-se a seguir 0,2 ml de cada um dos antígenos na bateria de tubos correspondentes a uma amostra sérica, obtendo-se assim, uma diluição final de 1:100.

Os tubos com a mistura soro-antígeno eram levemente agitados e incubados em estufa a 28°C durante três horas, para a seguir, proceder-se a leitura, usando-se microscopia de campo escuro com aumento de 150 x. Uma gota da mistura soro-antígeno era colocada sobre uma lâmina de vidro e levada ao microscópio, observando-se a existência ou não de aglutinação.

O grau de aglutinação era lido e avaliado de acordo com o seguinte critério: 1+ quando pelo menos 25% das leptospiras estavam aglutinadas no campo microscópico; 2+ quando havia 50% de aglutinação; 3+ e 4+ quando se observavam a aglutinação de respectivamente 75 e 100% das leptospiras.

Foram consideradas positivas as reações em que houve aglutinação de pelo menos 50% das leptospiras.

As amostras de soro coletadas após a inoculação foram diluídas com salina fisiológica com tampão de Sørensen, a 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400; 0,2 ml destas diluições foram distribuídas em 4 tubos de ensaio, adicionando-se a seguir 0,2 ml dos antígenos e procedendo-se da maneira idêntica à citada anteriormente.

O título de cada soro foi considerado o inverso da diluição em que pelo menos 50% das leptospiras se encontravam aglutinadas.

3.3. Reação de fixação do complemento.

3.3.1. Hemácias de carneiro.

Durante todas a investigação foram usadas hemácias de carneiro conservadas em solução de Alsever modificada de acordo com BUKANTZ e col.⁸ (1946)*. No momento do uso, as hemácias foram filtradas em algodão hidrófilo e a seguir lavadas 3 vezes por centrifugação a 1.500 rpm, durante 10 minutos em solução fisiológica. Da papa de hemácias obtida após a 3a. centrifugação, preparou-se uma suspensão a 5% em solução fisiológica, padronizando-a a seguir para densidade ótica 0,56 em espectrofotômetro Coleman Jr., modelo 6A em comprimento de onda de 545 nm.

3.3.2. Hemolisina anti-hemácias de carneiro.

A hemolisina foi preparada em coelhos, segundo a técnica descrita por ULRICH & MAC ARTHUR⁵¹ (1942)* e foi usada na sua concentração ótima de 1:1000.

3.3.3. Complemento.

Como fonte de complemento utilizou-se uma mistura de soros de 20 cobaios machos, distribuída em alíquotas de 1 a 2 ml, que foram conservadas à temperatura de -20°C até o momento do uso. O complemento foi titulado em unidade 50% de hemólise, de acordo com a técnica descrita por CAMARGO e col.,¹¹ (1950), cada vez que se procedia à realização da prova de fixação do complemento.

---

* Preparadas e gentilmente cedidas pelo Prof.Dr. Aramis A.Pinto, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.-

3.3.4. Antígenos.

Os antígenos utilizados na reação de fixação do complemento foram preparados de acordo com a técnica descrita por STURDZA e col., ⁴⁵ (1960) com ligeiras modificações. Para o preparo do antígeno foram usadas as seguintes cepas de leptopiras: Leptospira interrogans sorotipo canicola estirpe Hond Utrech IV, sorotipo icterohaemorrhagiae cepa R.G.A. e as cepas Rufino, Buenos Aires e Patoc I das leptopiras aquícolas. As amostras foram semeadas em meio líquido (EMJH - Difco) a crescido de 10% de soro de coelho e incubadas a 28°C durante 8 a 10 dias. Havendo um bom crescimento, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspenso na proporção de 1:10 do volume original em solução fisiológica contendo mertiolate a 1:10.000. As suspensões dos antígenos assim preparadas foram conservadas à temperatura de 4°C até o momento do uso, tendo sido agitadas ocasionalmente durante os primeiros dias. Durante todo o experimento os antígenos foram utilizados em sua dose de reatividade ótima. Para tanto, realizou-se a titulação em bloco, em que várias diluições do antígeno foram testadas contra várias diluições dos respectivos soros hiperimunes, empregando-se 2,5 unidades de complemento (50% hemólise).

3.3.5. Soros hiperimunes.

Para obtenção dos soros hiperimunes, coelhos adultos normais de aproximadamente 2.500 gramas de peso foram inoculados por via endovenosa, na veia marginal da orelha. Foram praticadas 5 inoculações de culturas vivas de leptopiras em meio líquido, em doses sucessivas de 1, 2, 4, 4,

4 ml, com intervalos de 6 dias entre cada inoculação. Decorridos 6 dias após a última inoculação procedeu-se a sangria branca; os soros obtidos foram titulados pela técnica de aglutinação microscópica com o antígeno homólogo. Os títulos obtidos para todos os soros variaram de 51.200 a 102.400.

Os soros hiperimunes foram usados para titular os antígenos empregados nas provas de fixação do complemento, e também como controle positivo nas reações de aglutinação microscópica.

3.3.6. Soros.

Os soros a serem testados foram coletados de animais infectados experimentalmente com as leptospiros dos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola conforme o item 3.1.4. Cada amostra de soro foi diluída em solução fisiológica a 1:5, 1:10, e assim sucessivamente até a diluição 1:640, e testada contra o antígeno homólogo e contra os antígenos heterólogos Buenos Aires, Patoc I e Ru fino.

3.3.7. Técnica da reação de fixação do complemento.

Para as reações de fixação do complemento utilizou-se a técnica descrita por CAMARGO e col.¹¹ (1950) utilizada rotineiramente no sistema febre aftosa, sendo os seguintes os volumes dos reagentes e o tempo de incubação:

soro.....0,2 ml

antígeno.....0,2 ml

complemento.....0,2 ml

Incubação a 37°C, durante 30 minutos
sistema hemolítico ... 0,4 ml

Incubação a 37°C durante 30 minutos

Após o período de incubação, cada tubo foi centrifugado, fazendo-se a leitura da densidade ótica do sobrenadante em espectrofotômetro Collemann Jr. modelo 6A, em comprimento de onda de 545 nm. A partir da densidade ótica calculou-se a percentagem de hemólise. As reações foram consideradas positivas quando não houve hemólise, calculando-se o título final do soro nas diluições em que se observou 50% de hemólise ou empregando-se a seguinte expressão, em substituição ao método da leitura em gráfico estabelecido pela técnica de CAMARGO e col.,¹¹ (1950):

$$x = a + \frac{(50 - b) \cdot a}{c - b}, \text{ sendo:}$$

x = título a ser conhecido.

a = inverso da diluição em que ocorre percentagem de hemólise menor e mais próxima de 50%.

b = percentagem de hemólise em a.

c = percentagem de hemólise na diluição seguinte.

4. RESULTADOS.

4.1. Reação de soroaglutinação microscópica e de fixação do complemento frente aos antígenos homólogos.

Todos os animais inoculados com leptospiroas patogênicas dos sorotipos icterohaemorrhagiae ou canicola responderam ao estímulo antigênico, produzindo anticorpos fixadores do complemento e aglutininas detectados na circulação sanguínea através das reações de fixação do complemento e de soroaglutinação microscópica. No 4º dia após a inoculação, 7 dos animais infectados pelo sorotipo icterohaemorrhagiae (47%) e 8 dos animais inoculados com o sorotipo canicola (53%) foram reagentes à reação de fixação do complemento, frente aos antígenos homólogos, enquanto não se observou nenhum resultado positivo na reação de aglutinação microscópica. Já no 7º dia, 87% dos cães do grupo I, e 100% dos animais do grupo II, apresentaram anticorpos fixadores do complemento. Nessa ocasião as aglutininas foram detectadas em títulos 100 em 80% dos cães do 1º grupo e em 53% dos cães do 2º grupo. Ambas as reações tornaram-se positivas em todos os animais infectados pelo sorotipo icterohaemorrhagiae e pelo sorotipo canicola, 10 dias após a inoculação (TABELAS 2 e 3).

Quando se compara a evolução dos anticorpos revelados pelas duas reações empregadas no presente experimento, pode-se observar que a persistência dos anticorpos fixadores do complemento foi por um período menor de tempo, desaparecendo totalmente da circulação sanguínea 56 dias após a inoculação com o sorotipo icterohaemorrhagiae e 63 dias após a infecção pelo sorotipo canicola (FIGURAS 1 e 2).

De um modo geral, a ascensão dos títulos para as reações de fixação do complemento e de aglutinação microscópica é rápida, enquanto o declínio é mais lento.

Os anticorpos aglutinantes tendem a persistir na circulação por um período maior de tempo, embora em títulos baixos (TABELAS 4, 5, 6 e 7). Existe uma variação muito grande no nível sérico de anticorpos humorais detectados por ambas as reações, encontrando-se título máximo de 6.400 para a reação de soroaglutinação microscópica e ≥ 640 para a reação de fixação do complemento.

4.2. Reações de soroaglutinação microscópica e fixação do complemento frente aos antígenos heterólogos.

4.2.1. Estirpe Patoc I.

Oito dos 15 animais (53%) inoculados com o sorotipo icterohaemorrhagiae apresentaram reação de aglutinação microscópica positiva quando se utilizou como antígeno a suspensão de leptospiras da estirpe aquícola Patoc I, embora por um período curto de tempo, abrangendo do 7º ao 21º dia (TABELA 8). Desses oito reagentes dois não apresentaram anticorpos capazes de fixar o complemento na presença de antígeno Patoc I. O período de persistência desses anticorpos na circulação periférica é bastante curto, pois, em 2 animais, a reação foi positiva em apenas uma amostra sérica, enquanto em outros, observou-se reação positiva em 2 ou 3 amostras séricas consecutivas.

Menor positividade foi obtida no grupo de animais inoculados com o sorotipo canicola, no qual se observaram apenas 5 reagentes no teste de aglutinação microscópica e 4 no teste de fixação do complemento, correspondendo a uma proporção, respectivamente de 33 e 27% (TABELA 9).

Os títulos das reações de aglutinação microscópica com o antígeno Patoc I não excederam o título mínimo considerado significativo (100) em

ambos os grupos de animais. Os títulos observados nas reações de fixação do complemento também foram baixos variando entre 5 e 30.

4.2.2. Estirpe Rufino.

Entre os animais do grupo I, inoculados com o sorotipo icterohaemorrhagiae, 7 animais (53%) apresentaram reação de soroaglutinação positiva durante um curto período de tempo quando se utilizou como antígeno a suspensão de leptospi^{ras} a quícolas da amostra Rufino, não se observando nenhum reagente 28 dias após a inoculação (TABELA 10).

Pela reação de fixação do complemento, quando se testaram os mesmos soros frente ao antígeno preparado com a estirpe Rufino, não se obteve nenhum resultado positivo.

Características semelhantes foram observadas entre os animais inoculados com o sorotipo canicola pois, na reação de fixação do complemento não se observou nenhuma reação positiva frente ao antígeno Rufino, enquanto foram observados 8 (53%) reagentes pela reação de aglutinação microscópica (TABELA 11).

Os títulos medidos pela reação de aglutinação microscópica foram baixos, como havia sido observado quando se utilizou a estirpe Patoc I.

4.2.3. Estirpe Buenos Aires.

Dos animais inoculados com o sorotipo icterohaemorrhagiae, 87% apresentaram reação positiva aos testes de fixação do complemento e aglutinação microscópica, frente aos antígenos prepara

dos com leptospiiras da estirpe Buenos Aires. Entre os animais do grupo II, inoculados com leptospiiras patogênicas do sorotipo canicola, a proporção de reagentes foi menor, isto é, da ordem de 80%. O período de tempo em que se observaram resultados positivos nas reações de fixação do complemento vai do 4º ao 35º dia e nas reações de aglutinação microscópica do 7º ao 35º dia, embora a maioria das reações positivas tenha sido observada entre o 7º e 21º dia em ambos os grupos de animais (TABELAS 12 e 13).

Os títulos de anticorpos medidos pelas reações de aglutinação microscópica e de fixação do complemento, em ambos os grupos de animais estão apresentados nas TABELAS 14 e 15.

TABELA 2 - Frequência de cães reagentes e não reagentes às reações de soro aglutinação microscópica e de fixação do complemento, frente ao antígeno homólogo, antes e após a inoculação com Leptospira in terrogans sorotipo icterohaemorrhagiae. São Paulo, 1979.

Reação de Soroaglutinação Microscópica					Reação de Fixação do Complemento			
Tempo (Dias)	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes
0	0	15	15	0	0	15	15	0
4	0	15	15	0	7	8	15	47
7	12	3	15	80	13	2	15	87
10	15	0	15	100	15	0	15	100
14	15	0	15	100	15	0	15	100
21	15	0	15	100	14	1	15	93
28	13	0	13	100	9	4	13	69
35	12	1	13	95	7	6	13	54
42	9	3	12	75	4	8	12	33
49	8	3	11	73	2	9	11	18
56	4	4	8	50	0	8	8	0

TABELA 3 - Frequência de cães reagentes e não reagentes às reações de soro aglutinação microscópica e de fixação do complemento, frente ao antígeno homólogo, antes e após a inoculação com Leptospira in terrogans sorotipo canicola. São Paulo, 1979.

Reação de Soroaglutinação Microscópica					Reação de Fixação do Complemento			
Tempo (Dias)	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes
0	0	15	15	0	0	15	15	0
4	0	15	15	0	8	7	15	53
7	8	7	15	53	15	0	15	100
10	15	0	15	100	15	0	15	100
14	15	0	15	100	15	0	15	100
21	15	0	15	100	14	1	15	93
28	15	0	15	100	13	2	15	87
35	15	0	15	100	12	3	15	80
42	14	1	15	93	8	7	15	53
49	13	2	15	87	7	8	15	47
56	9	2	11	82	3	8	11	27
63	8	2	10	80	0	10	10	0

TABELA 4 - Títulos de anticorpos medidos pela reação de aglutinação microscópica frente ao antígeno homólogo, em cães inoculados com Leptospira interrogans sorotipo icterohaemorrhagiae. São Paulo, 1979.

Tempo (dias) \ Animal Nº	0	4	7	10	14	21	28	35	42	49	56
1	-	-	200	200	400	100	*				
2	-	-	100	800	800	800	400	100	100	100	-
3	-	-	100	400	800	6400	1600	800	800	100	*
4	-	-	100	200	1600	3200	400	400	400	200	*
5	-	-	-	800	800	800	800	200	100	100	100
6	-	-	100	100	800	1600	*				
7	-	-	800	1600	1600	1600	1600	800	400	-	-
8	-	-	200	200	400	400	200	-	-	-	-
9	-	-	200	800	800	800	100	100	-	-	*
10	-	-	200	800	800	6400	800	100	100	100	100
11	-	-	100	1600	6400	6400	6400	1600	800	400	400
12	-	-	200	800	800	6400	1600	1600	800	800	400
13	-	-	-	400	400	800	400	100	*		
14	-	-	800	1600	3200	3200	3200	100	100	100	-
15	-	-	-	200	200	1600	1600	800	400	*	

* = óbito no decurso do experimento.

TABELA 5 - Evolução dos títulos de anticorpos medidos pela reação de fixação do complemento frente ao antígeno homólogo, em cães inoculados com Leptospira interrogans sorotipo icterohaemorrhagiae. São Paulo, 1979.

Tempo (dias)	0	4	7	10	14	21	28	35	42	49	56
Animal Nº											
1	-	-	110	150	190	80	*				
2	-	-	110	440	560	360	20	-	-	-	-
3	-	-	40	50	160	640	640	640	640	640	*
4	-	360	640	640	640	80	60	5	5	5	*
5	-	80	450	450	280	180	90	50	50	-	-
6	-	-	-	5	10	440	*				
7	-	160	>640	>640	540	440	120	-	-	-	-
8	-	80	>640	>640	540	440	120	-	-	-	-
9	-	40	350	350	130	70	-	-	-	-	*
10	-	-	30	30	40	-	-	-	-	-	-
11	-	40	250	>640	>640	>640	620	480	100	-	-
12	-	-	>640	610	340	60	-	-	-	-	-
13	-	-	>640	>640	120	30	-	-	*		
14	-	>640	>640	>640	>640	>640	>640	340	-	-	-
15	-	-	-	640	640	640	40	40	-	*	

* = Óbito no decurso do experimento.

TABELA 6 - Evolução dos títulos de anticorpos medidos pela reação de aglutinação microscópica frente ao antígeno homólogo, em cães inoculados com Leptospira in terrogans sorotipo canicola. São Paulo, 1979.

Tempo (dias)	0	4	7	10	14	21	28	35	42	49	56	63
Animal N°												
1	-	-	800	1600	1600	400	400	400	400	200	200	-
2	-	-	200	800	6400	6400	6400	6400	6400	6400	3200	800
3	-	-	-	800	3200	6400	6400	6400	3200	3200	1600	800
4	-	-	100	800	1600	6400	1600	200	200	200	200	100
5	-	-	-	800	6400	6400	6400	6400	6400	1600	*	
6	-	-	200	800	1600	1600	200	200	-	-	-	*
7	-	-	400	800	1600	1600	1600	200	200	100	100	800
8	-	-	-	1600	1600	3200	3200	400	200	200	*	
9	-	-	400	800	6400	6400	6400	3200	3200	3200	1600	800
10	-	-	-	1600	1600	1600	800	200	100	-	-	-
11	-	-	200	1600	1600	1600	1600	800	200	200	200	200
12	-	-	200	800	800	1600	200	200	200	200	*	
13	-	-	-	3200	6400	6400	1600	1600	400	200	*	
14	-	-	-	3200	3200	3200	3200	3200	800	100	100	100
15	-	-	-	6400	6400	6400	3200	1600	1600	800	400	200

* = óbito no decurso do experimento.

TABELA 7 - Títulos dos anticorpos medidos pela reação de fixação de complemento frente ao antígeno homólogo, em cães inoculados com Leptospira interrogans sorotipo canicola. São Paulo, 1979.

Tempo (dias) Animal Nº	0	4	7	10	14	21	28	35	42	49	56	63
1	-	160	>640	410	270	60	-	-	-	-	-	-
2	-	-	90	>640	420	400	350	420	90	-	-	-
3	-	-	270	550	640	640	640	350	350	210	-	-
4	-	80	260	>640	>640	>640	170	-	-	-	-	-
5	-	160	160	>640	>640	>640	>640	>640	>640	600	*	-
6	-	-	180	180	200	-	-	-	-	-	-	*
7	-	80	260	320	260	180	180	80	90	80	40	-
8	-	-	640	320	260	240	240	130	-	-	*	-
9	-	80	>640	>640	>640	>640	640	560	220	160	80	-
10	-	-	>640	>640	640	400	200	10	5	-	-	-
11	-	-	>640	>640	640	640	370	160	80	80	-	-
12	-	80	640	320	260	200	80	80	-	-	*	-
13	-	50	640	640	320	260	160	80	-	-	*	-
14	-	-	>640	640	640	160	160	160	80	20	-	-
15	-	20	360	>640	>640	640	640	320	160	110	80	-

* = óbito no decurso do experimento.

FIGURA 1 - PORCENTAGEM DE REAGENTES ÀS REAÇÕES DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA E DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO FRENTE AO ANTÍGENO HOMÓLOGO, ANTES E APÓS A INOCULAÇÃO COM LEPTOSPIRA INTERROGANS SOROTIPO ICTEROHAEMORRHAGIAE, SÃO PAULO, 1979.

FIGURA 2 - PORCENTAGEM DE REAGENTES ÀS REAÇÕES DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA E DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO FRENTE AO ANTÍGENO HOMÓLOGO, ANTES E APÓS A INOCULAÇÃO COM LEPTOSPIRA INTERROGANS SOROTIPO CANICOLA. SÃO PAULO, 1979.

TABELA 8 - Frequência de cães reagentes e não reagentes às reações de soroaglutinação microscópica e de fixação do complemento frente ao antígeno Patoc I, antes e após a infecção experimental por Leptospira interrogans sorotipo icterohaemorrhagiae. São Paulo, 1979.

Reação de Soroaglutinação Microscópica					Reação de Fixação do Complemento			
Tempo (Dias)	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes
0	0	15	15	0	0	15	15	0
4	0	15	15	0	1	14	15	7
7	4	11	15	27	5	10	15	33
10	8	7	15	53	6	9	15	40
14	8	7	15	53	4	11	15	27
21	6	9	15	40	2	13	15	13
28	1	12	13	8	0	13	13	0
35	1	12	13	8	0	13	13	0
42	0	12	12	0	0	12	12	0
49	0	11	11	0	0	11	11	0
56	0	8	8	0	0	8	8	0

TABELA 9 - Frequência de cães reagentes e não reagentes às reações de soro aglutinação microscópica e de fixação do complemento frente ao antígeno Patoc I, antes e após inoculação com Leptospira interrogans sorotipo canicola. São Paulo, 1979.

Reação de Soroaglutinação Microscópica					Reação de Fixação do Complemento			
Tempo (Dias)	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes
0	0	15	15	0	0	15	15	0
4	0	15	15	0	1	14	15	7
7	3	12	15	20	2	13	15	13
10	4	11	15	27	4	11	15	27
14	5	10	15	33	4	11	15	27
21	4	11	15	27	4	11	15	27
28	1	14	15	7	0	15	15	0
35	1	14	15	7	0	15	15	0
42	1	14	15	7	0	15	15	0
49	0	15	15	0	0	15	15	0
56	0	11	11	0	0	11	11	0
63	0	10	10	0	0	10	10	0

TABELA 10 - Frequência de cães reagentes e não reagentes às reações de soro aglutinação microscópica e de fixação do complemento frente ao antígeno Rufino, antes e após inoculação com Leptospira interrogans sorotipo icterohaemorrhagiae. São Paulo, 1979.

Reação - de Soroaglutinação Microscópica					Reação de Fixação do Complemento			
Tempo (Dias)	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes
0	0	15	15	0	0	15	15	0
4	0	15	15	0	0	15	15	0
7	5	10	15	33	0	15	15	0
10	7	8	15	53	0	15	15	0
14	7	8	15	53	0	15	15	0
21	4	11	15	27	0	15	15	0
28	0	13	13	0	0	13	13	0
35	0	13	13	0	0	13	13	0
42	0	12	12	0	0	12	12	0
49	0	11	11	0	0	11	11	0
56	0	8	8	0	0	8	8	0

TABELA 11 - Frequência de cães reagentes e não reagentes às reações de soro aglutinação microscópica e de fixação do complemento frente ao antígeno Rufino, antes e após inoculação com Leptospira interrogans sorotipo canicola. São Paulo, 1979.

Reação de Soroaglutinação Microscópica					Reação de Fixação do Complemento			
Tempo (Dias)	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes
0	0	15	15	0	0	15	15	0
4	0	15	15	0	0	15	15	0
7	0	15	15	0	0	15	15	0
10	3	12	15	20	0	15	15	0
14	5	10	15	33	0	15	15	0
21	8	7	15	53	0	15	15	0
28	8	7	15	53	0	15	15	0
35	7	8	15	47	0	15	15	0
42	4	11	15	27	0	15	15	0
49	0	15	15	0	0	15	15	0
56	0	11	11	0	0	11	11	0
63	0	10	10	0	0	10	10	0

TABELA 12 - Frequência de cães reagentes e não reagentes às reações de soro aglutinação microscópica e de fixação do complemento frente ao antígeno Buenos Aires, antes e após inoculação com Leptospira interrogans sorotipo icterohaemorrhagiae. São Paulo, 1979.

Reação de Soroaglutinação Microscópica					Reação de Fixação do Complemento			
Tempo (Dias)	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes
0	0	15	15	0	0	15	15	0
4	0	15	15	0	2	13	15	13
7	3	12	15	20	11	4	15	73
10	13	2	15	87	12	4	15	80
14	13	2	15	87	11	4	15	73
21	10	5	15	67	5	10	15	33
28	7	6	13	54	2	11	13	15
35	3	10	13	23	2	11	13	15
42	0	12	12	0	0	12	12	0
49	0	11	11	0	0	11	11	0
56	0	8	8	0	0	8	8	0

TABELA 13 - Frequência de cães reagentes e não reagentes às reações de soroaglutinação microscópica e de fixação do complemento frente ao antígeno Buenos Aires, antes e após inoculação com Leptospira interrogans sorotipo canicola. São Paulo, 1979.

Reação de Soroaglutinação Microscópica					Reação de Fixação do Complemento			
Tempo (Dias)	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes	Reagentes	Não Reagentes	Total	% Reagentes
0	0	15	15	0	0	15	15	0
4	0	15	15	0	1	14	15	7
7	3	13	15	20	9	6	15	60
10	12	3	15	80	12	3	15	80
14	12	3	15	80	7	8	15	53
21	10	5	15	67	2	13	15	13
28	6	9	15	40	0	15	15	0
35	2	13	15	13	0	15	15	0
42	0	15	15	0	0	15	15	0
49	0	15	15	0	0	15	15	0
56	0	11	11	0	0	11	11	0
63	0	10	10	0	0	10	10	0

TABELA 14 - Títulos de anticorpos medidos pelas reações de aglutinação microscópica e de fixação do complemento frente ao antígeno Buenos Aires, em cães inoculados com Leptospira interrogans sorotipo icterohaemorrhagiae. São Paulo, 1979.

Tempo (dias)	0		4		7		10		14		21		28		35		42		49		56	
Reação																						
Animal Nº	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC
1	-	-	-	5	-	10	100	5	200	-	100	-	*									
2	-	-	-	-	-	20	100	10	100	10	100	10	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	
5	-	-	-	-	8	100	10	100	10	100	10	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	5	100	5	100	5	-	-	-	*									
7	-	-	-	6	100	5	100	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	100	20	100	20	100	15	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	20	100	20	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	
10	-	-	-	-	-	100	20	100	20	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	100	20	100	20	100	10	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	100	20	100	20	100	20	100	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	10	100	10	100	10	-	-	-	-	-	-	*						
14	-	-	-	-	20	200	30	200	20	100	20	100	100	10	100	5	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	5	100	30	100	20	100	5	100	5	100	5	-	-	*				

* = Óbito no decurso do experimento.
SA = soroaglutinação microscópica.
FC = fixação do complemento.

TABELA 15 - Títulos de anticorpos medidos pela reação de soroaglutinação microscópica e de fixação do complemento frente ao antígeno Buenos Aires, em cães inoculados com Leptospira interrogans sorotipo canicola. São Paulo, 1979.

Tempo (dias)	0		4		7		10		14		21		28		35		42		49		56		63	
Reação																								
Animal N°	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC	SA	FC
1	-	-	-	-	-	20	100	20	100	-	100	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	5	100	5	100	5	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	5	100	20	100	5	100	5	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	100	50	200	20	100	5	100	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	30	100	40	100	30	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
9	-	-	-	-	-	5	100	5	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	100	5	100	5	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	100	10	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	10	100	10	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
13	-	-	-	-	-	5	100	10	100	5	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
14	-	-	-	-	-	10	100	5	100	-	100	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	100	10	100	20	100	10	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* = ôbitos no decurso do experimento.
 SA = soroaglutinação microscópica.
 FC = fixação do complemento.

5. DISCUSSÃO.

A soroconversão ou o aumento gradativo dos títulos em duas amostras de soros coletados com intervalos de 1 ou de 2 semanas, considerados requisitos básicos para se confirmar o diagnóstico de leptospirose em animais com ou sem sintomatologia clínica, foram observados em todos os animais do grupo I, inoculados com leptospiiras patogênicas do sorotipo icterohaemorrhagiae e do grupo II, inoculados com leptospiiras do sorotipo canicola. A imune resposta foi rápida, podendo observar-se anticorpos humorais revelados pela reação de fixação do complemento, a partir do 4º dia após a inoculação experimental em ambos os grupos e pela reação de aglutinação microscópica, a partir do 7º dia.

Existem diversidades de opiniões em relação ao início do aparecimento dos anticorpos aglutinantes nos soros dos animais infectados, como as de ALSTON & BROOM⁴(1958), segundo os quais as aglutininas são detectáveis na circulação sanguínea após o 7º dia de doença, como ocorreu também no presente experimento, as de TAYLOR e col.,⁴⁸(1970), que observaram anticorpos humorais em animais inoculados com leptospiiras do sorotipo canicola entre o 10º e 14º dia. Essas variações podem ser explicadas por diferenças individuais de resposta imunológica ao mesmo estímulo, como também, podem estar na dependência dos títulos considerados positivos. É possível que, a partir de diluições mais baixas, a positividade fosse de 100% no 7º dia, podendo inclusive, encontrar-se animais reagentes no 4º dia após a inoculação, como foi observado por COMBIESCO e col.,¹⁴(1960), em seres humanos. MENGES e col.,³⁰(1960) citam o aparecimento de anticorpos circulantes em títulos menores que 50 no 6º dia após a inoculação experimental de cães com o sorotipo pomona. Entretanto, seguindo os conceitos estabelecidos por SANTA ROSA⁴²(1970), sempre utilizamos a diluição inicial de 1:100, considerando assim, o título mínimo significativo igual a 100¹⁹.

A precocidade da reação de fixação do complemento em revelar anticorpos antileptospiras quando comparada à reação de aglutinação microscópica é citada na literatura, em relação ao soros humanos por STURDZA e col.,⁴⁶ (1960) e em suínos²³ e bovinos^{24,36} infectados experimentalmente.

A análise das TABELAS 2 e 3 e FIGURAS 1 e 2, demonstra que os anticorpos fixadores do complemento são observados mais precocemente que as aglutininas, tanto no soro dos cães infectados pelo sorotipo icterohaemorrhagiae como nos infectados pelo sorotipo canicola, sendo em alguns casos, os títulos bastante elevados mesmo decorridos apenas 4 dias após a infecção experimental.

No decurso da segunda semana, pode observar-se um paralelismo entre os resultados das reações de fixação do complemento e aglutinação microscópica, fato já salientado por inúmeros pesquisadores, quer nos espécimes caninos³⁴, bovinos^{41,36}, suínos²³ como também, no homem^{39, 54}. Após três a quatro semanas, pode observar-se pela reação de fixação do complemento em ambos os grupos, a diminuição do número de reagentes, ao passo que as aglutininas séricas persistiram na circulação por um período maior de tempo.

As imunoglobulinas do tipo M, produzidas precocemente como resposta à infecção leptospírica são as responsáveis pelas reações de soroaglutinação positivas, como demonstraram HANSON²⁰ (1973) e MORRIS & HOUSSAINI³¹ (1974). Entretanto, a atividade aglutinante do soro não está restrita apenas à classe IgM de anticorpos como foi sugerida por HANSON²⁰ (1973), mas também, associada à presença de anticorpos do tipo IgG, que aparecem mais tardiamente na circulação sanguínea, permanecendo porém por um período maior de tempo. Destarte, a reação de aglutinação microscópica permanece positiva por um período longo de tempo, detectando anticorpos residuais do tipo IgG. A reação de fixação do complemento parece revelar principalmente anticorpos humorais do tipo IgM, já que não permanece positivo por um período longo de tempo, como ocorre na reação de aglutinação microscópica, que detecta ambos os tipos de anticorpos.

No presente trabalho, confirmou-se o desempenho irregular e pouco satisfatório da leptospira aquícola Patoc I quando utilizada como antígeno único nas provas de soroaglutinação microscópica ou de fixação do complemento, para o diagnóstico da leptospirose canina pelos sorotipos icterohaemorrhagiae ou canicola, fato anteriormente citado por outros autores^{11, 2, 32, 43}.

Embora os autores sejam concordes em salientar que existe uma diversidade de comportamento da estirpe Patoc I frente aos soros humanos e animais positivos para leptospirose patogênicas^{17, 1, 44}, poucas hipóteses foram formuladas para se justificar essa diferença. Para NICOLESCO & LELUTIU³², (1967) uma boa concordância entre os resultados positivos obtidos com o emprego de sorotipos patogênicos e o antígeno Patoc I indica infecções recentes, enquanto a positividade apenas para os sorotipos patogênicos pode ser interpretada como sinal de infecções mais antigas. Pelos dados obtidos, essa hipótese deve ser rejeitada, pois nos períodos pós-inoculação utilizados no presente experimento, não se observou em nenhum momento, uma concordância que fosse alta o suficiente para recomendar o uso do antígeno Patoc I na reação de fixação do complemento ou de aglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose em cães infectados recentemente.

Segundo TURNER⁵⁰ (1968) essa variação no comportamento pode ser explicada pelas diferenças imunológicas existentes entre as espécies animais, ocorrendo portanto, variações na resposta a um mesmo estímulo antigênico.

Entretanto, cabe salientar que, mesmo no diagnóstico da leptospirose humana, no qual é usada rotineiramente como antígeno de triagem, existe uma variabilidade nos resultados obtidos com o emprego da estirpe Patoc I, indicando que a sensibilidade é alta apenas nas infecções determinadas por alguns sorotipos como icterohaemorrhagiae, pomona, canicola ou copenhageni^{2, 18, 15, 22}, sendo mais baixa, em torno de 50% quando as infecções são causadas por outros sorotipos^{18, 22}.

A porcentagem de animais reagentes à reação de soroaglutinação microscópica ao antígeno Rufino (60%) em ambos os grupos experimentais, foi maior do que a verificada ao se empregar a estirpe Patoc I, sendo entretanto bastante inferior a concordância de 100% obtida por CACCHIONE e col.,⁹ (1971) e de 94% obtida pelos mesmos autores¹⁰ em 1972. Foi também diferente dos resultados observados por SANTA ROSA⁴³ (1977) que, obteve uma concordância de apenas 2,5% entre os resultados de aglutinação microscópica com soros de cães reagentes para os sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola e os resultados obtidos com o emprego da estirpe Rufino nessa mesma reação.

Os resultados obtidos nas reações de fixação do complemento através do emprego dos antígenos homólogos e dos antígenos preparados com as estirpes Patoc I e Buenos Aires em ambos os grupos experimentais, foram quase sempre concordantes com os obtidos nas reações de soroaglutinação microscópica frente aos mesmos antígenos. Entretanto, quando se empregou o antígeno preparado com a estirpe Rufino nas reações de fixação do complemento frente aos soros dos cães infectados pelos sorotipos icterohaemorrhagiae ou canicola não se observou nenhuma reação positiva, fato este difícil de ser explicado à luz dos conhecimentos atuais.

Os resultados obtidos pelo emprego da estirpe Buenos Aires nas reações de aglutinação microscópica e de fixação do complemento, com as amostras de soros de cães infectados pelos sorotipos icterohaemorrhagiae ou canicola, sugerem ser esta estirpe a que melhor se adapta ao diagnóstico da leptospirose canina por esses sorotipos. Não se pode entretanto, recomendá-lo como antígeno único de triagem, pois a sensibilidade de 87% para o 1º grupo e de 80% para o 2º grupo não foi suficientemente alta.

Duas das características observadas quando se testou a estirpe Buenos Aires em ambas as reações foram a precocidade e a homogeneidade da resposta. As reações positivas na prova de fixação do complemento, como se observam nas TABELAS 12 e

13 ocorreram entre o 7º e 14º dia pós-infecção, e na prova de soroaglutinação microscópica entre o 10º e 21º dia em ambos os grupos de animais, não se observando reagentes após a 6a. semana.

Durante as primeiras semanas da infecção leptospírica podem ocorrer as reações heterólogas, às vezes mais intensas que as homólogas. Segundo KMETZ²⁵ (1958), essas reações paradoxais ocorrem mais comumente entre o 6º e 11º dias da doença, em aproximadamente 50% das provas de soroaglutinação, sendo mais frequentes nas infecções por alguns sorotipos como sejoe, icte rohaemorrhagiae ou pomona. STURDZA e col.,⁴⁵ (1960) consideraram a aglutinação da estirpe Patoc I pelos soros de indivíduos doentes por outros sorotipos de leptospiiras patogênicas como uma reação paradoxal. Todavia, para ADDAMIANO¹ (1962) existe um antígeno comum à leptospira patogênica e à aquícola diferenciado antígeno gênero-específico comum a todas as leptospiiras, não sendo portanto, apenas uma reação paradoxal.

PALIT & GULASEKHARAN³⁵ (1973) idealizaram um teste de hemaglutinação, em que empregaram como antígeno hemácias de carneiro sensibilizadas com antígeno gênero-específicos extraídos de uma cepa de leptospira aquícola, observando que apenas as imunoglobulinas do tipo M tomam parte nessas reações. Os resultados obtidos por CHANG & FAINE¹² (1974) com o antígeno preparado com o filamento axial de diversas linhagens de leptospiiras, vieram também demonstrar que as reações cruzadas ocorrem às custas de anticorpos do tipo IgM. Assim, é de se esperar que, as reações de aglutinação microscópica ou de fixação do complemento com o emprego de antígenos heterólogos sejam mais precisas, revelando deste modo os animais recentemente infectados.

Em relação à reação de fixação do complemento, cabe ainda salientar a ocorrência do fenômeno de zona aproximadamente 30% das reações positivas, fenômeno esse também observado e citado por outros autores^{34, 36}. Esse fenômeno segundo ALMEIDA³ (1956) parece ser inerente a determinados sistemas de fixação do complemento, incluindo o sistema leptospirose, os quais fornecem uma curva de isofixação do tipo II. Existe assim, uma inibição

da fixação do complemento em zonas de excesso de anticorpos pa
ra uma dada quantidade de antígeno, considerada ótima quando do
sada com o anti-soro específico.

6. CONCLUSÕES.

Face aos resultados obtidos pela metodologia em pregada, podemos concluir que:

- 6.1. A reação de fixação do complemento é mais precoce em re velar os animais reagentes na fase inicial da infecção, pois os anticorpos fixadores do complemento podem ser ob servados na circulação sanguínea em títulos significativos a partir do 4º dia após a infecção experimental em 47% dos cães inoculados com leptospiros patogênicas do sorotipo icterohaemorrhagiae e 53% dos cães inoculados com o sorotipo canicola. As aglutininas são observadas a partir do 7º dia em 80% dos cães do 1º grupo e em 53% dos cães do 2º grupo, em títulos iguais ou maiores que 100.
- 6.2. As aglutininas persistem durante um período maior de tem po, sendo que 50% dos animais inoculados com o sorotipo icterohaemorrhagiae ainda apresentam anticorpos circulantes no 56º dia após a infecção experimental e 80% dos cães inoculados com o sorotipo canicola são reagentes no 63º dia, enquanto os anticorpos fixadores do complemento não mais são encontrados em nível significativo.
- 6.3. As estirpes Patoc I e Rufino não se prestam ao diagnóstico da leptospirose em cães, pois não foram eficientes em revelar anticorpos circulantes em ambos os grupos experimentais, em proporções que justifiquem o seu emprego co mo antígeno único. A baixa concordância entre os resultados obtidos pelo emprego dessas cepas e os obtidos com o emprego de antígenos homólogos não está relacionada ao período de tempo decorrido após a infecção.
- 6.4. A estirpe aquícola Buenos Aires é a que melhor se adapta ao diagnóstico da leptospirose em cães pelos sorotipo ic terohaemorrhagiae ou canicola, sendo a sua sensibilidade em detectar os reagentes a esses sorotipos de 87% e 80%,

respectivamente, na fase inicial da infecção, no período compreendido entre o 7º e 28º dias após a infecção.

- 6.5. A sensibilidade da estirpe Buenos Aires não é suficientemente alta para se indicar o seu emprego como antígeno único nas reações de soroaglutinação microscópica ou de fixação do complemento, mas recomenda-se incluí-la na bateria de antígenos, devido à possibilidade de revelar os animais reagentes às leptospiros patogênicas na fase aguda da infecção, dando ao clínico informações suficientes para o início do tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *.

1. ADDAMIANO, L. La utilizzazione di Leptospira biflexa nella siero diagnosi di Leptospirosi. In: SIMPOSIO NAZIONALE SULLA LEPTOSPIROSI, 1, Atti. Pisa, 1962. p. 231-42.
2. ADDMANIANO, L. & BABUDIERI, B. Water strains of leptospira in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. Bull. Wld Hlth Org., 39: 925-34, 1964.
3. ALMEIDA, J. O. Isofixation curves a method for standardizing quantitative complement fixation tests. J. Immunol., 76: 259-63, 1956.
4. ALSTON, J. M. & BROOM, J. C. Leptospirosis in man and animals. Edinburgh, E. & L. Livingstone, 1958.
5. BERGEY'S manual of determinative bacteriology. 8 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
6. BESSEMANS, A. & NELIS, P. apud OTSUKA, S. ³⁴ p. 236.
7. BUERKI, F. An orienting study of animal sera for antibodies against Leptospira by mixed antigens in the complement fixation reaction. II. Results in comparison to the agglutination lysis reaction. Z. Immun. Försch., 119: 333-43, 1960.
8. BUKANTZ, S. C. Studies in complement fixation. II. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixture (Modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. J. Lab. clin. Med., 31: 394-9, 1946.
9. CACCHIONE, B. A.; CASCELLI, E. S.; MARTINEZ, E.S. Leptospira biflexa Rufino. Su uso en el diagnostico de leptospirosis animal. Rev. Invest. agropec., serie 4, 8: 29-35, 1971.

---

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. Referências bibliográficas em ciências biomédicas. São Paulo, 1971.

10. CACCHIONE, R. A.; CASCELLI, E. S.; MARTINEZ, E. S. Avances en el diagnostico de leptospirosis animal por una prueba microscopica empleando un antígeno de L. biflexa cepa Ru fino. Rev. Asoc. argent. Microbiol., 4: 3-7, 1972.
11. CAMARGO, N. F.; EICHORN, E. A.; LEVINE, J. M.; TELEZ GIRON, A. A complement fixation technique for Foot-and-Mouth diseases and vesicular stomatitis. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 87 th, 1950. Proceedings. p. 207-11.
12. CHANG, A. & FAINE, S. Relative specificities of immunoglobulins reacting with axial filament antigen of Leptospira. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 52: 639-46, 1974.
13. COMBIESCO, D.; STURDZA, N.; SEFER, M.; RADU, J. Recherches sur les leptospirosis. Arch. roum. Path. exp., 17: 245-50, 1958.
14. COMBIESCO, D.; STURDZA, N.; SEFER, M.; KLIPPER, A. Evolution des agglutinines dans les leptospiroses humaines, valeur de la reaction d'agglutination-lyse dans la determination du type Étiologique. Arch. roum. Pathol. exper., 19:202-9, 1960.
15. CORREA, M. O.A.; NATALE, V.; SADATSUNE, T.; FLEURY, O. C. Valor prático do uso de Leptospira semaranga Patoc I no diagnóstico das leptospiroses humanas. Rev. Inst. Med. trop. S.Paulo, 12: 284-7, 1970.
16. COX, C. D.; STROVER, R. C.; TREIK, R. W. Serological studies on hemolytic antigen from leptospira. Proc.Soc. exp. Biol., New York, 98: 265, 1958.
17. ELIAN, M. & NICOARA, I. The use of Leptospira fiflexa Patoc antigen in field investigayions of leptospirosis. Bull. Wld Hlth Org., 34: 359-63, 1964.
18. FUCHS, G. H. Experience with L. biflexa antigens in laboratory diagnosis of suspect cases of leptospirosis. Zbl.Bakt. Parasitkde, 209: 261-7, 1969.

19. HAGIWARA, M. K. Leptospirose canina em São Paulo. São Paulo, 1974.(Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública).
20. HANSON, L. E. Immunology of bacterial diseases with special references to leptospirosis. J. Amer. vet. med. Assoc. , 170: 991-4, 1977.
21. HEGYESSEY, G. & KUBINYI-SCHWNNER, M. Beitrag zur Laboratoriums-diagnostik der Leptospiren (Laboratory diagnosis of leptospirosis: The complement fixation test), Zbl. Bakt.I Abt. Orig., 184: 471-77, 1962.
22. HERGT, B. Meaning of serotype Patoc (biflexa complex) for the diagnosis of leptospirosis by microscopic agglutination test. Zbl. Bakt. Parasitkde, 235: 506-11, 1976.
23. HODGES, R. T. A complement fixation test for the serological diagnosis of leptospirosis in pigs experimentally infected with serotype pomona. N. Z. vet. J., 21: 1-6, 1973.
24. HODGES, R. T. & RIS, O. R. Complement fixing and agglutinating antibodies responses and leptospiruria in calves inoculated with L. serotypes pomona, hardjo, copenhageni or ballum. N.Z. vet. J., 22: 25-30, 1974.
25. KMETY, E. Betrachtungen zum Problem du paradoxen rektion und deren Bedeutung in der Serodiagnostik einiger Leptospiren. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 170: 597-608, 1958.
26. LEPTOSPIRAL SEROTYPE DISTRIBUTION LISTS. According to host and geographic area. Atlanta, Ga. Department of Health, Education and Welfare, 1966.
27. LEPTOSPIRAL SEROTYPE DISTRIBUTION LISTS. According to host and geographic area. Supplement to 1966 publication Atlanta, Ga. Departament of Health, Education and Welfare, 1975.
28. MAILLOUX, M. Utilité de l'antigene biflexa patoc dans les serodiagnostics de leptospiroses. Ann. Inst. Pasteur. 112: 121-5, 1967.

29. MARTIN, L. & PETIT, A. apud TURNER, L. H. ⁵⁰. p. 882.
30. MENGES, R. M.; GALTON, M.M.; HABERMANN, R. T. Culture and serologic studies on four dogs inoculated with two leptospiral serotypes, Leptospira pomona and Leptospira canicola. Amer. J. vet. Res., 21: 371-6, 1960.
31. MORRIS, J. A. & HOUSSAINI, S. N. Characterization of the antibodies detected by the microscopic agglutination test for bovine leptospirosis. J. Hyg., Cambridge, 73: 425-32, 1974.
32. NICOLESCO, M. & LELUTIU, C. Diagnostic par la reaction du complement a l'aide d'un antigens unique dans le decelerement des leptospiroses animales. Arch. roum Path. exper. Microbiol., 26: 557-64, 1967.
33. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Grupo de Expertos em Problemas Actuales de las Investigaciones sobre Leptospirosis, Moscu, 1966. Informes. Geneva, 1967. (Ser. Inf. tecn., 380).
34. OTSUKA, S. Complement fixation test for diagnosis of canine leptospirosis. I. Relation to agglutination lysis probe in natural cases. Igaku to Seibutsugaku (Med. Biol.), 32: 236-38, 1954.
35. PALIT, A. & GULASEKHARAN, J. Genus specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. J. clin. Path., 26: 7-16, 1973.
36. PALIT, A. & SHARMA, G.L. Comparison of microscopic agglutination, indirect haemagglutination and complement fixation tests in rabbit and buffalo calf immunesera for detection of leptospiral antibodies. Brit. vet. J., 127: 154-61, 1971.
37. PETELIN, N.; CINCO, M.; MAGLIOCCHETTI-LOMBI, P. Comparative diagnostic significance of some water-Leptospirae for human leptospirosis. Trop. geogr. Med., 22: 245-9, 1970.

38. PINTO, A. A.; SANTA ROSA, C. A.; SADATSUME, T.; FLEURY, G.C. Comparative study between complement fixation and microscopic agglutination tests for leptospiral diagnosis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 16: 28-31, 1974.
39. POTT, A. W. & DORNICK, C. G. T. The complement fixation test in the diagnosis of Weil's disease. J. Path. Bact., 43: 367-72, 1936.
40. RIS, D. R. The failure of genus specific serological tests to detect leptospirosis in cattle and rabbits. N. Z. vet. J., 23: 164-6, 1975.
41. ROBERTSON, A. & BOULANGER, P. Comparison of the complement fixation test and the microscopic agglutination test (agglutination lysis) for the detection of leptospiral sero group antibodies. Canad. J. comp. Med. vet. Sci., 27:113-20, 1963.
42. SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. Rev. Microbiol., 1: 97-109, 1970.
43. SANTA ROSA, C. A. Estudo comparativo de algumas estirpes de leptospiras apatogênicas para o diagnóstico de leptospirose animal. São Paulo, 1977. (Tese de Livre Docência - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP).
44. SANTA ROSA, C. A. & PINTO, A. A. Reação de fixação do complemento no diagnóstico de leptospirose animal. Emprego de um antígeno de amostra apatogênica. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 41: 19-23, 1974.
45. STURDZA, N.; ELIAN, M.; TULPAN, G. Diagnosis of human leptospirosis by the complement fixation test with a single antigen. Arch. roum. Path. exper. Microbiol., 19: 571-82, 1960.
46. STURDZA, N. & ELIAN, M. Comparative study of different strains of L. biflexa as antigens for the complement fixation tests in leptospirosis. Arch. roum. Path. exp. Microbiol., 20: 33-41, 1961.

47. SZATALOWICZ, F. T.; GRIFFIN, T. P.; STUNKARD, J. A. The international dimensions of leptospirosis. J. Amer. vet. med. Ass., 155: 2122-33, 1969.
48. TAYLOR, P. L.; HANSON, L. E.; SIMON, J. Serologic, pathologic and immunologic features of experimentally induced leptospiral nephritis in dogs. Amer. J. vet. Res., 31: 1033-49, 1970.
49. TRIGG, J.S. & MARSHAK, R. R. Leptospirosis: a contemporary zoonosis. Ann. intern. Med., 79: 893-4, 1973.
50. TURNER, L. H. Leptospirosis. II. Serology. Trans. roy. Soc. Med. Hyg., 62: 880-9, 1968.
51. ULRICH, C. A. & MAC ARTHUR, F. X. An improved method for production of anti-sheep hemolysin. J. clin. Path., 12: 84-5, 1942.
52. WOLFF, J. W. & TURNER, L. H. Report of a meeting of a taxonomic subcommittee on Leptospira. Int. Bull. bact.Nomencl., 13: 161-5, 1963.
53. WONG, M. L.; SHELTON KAPLAN, M. D.; DUNKLE, L. M.; STECKENBERG, B. W.; FEIGIN, R. D. Leptospirosis: a childhood disease. J. Pediat., 90: 532-37, 1977.
54. YANGER, R. H.; GOCHENOUR, W. S. Jr; WARNER, A. R.; WETMORE, P. W.; HALL, H. Complement fixation in diagnosis of human leptospirosis. Fed. Preoc., 10: 425-35, 1951.
55. YASSUDA, P. H. Leptospirose em cães errantes da cidade de São Paulo, 1979. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).