

EMPREGO DE ESTIRPES DE *Leptospira biflexa* NA PROVA DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA APLICADA AO DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE CAPRINA E OVINA*

USE OF *Leptospira biflexa* STRAINS IN THE SEROAGGLUTINATION TEST FOR DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS IN SHEEPS AND GOATS

Edgard de Aquino VIEGAS¹; Roberto Mitio YANAGUITA²; Simone Assis Rosas de Aquino VIEGAS³; Luzinete Alves SILVA⁴; Silvio Arruda VASCONCELLOS⁵

RESUMO

O estudo comparativo de antígenos preparados com 13 estirpes de *Leptospira biflexa* (**abaeté, andamana, buenos aires, bovedo, garcia, jequitáia, nazaré, ondina, patoc, pirajá, rufino, são paulo e tororó**) na prova de aglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose, em soros de ovinos e caprinos triados com uma coleção de 18 sorotipos de *Leptospira interrogans*, demonstrou que as estirpes **jequitáia e buenos aires** apresentaram o melhor comportamento com níveis de sensibilidade, especificidade e concordância relativas superiores a 60%. Para os soros de ovinos não houve diferença entre os antígenos **jequitáia e buenos aires** ($0,70 < p < 0,50$); frente aos soros de caprinos a estirpe **jequitáia** foi superior à **buenos aires** ($0,01 < p < 0,002$). A ocorrência de resultados falsos positivos (6 a 30%) com estas duas estirpes salienta que uma parcela das reações, pode ser de natureza inespecífica.

UNITERMOS: Leptospirose; Diagnóstico; Teste de aglutinação; Ovinos; Caprinos

INTRODUÇÃO

A leptospirose em ovinos e caprinos manifesta-se em algumas oportunidades, com febre, icterícia, hemoglobinúria, anemia, infertilidade, abortamento, mortalidade perinatal e em outras ocasiões, de forma pouco pronunciada, tão leve, que pode passar despercebida¹³. A única maneira para o esclarecimento da suspeita da infecção é através da execução dos exames laboratoriais.

Dentre os ensaios laboratoriais empregados para a confirmação do diagnóstico da leptospirose a reação de soroaglutinação microscópica (SAM) é a técnica mais amplamente difundida⁸, no entanto é muito trabalhosa pois utiliza um grande número de estirpes de leptospira, para o exame de uma única amostra de soro⁷.

A verificação de que a estirpe **Patoc I** de *Leptospira biflexa* foi capaz de revelar a presença de aglutininas anti-leptospira em soros de seres humanos infectados por diversos sorotipos de *Leptospira interrogans*, trouxe um grande avanço para o diagnóstico da leptospirose humana^{1,10,12}, todavia esta característica não foi obtida quando do exame de soros provenientes de diversas espécies de animais^{2,3,4,9,14,15}.

No relativo ao emprego de estirpes de *Leptospira biflexa* para o exame de soros de ovinos e caprinos os resultados disponíveis são irregulares: CACHIONE et al.³ (1971), relataram um bom comportamento para a estirpe **rufino**, no entanto isto não foi confirmado por CALDAS et al.⁴ (1978) que posteriormente⁵ obtiveram bons resultados com a estirpe **buenos aires**.

Tendo em vista a existência de resultados discordantes nas tentativas de utilização das estirpes **rufino, são paulo, patoc e buenos aires**^{3,4,5} para o diagnóstico da leptospirose ovina e caprina, o presente trabalho teve por objetivo reavaliar o emprego destas quatro estirpes bem como introduzir nove outras, ainda não estudadas (**abaeté, andamana, bovedo, garcia, jequitáia, nazaré, ondina, pirajá e tororó**).

MATERIAL E MÉTODO

As amostras de sangue foram obtidas em criatórios de ovinos e caprinos que apresentavam problemas da esfera reprodutiva (principalmente abortamento), localizados em três Municípios da microrregião do Sertão de Canudos, interior da Bahia: Uauá, Euclides da Cunha e Itiúba. Foram colhidos soros de 317 caprinos e de 219 ovinos.

* Trabalho conduzido com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

1 - Professor Doutor-Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia

2 - Professor Associado-Instituto de Ciências Biomédicas da USP

3 - Médico Veterinário-Empresa Agropecuária da Bahia

4 - Professor Doutor-Instituto de Ciências Biomédicas da USP

5 - Professor Titular-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

A reação de soroglutinação microscópica foi executada conforme a recomendação do CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES⁷ (1968). A coleção de antígenos utilizada incluiu 18 estirpes de *Leptospira interrogans* (icterohaemorrhagiae, wolffi, tarassovi, cynopteri, canicola, australis, pyrogenes, javanica, pomona, castellanis, autumnalis, celledoni, panama, grippothyphosa, bataviae, brasiliensis, shermani e hebdomadis) e 13 estirpes de *Leptospira biflexa* (abaete, andamana, buenos aires, bovedo, garcia, jequitáia, nazaré, ondina, patoc, pirajá, rufino, são paulo e tororó). Os antígenos foram cultivados em meio líquido de Stuart acrescido de 10% de soro estéril de coelho ligeiramente hemolisado, livre de anticorpos anti-leptospira e inativado a 56⁰ por uma hora durante dois dias consecutivos⁷.

Os soros foram inicialmente submetidos a uma triagem através da SAM frente as 18 estirpes de *Leptospira interrogans* e a seguir foram aleatoriamente selecionados 50 soros de animais reagentes e 50 animais não reagentes para cada espécie animal, os quais foram retestados com as 13 estirpes de *Leptospira biflexa*.

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste de Mc Nemar¹⁶. Os parâmetros de sensibilidade, especificidade e concordância relativas foram calculados conforme proposto por MARTIN¹¹ (1977).

RESULTADOS

Nas Tab. 1 e 2 são apresentados respectivamente os resultados dos exames dos 50 soros de caprinos e de 50 soros de ovinos, submetidos ao teste de soroglutinação microscópica aplicado a leptospirose frente a uma coleção de 18 estirpes de *Leptospira interrogans*. A observação destas Tabelas possibilita a constatação de que a reação sorológica mais frequente com os soros de caprinos foi com a estirpe *autumnalis* e para os de ovinos com a *javanica*.

A Tab. 3 apresenta os resultados do reteste dos soros inicialmente triados com antígenos de *Leptospira interrogans* frente às 13 estirpes de *Leptospira biflexa*. A observação dos valores apresentados nesta Tabela demonstra que para as duas espécies animais estudadas as três estirpes que apresentaram a maior capacidade de revelar a presença de anticorpos

TABELA 1

Frequência de soros caprinos examinados pelo teste de soroglutinação microscópica para leptospirose segundo o sorotipo reagente e o título* obtido. Salvador-Ba, 1985.

ANTÍGENOS	TÍTULOS					TOTAL	(%)
	100	200	400	800	1600		
icterohaemorrhagiae	0	0	0	0	0	0	0
wolffi	0	0	0	0	0	0	0
tarassovi	3	0	0	0	0	3	2,0
cynopteri	0	0	0	0	0	0	0
canicola	7	1	0	0	0	8	5,4
australis	9	0	0	0	0	9	6,0
pyrogenes	2	1	1	0	0	4	2,7
javanica	9	5	1	0	0	15	10,9
pomona	2	0	0	0	0	2	1,3
castellanis	12	3	5	1	0	21	14,1
autumnalis	11	11	5	1	0	28	19,0
celledoni	23	2	1	0	0	26	17,5
panama	4	7	3	2	0	16	11,5
grippythosa	6	1	0	0	0	7	4,1
bataviae	6	1	0	0	0	7	4,1
brasiliensis	0	0	0	0	0	0	0
shermani	1	0	0	0	0	1	0,7
hebdomadis	0	0	1	0	0	1	0,7
TOTAL	95	32	17	4	0	148	100,0

*= Recíproca da maior diluição do soro onde foi constatado 50% de leptospiros aglutinadas por campo microscópico.

TABELA 2

Frequência de soros de ovinos examinados pelo teste de sorotipagem microscópica para leptospirose segundo o sorotipo reagente e o título* obtido. Salvador-BA, 1985.

ANTÍGENOS	TÍTULOS					TOTAL	(%)
	100	200	400	800	1600		
icterohaemorrhagiae	0	0	0	0	0	0	0
wolffi	1	0	0	1	0	2	0,9
tarassovi	1	0	0	0	0	1	0,4
cynopteri	0	0	0	0	0	0	0
canicola	17	7	1	1	0	26	11,2
australis	3	2	0	0	0	5	2,2
pyrogenes	6	0	0	0	0	6	2,6
javanica	23	8	2	0	0	33	14,3
pomona	5	0	0	0	0	5	2,2
castellonis	29	3	0	0	0	32	13,9
autumnalis	14	10	2	0	0	26	11,2
celledoni	21	6	0	0	0	27	11,7
panama	20	5	1	0	0	26	11,2
grippotyphosa	16	0	0	0	0	16	6,9
bataviae	19	1	0	0	0	20	8,7
brasiliensis	5	1	0	0	0	6	2,6
shermani	0	0	0	0	0	0	0
hebdomadis	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	180	43	6	2	0	231	100,0

*= Recíproca da maior diluição do soro onde foi constatado 50% de leptospiros aglutinadas por campo microscópico.

TABELA 3

Comportamento de soros de caprinos e ovinos reagentes e não reagentes para antígenos patogênicos frente a diferentes antígenos de leptospiros apatogênicos. Salvador-BA, 1985.

SOROS / ANTÍGENOS	CAPRINOS		OVINOS	
	REAGENTES	NÃO REAGENTES	REAGENTES	NÃO REAGENTES
abaeté	0/50*	0/50	0/50*	0/50
andamana	10/50	1/50	8/50	5/50
buenos aires	30/50	3/50	31/50	14/50
bovedo	7/50	3/50	7/50	4/50
garcia	15/50	9/50	13/50	5/50
jequitáia	37/50	15/50	34/50	7/50
nazaré	10/50	10/50	8/50	5/50
ondina	7/50	1/50	15/50	3/50
patoc	25/50	6/50	26/50	1/50
pirajá	0/50	0/50	1/50	0/50
rufino	11/50	2/50	19/50	2/50
são paulo	10/50	2/50	14/50	5/50
tororó	5/50	1/50	1/50	0/50

*= Número de soros reagentes/total de soros examinados.

séricos aglutinantes foram em ordem decrescente de eficiência, respectivamente: **jequitáia**, **buenos aires** e **patoc**.

características estudadas apenas com as estirpes **jequitáia** e **buenos aires**.

As Tab. 4 e 5 relacionam os parâmetros de sensibilidade, especificidade e concordância relativas dos antígenos de *Leptospira biflexa* avaliados, respectivamente, com soros de caprinos e de ovinos. Dentre os valores registrados constatou-se a existência de níveis superiores a 60% para as três

A análise estatística dos resultados referidos na Tab. 4 (soros de caprinos) demonstrou que a diferença de sensibilidade apresentada pelas estirpes **jequitáia** e **buenos aires** (respectivamente, 74 e 60%) apresenta uma probabilidade de ocorrência casual situada entre 1,0 e 0,2%. A utilização do mesmo

TABELA 4

Valores de sensibilidade, especificidade e concordância relativas do teste de soroaglutinação microscópica aplicado à leptospirose em soros de caprinos, segundo o sorotipo de *Leptospira biflexa* utilizado como antígeno. Salvador-BA, 1985.

CARACTERÍSTICA ANTÍGENO	SENSIBILIDADE %	ESPECIFICIDADE %	CONCORDÂNCIA %
abaeté	0	0	0
andamana	20	98	59
buenos aires	60	94	77
bovedo	14	94	54
garcia	30	82	56
jequitáia	74	70	72
nazaré	20	80	50
ondina	14	98	56
patoc	50	88	69
pirajá	0	0	0
rufino	22	96	59
são paulo	20	96	58
tororó	10	98	54

TABELA 5

Valores de sensibilidade, especificidade e concordância relativas do teste de soroaglutinação microscópica aplicado à leptospirose em soros de ovinos segundo o sorotipo de *Leptospira biflexa* utilizado como antígeno. Salvador-BA, 1985.

CARACTERÍSTICA ANTÍGENO	SENSIBILIDADE %	ESPECIFICIDADE %	CONCORDÂNCIA %
abaeté	0	0	0
andamana	16	90	53
buenos aires	62	72	67
bovedo	14	92	53
garcia	26	90	58
jequitáia	68	86	77
nazaré	16	90	53
ondina	30	94	62
patoc	52	98	75
pirajá	2	100	51
rufino	38	96	67
são paulo	28	90	59
tororó	2	100	51

tipo de raciocínio para os valores apresentados na Tab. 5 (soros de ovinos) salienta que a probabilidade da ocorrência de uma diferença casual situa-se entre 50 e 70%.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados na reação de SAM com os antígenos de *Leptospira biflexa* demonstraram maior sensibilidade para às estirpes **jequitáia** e **buenos aires**. A despeito da estirpe **patoc** ter apresentado cerca de 50% de sensibilidade para revelar aglutininas anti-leptospira em soros de ovinos e caprinos, este valor é muito inferior ao obtido quando da sua utilização em soros humanos^{1,10,12}.

Os valores de sensibilidade, especificidade e concordância relativa dos antígenos **jequitáia** e **buenos aires** foram superiores aos obtidos com as demais estirpes de *Leptospira biflexa*; no entanto a concordância obtida com a estirpe **buenos aires** em soros de ovinos (67%) foi inferior à encontrada por CALDAS et al.⁵ (1982). Talvez estas discordâncias possam ser atribuídas à participação de algumas fontes de variação na condução da SAM tais como tipo de meio de cultura e às conseqüentes diferenças na concen-

tração dos antígenos⁶, à fase pós-infecção em que foram colhidas as amostras de sangue¹⁷, ou ao sorotipo de *Leptospira interrogans* responsável pela infecção¹.

Das duas estirpes identificadas como detentoras de maior sensibilidade para revelar aglutininas anti-leptospira, em soros de ovinos e caprinos, o **buenos aires** foi quem apresentou maior índice de especificidade para soros de caprinos (94%) e o **jequitáia** para soros de ovinos (86%). Estes valores demonstraram que com estas duas estirpes ocorre uma parcela de reações inespecíficas.

Os resultados obtidos salientaram que para o diagnóstico da leptospirose caprina, a despeito da estirpe **jequitáia** ter sido mais sensível, a ocorrência de uma maior frequência de resultados inespecíficos indica que o antígeno **buenos aires** tem maior perspectiva de utilização em testes de triagem; já para o diagnóstico de leptospirose ovina, tendo em vista que as duas estirpes (**jequitáia** e **buenos aires**) apresentaram o mesmo nível de sensibilidade, a recomendação de utilização recaí sobre a estirpe **jequitáia** que demonstrou maior nível de especificidade.

SUMMARY

Testing 13 serotypes of *Leptospira biflexa* as antigens, for the diagnosis of leptospirosis in sheeps and goats by means of the microscopic agglutination test, it was observed that the antigens **jequitáia** and **buenos aires** presented the best results. If for sheep sera there was no significant difference between the antigens **jequitáia** and **buenos aires** ($0,70 < p < 0,50$), for goat sera the **jequitáia** antigen was better than **buenos aires** ($0,01 < p < 0,002$). The occurrence of some false positive results showed limitations in the specificity of the SAT with *Leptospira biflexa* strains as antigens.

UNITERMS: Leptospirosis; Diagnosis; Agglutination tests; Sheep; Goats

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-ADDAMIANO, L.; BABUDIERI, B. Water strains of leptospira in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. *Bull. Wd. Hlth Org.*, v.39, p.925-34, 1968.
- 02-AVILA, F.A.; MOREIRA, E.C.; VIANA, F.C. *Leptospira patoc* amostra Patoc I como antígeno de triagem no diagnóstico sorológico das leptospiroses suínas. *Científica*, Jaboticabal, v.5, p.352-5, 1977.
- 03-CACHIONE, R.A.; CASCELLI, E.S.; MARTINEZ, E.S. *Leptospira biflexa* Rufino. Su uso en el diagnóstico de leptospirosis animal. *Rev. Invest. Agropec.*, Buenos Aires, v.8, p.29-35, 1971.
- 04-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. *Int. J. Zoonosis*, v.5, p.91-6, 1978.
- 05-CALDAS, E.M.; SAMPAIO, M.B.; VIEGAS, E.A.; VIEGAS, S.A.R.A. Investigaçao comparativa de estirpes apatogênicas para diagnóstico sorológico de leptospirose em animais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18. Camboriú, 1982. *Anais*. Santa Catarina, Comissão Científica dos Eventos, 1982. p.94.
- 06-CARBREY, E.A. The relative importance of variable factors in the agglutination Lysis test. *Proc. U. S. Live Stk. Sanit. Ass.*, v.69, p.130-42, 1960.

- 07-CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Manual sobre métodos de laboratório para leptospirosis**. Buenos Aires, 1968. (Nota Técnica, 9)
- 08-FAYNE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva, World Health Organization, 1982. (WHO off set publications, 67)
- 09-GIRIO, R.J.S. **Estudo comparativo de quatro cepas apatogênicas utilizadas em teste de triagem para o diagnóstico sorológico da leptospirose em búfalos (Bubalus bubalis)**. São Paulo, 1984. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 10-MAILLOUX, M. Utilité de l'antigens *Leptospira biflexa* patoc dans les serodiagnostic de leptospiroses. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.112, p.121-5, 1967.
- 11-MARTIN, S.W. The evaluation of tests. **Canad. J. Comp. Med.**, v.41, p.19-25, 1977.
- 12-PETELIN, N.; CINCO, M.; MAGLIOCCHETTI LOMBI, P. Comparative diagnostic significance of some water-leptospirosis. **Trop. Geogr. Med.**, v.22, p.245-9, 1970.
- 13-RAFYI, A.; MAGHAMI, G.; NIAK, A.I. Leptospirose ovine et caprine. **Bull. Off. Int. Épiz.**, v.68, p.43-59, 1967.
- 14-SANTA ROSA, C.A. **Estudo comparativo de algumas estirpes de leptospiroses apatogênicas para o diagnóstico da leptospirose animal**. São Paulo, 1977. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 15-SANTA ROSA, C.A.; PINTO, A.A. Reação de fixação do complemento no diagnóstico da leptospirose animal. Emprego de antígeno de amostra apatogênica. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.41, p.19-23, 1974.
- 16-SIEGEL, S. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. New York, Mc Graw Hill, 1965.
- 17-VASCONCELLOS, S.A.; OHTSUBO, I.; MORETTI, A.S.; ITO, F.H.; PASSOS, E.C.; CÔRTEZ, J.A.; MORENO, A.G.; YASUDA, P.H. Emprego do antígeno de *Leptospira biflexa* estirpe buenos aires na reação de soroglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em suínos experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. **Rev. Microbiol.**, v.20, p.62-70, 1989.

Recebido para publicação em 17/06/92
Aprovado para publicação em 07/04/93