

**LEPTOSPIROSE CANINA EXPERIMENTAL
PELOS SOROTIPOS ICTEROHAEMORRHAGIAE
E CANICOLA. AVALIAÇÃO DO EMPREGO
DAS AMOSTRAS PATOC I, RUFINO E
BUENOS AIRES NAS REAÇÕES DE SORO—
AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA
E DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO**

MITIKA KURIBAYASHI HAGIWARA
Professor Assistente Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

CARLOS DE ALMEIDA SANTA ROSA
Professor Adjunto
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

ARAMIS AUGUSTO PINTO
Professor Livre-Docente
Instituto de Ciências Biomédicas da USP

HAGIWARA, M.K.; SANTA ROSA, C.A.; PINTO, A.A. Leptospirose canina experimental pelos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola. Avaliação do emprego das amostras Patoc I, Rufino e Buenos Aires nas reações de soroaglutinação microscópica e de fixação de complemento. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec.Univ.S. Paulo*, 19(1): 61-66, 1982.

RESUMO: Procurou-se avaliar a potencialidade do emprego das estirpes aquícolas Patoc I, Rufino e Buenos Aires no diagnóstico da leptospirose canina, como antígeno único nas reações de soroaglutinação microscópica e fixação de complemento, através do acompanhamento sorológico de dois grupos de cães inoculados respectivamente com leptospiros patogênicas dos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola. 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 de complemento em proporções que justifiquem seu uso como antígeno único. Entretanto, quando se empregou a estirpe Buenos Aires em ambas as reações, 87% dos cães inoculados com o sorotipo icterohaemorrhagiae e 80% dos inoculados com o sorotipo canicola apresentavam anticorpos circulantes detectados por esse antígeno, embora por um curto período de tempo, abrangendo do 7o. ao 28o. dias.

UNITERMOS: Leptospirose, cães*; Teste de aglutinação microscópica*; Teste de fixação do complemento*

INTRODUÇÃO

O teste de aglutinação microscópica, recomendado, pela Organização Mundial da Saúde como a reação sorológica padrão para o diagnóstico da leptospirose ou nos inquéritos epidemiológicos, apresenta alguns inconvenientes como a necessidade de equipamento especial e a manutenção de culturas vivas de leptospiros dos sorotipos representativos de cada um dos sorogrupos patogênicos. Nos últimos 20 anos, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos, procurando-se uma reação de fácil execução, com um mínimo de sorotipo como antígeno ou a utilização de um antígeno único, que permita estabelecer o diagnóstico da infecção com facilidade e segurança, independente dos sorotipos envolvidos.

A observação de que algumas amostras de leptospiros aquícolas podem ser aglutinadas pelos soros de indivíduos reagentes às leptospiros patogênicas, induziu muitos pesquisadores a procurarem entre as diversas cepas apatógênicas, uma amostra que apresentasse reação cruzada com a maioria dos sorotipos patogênicos. KMETZ⁹ (1958) observou que leptospiros da estirpe Patoc I eram frequentemente aglutinadas em altas diluições pelo soro de paciente com leptospirose. Antígeno produzido com a mesma estirpe foi também utilizado por COMBIESCO e cols⁵ (1958) na reação de fixação do complemento, obtendo-se resultados bastante encorajadores, confirmados posteriormente por STURDZA e cols¹⁴ (1960) e por STURDZA e ELIAN¹⁵ (1961), que observaram uma concordância de aproximadamente 90% entre os resultados assim obtidos e os da reação aglutinação microscópica. A sensibilidade do antígeno Patoc I foi também confirmada na reação de aglutinação microscópica por ADDAMIANO e BABUDIERI¹ (1964) e por CORRÊA e cols⁶ (1970).

A utilização da estirpe Patoc I para o diagnóstico sorológico da leptospirose em cães tem fornecido resultados contraditórios como os de NICOLESCO e LELUTIU¹¹ (1967) e os de MAILLOUX¹⁰ (1967), sugerindo-se entretanto que uma boa concordância entre os resultados da soroaglutinação microscópica clássica e os obtidos com o uso de linhagens saprófitas indicaria infecção recente e a ausência desta concordância, infecção antiga. O emprego de outras cepas de leptospiros aquícolas com a mesma finalidade têm também fornecido resultados controversos, considerados bons por uns e contestados por outros. 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 infecção.

Com o presente trabalho, procurou-se avaliar a real potencialidade do uso das estirpes aquícolas Patoc I, Rufino e Buenos Aires no diagnóstico da leptospirose canina, como antígeno único nas reações de aglutinação microscópica e de fixação de complemento, através do acompanhamento

sorológico de dois grupos de cães inoculados com leptospi-
ras patogênicas dos sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *canicola*.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação Experimental

Foram inoculados 30 animais da espécie canina, adultos, sem raça definida, considerados saudáveis, livres de anticorpos anti-leptospiras e que não se caracterizavam como eventuais portadores renais.

Após imunização contra a cinomose e hepatite todos os animais receberam tratamento anti-helmíntico (Mebendazole na dose de 20mg/kg/dia durante 3 dias) e foram separados em dois grupos: 15 cães de um grupo foram inoculados por via sub-cutânea com 20 ml de uma cultura de 5 dias (aproximadamente 2×10^9 leptospiras) da *Leptospira interrogans* Sorotipo *icterohaemorrhagiae*, amostra R10 (gentilmente cedidas por P-H. Yasuda, Departamento de Microbiologia e Imunologia, ICB - USP), e 15 cães do outro grupo com idêntica quantidade do sorotipo *canicola*, amostra CCZ 8 (também cedida por P-H. Yasuda). O inóculo foi preparado em meio líquido (EMJH-Difco) após duas passagens em cobaios para aumentar a virulência de ambas as amostras.

As amostras sorológicas foram obtidas imediatamente antes da inoculação e decorridos, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 49, 56 e 63 dias, naqueles animais que sobreviveram. A partir da 7a. semana, os animais foram sacrificados em grupos de 4, para o estudo das alterações anatômicas e histológicas.

Sorologia

Soroaglutinação microscópica - RAM

Os antígenos utilizados na reação de aglutinação microscópica foram os homólogos *icterohaemorrhagiae* e *canicola* para os respectivos grupos e os antígenos Patoc I, Rufino e Buenos Aires. A reação de aglutinação microscópica foi executada de acordo com a técnica descrita em SANTA ROSA¹² (1970).

Reação de fixação de complemento - RFC

Antígenos: os antígenos utilizados na reação de fixação de complemento foram preparados de acordo com a técnica descrita por STURDZA e cols¹⁴ (1960) com ligeiras modificações. As amostras de leptospiras foram semeadas em meio líquido (EMJH-Difco) acrescido de 10% de soro de coelho e incubadas a 28°C durante 8 a 10 dias. Após esse período de tempo, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspensão na proporção de 1:10 do volume original em solução fisiológica contendo

mertiolate a 1:10.000. As suspensões dos antígenos assim preparadas foram mantidas a temperatura de 4°C até o momento do seu uso, com agitações ocasionais, nos 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 hiper-ímmunes, empregando-se 2,5 unidade de complemento (2,5 UC'50%).

A técnica utilizada foi a de CAMARGO e cols⁴ (1950) utilizada rotineiramente no sistema febre aftosa e adaptada para o sistema leptospirose. O cálculo do título final do soro obtido a partir das diluições em que se observou 50% de hemólise ou empregando-se a seguinte expressão, em substituição ao método de leitura em gráfico estabelecido pela técnica.

$$X = a + (50-b).a, \text{ sendo} \\ C-b$$

X = título a ser calculado

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

b = % de hemólise em a.

c = % de hemólise na diluição seguinte

RESULTADOS

Os resultados obtidos com o emprego dos antígenos homólogos, Patoc I, Rufino e Buenos Aires nas reações de soroaglutinação microscópica e fixação de complemento em ambos os grupos de animais estão apresentados nas tabelas 1 e 2. Oito dos 15 animais (53%) inoculados com o sorotipo *icterohaemorrhagiae* apresentaram reação de aglutinação 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. Desses oito animais reagentes, dois apresentaram anticorpos capazes de fixar complemento com 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 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 de complemento, correspondendo a uma proporção de 33 e 27% respectivamente. 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 de complemento também foram baixos, variando entre 5 a 30.

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

leptospiras aquícolas de estirpe Rufino, não se observando nenhum reagente 28 dias após a inoculação. Pela reação de fixação de 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 de complemento não se observou reação positiva frente ao antígeno Rufino, enquanto foram observados 8 (53%) reagentes pela reação de aglutinação microscópica. Os títulos medidos pela reação de aglutinação microscópica foram baixos, como havia sido observado quando se utilizou a estirpe Patoc I.

Dos animais inoculados com o sorotipo **icterohaemorrhagiae**, 80% e 87% apresentaram reação positiva respectivamente aos testes de fixação de complemento e aglutinação microscópica, frente aos antígenos preparados com a estirpe Buenos Aires. Entre os animais do grupo II, inoculados com leptospiras patogênicas do sorotipo **canicola** a proporção de reagentes foi menor da ordem de 80%, para ambas as reações. O período de tempo em que se observaram reações positivas vai do 4o. ao 21o. dia na reação de fixação de complemento e do 7o. ao 35o. na reação de aglutinação microscópica, embora a maioria das reações positivas tenha sido observada entre o 7o. e o 21o. dia em ambos os grupos de animais.

TABELA 1 – Frequência de cães reagentes às reações de soroaaglutinação microscópica e de fixação de complemento frente aos antígenos homólogos, Patoc I, Rufino e Buenos Aires antes e após inoculação com *Leptospira interrogans* sorotipo icterohaemorrhagiae.

Tempo (dias)	No. de Animais	REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA								REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO							
		ICTERO		PATOC I		RUFINO		B.AIRES		ICTERO		PATOC I		RUFINO		B.AIRES	
		R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%
0	15	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0
4	15	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	7	47	1	7	NR	0	2	13
7	15	12	80	4	27	5	33	3	20	13	87	5	33	NR	0	11	73
10	15	15	100	8	53	7	53	13	87	15	100	6	40	NR	0	12	80
14	15	15	100	8	53	7	53	13	87	15	100	4	27	NR	0	11	73
21	15	15	100	6	40	4	27	10	67	14	93	2	13	NR	0	5	33
28	13	13	100	1	8	NR	0	7	54	9	69	NR	0	NR	0	2	15
35	13	12	95	1	8	NR	0	3	23	7	54	NR	0	NR	0	2	15
42	12	9	75	NR	0	NR	0	NR	0	4	33	NR	0	NR	0	NR	0
49	11	8	73	NR	0	NR	0	NR	0	2	18	NR	0	NR	0	NR	0
56	8	4	50	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0

R = Reagentes

NR = Não reagentes

TABELA 2 — Frequência de cães reagentes às reações de soroprecipitação microscópica e de fixação de complemento frente aos antígenos homólogos, Patoc I, Rufino e Buenos Aires antes e após inoculação e experimental com *L. interrogans* sorotipo *canicola*.

Tempo (dias)	No. de Animais	REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA								REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO									
		CANICOLA		PATOC I		RUFINO		B.AIRES		CANICOLA		PATOC I		RUFINO		B.AIRES			
		R	% R	R	% R	R	% R	R	% R	R	% R	R	% R	R	% R	R	% R		
0	15	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0
4	15	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0
7	15	8	53	3	20	NR	0	3	20	15	100	2	13	NR	0	9	60	15	100
10	15	15	100	4	27	3	20	12	80	15	100	4	27	NR	0	12	80	15	100
14	15	15	100	5	33	5	33	12	80	15	100	4	27	NR	0	7	53	15	100
21	15	15	100	4	27	8	53	10	67	14	93	4	27	NR	0	2	13	14	93
28	15	15	100	1	7	8	53	6	40	13	87	NR	0	NR	0	NR	0	13	87
35	15	15	100	1	7	7	47	2	13	13	80	NR	0	NR	0	NR	0	13	80
42	15	14	93	1	7	4	27	NR	0	8	53	NR	0	NR	0	NR	0	8	53
49	15	13	87	NR	0	NR	0	NR	0	7	47	NR	0	NR	0	NR	0	7	47
56	11	9	82	NR	0	NR	0	NR	0	3	27	NR	0	NR	0	NR	0	3	27
63	10	8	80	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0

R = Reagentes

NR = Não reagentes

DISCUSSÃO

No presente trabalho, confirmou-se o desempenho irregular e pouco satisfatório da estirpe Patoc I, quando utilizada como antígeno único das reações de aglutinação microscópica ou de fixação de complemento, para o diagnóstico da leptospirose canina pelos sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *canicola*, como já havia sido citado por ADDAMIA—NO e BABUDIERI¹ (1964), NICOLESCO e LELUTIU¹¹ (1967) e SANTA ROSA¹³ (1977).

Para NICOLESCO e LELUTIU¹¹ (1967), uma boa concordância entre os resultados obtidos com o emprego de sorotipo 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 no presente trabalho, essa hipótese deve ser rejeitada, pois nos períodos imediatamente posteriores à inoculação, 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 de complemento ou aglutinação microscópica.

Essa variação no comportamento sorológico entre o homem e os cães e outros animais domésticos pode ser explicada pelas diferenças imunobiológicas existentes entre as espécies animais, ocorrendo portanto, variações na resposta a um mesmo estímulo imunogênico, como salienta TUR—NER¹⁶ (1960). 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*, *canicola* ou *copenhagensis*, sendo mais baixa em torno de 50% quando as infecções são causadas por outros sorotipos, como foi observado por FUCHS⁷ (1969).

A inadequacidade do emprego do antígeno Rufino nas provas de soroprecipitação microscópica está perfeitamente clara face aos resultados obtidos no presente traba-

lho, como já havia demonstrado SANTA ROSA¹³ (1977), em contraposição aos de CACCHIONE e cols^{2,3} (1971, 1972). A inexistência de reação cruzada entre os sorotipos patogênicos **canicola** e **icterohaemorrhagiae** e a estirpe aquícola Rufino é também confirmada pela reação de fixação de complemento em que se observou nenhum resultado com o antígeno preparado a partir da última amostra.

Os resultados obtidos pelo emprego da estirpe Buenos Aires nas reações de aglutinação microscópica e de fixação de 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 de leptospirose canina por esse sorotipo. Não se pode entretanto recomendá-lo como antígeno único de triagem pois a sensibilidade de 87% para o primeiro grupo e de 80% para o segundo, não foi suficientemente alta para o seu emprego com essa finalidade. Mesmo assim, pode-se sugerir o seu emprego na bateria de antígeno devido a precocidade e homogeneidade da resposta, como também a sua negatificação mais rápida. Animais com reação de soroaglutinação positiva para os sorotipos **icterohaemorrhagiae** e **canicola** e também para a estirpe Buenos Aires poderiam ser considerados recentemente infectados e assim, adequadamente tratados, para se impedir a leptospiúria prolongada, principalmente na infecção pelo sorotipo **canicola**.

CONCLUSÕES

1. 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 como antígeno único.

2. A baixa concordância entre os resultados obtidos pelo emprego dessas estirpes e os obtidos com o emprego de antígenos homólogos não está relacionada ao período de tempo decorrido após a infecção.

3. A estirpe Buenos Aires é entre as três a que melhor se adapta ao diagnóstico da leptospirose canina pelos sorotipos **icterohaemorrhagiae** e **canicola**, sendo a sua sensibilidade em detectar os reagentes a esses sorotipos, da ordem de 87% e 80% respectivamente, na RAM, e de 80% na RFC na fase inicial da infecção no período compreendido entre o 7o. e 28o. dia pós-infecção.

HAGIWARA, M.K.; SANTA ROSA, C.A.; PINTO, A.A. Experimental canine leptospirosis. Evaluation of leptospira Patoc I, Rufino and Buenos Aires as antigen in both microscopic agglutination and complement fixation tests. *Rev.Fac.Med.vet.Zootec. Univ.S.Paulo*, 19(1): 61-66. 1982.

SUMMARY: The antibody evolution in two groups of dogs inoculated with pathogenic leptospiras **icterohaemorrhagiae** and **canicola** was followed by microscopic agglutination and complement fixation tests in order to evaluate the usefulness of leptospiras Patoc I, Rufino and Buenos Aires as screening antigen in the diagnosis of leptospiral infection. Results showed that the antigens Patoc I and Rufino were inefficient in providing detected circulation antibodies titres in experimentally infected animals. However, when the Buenos Aires antigen was used, 87% of the animals infected with serovar **icterohaemorrhagiae** and 80% of those infected with serovar **canicola** showed significant titres of agglutination and complement fixing antibodies.

UNITERMS: Leptospirosis in dog*; Complement fixation test*; Microscopic agglutination test*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – ADDAMIANO, L. & BABUDIARI, B. Water strains of leptospira in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. *Bull.Wld.Hlth.Org.*, 39: 925-34, 1964.
- 2 – CACCHIONE, B.S. & MARTINEZ, E.S. *Leptospira biflexa* Rufino. Su uso en el diagnostico de leptospirosis animal. *Rev.Invest.agropec.*, ser. 4, 8: 29-35, 1971.
- 3 – CACCHIONE, R.A.; CASCELLI, E.S.; MARTINEZ, E.S. Avances en el diagnostico de leptospirosis animal por una prueba microscopica empleando um antígeno de *L. biflexa* cepa Rufino. *Rev. Asoc.argent.Microbiol.*, 4:3-7, 1972.
- 4 – CAMARGO, N.F.; EICHORN, E.A.; LEVINE, J.M.; TELEZ GIRON, A.A. Complement fixation technique for Foot-and-Mouth disease and vesicular stomatitis. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 87., 1950. *Proceedings*. p.207-11.
- 5 – COMBIESCO, D.; STURDZA, N.; SEFER, M.; RADU, J. Recherches sur les leptospirosis. *Arch.roum. Path.exp.*, 245-50, 1958.
- 6 – CORRÊA, M.O.A.; NATALE, V.; SADATSUNE, T.; FLEURY, G.C. Valor pratico do uso de *Leptospira semaranga* Patoc I no diagnostico das leptospiroses humanas. *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo*, 12:284-7, 1970.

- 7 – FUCHS, G.H. Experience with *L. biflexa* antigens in laboratory diagnosis of suspect cases of leptospirosis. *Zbl.Bakt.Parasitkde.*, 209:261-7, 1969.
- 8 – HERGT, B. Meaning of serotype Patoc (*biflexa* complex) for the diagnosis of leptospirosis by microscopic agglutination test. *Zbl.Bakt.Parasitkde.*, 235:504-11, 1976.
- 9 – KMETY, E. Betrachtungen zum Problem der paraxenreaktion und deren Bedeutung in der Serodiagnostik einiger Leptospiren. *Zbl.Bakt.I Abt.Orig.*, 170:597-608, 1958.
- 10 – MAILLOUX, M. Utilité de l'antigène *biflexa patoc* dans les serodiagnoses de leptospirose. *Ann. Inst.Pasteur*, 112:2, 1967.
- 11 – NICOLESCO, M. & LELUTIU, C. Diagnostic par la réaction de fixation du complément à l'aide d'un antigène unique dans le décellement des leptospirose animales. *Arch.roum.Path.exp.*, 26:557-64, 1967.
- 12 – SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev.Microbiol.*, 1:97-109, 1970.
- 13 – SANTA ROSA, C.A. Estudo comparativo de algumas estirpes de leptospiroses apatogênicas para o diagnóstico de leptospirose animal. São Paulo, 1977. /Tese de Livre-Docência – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP/
- 14 – STURDZA, N.; ELIAN, M.; TULPAN, G. Diagnosis of human leptospirosis by the complement fixation test with a single antigen. *Arch.roum.Path.exp.*, 19:571-82, 1960.
- 15 – STURDZA, N. & ELIAN, M. Comparative study of different strains of *L. biflexa* as antigen for the complement fixation tests in leptospirosis. *Arch.roum.Path.exp.*, 20:33-41, 1961.
- 16 – TURNER, L.H. Leptospirosis II. Serology. *Trans.roy. Soc.Med.Hyg.*, 62:880-9, 1968.

Recebido para publicação em: 30-06-81.
Aprovado para publicação em: 06-04-82.