

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SORO SOBRE A SENSIBILIDADE E A ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA APLICADA AO DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE SUÍNA, TENDO COMO ANTÍGENO A *L. BIFLEXA* ESTIRPE BUENOS AIRES *

SILVIO ARRUDA VASCONCELLOS
Professor Associado
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

IOSHIHIRO OHTSUBO
Professor Assistente
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

PAULO HIDEKI YASUDA
Professor Assistente Doutor
Instituto de Ciências
Biomédicas da USP

ANIBAL SANT'ANNA MORETTI
Professor Assistente Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

FUMIO HONMA ITO
Professor Associado
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

ESTEVÃO DE CAMARGO PASSOS
Pesquisador Científico
Instituto Biológico de São Paulo

JOSÉ DE ANGELIS CÔRTEZ
Professor Titular
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

VASCONCELLOS, S.A.; OHTSUBO, I.; YASUDA, P.H.; MORETTI, A.S.; ITO, F.H.; PASSOS, E.C.; CÔRTEZ, J.A. Efeito da concentração do soro sobre a sensibilidade e a especificidade da reação de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose suína, tendo como antígeno a *L. biflexa* estirpe Buenos Aires. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(1):33-39, 1990.

RESUMO: Foi estudada a influência da variável concentração de soro sobre os resultados da reação de soroaglutinação microscópica (SAM) aplicada ao exame de grupos de suínos controlados. Dos 29 animais utilizados, nove permaneceram como testemunhos (Grupo "A"), dez receberam, durante três dias, água de bebida contaminada por *L. biflexa* estirpe Buenos Aires (Grupo "B") e dez foram inoculados pela via intraperitoneal com uma estirpe virulenta de *L. interrogans* sorotipo pomona (Grupo "C"). As amostras de soro examinadas foram obtidas no 5º, 15º, 30º, 39º e 51º dia da investigação, perfazendo um total de 145 amostras. Os soros foram examinados nas diluições de 1:10; 1:40; 1:80 e 1:100. A análise dos resultados considerou como especificidade absoluta o percentual de resultados negativos no grupo "A" e como sensibilidade absoluta o percentual de resultados positivos obtidos no grupo "C". Os resultados obtidos demonstraram que a medida em que se aumentou a concentração do soro houve concomitantemente um aumento na sensibilidade e uma diminuição na especificidade dos resultados obtidos com o antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires. Para este antígeno o maior valor encontrado simultaneamente para as características de sensibilidade e de especificidade foi o de 60% na diluição do soro de 1:20.

UNITERMOS: Leptospirose, suínos; *Leptospira interrogans*; *Leptospira biflexa*; Soroaglutinação

INTRODUÇÃO

A necessidade de utilizar um grande número de antígenos de leptospirosas vivas, potencialmente patogênicas, tem sido apontada como a principal limitação para o emprego da reação de soroaglutinação microscópica (SAM) aplicada ao diagnóstico da leptospirose animal^{15,16}. Esta condição tem suscitado o delineamento de investigações que procuram encontrar um antígeno único para o exame de soros de animais^{4,8,11,16}, tão eficiente como se tem mostrado a estirpe Patoc I da *L. biflexa*, sorogrupo semaranga, quando do exame de soros de pacientes da espécie humana^{1,6,11}.

Dentre os representantes de *L. biflexa* testados frente a soros de suínos, a estirpe Buenos Aires tem apresentado alguns resultados conflitantes. Enquanto SANTA ROSA¹¹ (1978) e CALDAS⁴ (1985) relataram a obtenção de resultados bastante promissores, GENOVEZ⁸ (1985) e VASCONCELLOS¹⁶ (1989) encontraram valores de sensibilidade muito baixos.

A sensibilidade da reação (SAM) aplicada ao diagnóstico da leptospirose é influenciada pela densidade do antígeno^{2,3,5,7,9}. Os antígenos muito densos têm

* Trabalho conduzido com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq.

apresentado menor sensibilidade³. Vários procedimentos são referidos para padronizar a concentração do antígeno empregado em tal prova: métodos de contagem em câmaras especiais^{6,7}, comparação com padrões que dosam o grau de turbidez⁹ e o método que considera a faixa etária da cultura¹⁰. Nenhum destes métodos satisfaz totalmente e o que é mais utilizado em termos práticos é o que leva em conta a idade das culturas¹⁰. Saliente-se, no entanto, que este critério é bastante falível, uma vez que a intensidade do crescimento de uma determinada amostra de leptospira depende das condições em que é cultivada, destacando-se o tipo de meio de cultura e principalmente dos lotes das fontes de enriquecimento.

Tendo em vista que as amostras de *L. biflexa* usualmente apresentam "in vitro" um crescimento mais vigoroso do que a maioria das amostras de *L. interrogans*, é de interesse que, fixando-se a concentração do antígeno, se analise a influência da concentração do soro sobre as características de sensibilidade e de especificidade da reação de SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose, tendo as amostras aquícolas de *L. biflexa* como antígeno. Saliente-se, inclusive, que embora seja aceito que a diluição de triagem de um soro deva ser de 1:100, este critério poderia ser modificado quando o antígeno fosse representado por amostras de *L. biflexa*. De fato SCHÖNBERG¹² (1979) trabalhou com soros de suínos diluídos a 1:10, quando testou as estirpes de *L. biflexa*, Patoc I e São Paulo.

Deste modo foi delineado o presente trabalho que teve por objetivo determinar a diluição ótima do soro, tendo em vista as características de sensibilidade e de especificidade da reação de SAM tendo como antígeno a *L. biflexa* estirpe Buenos Aires.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo utilizou soros de suínos obtidos de grupos controlados já especificados em investigações anteriores^{15,16} e que permaneceram congelados à temperatura de 20 °C negativos.

A reação de SAM com antígenos vivos foi executada e interpretada conforme a recomendação de SANTA ROSA¹⁰ (1970). O meio utilizado para o crescimento dos antígenos foi o de Ellinghausen; Mc Cullough; Johnson e Harris** (EMJH) enriquecido com 10% de soro estéril de coelho, livre de aglutininas para leptospiras, inativado a 56 °C positivos por 40 minutos e adicionado das soluções de L-asparagina, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio conforme preconizado por TURNER¹⁴ (1970). Os repiques dos antígenos foram programados de tal modo que por ocasião da execução das provas de SAM as

culturas estavam sempre entre o quinto e o sétimo dia de crescimento. Todos os soros foram examinados em quatro diluições seriadas de razão dois, partindo-se do valor inicial de 1:10. A diluição dos soros de 1:100 já ensaiada em experimentos anteriores^{15,16}, foi mantida como controle devido ser a diluição de triagem usualmente adotada nos laboratórios que executam a reação de SAM.

Os grupos experimentais foram constituídos a partir dos soros de 29 suínos, mestiços, recém-desmamados, que no início da investigação foram classificados como não reatores na prova de SAM, com uma coleção de 21 variantes sorológicas de *L. interrogans* e três de *L. biflexa*, especificada em VASCONCELLOS¹⁶ (1989).

Os nove animais do grupo "A" não foram submetidos a nenhum tipo de inoculação ou de exposição a ambiente contaminado por leptospiras e permaneceram como grupo testemunho.

Os dez animais do grupo "B", nos três primeiros dias da investigação, tiveram como única fonte de água de bebida uma suspensão aquosa a 0,5% volume/volume de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires. Na ocasião da utilização, as culturas apresentavam sete dias de cultivo em meio de EMJH. O pH da água foi mantido na faixa de 7,2 a 7,4 com o tampão fosfatado de Sorensen¹⁰.

Os dez animais do grupo "C" foram experimentalmente inoculados pela via intraperitoneal com uma suspensão de fígado a 1,0% peso/volume, da sétima passagem em hamster, de uma amostra virulenta de *L. interrogans* sorotipo pomona***. A observação deste material em microscopia de campo escuro, com aumento de 200 vezes, revelou a presença de 30 a 40 leptospiras ativas por campo. Cada suíno recebeu quatro mililitros desta suspensão.

As amostras de soro sanguíneo examinadas foram aquelas obtidas nas seguintes ocasiões: 5^a, 15^a, 30^a, 39^a e 51^a dia experimentais. Estas fases foram escolhidas por representarem três períodos distintos em termos de evolução dos níveis de aglutininas determinadas pela infecção¹⁶, ou seja, 5^a dia início das primeiras reações na diluição dos soros de 1:100; 15^a a 39^a, período com níveis de anticorpos aglutinantes variáveis, porém elevados e 51^a, fase de declínio nas taxas de anticorpos revelados pela SAM.

A análise dos resultados considerou como especificidade absoluta o percentual de resultados negativos no grupo "A" testemunho não infectado e como sensibilidade absoluta o percentual de resultados positivos obtidos no grupo "C", experimentalmente infectado com *L. interrogans* sorotipo pomona. Os resultados positivos obtidos no grupo "A" testemunho foram interpretados como falsas reações positivas.

** Difco

*** Obtida junto a Salsbury Laboratórios Ltda.

RESULTADOS

Os valores apresentados na Tab. 1, obtidos a partir dos exames dos animais do grupo "C", experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, oferecem subsídios para a avaliação da sensibilidade dos antígenos empregados. É possível constatar-se que nas maiores concentrações de soro, os dois antígenos utilizados apresentaram valores de sensibilidade mais elevados e, inclusive, maior precocidade na caracterização de um animal infectado como reator. Saliente-se que no 5º dia pós-infecção, na diluição do soro de 1:10, a sensibilidade obtida com o antígeno de *L. biflexa* foi superior à encontrada para o de *L. interrogans*, no entanto, nos exames realizados a partir das colheitas subsequentes, enquanto os valores de sensibilidade obtidos com o antígeno homólogo situaram-se na faixa de 80 a 100% frente às diversas diluições do soro, para o antígeno de *L. biflexa*, valores desta magnitude só foram observados na diluição do soro de 1:10, em todas as colheitas e na diluição de 1:20 para as colheitas realizadas no 30ª e 39ª dia pós-infecção.

As Tab. 2 e 3 apresentam resultados dos animais dos grupos experimentais constituídos para permitir a análise das características de especificidade dos antígenos empregados.

Os valores apresentados nas Tab. 2 e 3 revelam perfis sorológicos muito semelhantes, demonstrando que a contaminação da água de bebida do grupo "B" não foi capaz de determinar a produção de anticorpos séricos, demonstráveis através da reação de soroaglutinação microscópica, tendo como antígenos a *L. biflexa* estirpe Buenos Aires ou a *L. interrogans* sorotipo pomona.

Persistindo na apresentação das Tab. 2 e 3, pode-se constatar que frente ao antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona, só foram registradas sete reações inespecíficas nas colheitas realizadas no 5º e 15º dia da investigação, particularmente nas diluições dos soros de 1:10 (86%) e de 1:20 (14%). No entanto, frente ao antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires, a frequência de reações inespecíficas foi muito elevada nas diferentes colheitas realizadas e, particularmente, nas diluições dos soros de 1:10 e 1:20. Saliente-se, inclusive, que mesmo em diluições do soro de 1:100, não foi possível se eliminar totalmente a ocorrência de uma parcela de reações falso-positivas.

A Fig. 1 foi construída a partir dos valores totais apresentados nas Tab. 1 e 2, somatória de todas as colheitas, considerando-se como sensibilidade os resultados positivos nos animais do grupo "C" (Tab. 1) e como especificidade os resultados negativos (complemento dos positivos) dos animais do grupo "A" (Tab. 1).

A observação da Fig. 1 revela a existência de um comportamento inverso entre os valores de sensibili-

dade e de especificidade dos resultados obtidos com antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires, à medida em que a diluição dos soros decresce.

Ao nível da diluição dos soros de aproximadamente 1:20 ocorre o cruzamento entre as curvas relativas às características de sensibilidade e de especificidade absolutas. Pode-se verificar ser esta a diluição que oferece os melhores valores simultâneos para as duas características analisadas.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nas Tab. de 1 a 3 e na Fig. 1 comprovam que, com o aumento na concentração do soro, há concomitantemente um aumento no poder discriminador do antígeno de *L. biflexa*. No entanto, também é possível constatar-se a existência de um decréscimo nos valores relativos a especificidade da reação, ou seja, aumenta a frequência de resultados falso-positivos.

Este tipo de relação inversa entre as características de sensibilidade e de especificidade já foi referido por TIZARD¹³ (1977) em sua análise sobre as características dos métodos de diagnóstico sorológico.

A observação da Fig. 1 comprova que, na diluição dos soros no valor aproximado de 1:20, foi possível a obtenção do melhor resultado simultâneo para as características de sensibilidade e de especificidade para o antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires, no diagnóstico da leptospirose em suínos experimentalmente infectados pelo sorotipo pomona de *L. interrogans*. SCHÖNBERG¹² (1979) verificou em quatro suínos reagentes para *L. interrogans* com títulos iguais ou superiores a 100, a ocorrência de reações para antígenos de *L. biflexa* sorotipos Patoc e São Paulo, nas diluições do soro de 1:10 e 1:20.

A observação das Tab. 2 e 3 referentes ao exame dos soros provenientes, respectivamente, dos suínos dos grupos "A" e "B", confirma que tais grupos apresentaram o mesmo perfil sorológico ainda quando as diluições do soro foram inferiores ao valor 1:100. Esta constatação reforça a conclusão já relatada em investigação anterior¹⁵ de que o fornecimento de água de bebida, experimentalmente contaminada com *L. biflexa* estirpe Buenos Aires, não foi capaz de determinar modificações no perfil sorológico dos animais.

CONCLUSÕES

1. Em soros de suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, a diluição de 1:20 foi a que ofereceu os melhores valores simultâneos para

as características de sensibilidade e de especificidade para a reação de SAM com o antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires.

2. Mesmo em concentrações elevadas de soro, os valores de sensibilidade e de especificidade observados não permitem recomendar-se o emprego do antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires para o diagnóstico da leptospirose suína através da reação de SAM.

VASCONCELLOS, S.A.; OHTSUBO, I.; YASUDA, P.H.; MORETTI, A.S.; ITO, F.H.; PASSOS, E.C.; CÔRTEZ, J.A. The influence of serum concentration on the sensitivity and specificity of the microscopic agglutination test, using the *L. biflexa*, Buenos Aires strain, as antigen for diagnosing swine leptospirosis. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(1):33-39, 1990.

SUMMARY: The influence of serum concentration on the results of the microscopic agglutination test (MAT),

using the *L. biflexa* strain Buenos Aires as antigen, was investigated in three experimental groups of swines. The group "A" composed of nine animals was the control. The group "B" composed of ten animals had its water supply contaminated with the *L. biflexa* strain during the first three experimental days. The group "C" composed of ten animals was inoculated with a virulent strain of *L. interrogans* serovar pomona by the intraperitoneal route. The blood collections were obtained on the experimental days 5th, 15th, 30th, 39th and 51st. The serum dilutions tested were: 1:10; 1:20; 1:40; 1:80 and 1:100. The amounts of negative results in group "A" represented the specificity of the test and the amounts of positive results in group "C" the sensitivity. The results showed that when the concentration of the serum increases there was also an increase in its sensitivity but there was a decrease in its specificity. The best results of both of these characteristics were 60% at the serum dilution of 1:20.

UNITERMS: Leptospirosis in swine; *Leptospira interrogans*
Leptospira biflexa; Soroagglutination

TABELA 1 - Resultados das provas de soroaglutinação microscópica para a leptospirose, em suínos do grupo "C", experimentalmente infectados via intraperitoneal com *L. interrogans* sorotipo pomona, segundo a diluição do soro, o tipo de antígeno empregado e o momento da investigação, em que foi realizada a colheita de sangue. São Paulo, 1989.

DILUIÇÃO DO SORO		DATA COLHEITA (P.L.)		5º		15º		30º		39º		51º		TOTAL	
		ANTÍGENO		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1:10	POS / EX	5/10	7/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	5/10	45/50	40/50		
	%	50,00	70,00	100,00	90,00	100,00	100,00	100,00	90,00	100,00	50,00	90,00	80,00		
1:20	POS / EX	4/10	4/10	10/10	6/10	10/10	8/10	10/10	8/10	10/10	3/10	44/50	29/50		
	%	40,00	40,00	100,00	60,00	100,00	80,00	100,00	80,00	100,00	30,00	88,00	58,00		
1:40	POS / EX	0/10	2/10	10/10	5/10	10/10	5/10	10/10	4/10	10/10	2/10	40/50	18/50		
	%	0,00	20,00	100,00	50,00	100,00	50,00	100,00	40,00	100,00	20,00	80,00	36,00		
1:80	POS / EX	0/10	1/10	10/10	2/10	10/10	0/10	10/10	2/10	8/10	3/10	38/50	8/50		
	%	0,00	10,00	100,00	20,00	100,00	0,00	100,00	20,00	80,00	30,00	76,00	16,00		
1:100	POS / EX	1/10	1/10	10/10	1/10	1/10	0/10	10/10	3/10	9/10	3/10	40/50	8/50		
	%	10,00	10,00	100,00	10,00	100,00	0,00	100,00	0,00	90,00	30,00	80,00	16,00		

- (a) I = Antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona
 II = Antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires
 % = Valor expresso em percentual
 POS/EX = Número de soros reagentes sobre número de soros examinados

Efeito da concentração do soro sobre a sensibilidade e a especificidade da reação de soroaglutinação

TABELA 2 Resultados das provas de soroaglutinação microscópica para leptospirose em suínos do grupo A controle não infectado, segundo a diluição do soro o tipo de antígeno empregado e o momento da investigação em que foi realizada a colheita de sangue São Paulo 1989

DILUIÇÃO DO SORO		DATA COLHEITA SANGUE		5º		15º		30º		39º		51º		TOTAL	
		(a) ANTIGENO		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1:10	POS / EX	3/9	8/9	9/9	0/9	0/9	7/9	0/9	5/9	0/9	4/9	3/45	33/45		
	%	33,33	88,88	0,00	100,00	0,00	77,77	0,00	55,55	0,00	44,44	6,66	73,33		
1:20	POS / EX	1/9	1/9	0/9	3/9	0/9	4/9	0/9	1/9	0/9	6/9	1/45	15/45		
	%	11,11	11,11	0,00	33,33	0,00	44,44	0,00	11,11	0,00	66,66	2,22	33,33		
1:40	POS / EX	0/9	1/9	0/9	0/9	0/9	3/9	0/9	0/9	0/9	2/9	0/45	6/45		
	%	0,00	11,11	0,00	0,00	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00	22,22	0,00	13,33		
1:80	POS / EX	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	2/9	0/9	2/9	0/9	2/9	0/45	6/45		
	%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,22	0,00	22,22	0,00	22,22	0,00	13,33		
1:100	POS / EX	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	2/9	0/9	1/9	0/45	3/45		
	%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,22	0,00	11,11	0,00	0,66		

(a) I = Antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona
 II = Antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires
 % = Valor expresso em percentual
 POS/EX = Número de soros reagentes sobre número de soros examinados

TABELA 3 Resultado das provas de soroaglutinação microscópica para a leptospirose em suínos do grupo "B", que recebeu água de bebida experimentalmente contaminada com *L. biflexa* estirpe Buenos Aires, segundo a diluição do soro, o tipo de antígeno empregado e o momento da investigação em que foi realizada a colheita de sangue. São Paulo, 1989.

DILUIÇÃO DO SORO		DATA COLHEITA SANGUE		5º		15º		30º		39º		51º		TOTAL	
		(a) ANTIGENO		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1:10	POS / EX	2/10	7/10	1/10	7/10	0/10	6/10	0/10	7/10	0/10	3/10	3/50	30/50		
	%	20,00	70,00	10,00	70,00	0,00	60,00	0,00	70,00	0,00	30,00	6,00	60,00		
1:20	POS / EX	0/10	2/10	0/10	1/10	0/10	2/10	1/10	1/10	0/10	2/10	1/50	8/50		
	%	0,00	20,00	0,00	20,00	0,00	20,00	10,00	10,00	0,00	20,00	2,00	16,00		
1:40	POS / EX	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	2/10	0/10	1/10	0/50	6/50		
	%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	30,00	0,00	20,00	0,00	10,00	0,00	12,00		
1:80	POS / EX	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/50	2/50		
	%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00		
1:100	POS / EX	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/50	1/50		
	%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00		

(a) I = Antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona
 II = Antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires,
 % = Valor expresso em percentual
 POS/EX = Número de soros reagentes sobre número de soros examinados

REFERÊNCIA

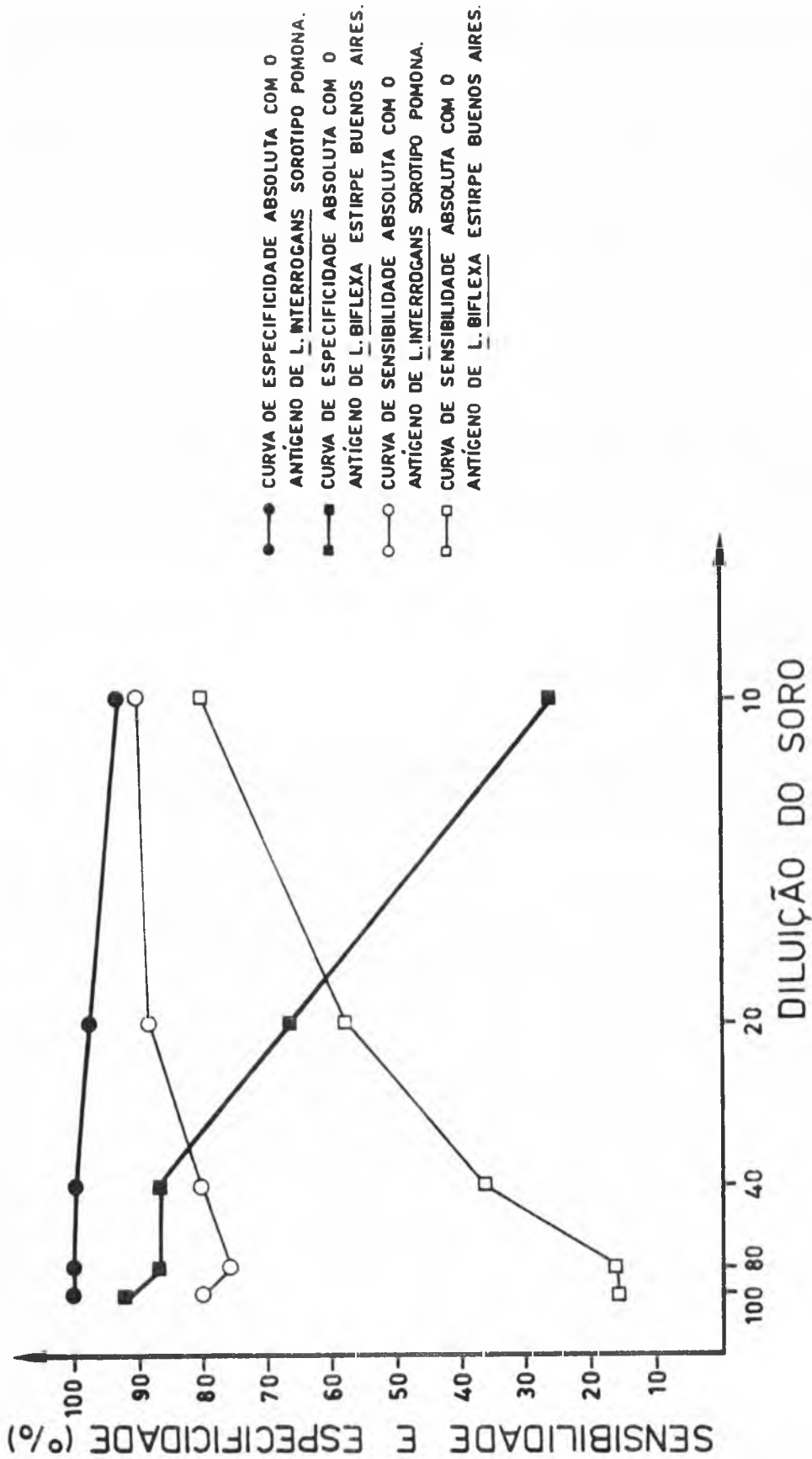


FIGURA 1 — Valores de sensibilidade (a) e de especificidade (b) absolutas das provas de soroaglutinação microscópica expressos em percentuais segundo a diluição do soro e o tipo de antígeno empregado, das colheitas realizadas no 5º, 15º, 30º, 39º e 51º dia experimental.

(a) especificidade absoluta = proporção de resultados negativos no grupo "A" (suínos não infectados).

(b) sensibilidade absoluta = proporção de resultados positivos no grupo "C" (suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-ADDAMIANO, L. & BABUDIERI, B. Water strains of leptospira in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. *Bull. Wld Hlth Org.*, 39:925-934, 1968.
- 02-BARBOSA, M. Effect of various factors upon the agglutination lysis test and agglutination test for *Leptospira pomona* infection. *Arq. Esc. Sup. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 11:287-308, 1958.
- 03-BORG-PETERSEN, C. & FAGROEUS, A. The influence of the antigen density and other factors on the serum titer in the agglutination-lysis-test for leptospirosis. *Acta path. microbiol. scand.*, 26:555-567, 1949.
- 04-CALDAS, E.M. *Investigação comparativa de estirpes apatogênicas para o diagnóstico sorológico da leptospirose animal*. Salvador, 1985. /Concurso para Professor Titular-Escola de Medicina Veterinária da UFBA/
- 05-CARBREY, E.A. The relative importance of variable factors in the agglutination Lysis test. *Proc. U.S. Live Stk. Sanit. Ass.*, 69:130-142, 1960.
- 06-FAYNE, S. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, World Health Organization, 1982. (WHO off set publications, 67)
- 07-FUCHS, G.H.P. Proposals for the standardization of antigens used in the serological diagnosis of leptospirosis. *Arch. exp. Vet. Med.*, 23:1183-1189, 1970.
- 08-GENOVEZ, M.E. *Avaliação da eficiência de estirpes de Leptospira biflexa no diagnóstico sorológico de triagem da leptospirose animal*. São Paulo, 1985. /Dissertação de mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP/
- 09-HORSCH, V.F.; MARWITZ, H.; JANETZKY, B. Studies in to the reliability, specificity and sources of error of micro-agglutination reaction when used in serological diagnosis of leptospirosis. *Mh. Vet. Med.*, 26:189-204, 1971.
- 10-SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.*, 1:97-109, 1970.
- 11-SANTA ROSA, C.A. *Estudo comparativo de algumas estirpes de leptospiroses apatogênicas para o diagnóstico da leptospirose animal*. São Paulo, 1978. /Tese de livre docência - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP/
- 12-SCHÖNBERG, A. Antibodies against *Leptospira biflexa* serovar Patoc and São Paulo in pigs: possible occurrence and importance for the intracutaneous test for leptospirosis. *Zbl. Bakt., I. Abt. Hyg.*, 244A:45-49, 1979.
- 13-TIZARD, I. *An introduction to veterinary immunology*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1977.
- 14-TURNER, L.H. Leptospirosis III. Maintenance isolation and demonstration of leptospires. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 64:623-646, 1970.
- 15-VASCONCELLOS, S.A.; OHTSUBO, I.; YASUDA, P.H.; MORETTI, A.S.; ITO, F.H.; PASSOS, E.C.; CÔRTEZ, J.A. Ausência de resposta imunológica humoral em suínos que receberam água de beber contaminada com *Leptospira biflexa* estirpe Buenos Aires. *Rev. Microbiol.*, 20:56-61, 1989.
- 16-VASCONCELLOS, S.A.; OHTSUBO, I.; YASUDA, P.H.; MORETTI, A.S.; ITO, F.H.; PASSOS, E.C.; CÔRTEZ, J.A.; MORENO, A.G. Emprego do antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires na reação de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona. *Rev. Microbiol.*, 20:62-70, 1989.

Recebido para publicação em 12/09/89

Aprovado para publicação em 12/12/89