

IMUNODIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA. 1. ANTÍGENO POLISSACARÍDICO PARA A PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA *

Maricy Alves RIBEIRO **
Massami KAWARABAYASHI **
Augusta Kiyomi TAKEDA **

RIALA6/536

RIBEIRO, M.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polissacarídico para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):127-133, 1981.

RESUMO: Antígenos polissacarídicos F_4 foram extraídos de leptospiros dos sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *patoc*, cuja relação proteína/carboidrato foi de 1,24 e 0,54, respectivamente. Sua especificidade sorológica foi avaliada na reação de hemaglutinação passiva para o diagnóstico da leptospirose humana. Para tanto, hemácias de carneiro previamente fixadas com glutaraldeído foram sensibilizadas com ambas as preparações. Esta prova foi experimentada em 91 soros obtidos de 35 pacientes com leptospirose, causada presumivelmente pelos sorotipos *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippothyphosa* e *pomona*. Verificou-se que ambas as frações F_4 comportaram-se de maneira semelhante. A reação de hemaglutinação passiva foi gênero específica, bastante sensível, positivando-se precocemente na fase aguda da doença. Foram salientadas as vantagens do emprego do antígeno F_4 *patoc*, por se tratar de sorotipo não patogênico.

DESCRITORES: leptospirose humana, imunodiagnóstico; antígeno polissacarídico de leptospira; prova de hemaglutinação passiva.

INTRODUÇÃO

Desde o trabalho descrito por HINDLE & WHITE¹¹, em 1934, inúmeros autores^{3, 4, 5, 7, 8, 14, 15, 19, 20, 21} têm investigado antígenos estáveis e suas eventuais aplicações em provas diagnósticas das leptospiroses, a fim de substituir ou complementar a prova clássica da soroprecipitação microscópica.

FAINE *et alii*⁹, em 1974, isolaram um antígeno lipopolissacarídico, denominado Fração 4 (F_4), provavelmente situado perto do envelope externo¹⁶ das leptospiros, cujas propriedades biológicas foram estudadas¹⁰, tais como, a produção dos anticorpos anti- F_4 , em coelhos, e seu efeito bactericida *in vitro*, a imunização passiva e ativa com anti- F_4 e F_4 , respectivamente, e sua capacidade protetora em camundongos.

A determinação da eventual especificidade sorológica do F_4 , extraído de sorotipos pertencentes a diferentes sorogrupos, obtida através da hemaglutinação passiva (HAP), mostrou a ocorrência de ampla reação cruzada frente aos respectivos anti-soros específicos de coelhos, quando imunizados por via intravenosa, onde os anticorpos pertenciam à classe de imunoglobulina M, segundo ADLER & FAINE². Estes autores, ao imunizarem coelhos por via intramuscular com o antígeno emulsionado com adjuvante, obtiveram anticorpo IgG, com reações cruzadas muito menos intensas. Todavia, trabalhando com F_4 do sorotipo *patoc*, frente a soros de pacientes acometidos de leptospirose, verificaram reações positivas em altos títulos.

O presente trabalho teve por objetivo a obtenção do antígeno polissacarídico de leptospiros dos sorotipos *icterohaemorrhagiae* e

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

patoc e a sua avaliação na reação de hemaglutinação passiva (HAP) frente a amostras de soros de 35 pacientes com quadro clínico de leptospirose.

MATERIAL E MÉTODOS

Sorotipos de leptospirosas

Foram utilizados os sorotipos *icterohaemorrhagiae* RGA e *patoc* Patoc I, que foram cultivados em 5,3 litros do meio de Korthoff, modificado, contendo 10% de soro normal de coelho, e incubados a 28°C, durante 9 a 12 dias. As suspensões finais continham aproximadamente 300 organismos por campo microscópico (aumento 400 X).

Antígeno polissacarídico (F₁)

a) Extração

A extração deste antígeno foi feita de acordo com a técnica preconizada por FAINE *et alii*⁹, com algumas modificações, descritas a seguir: culturas de leptospirosas foram fixadas com formaldeído a 1%, a 37°C, por uma hora, e centrifugadas a 16.300 x g*, por 10 minutos, a 4°C. O sedimento foi lavado duas vezes com solução salina tamponada fosfatada (SSTF), pH 7,2, ressuspenso nesse mesmo tampão e adicionado a igual volume de NaOH, a 1%. A suspensão foi mantida por 12 horas, a 56°C, com agitação ocasional e, após resfriamento à temperatura ambiente, foi centrifugada a 27.000 x g, por 25 minutos, a 4°C. O precipitado foi desprezado. O sobrenadante teve o pH ajustado para 8,5, com HCl 1 N, e foi adicionado a igual volume de etanol absoluto.

Essa suspensão foi estocada por 12 horas, a 4°C, após o que foi centrifugada a 27.000 x g, por 20 minutos, para remoção do precipitado (fração 1 de Faine⁹); o pH do sobrenadante foi acertado para 3,5 com ácido acético glacial e estocado por 48 horas, a 4°C. O precipitado (fração 2 de Faine⁹) foi removido por centrifugação a 37.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi neutralizado e precipitado com etanol a 90%, por 3 horas. Após centrifugação a 10.400 x g, por 20 minutos, a 4°C, o precipitado foi ressuspenso em água destilada e, após diálise, reprecipitado 2 vezes com etanol a 90%. O precipitado formado, fração 4 de Faine⁹, que contém o antígeno polissacarídico, foi ressuspenso em salina estéril e estocado a -20°C. Foram obtidos, dessa forma, os antígenos polissacarídicos dos sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *patoc*, que serão mencionados como F₁ *icterohaemorrhagiae* e F₁ *patoc*.

b) Determinações químicas

O conteúdo de carboidratos foi determinado pelo método da antrona¹⁰, enquanto que a concentração das proteínas foi dosada pelo método de LOWRY *et alii*¹¹.

Prova de hemaglutinação passiva

a) Preparo de hemácias fixadas com glutaraldeído

Hemácias de carneiro foram fixadas com glutaraldeído, conforme técnica descrita por IMAI *et alii*¹².

b) Sensibilização das hemácias fixadas

No momento do uso, as hemácias de carneiro previamente fixadas com glutaraldeído foram lavadas duas vezes em SSTF, pH 7,2. Uma suspensão a 10% dos eritrócitos foi distribuída em 2 tubos marcados, "reação" e "controle", respectivamente. No tubo marcado "reação" foi adicionado 1,9 ml da suspensão de antígeno polissacarídico (F₁), na concentração pré-titulada para cada 0,3 ml da suspensão de hemácias a 10%. No tubo "controle", a suspensão de antígeno foi substituída por SSTF, pH 7,2. Após homogeneização, os eritrócitos foram incubados, a 37°C, por 60 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Em seguida, as hemácias foram lavadas 3 vezes com SSTF, pH 7,2, e centrifugadas a 755 x g, por 10 minutos. Foram obtidas por essa técnica suspensões a 1%, em SSTF, pH 7,2, de eritrócitos sensibilizados com F₁ *icterohaemorrhagiae* e com F₁ *patoc*.

c) Reação propriamente dita

As amostras de soros a serem examinados foram diluídas em série, na razão log₂, com tampão diluente (soroalbumina bovina a 0,5 g %, diluída em SSTF pH 7,2) em placas de microtitulação em "V", com alças diluidoras de 25 µl. Em cada cavidade da placa foram adicionados 25 µl da suspensão, a 1%, de hemácias sensibilizadas. As placas foram agitadas e colocadas em câmara úmida por 60 minutos, à temperatura de 37°C; em seguida, permaneceram à temperatura ambiente por 18 horas. A leitura foi expressa em título, considerado como sendo a maior diluição do soro onde ainda ocorria a aglutinação de hemácias. Foi considerado significativo o título igual ou maior do que 1:32, com base na mediana de valores obtidos em grupo controle¹⁷.

Soros analisados

Foram utilizadas de 2 a 3 amostras de soro, num total de 91 amostras, obtidas de 35 pacientes com leptospirose cujos títulos de aglutininas específicas foram positivos pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). O intervalo médio, após o início dos sintomas, em que foram colhidas as amostras

* g = aceleração padrão da gravidade (9.807 mm/s²).

foi para a 1.^a amostra de 6 dias, para a 2.^a amostra, de 16 dias e para a 3.^a amostra, de 38 dias. A procedência e os resultados da SAM desses soros estão descritos na parte 2 do presente trabalho (RIBEIRO *et alii*¹⁷). O sorotipo etiológico presumível foi o *icterohaemorrhagiae* em 25 pacientes, o *copenhageni* em 4, o *grippotyphosa* em 3, o *pomona* em um. Nos dois pacientes restantes, os sorotipos não foram claramente determinados pela SAM.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na extração e dosagens químicas dos antígenos polissacarídicos F₁ estão sumarizados na tabela 1, onde se

pode observar que em 5,3 litros de cultura de *icterohaemorrhagiae*, cepa RGA, foram obtidos 28,7 mg, em peso seco, do antígeno polissacarídico (F₁ RGA), sendo 23,43% correspondente a carboidratos e 29,17% a proteínas. A concentração na diluição ótima sensibilizante foi de 9,56 µg/ml, contendo 2,788 µg/ml de proteína e 2,24 µg/ml de carboidrato.

No mesmo volume de cultura do sorotipo *patoc Patoc I*, foram obtidos 15,6 mg de peso seco de antígeno polissacarídico (F₁ Patoc I), do qual 22,44% corresponde a carboidratos e 12,05% a proteínas; a concentração na diluição ótima sensibilizante foi de 15,60 µg/ml, dos quais 1,879 µg/ml correspondem a proteínas e 3,50 µg/ml, a carboidratos.

TABELA 1

Dosagens químicas dos antígenos polissacarídicos (F₁) obtidos dos sorotipos *icterohaemorrhagiae* RGA e *patoc Patoc I*

Fração F ₁	Cepa de leptospira	
	RGA	Patoc I
Peso seco (mg)	28,70	15,60
Carboidratos (%)	23,43	22,44
Proteínas (%)	29,17	12,05
Concentração na D.O.S. (µg/ml)*	9,56	15,60
Proteínas na D.O.S. (µg/ml)	2,788	1,879
Carboidratos na D.O.S. (µg/ml)	2,24	3,50

* D.O.S. = diluição ótima sensibilizante.

A relação proteína/carboidrato da cepa RGA foi de 1,24, enquanto que a da Patoc I foi de 0,54, demonstrando que este último apresenta um teor de proteína bem menor do que o da cepa RGA, enquanto que o teor de carboidrato se encontra em proporções bem próximas em ambas as cepas.

Os dois F₁ obtidos foram capazes de sensibilizar hemácias de carneiro previamente fixadas com glutaraldeído, possibilitando a execução de reações de hemaglutinação passiva nas amostras de soros humanos em estudo, cujos resultados estão discriminados na tabela 2.

Como se pode observar, os dois lotes de hemácias reagiram com soros provenientes de pacientes cujos agentes infectantes presumíveis eram sorotipos homólogos ou não.

Na tabela 3 encontra-se a comparação dos resultados de HAP, empregando-se eritrócitos sensibilizados com F₁ RGA (cepa homóloga) e com F₁ Patoc I (cepa heteróloga) em cada uma das amostras de soro de pacientes com leptospirose cujo agente etiológico presumível foi o sorotipo *icterohaemorrhagiae*. Com os dois critérios de comparação, isto é, frequência de positividade e frequência de diferença significativa entre os títulos, os resultados obtidos foram idênticos ou similares.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polissacarídico para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):127-133, 1981.

TABELA 2

Títulos das amostras séricas de cada paciente com leptospirose obtidos através de hemaglutinação passiva, empregando-se os antígenos F, icterohaemorrhagiae RGA e F, patoc Patoc I

Paciente	Agente infeccioso presumível Sorotipo	Hemaglutinação Passiva (título 1:)					
		1.ª Amostra		2.ª Amostra		3.ª Amostra	
		RGA	Patoc I	RGA	Patoc I	RGA	Patoc I
1 MFL	<i>icterohaemorrhagiae</i>	128	128	4.096	2.048	512	512
2 ESO	"	8.192	16.384	4.096	1.024	2.048	512
3 IV	"	32	32	4.096	2.048	4.096	1.024
4 LBS	"	32	32	16.384	1.024	512	1.024
5 JAC	"	1.024	512	4.096	1.024	128	512
6 MAS	"	256	512	1.024	1.024	... (*)	...
7 SMA	"	16	64	2.048	512	512	256
8 MS	"	8.192	16.384	4.096	32.768
9 TVP	"	256	256	2.048	2.048
10 PS	"	1.024	1.024	4.096	1.024
11 JCB	"	256	64	512	1.024	256	256
12 MIP	"	1.024	2.048	4.096	8.192
13 ASS	"	1.024	1.024	2.048	2.048
14 FJA	"	1.024	2.048	4.096	8.192
15 JLR	"	1.024	256	512	256	256	256
16 KI	"	4.096	8.192	8.192	8.192
17 JM	"	8.192	8.192	4.096	16.384
18 CRS	"	8	32	1.024	512	256	128
19 MCAS	"	8.192	16.384	2.048	1.024
20 MHK	"	4.096	1.024	512	2.048	512	512
21 JRO	"	512	512	1.024	1.024
22 AN	"	256	512	1.024	2.048
23 FTS	"	256	512	512	1.024	256	256
24 JCS	"	64	64	512	256	64	128
25 CAS	"	512	256	16.384	16.384	8.192	8.192
26 MTS	<i>copenhageni</i>	512	512	1.024	512	512	256
27 JAS	"	256	256	1.024	2.048
28 ACD	"	16	2.048	16	2.048	2.048	1.024
29 IMG	"	1.024	2.048	65.536	8.192	4.096	32.768
30 YK	<i>grippotyphosa</i>	512	256	16.384	2.048	8.192	2.048
31 ARS	"	64	2.048	16.384	65.536	8.192	32.768
32 EVC	"	128	64	512	256	128	256
33 JPM	<i>pomona</i>	512	256	1.024	1.024	128	128
34 JAF	<i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>copenhageni</i>	2.048	2.048	1.024	2.048	256	2.048
35 RJS	<i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>grippotyphosa</i>	32	64	512	512

(*) As casas vazias (...) indicam amostra não colhida.

TABELA 3

Comparação dos resultados de hemaglutinação passiva executada com os dois antígenos (F₁ RGA e F₁ Patoc I) em cada uma das amostras de soro de pacientes com leptospirose presumivelmente devida ao sorotipo icterohaemorrhagiae

	Soros	N.º de casos			
		Fração F ₁	1.ª amostra	2.ª amostra	3.ª amostra
Frequência de positividade *	RGA		23/25 **	25/25	13/13
	Patoc I		25/25	25/25	13/13
Frequência de diferença significativa *** entre os títulos, favorável a	RGA		3/25	5/25	2/13
	Patoc I		2/25	3/25	2/13

* A mediana dos títulos no grupo controle foi de 1:16.

** Frequência expressa como n.º de casos positivos sobre o total de casos analisados.

*** Diferença de duas ou mais diluições duplas.

DISCUSSÃO

Da análise dos resultados obtidos pode-se constatar que hemácias sensibilizadas com F₁ icterohaemorrhagiae e com F₁ patoc dão reações cruzadas com anticorpos produzidos por vários sorotipos pertencentes a diferentes sorogrupos causadores de leptospirose humana.

Ambas as extrações de F₁ foram preparadas exatamente da mesma maneira e, por conseguinte, as reações cruzadas configuradas na tabela 2 contrastam com os achados de ADLER & FAINE², que não encontraram reatividade cruzada no soro de coelho heterólogo contra F₁ patoc. Tal contraste é bem compreensível, uma vez que é sabido que o sorotipo patoc não funciona como antígeno polivalente de triagem, frente a anticorpos anti-leptospiras produzidos pelas diferentes espécies de animais domesticados.

CHERNUKHA *et alii*⁶, estudando a dinâmica de elaboração dos anticorpos aglutinantes específicos em 1047 soros de 669 pacientes com histórico de doença leptospirótica, verificaram que a formação de microglobulinas e macroglobulinas era simultânea, porém a concentração dos anticorpos 19 S (IgM) excedia consideravelmente a dos anticorpos 7 S (IgG) e a queda de imunoglobulinas da classe G, em toda a evolução da doença, era consideravelmente menor que a de imunoglobulinas da classe M. Assim é que, durante a primeira semana de doença circulam no sangue prin-

cipalmente anticorpos da classe M, cujos títulos aumentam em até 10 vezes até a 4.ª semana da doença, enquanto os níveis de anticorpos IgG atingem os maiores títulos em torno do 20.º dia da doença. Segundo esses mesmos autores, os anticorpos da classe M possuem espectro de reação cruzada bem maior do que aquele pertinente às imunoglobulinas da classe G.

Por outro lado, de acordo com ADLER & FAINE¹, os anticorpos anti-F₁ humanos pertencem à classe de imunoglobulina M, mesmo quando detectados até 10 meses após o início da infecção, o que explicaria o fato de não terem esses anticorpos sua especificidade aumentada durante os diferentes estágios da doença.

O amplo espectro de reação cruzada inerente às imunoglobulinas da classe M ficou evidente em nossa casuística, pois as provas de hemaglutinação passiva com eritrócitos sensibilizados com antígeno F₁ de ambos os sorotipos (icterohaemorrhagiae e patoc) detectaram anticorpos na maioria dos pacientes, independentemente da cepa com que foram infectados. O fato é de importância clínica pois, com a utilização de apenas uma única cepa, chega-se ao diagnóstico de leptospirose humana, o que é suficiente para o médico clínico, desde que não existe tratamento medicamentoso diferente para cada uma das diversas cepas de leptospiras causadoras das leptospiroses humanas.

Quanto à estabilidade dos antígenos polissacarídicos F₁, observou-se que puderam ser estocados por um período de um ano sem perda de suas propriedades sensibilizantes de eritrócitos.

CONCLUSÕES

As reações de hemaglutinação passiva com eritrócitos sensibilizados com antígenos polissacarídicos F₁ de ambos os sorotipos (*icterohaemorrhagiae* e *patoc*) detectaram anticorpos nos pacientes com leptospirose, independentemente do sorotipo infectante. Por conseguinte, as reações com ambos os sorotipos são gênero-específicas. Os resultados obtidos com F₁ Patoc I foram idênticos ou

similares aos obtidos com F₁ RGA. Todavia, a análise, por inspeção, deste estudo que pode ser considerado como exploratório, indica a necessidade de se trabalhar com um número bem maior de amostras de soro, para que tais conclusões sejam definitivas.

O confronto dessa prova com a soroglutinação microscópica e com a imunofluorescência indireta está descrito em RIBEIRO *et alii*¹⁷

É vantajosa a utilização do antígeno F₁ *patoc*, devido à facilidade de sua obtenção e à ausência de patogenicidade em caso de contaminação laboratorial.

A estabilidade do antígeno polissacarídico F₁, quando estocado a -20°C, é de cerca de 12 meses.

RIALAG/536

RIBEIRO, M.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Immunodiagnosis of human leptospirosis. 1. Polysaccharide antigen for passive hemagglutination test. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):127-133, 1981.

ABSTRACT: F₁ polysaccharide antigen were extracted from leptospires belonging either to *icterohaemorrhagiae* or *patoc* serovars, the protein/carbohydrate ratio being respectively 1.24 and 0.54. The serological specificity was tested through passive hemagglutination test. Preparations of glutaraldehyde-fixed sheep red blood cells were sensitized with either *L. icterohaemorrhagiae* or *L. patoc* antigens. Each final preparation was employed in tests carried out in 91 blood specimens obtained from 35 patients suffering from leptospirosis presumably due to serovars *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippothyphosa* or *pomona*. Both F₁ preparations behaved very similarly. The passive hemagglutination test was genus specific, very sensitive and became positive in the early stage of the illness. The advantage of F₁ *patoc* antigen is point out because of its lack of pathogenicity.

DESCRIPTORS: leptospirosis, human, immunodiagnosis; antigens, polysaccharidic; passive hemagglutination test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, B. & FAINE, S. — The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J. med. Microbiol.*, 11:387-400, 1978.
2. ADLER, B. & FAINE, S. — Serological cross-reactions of leptospiral lipopolysaccharide (F₁) antigen. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 244:291-301, 1979.
3. AURAN, N.E.; JOHNSON, R.C. & RITZI, D.M. — Isolation of outer sheath of *Leptospira* and its immunogenic properties in hamsters. *Infect. Immun.*, 5:968-75, 1972.
4. BAKER, L.A. & COX, C.D. — Quantitative assay for genus-specific leptospiral antigen and antibody. *Appl. Microbiol.*, 25:697-8, 1973.
5. CHANG, R. SHIH-MAN & McCOMB, D.E. — Erythrocyte sensitizing substances from five strains of Leptospirae. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 3:481-9, 1954.
6. CHERNUKHA, Y. G.; SHISHKINA, Z.S.; BARYSHEV, P.M. & KOKOVIN, I.L. — The dynamics of IgM-antibodies in leptospiral infection in man. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 236:336-43, 1976.
7. COX, C.D. — Hemolysis of sheep erythrocytes sensitized with leptospiral extracts. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 90:610-5, 1955.
8. COX, C.D.; ALEXANDER, A.D. & MURPHY, L.C. — Evaluation of the hemolytic test in the serodiagnosis of human leptospirosis. *J. infect. Dis.*, 101:210-8, 1957.
9. FAINE, S.; ADLER, B. & PALIT, A. — Chemical, serological and biological properties of a serotype-specific polysaccharide antigen in *Leptospira*. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 52:311-9, 1974.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polissacarídico para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):127-133, 1981.

10. FAINE, S.; ADLER, B. & RUTA, G. — A mechanism of immunity to leptospirosis. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 52:301-10, 1974.
11. HINDLE, E. & WHITE, P.B. — A specific soluble substance in spirochaetes. *Proc. Roy. Soc., London*, sB, 114:523-29, 1934 apud *Q. cum. Index med.*, 15:1188, 1934.
12. IMAI, M.; YAMASHITA, Y.; MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. — Haemagglutination inhibition assay of the common determinants and subspecificities of Australia antigen. *Immunology*, 27:871-8, 1974.
13. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
14. MYERS, D.M. — Evaluacion de antigenos de la envoltura externa de *Leptospira* en las pruebas de fijacion de complemento y de hemaglutinacion para la leptospirosis. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 87:141-51, 1979.
15. PALIT, A. & GULASEKHARAM, J. — Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *J. clin. Path.*, 26:7-16, 1973.
16. PALIT, A. & HARRINSON, P.M. — Immunochemistry of extracts from *Leptospira interrogans* serotype hardjo. *J. gen. Microbiol.*, 100:249-56, 1977.
17. RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. — Imunodiagnóstico de leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroprecipitação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-43, 1981.
18. SCOTT, T.A. & MELVIN, E.H. — Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chem.*, 25:1656-61, 1953.
19. SHINAGAWA, M. & YANAGAWA, R. — Isolation and characterization of a leptospiral type-specific antigen. *Infect. Immun.*, 5:12-19, 1972.
20. SULZER, C.R.; GLOSSER, J.W.; ROGERS, F.; JONES, W.L. & FRIX, M. — Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J. clin. Microbiol.*, 2:218-21, 1975.
21. SULZER, C.R. & JONES, W.L. — Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. *Appl. Microbiol.*, 26:655-657, 1973.

Recebido para publicação em 12 de maio de 1981.

