

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES INTERPRETAÇÕES DA
SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA SOBRE OS
RESULTADOS DE PESQUISAS EPIDEMIOLÓGICAS COM
Leptospira spp.**

**Rafael Massa
Médico Veterinário**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES INTERPRETAÇÕES DA
SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA SOBRE OS
RESULTADOS DE PESQUISAS EPIDEMIOLÓGICAS COM
Leptospira spp.**

Rafael Massa

Orientador: Luis Antonio Mathias

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária (Medicina Veterinária
Preventiva)**

2017

M414i Massa, Rafael
Influência das diferentes interpretações da soroaglutinação
microscópica sobre os resultados de pesquisas epidemiológicas com
Leptospira spp. / Rafael Massa. -- Jaboticabal, 2016
viii, 59 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Luis Antonio Mathias

Banca examinadora: Anna Monteiro Correia Lima, Raphaella
Barbosa Meirelles Bartoli, Raul José Silva Girio, Samir Issa Samara
Bibliografia

1. Leptospirose. 2. Soroaglutinação microscópica. 3.
Sorovariedade mais provável. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.986.7

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES INTERPRETAÇÕES DA SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA SOBRE OS RESULTADOS DE PESQUISAS EPIDEMIOLÓGICAS COM *Leptospira* spp.

AUTOR: RAFAEL MASSA

ORIENTADOR: LUÍS ANTONIO MATHIAS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LUÍS ANTONIO MATHIAS

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. ANNA MONTEIRO CORREIA LIMA

Faculdade de Medicina Veterinária / UFU - Uberlândia, MG



Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. RAUL JOSÉ SILVA GIRIO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. RAPHAELLA BARBOSA MEIRELLES BARTOLI

Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal de Goiás - Jataí, GO

Jaboticabal, 17 de janeiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Rafael Massa – Nascido em 11 de dezembro de 1984, em Ribeirão Preto, São Paulo. Possui graduação e mestrado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho. É fiscal estadual agropecuário do estado do Rio Grande do Sul, onde realiza defesa sanitária animal e inspeção de produtos de origem animal.

“A ciência comete suicídio quando adota um credo”

Thomas Huxley, o buldogue de Darwin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Mensuração da concordância entre resultados da soroprecipitação microscópica contra 24 sorovariedades de <i>Leptospira</i> por meio do coeficiente Kappa	23
4.1.1. Dos resultados concordantes	24
4.1.2. Dos resultados discordantes	27
4.2. Comparação entre as prevalências para cada sorovariedade de <i>Leptospira</i> spp. pelo método clássico e pelo método da sorovariedade mais provável	28
4.3. Comparação entre as prevalências obtidas pelo método da sorovariedade mais provável utilizando uma bateria de 24 (SMP24) e uma bateria de 8 antígenos (SMP8) na SAM	33
4.4. Comparação entre 3 diferentes critérios de escolha do denominador do cálculo do resultado	36
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES	49
Apêndice A: Coeficiente <i>Kappa</i> e limites do IC 95% obtidos entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em bovinos	50
Apêndice B: Coeficiente <i>Kappa</i> e limites do IC 95% obtidos entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em caninos	53
Apêndice C: Coeficiente <i>Kappa</i> e limites do IC 95% obtidos entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em cervídeos	56

Apêndice D: Coeficiente <i>Kappa</i> e limites do IC 95% obtidos entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em suínos	59
--	----

Influência das diferentes interpretações da soroaglutinação microscópica sobre os resultados de pesquisas epidemiológicas com *Leptospira* spp.

RESUMO – Com o objetivo de analisar as diferentes formas de interpretação dos resultados em pesquisas epidemiológicas com *Leptospira* spp., em quatro espécies de hospedeiros, as concordâncias entre os resultados da soroaglutinação microscópica (SAM) contra 24 sorovariedades foram testadas por meio do coeficiente *Kappa*. Os resultados obtidos com o cálculo clássico da soroprevalência, o método da sorovariedade mais provável (SMP) com 24 e oito antígenos e três variações do SMP foram comparados por meio da intersecção entre os intervalos de confiança de 95%. As concordâncias entre sorovariedades nos resultados da SAM indicam que a maioria das coaglutinações ocorre dentro do esperado pelo acaso e que não é possível atribuí-las apenas a reações cruzadas. O SMP resultou em soroprevalências menores que as obtidas pelo método clássico. Quanto mais antígenos são utilizados na SAM, menores serão as soroprevalências para cada sorovariedade, demonstrando que a bateria de antígenos interfere nos resultados. As diferentes formas de calcular o resultado do SMP mostraram ser coeficientes diferentes, que podem confundir os leitores, caso não sejam bem definidos nos trabalhos. Conclui-se que o método clássico de cálculo da soroprevalência seria o mais indicado, respeitando-se as limitações da SAM na conclusão das pesquisas.

Palavras-chave: *Leptospira*, soroaglutinação microscópica, sorovariedade mais provável

Influence of different interpretations of the microscopic agglutination test on the results of epidemiological researches with *Leptospira* spp.

ABSTRACT – Aiming to analyze the different ways of interpreting the results of epidemiological research with *Leptospira* spp. in four host species, the agreement between the results in the microscopic agglutination test (MAT) against 24 serovars was tested by the *Kappa* coefficient. The results with the classic seroprevalence method, the most likely serovar method (SMP) with 24 and eight antigens and three variations of the SMP were compared by the intersection of the 95% confidence intervals. Agreements between serovars in the results of MAT indicate that most co-agglutinations occur randomly, and cross-reactions can not assign as the only cause of them. The SMP resulted in lower seroprevalences than those obtained by the classical method. The more antigens are used in MAT, lower the seroprevalences for each serovar, demonstrating that the antigen battery interferes with the results. The different ways of calculating the result of the SMP proved to be different coefficients, which may confuse readers, if they are not well defined in the research. It was concluded that the classic seroprevalence would be the most appropriate method of calculation, respecting the limitations of the MAT in the research's conclusions.

Keywords: *Leptospira*, microscopic agglutination test, most likely serovar

LISTA DE ABREVIATURAS

Aus	=	sorovariedade Australis
Bra	=	sorovariedade Bratislava
Aut	=	sorovariedade Autumnalis
But	=	sorovariedade Butembo
Cas	=	sorovariedade Castellonis
Bat	=	sorovariedade Bataviae
Can	=	sorovariedade Canicola
Whi	=	sorovariedade Whitcombi
Cyn	=	sorovariedade Cynopteri
Gri	=	sorovariedade Grippytyphosa
Heb	=	sorovariedade Hebdomadis
Cop	=	sorovariedade Copenhageni
Ict	=	sorovariedade Icterohaemorrhagiae
IC95%	=	Intervalo de confiança de 95%
Jav	=	sorovariedade Javanica
LPS	=	Lipopolissacarídeos
Pan	=	sorovariedade Panama
Pom	=	sorovariedade Pomona
Pyr	=	sorovariedade Pyrogenes
Har	=	sorovariedade Hardjo
Wol	=	sorovariedade Wolffi
She	=	sorovariedade Shermani
Tar	=	sorovariedade Tarassovi
And	=	sorovariedade Andamana
Pat	=	sorovariedade Patoc
Sen	=	sorovariedade Sentot
SAM	=	soroaglutinação microscópica
SMP	=	método da sorovariedade mais provável
SMP24	=	método da sorovariedade mais provável com 24 antígenos
SMP8	=	método da sorovariedade mais provável com 8 antígenos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sorogrupos, sorovariedades e abreviaturas dos antígenos utilizados na soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose	20
Tabela 2: Interpretação da concordância pelo coeficiente Kappa	21
Tabela 3: Soroprevalência por sorovariedade pelos métodos clássico e da sorovariedade mais provável, com utilização de 24 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em bovinos	29
Tabela 4: Soroprevalência por sorovariedade pelos métodos clássico e da sorovariedade mais provável, com utilização de 24 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em cervídeos	30
Tabela 5: Soroprevalência por sorovariedade pelos métodos clássico e da sorovariedade mais provável, com utilização de 24 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em caninos	31
Tabela 6: Soroprevalência por sorovariedade pelos métodos clássico e da sorovariedade mais provável, com utilização de 24 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em suínos	32
Tabela 7: Soroprevalência pelo método da sorovariedade mais provável, com utilização de 8 ou 24 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em bovinos..	34
Tabela 8: Soroprevalência pelo método da sorovariedade mais provável, com utilização de 8 ou 24 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em cervídeos	34
Tabela 9: Soroprevalência pelo método da sorovariedade mais provável, com utilização de 8 ou 24 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em caninos.	35
Tabela 10: Soroprevalência pelo método da sorovariedade mais provável, com utilização de 8 ou 24 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., em suínos .	35
Tabela 11: Resultados obtidos pelo método da sorovariedade mais provável, com 3 diferentes critérios para inclusão de unidades amostrais no denominador, utilizando a soroaglutinação microscópica com 24 sorovariedades, em bovinos	37

Tabela 12: Resultados obtidos pelo método da sorovariedade mais provável, com 3 diferentes critérios para inclusão de unidades amostrais no denominador, utilizando a soroaglutinação microscópica com 24 sorovariedades, em caninos	38
Tabela 13: Resultados obtidos pelo método da sorovariedade mais provável, com 3 diferentes critérios para inclusão de unidades amostrais no denominador, utilizando a soroaglutinação microscópica com 24 sorovariedades, em cervídeos	39
Tabela 14: Resultados obtidos pelo método da sorovariedade mais provável, com 3 diferentes critérios para inclusão de unidades amostrais no denominador, utilizando a soroaglutinação microscópica com 24 sorovariedades, em suínos	40
Tabela 1A: Limite inferior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em bovinos	50
Tabela 2A: Coeficiente kappa médio entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em bovinos	51
Tabela 3A: Limite superior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em bovinos	52
Tabela 1B: Limite inferior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em caninos	53
Tabela 2B: Coeficiente kappa médio entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em caninos	54
Tabela 3B: Limite superior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em caninos	55
Tabela 1C: Limite inferior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em cervídeos	56
Tabela 2C: Coeficiente kappa médio entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em cervídeos	57

Tabela 3C: Limite superior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em cervídeos	59
Tabela 1D: Limite inferior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em suínos	59
Tabela 2D: Coeficiente kappa médio entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em suínos	59
Tabela 3D: Limite superior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. na soroaglutinação microscópica em suínos	59

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa que acomete diversas espécies de animais e os seres humanos em todo o mundo. Ela é estudada há mais de um século e já foram identificadas mais de 300 sorovariedades, 20 sorogrupos e 20 espécies. As deficiências no diagnóstico da leptospirose por meio da soroaglutinação microscópica (SAM), que rotineiramente reage a mais de uma sorovariedade numa mesma amostra, levaram cientistas a adotar um método para tentar prever as sorovariedades infectantes chamado comumente de sorovariedade mais provável (SMP), que considera como infectante a sorovariedade que apresente maior titulação. Além disso, entre os autores que utilizam o SMP, há pelo menos quatro variações do denominador do cálculo do resultado. Isso gera variações importantes na metodologia dos estudos epidemiológicos, que podem alterar os resultados obtidos e prejudicar a interpretação e a comparação entre pesquisas epidemiológicas.

Dessa forma, os objetivos desta tese são:

- Mensurar a concordância dos resultados entre 24 sorovariedades de *Leptospira* spp., na soroaglutinação microscópica, em quatro espécies hospedeiras diferentes, por meio do coeficiente *Kappa* (LANDIS; KOCH, 1977);
- Comparar as prevalências obtidas para 24 sorovariedades de *Leptospira* spp., em quatro espécies hospedeiras diferentes conforme Thrusfield (2005), doravante denominado método clássico, e com o SMP, conforme Romero et al. (2003), Batista et al. (2005), Azevedo et al. (2008) e Oliveira et al. (2009);
- Avaliar se a bateria de antígenos utilizados na SAM influencia os resultados obtidos, garantindo ou inviabilizando a comparação e a repetição de estudos com baterias diferentes;
- Comparar os resultados obtidos pelo SMP utilizando três diferentes formas de cálculo descritas na literatura científica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose é uma doença transmissível dos animais e humanos, causada pela infecção por qualquer membro patogênico do gênero *Leptospira* (OIE, 2016), pertencente à família Leptospiraceae, da ordem Spirochaetales (FAINE, 1993). As leptospirosas apresentam grande variedade genética e química, no entanto, a morfologia de seus flagelos, presentes em ambas as extremidades, e sua estrutura celular são geralmente similares (FAINE, 1993). São bactérias móveis, finas e helicoidais, com extremidades em forma de gancho, têm comprimento entre seis e 20 μm e largura de 0,1 μm (ACHA; SZYFRES, 2001). Seu formato helicoidal forma uma onda de aproximadamente 0,5 μm (FAINE, 1993) e permite que atravessem filtros que outras bactérias não atravessam (ACHA; SZYFRES, 2001). São aeróbios obrigatórios e apresentam crescimento em meios simples enriquecidos com vitaminas B1 e B12, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônia (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Seu crescimento ótimo ocorre em condições aeróbias, com pH entre 7,2 e 7,6 e temperatura entre 28 °C e 30°C (FAINE, 1993). São bactérias Gram-negativas, mas são facilmente identificadas sem coloração em microscópio de campo escuro (FAINE, 1993).

As leptospirosas são capazes de sobreviver por longos períodos em solos alcalinos, lama, pântanos, cursos de água, fluidos e tecidos de animais vivos ou mortos, sendo sensíveis principalmente a baixa umidade, temperaturas maiores que 42°C, pH menores que 6,8, condições anaeróbicas, detergentes e a maioria dos antibióticos, exceto o cloranfenicol (FAINE, 1993). Embora essa sensibilidade possa variar em intensidade entre cepas de *Leptospira* spp., fatores ambientais agem da mesma forma em todas as cepas, ou seja, um ambiente favorável para a sobrevivência de uma cepa será favorável para a sobrevivência das demais. A temperatura média e a alta pluviosidade dos países tropicais são fatores favoráveis para as leptospirosas (ACHA; SZYFRES, 2001).

O gênero *Leptospira* inclui 20 espécies (seis espécies saprófitas, nove espécies patogênicas e cinco espécies cuja patogenicidade ainda não foi demonstrada experimentalmente), divididas sorologicamente em mais de 300 sorovariedades, agrupadas em 20 sorogrupos (PICARDEAU, 2013). A sorovariedade é o “táxon” básico. O termo sorovariedade é definido como uma leptospirosas cujo soro homólogo de

coelho consegue aglutiná-la, sem aglutinar outras cepas (FAINE, 1993). A classificação em sorovariedades é baseada na expressão de epítomos de superfície no mosaico de antígenos lipopolissacarídeos (LPS), enquanto a especificidade dos epítomos depende da composição do açúcar e sua orientação (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Os métodos de identificação de cepas isoladas são baseados na utilização de soro imune de coelho ou anticorpos monoclonais para epítomos específicos da sorovariedade, mas esses epítomos não são necessariamente os únicos responsáveis por aglutinações (FAINE, 1993). Recentemente, dezenas de métodos moleculares, baseados na reação em cadeia da polimerase, foram desenvolvidos para identificação de cepas isoladas, servindo de guia para a utilização dos métodos sorológicos, embora não sejam aceitos para a identificação de novas sorovariedades (OIE, 2016). As sorovariedades são agrupadas em sorogrupos, cujos membros apresentam reações cruzadas devido à existência de antígenos comuns, e não o fazem com membros de outro sorogrupo (FAINE, 1993). Epítomos específicos para sorovariedades podem ser subunidades de epítomos específicos para sorogrupos; por essa razão, a especificidade para sorovariedade de uma reação de aglutinação é relativa quando se estudam sorovariedades sorologicamente relacionadas (FAINE, 1993). O conceito de sorovariedade, para fins de diagnóstico ou produção de vacinas, é bem definido quando se utilizam cepas de laboratório em coelhos, mas, na prática, o padrão de reações cruzadas não é consistente com o sistema de classificação estabelecido (FAINE, 1993).

Uma espécie animal pode ser hospedeira de diversas sorovariedades, mas as sorovariedades costumam ter um hospedeiro de predileção (ACHA; SZYFRES, 2001), por exemplo: Canicola em cães; Bratislava em cavalos; Hardjo em bovinos; Bratislava, Australis e Pomona em suínos; Ballum em camundongos; e Icterohaemorrhagiae e Copenhageni em ratos. Essa especificidade não é absoluta, podendo determinada sorovariedade ser isolada de várias espécies (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Várias sorovariedades podem coexistir em uma mesma região, e infecções por mais de uma sorovariedade podem ocorrer, por exemplo: onde bovinos coexistem com roedores ou marsupiais, dividindo o habitat, cada espécie mantém as

sorovariedades adaptadas a si, no entanto, infecções cruzadas ou acidentais ocorrem (FAINE, 1993).

Dessa forma, saber a sorovariedade infectante pode ser importante para reconhecer a epidemiologia da doença na população e determinar as medidas preventivas, uma vez que a resposta imunológica é restrita às sorovariedades antigenicamente relacionadas (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Além disso, cada sorovariedade está associada a diferentes níveis de severidade da doença, e podem ser responsáveis por determinados sinais clínicos, como as sorovariedades Pomona e Hardjo, que são normalmente incriminadas em abortos de bovinos (FAINE, 1993).

Evidências de infecção já foram encontradas em praticamente todas as espécies de mamíferos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). A transmissão direta ocorre quando sangue ou fluidos corpóreos de animais infectados passam diretamente a um animal susceptível, por via congênita, venérea ou amamentação (FAINE, 1993). O contato direto com portadores genitais da leptospirose é uma importante rota de transmissão entre animais, e desempenha importante papel na manutenção da leptospirose dentro de uma mesma espécie (FAINE, 1993). A transmissão indireta ocorre quando o animal adquire a leptospirose do ambiente contaminado. As leptospirosas entram no organismo por soluções de continuidade na pele e possivelmente através da pele íntegra encharcada, pela conjuntiva, pelas vias aéreas, pelo trato genital e pela placenta em qualquer fase da gestação (FAINE, 1993).

No organismo, elas se espalham por bacteremia e alojam-se primeiramente nos pulmões, no fígado e no baço, com um crescimento exponencial de aproximadamente oito horas (FAINE, 1993). A bacteremia dura aproximadamente sete dias, até serem removidas da circulação por opsonização e fagocitose (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). A partir daí, a infecção crônica se inicia e dura por período variável, dependendo, entre outros fatores, da adaptação da sorovariedade ao hospedeiro (ACHA; SZYFRES, 2001).

As leptospirosas se alojam no epitélio dos túbulos proximais renais do hospedeiro, e esse portador renal desempenha papel importante para a persistência e a epidemiologia da doença (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Essa condição

pode durar por toda a vida com sorovariedades bem adaptadas ao hospedeiro, e sempre ocorre após infecção sistêmica, seguida, ou não, de sinais clínicos (FAINE, 1993).

Várias espécies animais podem atuar como reservatórios, mantendo a infecção não só nos túbulos renais proximais dos rins como em outros órgãos e sistemas, tais como sistema reprodutor, cérebro e câmara anterior dos olhos (FAINE, 1993). Roedores e marsupiais são reservatórios importantes da leptospirose, normalmente não apresentam sinais clínicos, mas mantêm leptospiras em seus rins e excretam grande quantidade delas no ambiente (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Em bovinos, infecções crônicas pela sorovariedade Hardjo podem permanecer no útero e nos ovidutos de fêmeas gestantes ou não (ACHA; SZYFRES, 2001).

A severidade da doença depende principalmente da dose infectante, da virulência, da toxicidade e da taxa de crescimento da cepa envolvida, da idade e da condição imune do hospedeiro (FAINE, 1993). Na natureza supõe-se que as doses infectantes sejam muito pequenas, resultando em longos períodos de incubação, que superam o período para o surgimento de imunidade e produzem infecções subclínicas ou muito brandas, clinicamente insignificantes, cuja importância principal é a imunidade residual que ela estimula (FAINE, 1993).

Anticorpos antileptospira aparecem poucos dias após a infecção e persistem por semanas ou meses, e em alguns casos por anos (OIE, 2016). A imunidade é mediada principalmente por anticorpos contra os antígenos LPS da membrana externa (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

O diagnóstico da leptospirose é difícil. Os sinais clínicos não são específicos nem patognômicos, e o diagnóstico conclusivo depende de confirmação laboratorial (FAINE, 1993; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). A soroaglutinação microscópica (SAM) utilizando antígenos vivos é o teste sorológico mais usado, sendo a técnica de referência para validação de novos testes e trânsito internacional (OIE, 2016). No entanto, a SAM apresenta limitações no diagnóstico de infecções individuais, abortos, identificação de portadores renais e/ou genitais e em estudos epidemiológicos (KUSUM et al., 2005; SMYTHE et al., 2009; PICARDEAU, 2013; OIE, 2016). É uma técnica antiga, desenvolvida em 1917, muito subjetiva, dispendiosa e

difícil de implementar, requerendo muito treinamento do técnico que a realiza (PICARDEAU, 2013).

Na SAM, anticorpos contra outras bactérias normalmente não apresentam reações cruzadas significantes com as leptospiras, embora ocorram reações cruzadas entre sorovariedades e sorogrupos (OIE, 2016). O LPS é o principal tipo de antígeno envolvido em reações de aglutinação (FAINE, 1993). Anticorpos contra o LPS e outras estruturas da superfície provocam a destruição do envelope externo, gradual dissolução e perda da integridade das leptospiras. A motilidade torna-se errática, e as leptospiras se aglutinam. Essa aglutinação, quando ocorre em pelo menos metade das leptospiras do campo do microscópio, determina o resultado positivo na SAM (FAINE, 1993).

A SAM realizada após 20 dias de infecção é bem específica para sorogrupos, não para sorovariedades (PICARDEAU, 2013), e não permite diferenciar anticorpos vacinais de anticorpos resultantes de infecção (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Embora a SAM não possa identificar definitivamente a sorovariedade envolvida em infecções individuais ou surtos, ela pode sugerir a sorovariedade infectante em estudos realizados em regiões onde a sorovariedade já foi isolada de animais infectados (OIE, 2016).

Discordâncias quanto ao título significativo para diagnosticar leptospirose existem na literatura. Segundo Adler e de la Peña Moctezuma (2010), em áreas endêmicas, o critério para considerar um resultado indicativo de leptospirose é usualmente aceito quando o título for maior que 400 em um teste único, em presença de sinais clínicos e histórico de contato compatível. Já Faine (1993) considera a titulação maior que 800. Ambos concordam que um aumento de quatro vezes no título em amostras pareadas com intervalo de cinco a dez dias é significativo. Picardeau (2013) considera os títulos de 100 ou 400 como pontos de corte, dependendo da morbidade da doença na região. A OIE (2016) recomenda o título mínimo aceitável de 100 na SAM, mas Faine (1993) afirma que um título superior ou igual a 50 em pacientes com sintomas compatíveis, em áreas não endêmicas, indica leptospirose. Os títulos de anticorpos caem após semanas ou meses da infecção, no entanto, podem persistir por anos ou até mesmo toda a vida de um animal (FAINE, 1993). O título de anticorpos pode cair até níveis indetectáveis quando os animais tornam-se

cronicamente infectados, e animais infectados podem abortar ou ser portadores de infecção renal e/ou genital, mesmo apresentando títulos abaixo do mínimo aceitável de 100 na SAM (OIE, 2016). Títulos baixos podem significar anticorpos residuais de infecções passadas ou anticorpos de formação muito recente (ACHA; SZYFRES, 2001). Nas pesquisas epidemiológicas que utilizam a SAM, o título de 100 é o mais usado como ponto de corte.

Discordâncias quanto à sensibilidade e à especificidade do teste também são encontradas na literatura. Adler e de la Peña Moctezuma (2010) afirmam que tanto a sensibilidade quanto a especificidade da SAM são bem altas, porém o Manual de Teste de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2016) afirma que em infecções com sorovariedades bem adaptadas ao hospedeiro, como sorovariedade Hardjo em bovinos, quando se considera o título 100 como significativo, a sensibilidade do teste é apenas 41%, e aumenta para 67% quando se considera o título 10. Limmathurotsakul et al. (2012) encontraram uma sensibilidade muito baixa (49,8% [37,6% – 60,8%]) e uma especificidade alta (98,8% [92,8% – 100%]), usando como ponto de corte a titulação de 400 ou o aumento de quatro vezes na titulação entre fase aguda e crônica.

Inquéritos sorológicos são realizados em todo o mundo, no entanto, pode-se perceber uma diferença importante na metodologia aplicada às publicações nacionais. Publicações internacionais, de maneira geral, consideram todos os reagentes a determinada sorovariedade como sendo casos daquela sorovariedade e os dividem pelo total de unidades amostrais, obtendo assim uma prevalência ou incidência, conforme Thrusfield (2005). No Brasil, a maioria dos autores utiliza um método comumente denominado “Sorovariedade Mais Provável” (SMP), que, de maneira geral, consiste em considerar a sorovariedade que apresentar maior titulação na SAM como sendo a responsável pela reação e, em caso de empate nos títulos de duas ou mais sorovariedades, considera-se o resultado apenas como reagente (sem atribuir a alguma sorovariedade). Tal método considera que respostas humorais mais discretas são sempre atribuídas a reações cruzadas com a sorovariedade infectante, independentemente dos sorogrupos a que pertençam. Como exemplo, temos: Yasuda et al. (1980); Almeida et al. (1994); Favero et al. (2001); Favero et al. (2002); Romero et al. (2003); Batista et al. (2005); Aguiar et al. (2006); Azevedo et al. (2008); Mineiro

et al. (2007); Hashimoto et al. (2007); Castro et al. (2008); Figueiredo et al. (2009); Oliveira et al. (2009); Mineiro et al. (2010); e Hashimoto et al. (2012).

Dessa forma, a utilização ou não de uma sorovariedade qualquer na SAM pode influenciar as prevalências de outras sorovariedades. Em um levantamento realizado em 15 trabalhos que utilizam o SMP, percebe-se que há variação na bateria de antígenos utilizada na SAM: Figueiredo et al. (2009) utilizaram dez sorovariedades; Yasuda et al. (1980) utilizaram 18; Romero et al. (2003) utilizaram 20; Hashimoto et al. (2007), Castro et al. (2008) e Hashimoto et al. (2012) utilizaram 22; Batista et al. (2005) descreveram 22 sorovariedades nos materiais e métodos, mas tiveram resultados para mais sorovariedades, de modo que não há como saber quantas foram usadas; Oliveira et al. (2009) utilizaram 23; Favero et al. (2001), Favero et al. (2002), Aguiar et al. (2006), Mineiro et al. (2007) e Azevedo et al. (2008) utilizaram 24; Mineiro et al. (2010) utilizaram 25; e Almeida et al. (1994) utilizaram 27. Vale ressaltar que entre os estudos que se utilizaram de um mesmo número de antígenos pode haver variação nas sorovariedades utilizadas.

Apesar de exaustivamente utilizado, há pelo menos 35 anos, o SMP não costuma ser referenciado nos trabalhos ou as referências remetem a outro trabalho sem a referência inicial, o que não permite o rastreamento da origem e, portanto, do embasamento científico do método. Pelo contrário, a literatura científica está cheia de resultados que não corroboram tal hipótese. Adler e de la Peña Moctezuma (2010) afirmam que a resposta imunológica é restrita às sorovariedades antigenicamente relacionadas. Acha e Szyfres (2001) afirmam que reações cruzadas ocorrem não só entre sorovariedades do mesmo sorogrupo; no início da infecção (duas a três semanas), também ocorrem entre sorovariedades de sorogrupos diferentes, podendo predominar o título de uma sorovariedade heteróloga. Picardeau (2013) afirma que a SAM se torna positiva entre o oitavo e o décimo dia de infecção, com um título geralmente maior contra a *L. biflexa* sorovariedade Patoc, às vezes apresentando coaglutininas contra vários sorogrupos, sendo possível a identificação do sorogrupo infectante (não da sorovariedade) apenas após o vigésimo dia de infecção. Além disso, deve-se considerar que sorovariedades diferentes podem coexistir em uma região, provocar infecções simultâneas e desencadear respostas imunológicas

distintas em um mesmo hospedeiro, de acordo com sua antigenicidade e adaptação ao hospedeiro (FAINE, 1993).

Smythe et al. (2009) compararam o resultado obtido na SAM (considerando como infectante a sorovariedade com maior título, em amostra colhida em fase convalescente) com a sorovariedade isolada e identificada na fase aguda, em 78 pacientes humanos, e obtiveram 33% de resultados corretos, 53% de resultados errados (a SAM apresentava titulação maior contra outra sorovariedade) e 14% que não tiveram a sorovariedade identificada pela SAM, pois apresentaram titulações iguais contra duas ou mais sorovarietades. Concluíram que a utilização do SMP não serviria para a região estudada.

Kusum et al. (2005) cultivaram 22 amostras de pacientes humanos com suspeita de leptospirose e as identificaram como sendo a sorovariedade Autumnalis. Ao analisar os resultados obtidos na SAM de 14 desses pacientes, descobriram que as titulações contra as sorovarietades Australis e Bratislava foram maiores que as obtidas contra a sorovariedade Autumnalis. Os autores concluíram que não foi possível determinar qual a sorovariedade infectante por meio da SAM.

Como se nota, a ocorrência de reações cruzadas na fase aguda da doença é amplamente relatada, no entanto, tal fenômeno fere um conceito básico da imunologia: a especificidade da resposta antígeno-anticorpo que, após a entrada de determinada bactéria em um hospedeiro susceptível, estimula a mitose e a diferenciação em linfócitos B de memória e plasmócitos apenas de linfócitos que reconheceram um epítipo específico (ABBAS; LICHTMAN, 2000), ou seja, para que haja reação cruzada, a bactéria infectante tem que ter ao menos um epítipo comum com os antígenos usados no diagnóstico. Sendo assim, é possível identificar quais sorovarietades usadas no diagnóstico apresentam um epítipo comum por meio da concordância de seus resultados, utilizando o coeficiente *kappa* proposto por Landis e Koch (1977). Esse coeficiente foi utilizado originalmente para mensurar a concordância entre diagnósticos clínicos de observadores diferentes, descontando-se a probabilidade de essas concordâncias ocorrerem ao acaso, e vem sendo usado há anos na comparação entre testes diagnósticos diferentes ou mesmo de antígenos diferentes em um mesmo teste, como nesta tese. O coeficiente *kappa* baseia-se na

comparação da concordância observada entre os resultados de dois testes com a concordância esperada, que pode ser atribuída ao acaso.

Além disso, nos trabalhos que utilizam o SMP, há também variação nos critérios de escolha do denominador do cálculo do resultado. Em um levantamento feito em 15 trabalhos que utilizam o SMP, percebe-se que não há padronização quanto à forma como é calculado o resultado, por exemplo: Romero et al. (2003), Batista et al. (2005), Azevedo et al. (2008) e Oliveira et al. (2009) dividem o número de casos de cada sorovariedade pelo total de animais na amostra; Aguiar et al. (2006) dividem o número de casos de cada sorovariedade pelo total de animais que reagiram a qualquer uma das sorovarietades; Yasuda et al. (1980), Favero et al. (2002), Almeida et al. (2004), Hashimoto et al, (2007), Mineiro et al. (2007), Figueiredo et al. (2009) e Mineiro et al. (2010) dividem o número de casos para cada sorovariedade pelo total de animais que reagiram a apenas uma sorovariedade ou apresentaram título maior em apenas uma sorovariedade; Favero et al. (2001) Castro et al. (2008) e Hashimoto et al. (2012) dividem o número de casos de cada sorovariedade ou de animais que tiveram titulação igual para Hardjo e Wolffi pelo total de animais que reagiram a apenas uma sorovariedade, ou apresentaram título maior em apenas uma sorovariedade, ou apresentaram títulos superiores aos demais e iguais para as sorovarietades Hardjo e Wolffi.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram aproveitados resultados obtidos de outros estudos com quatro espécies animais (SILVA, 2010; GALLI, 2011; MASSA, 2012; MORAES et al. 2013): 413 bovinos (*Bos taurus indicus*), 192 suínos (*Sus scroffa*), 217 cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e 392 caninos (*Canis familiaris*). Cada espécie de hospedeiro constituiu um grupo amostral, e os cálculos foram realizados apenas dentro de cada grupo. O local e a metodologia de amostragem são irrelevantes para os propósitos desta análise, que não pretende discutir a epidemiologia da leptospirose nas populações amostradas, apenas avaliar as diferenças nas formas como os dados podem ser analisados.

Conforme preconizado por Faine (1993), a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. foi testada pela SAM. As placas com os soros e os antígenos foram incubadas em estufa bacteriológica BOD à temperatura de 28°C, e a leitura realizada em microscópio de campo escuro, diretamente na placa, com aumento de 100 vezes. O critério adotado para considerar um soro como reagente foi a aglutinação de pelo menos 50% das leptospiros no campo microscópico. O título foi dado como a recíproca da maior diluição reagente. Foi utilizado o título inicial de 100 como ponto de corte. Amostras positivas com o título 100 foram submetidas a diluições seriadas na base 2. Os materiais, os antígenos e o leitor dos resultados não variaram dentro de cada grupo amostral.

As sorovariedades de *Leptospira* spp. utilizadas como antígeno estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Sorogrupos, sorovariedades e abreviaturas dos antígenos utilizados no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose.

Sorogrupos	Sorovariedades	Abreviaturas das sorovariedades
<i>Australis</i>	Australis	Aus
<i>Australis</i>	Bratislava	Bra
<i>Autumnalis</i>	Autumnalis	Aut
<i>Autumnalis</i>	Butembo	But
<i>Ballum</i>	Castellonis	Cas
<i>Bataviae</i>	Bataviae	Bat
<i>Canicola</i>	Canicola	Can
<i>Celledoni</i>	Whitcombi	Whi
<i>Cynopteri</i>	Cynopteri	Cyn
<i>Grippotyphosa</i>	Grippotyphosa	Gri
<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis	Heb
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Copenhageni	Cop
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Icterohaemorrhagiae	Ict
<i>Javanica</i>	Javanica	Jav
<i>Panamá</i>	Panama	Pan
<i>Pomona</i>	Pomona	Pom
<i>Pyrogenes</i>	Pyrogenes	Pyr
<i>Sejroe</i>	Hardjo	Har
<i>Sejroe</i>	Wolffi	Wol
<i>Shermani</i>	Shermani	She
<i>Tarassovi</i>	Tarassovi	Tar
<i>Andamana</i>	Andamana	And
<i>Seramanga</i>	Patoc	Pat
<i>Djasiman</i>	Sentot	Sen

Adaptado de: FAINE (1993)

Para mensurar a ocorrência de reações cruzadas entre as sorovariedades, calculou-se a concordância entre os resultados obtidos em todas as sorovariedades por meio do coeficiente *Kappa*, com a titulação 100 como ponto de corte, com o auxílio do programa SAS 9.2 (SAS® 9.2, 2008). Entre sorovariedades cujo intervalo de confiança de 95% de *Kappa* abrangia qualquer valor menor ou igual a zero, foi descartada a hipótese de ocorrência de reações cruzadas. As concordâncias estatisticamente significativas foram interpretadas de acordo com o critério proposto por Landis e Koch (1977), Tabela 2.

Tabela 2: Interpretação da concordância pelo coeficiente *Kappa*.

Concordância	Intervalo de <i>Kappa</i>
Perfeita	1
Ótima	0,80 - 0,99
Boa	0,60 - 0,80
Moderada	0,40 - 0,60
Regular	0,20 - 0,40
Fraca	0,00 - 0,20
Ruim	<0,00

Adaptado de Landis e Koch (1977)

Para avaliar a influência das diferentes formas de se considerar que uma unidade amostral é caso ou não de determinada sorovariedade, comparou-se a prevalência de anticorpos antileptospira para cada sorovariedade pelo método clássico, dividindo-se a quantidade de animais reagentes a cada sorovariedade pelo total de animais do grupo amostral (THRUSFIELD, 2005), e pelo método da sorovariedade mais provável para as 24 sorovarietades (SMP24), considerando a sorovariedade que apresentasse maior titulação na SAM como sendo a responsável pela infecção. Em caso de empate nos títulos de duas ou mais sorovarietades, considerou-se o resultado apenas como reagente (sem atribuir a infecção a alguma sorovariedade), dividindo-se pelo total de animais do grupo amostral.

Para avaliar a influência da bateria de antígenos utilizados na SAM sobre os resultados obtidos, comparou-se a prevalência pelo método da sorovariedade mais provável para as 24 sorovarietades (SMP24), e para apenas oito sorovarietades (SMP8): Canicola, Grippytyphosa, Copenhageni, Wolffii, Pomona, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Tarassovi. O critério utilizado para a escolha das sorovarietades no SMP8 foi baseado nos protocolos adotados no laboratório de brucelose e leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, que utiliza essa bateria de oito antígenos nos exames de rotina e a bateria de 24 antígenos em pesquisas.

Para avaliar a influência das diferentes formas de calcular os resultados em estudos que utilizam o SMP, compararam-se os resultados utilizando três critérios diferentes de eleição do denominador: todo o grupo amostral (SMP24 ou critério A); todos os reagentes a uma ou mais sorovarietades (critério B); que reagiram a apenas

uma sorovariedade ou tiveram uma titulação superior às demais (critério C). O quarto critério encontrado na literatura científica não foi testado, para evitar repetição, pois se trata de um critério intermediário, entre B e C, aplicado a estudos com bovinos.

Os dados foram tabulados e analisados com o auxílio do programa Epi Info 7.0.9.7 (Epi Info™ 7.0.9.7, 2012). Foram considerados significativamente diferentes prevalências ou resultados cujos intervalos de confiança de 95% não apresentaram intersecção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Mensuração da concordância entre resultados da sorologia microscópica contra 24 sorovariedades de *Leptospira* por meio do coeficiente *Kappa*

Os coeficientes *Kappas* e os intervalos de confiança de 95% entre os resultados obtidos com diferentes sorovariedades na SAM encontram-se no anexo.

Em bovinos, apenas 22 dos 136 *kappas* possíveis de se calcular tiveram IC95% com limite inferior acima de zero: Australis e Autumnalis (0,1608±0,0888 - concordância fraca); Australis e Hebdomadis (0,1826±0,0985 - concordância fraca); Australis e Shermani (0,1008±0,0971 - concordância fraca); Australis e Tarassovi (0,0710±0,0654 - concordância fraca); Autumnalis e Hebdomadis (0,0858±0,0841 - concordância fraca); Autumnalis e Shermani (0,1180±0,0797 - concordância fraca); Bratislava e Shermani (0,1791±0,0947 - concordância fraca); Bratislava e Tarassovi (0,1017±0,0850 - concordância fraca); Butembo e Hebdomadis (0,1185±0,0662 - concordância fraca); Butembo e Shermani (0,0606±0,0550 - concordância fraca); Hebdomadis e Tarassovi (0,1087±0,0673 - concordância fraca); Hebdomadis e Wolffi (0,1680±0,0749 - concordância fraca); Pyrogenes e Wolffi (0,0385±0,0353 - concordância fraca); Shermani e Tarassovi (0,1529±0,0630 - concordância fraca); Tarassovi e Wolffi (0,0284±0,0268 - concordância fraca); Autumnalis e Bratislava (0,3072±0,1074 - concordância regular); Bratislava e Hebdomadis (0,2210±0,0982 - concordância regular); Hardjo e Whitcombi (0,2409±0,1477 - concordância regular); Hebdomadis e Shermani (0,2868±0,0955 - concordância regular); Pyrogenes e Whitcombi (0,2475±0,1767 - concordância regular); Australis e Bratislava (0,4742±0,0926 - concordância moderada) e Hardjo e Pyrogenes (0,7004±0,1200 - concordância boa).

Em caninos, apenas 8 dos 153 *kappas* possíveis de se calcular tiveram IC95% superior a zero: Autumnalis e Butembo (0,1508±0,1317 - concordância fraca); Autumnalis e Copenhageni (0,1885±0,1432 - concordância fraca); Canicola e Patoc (0,1452±0,1343 - concordância fraca); Autumnalis e Whitcombi (0,235±0,1503 - concordância regular); Canicola e Castellonis (0,3647±0,2417 - concordância regular); Canicola e Copenhageni (0,2853±0,2345 - concordância regular); Copenhageni e

Grippotyphosa ($0,4551 \pm 0,3354$ - concordância moderada) e Butembo e Grippotyphosa ($0,5676 \pm 0,4407$ - concordância moderada);

Nos cervos-do-pantanal, apenas 10 dos 120 *kappas* possíveis de se calcular tiveram IC95% superior a zero: Autumnalis e Bratislava ($0,1176 \pm 0,1134$ - concordância fraca); Castellonis e Copenhageni ($0,1496 \pm 0,1444$ - concordância fraca); Bratislava e Copenhageni ($0,2980 \pm 0,2325$ - concordância regular); Bratislava e Pyrogenes ($0,3780 \pm 0,2218$ - concordância regular); Castellonis e Hardjo ($0,2355 \pm 0,1497$ - concordância regular); Castellonis e Pyrogenes ($0,2585 \pm 0,1566$ - concordância regular); Copenhageni e Pyrogenes ($0,2988 \pm 0,2166$ - concordância regular); Hardjo e Pyrogenes ($0,3076 \pm 0,1532$ - concordância regular); Icterohaemorrhagiae e Pyrogenes ($0,2431 \pm 0,2232$ - concordância regular); e Bratislava e Icterohaemorrhagiae ($0,4047 \pm 0,2608$ - concordância moderada).

Em suínos, apenas 2 dos 43 *kappas* possíveis de se calcular tiveram IC95% superior a zero: Autumnalis e Bratislava ($0,1576 \pm 0,1473$ - concordância fraca) e Bratislava e Sentot ($0,1517 \pm 0,1241$ - concordância fraca).

No máximo, em 42 das 454 (9,25%) concordâncias possíveis de serem calculadas houve a possibilidade de ter ocorrido reação cruzada entre as sorovariedades, indicando que se trataria de uma exceção, não de uma regra, como preconiza o SMP. Embora não seja possível determinar as reais causas dessas coaglutinações, sejam quais forem, elas ocorrem dentro do esperado pelo acaso.

4.1.1. Dos resultados concordantes

É importante salientar que, nos casos em que houve concordância de resultados, não é possível atribuir a infecção à sorovariedade com maior título, uma vez que a análise utilizou o ponto de corte de 100 nas duas sorovariedades.

Embora a reação cruzada leve a concordância de resultados, nem toda concordância se deve a reação cruzada, por exemplo: se um animal é exposto simultaneamente a mais de uma cepa, por exposição natural ou vacinas, seu sistema imunológico pode reconhecer diferentes epítomos e desencadear resposta humoral a mais de uma sorovariedade ao mesmo tempo, cuja intensidade poderá variar de acordo com a dose infectante e a antigenicidade do agente (FAINE, 1993).

Tal situação pode ser observada nos resultados obtidos por Natarajaseenivasan et al. (2012), que acompanharam por um ano a resposta humoral, por meio da SAM, de 30 filhotes caninos vacinados com as sorovariedades Canicola e Icterohaemorrhagiae, e obtiveram médias geométricas de títulos na SAM maiores que 100 para as duas sorovariedades. Dessa forma, essa vacina induziria a concordância dos resultados na SAM, mas seria um caso de coexposição, e não de reação cruzada.

Também se pode observar isso no trabalho de Arduíno et al. (2009), que acompanharam por seis meses a resposta humoral, por meio da SAM, de 100 fêmeas bovinas. Os animais foram distribuídos igualmente em cinco grupos, um controle, três que foram imunizados com vacinas comerciais contendo as sorovariedades Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi, e um grupo que foi imunizado com vacina comercial contendo Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Pomona. Nos quatro grupos imunizados, com alguma variação entre eles, houve resposta humoral suficiente para resultar em títulos superiores a 100 na SAM para as sorovariedades Hardjo, Wolffi, Pomona e Icterohaemorrhagiae, entre o 28^o e 180^o após a vacinação inicial, incluindo o grupo não vacinado com a sorovariedade Wolffi. Sendo assim, essas 4 vacinas comerciais teriam a capacidade de induzir concordância de resultados na SAM, mas essa concordância se deveria a coexposição aos antígenos, exceto no caso do grupo imunizado com a vacina que não tinha a sorovariedade Wolffi.

As sorovariedades de *Leptospira* spp. apresentam ciclos etiológicos semelhantes (ao menos nos casos de transmissão indireta), com eliminação renal, porta de entrada oronasal ou percutânea, e são influenciadas de forma semelhante por características ambientais. As espécies reconhecidamente patogênicas praticamente não se multiplicam no ambiente (FAINE, 1993), sendo pouco provável que uma sorovariedade sobreponha-se a outras devido à competição por nutrientes. Sendo assim, seria plausível aceitar que a fonte de água de uma fazenda leiteira, por exemplo, possa conter as sorovariedades Hardjo, Canicola e Icterohaemorrhagiae, liberadas no ambiente pelas vacas, pelo cão de guarda e pelos ratos que vivem próximo ao estoque de ração, respectivamente, e que essa fonte de água aja como meio de transmissão das três sorovariedades para quaisquer animais ou pessoas.

Dessa forma, das 42 concordâncias entre sorovariedades que admitiriam a possibilidade de reação cruzada ainda deve-se descartar indeterminada quantidade que pode ter sido causada por coexposição a sorovariedades diferentes, seja de forma natural, seja iatrogênica.

Deve-se notar que, das 42 concordâncias encontradas, apenas a concordância entre Hardjo e Pyrogenes ($0,7004 \pm 0,1200$) em bovinos obteve um *Kappa* médio acima de 0,6, classificado como bom por Landis e Koch (1977). Isso demonstra que nos outros 41 casos há ainda resultados discordantes o suficiente para indicar que podem estar ocorrendo exposições a sorovariedades distintas. Desconsiderando-se a possibilidade de coexposição, haveria, portanto, indicativo de que podem ter ocorrido infecções em bovinos por uma cepa de campo que apresente um mosaico de epítomos LPS misto das sorovariedades Hardjo e Pyrogenes. Se fosse isolada e submetida à identificação por meio da absorção cruzada de imunoglobulinas ou anticorpos monoclonais, essa cepa não seria classificada nem como Hardjo nem como Pyrogenes. Como isolamento e identificação da cepa infectante costumam ser “substituídos” pelo SMP, essa hipótese dificilmente será testada.

O termo sorovariedade é definido como uma leptospira cujo soro homólogo de coelho consegue aglutiná-la, sem aglutinar outras cepas, no entanto, hamsters conseguem diferenciar as sorovariedades Balcanica de Hardjo, que coelhos dificilmente conseguem, demonstrando que há diferença entre as repostas humorais contra leptospiras em diferentes hospedeiros (FAINE, 1993). Portanto, há a possibilidade de que os sistemas imunológicos dos hospedeiros estudados reajam de forma diferente aos dos coelhos, reconhecendo epítomos diferentes ou apresentando repostas humorais mais intensas. Se esse for o caso, determinar a sorovariedade infectante não faria sentido, pois o conceito de sorovariedade não se aplicaria ao hospedeiro estudado. Isso explicaria resultados imunologicamente conflitantes, como os obtidos por Castro et al. (2011), que acompanharam por seis meses a resposta humoral, por meio da SAM, de 26 filhotes caninos imunizados com as sorovariedades Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona e perceberam que a titulação contra a sorovariedade Autumnalis excedeu a titulação das sorovariedades inoculadas.

A SAM reconheceria apenas a exposição a epítomos semelhantes aos antígenos utilizados, podendo indicar quais antígenos seriam utilizados em vacinas, por exemplo. O conceito de sorovariedade seria aplicável para diferenciar cepas isoladas e mantidas em laboratórios, mas a resposta humoral a cada sorovariedade teria de ser determinada experimentalmente em cada espécie hospedeira que se queira estudar.

4.1.2. Dos resultados discordantes

Na grande maioria das vezes, estudos epidemiológicos com animais colhem a amostra de maneira seccional, em um curto espaço de tempo e em animais cujos sintomas são desconhecidos, de modo que não é possível saber em que fase da infecção se encontra cada unidade amostral. Considerando que anticorpos antileptospira aparecem poucos dias após a infecção e podem persistir por anos (FAINE, 1993; OIE, 2016), que títulos baixos podem significar anticorpos residuais de infecções passadas ou anticorpos de formação muito recente (ACHA; SZYFRES, 2001), que podem ocorrer infecções simultâneas, que a severidade da doença depende principalmente da dose infectante e que, na natureza, supõe-se que as doses infectantes sejam muito pequenas, tendo como principal importância a imunidade residual que ela estimula (FAINE, 1993), as coaglutinações de sorovariedades cujos IC95% de *kappa* incluem o valor zero podem ser resultado de exposições esporádicas a diferentes antígenos apatogênicos, ou abaixo da dose infectante, ou mesmo vestígios de infecções anteriores. De fato, a SAM não consegue identificar a sorovariedade infectante, que deve ser isolada e identificada (OIE, 2016).

Outro fator a se considerar é que, embora quase unanimemente utilizado nas pesquisas, o título de 100 em um único teste só é preconizado para o diagnóstico de casos clínicos em regiões onde a leptospirose não é endêmica (FAINE 1993; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU, 2013; OIE 2016), o que não é o caso do Brasil, onde prevalências superiores a 60%, por quaisquer sorovariedades de *Leptospira* spp., já foram descritas (FAVERO 2001; FAVERO et al. 2002).

4.2. Comparação entre as prevalências para cada sorovariedade de *Leptospira* spp. pelo método clássico e pelo método da sorovariedade mais provável

Em bovinos, Tabela 3, as soroprevalências de 12 das 17 soroviedades encontradas (70,58%) apresentaram diferença significativa nos dois métodos. Todas as prevalências obtidas pelo SMP24 apresentaram-se inferiores às obtidas pelo método clássico, pois 25,18% dos resultados positivos foram considerados apenas como reagentes, e outras reações positivas foram encobertas, pois apresentaram titulação mais baixa. Soroviedades normalmente prevalentes em bovinos, como Hardjo e Wolffi, tiveram sua prevalência muito subestimada pelo SMP24.

Caso o resultado do estudo com esses bovinos fosse publicado apenas com o SMP24, a informação de que foram encontrados soros reagentes às soroviedades Butembo, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Sentot e Whitcombi seria omitida, pois esses resultados foram encobertos por titulações iguais ou superiores.

Tabela 3: Soroprevalência por sorovariedade pelos métodos clássico e da sorovariedade mais provável, com utilização de 24 sorovariedades de *Leptospira* spp., em bovinos.

Sorovariedade	método clássico			método da sorovariedade mais			Significância Estatística
	Prevalência	Limite inferior	Limite superior	Prevalência	Limite inferior	Limite superior	
		IC95%	IC95%		IC95%	IC95%	
AND	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,15%	não
AUS	31,96%	27,53%	36,73%	6,05%	4,03%	8,92%	sim
AUT	11,38%	8,56%	14,94%	0,97%	0,31%	2,63%	sim
BAT	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,15%	não
BRA	23,73%	19,77%	28,19%	1,94%	0,90%	3,93%	sim
BUT	4,12%	2,49%	6,64%	0,00%	0,02%	1,15%	sim
CAN	0,24%	0,01%	1,56%	0,24%	0,01%	1,56%	não
CAS	5,81%	3,84%	8,64%	0,97%	0,31%	2,63%	sim
COP	0,97%	0,31%	2,63%	0,00%	0,02%	1,15%	não
CYN	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,15%	não
GRI	0,97%	0,31%	2,63%	0,73%	0,19%	2,29%	não
HAR	11,14%	8,35%	14,67%	0,48%	0,08%	1,93%	sim
HEB	32,93%	28,46%	37,73%	1,45%	0,59%	3,30%	sim
ICT	0,97%	0,31%	2,63%	0,00%	0,02%	1,15%	não
JAV	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,15%	não
PAN	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,15%	não
PAT	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,15%	não
POM	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,15%	não
PYR	7,51%	5,24%	10,60%	0,24%	0,01%	1,56%	sim
SEN	0,48%	0,08%	1,93%	0,00%	0,02%	1,15%	não
SHE	36,80%	32,18%	41,68%	5,81%	3,84%	8,64%	sim
TAR	4,60%	2,87%	7,22%	0,24%	0,01%	1,56%	sim
WHI	2,91%	1,58%	5,16%	0,00%	0,02%	1,15%	sim
WOL	64,65%	59,80%	69,22%	43,83%	39,00%	48,77%	sim
reagente*				25,18%	21,12%	29,71%	
negativo				11,86%	8,99%	15,47%	
TOTAL				100,00%			

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariedades.

Em cervídeos, Tabela 4, cinco de 16 sorovariedades encontradas (31,25%) apresentaram diferenças significativas de soroprevalências nos dois métodos, Autumnalis, Castellonis, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Pyrogenes, que tiveram suas prevalências subestimadas a menos da metade.

Caso o resultado do estudo com esses cervídeos fosse publicado apenas com o SMP24, a informação de que foram encontrados soros reagentes às sorovariedades Andamana, Butembo, Canicola, Icterohaemorrhagiae e Panama seria omitida, pois esses resultados foram encobertos por titulações iguais ou superiores.

Tabela 4: Soroprevalência por sorovariedade pelos métodos clássico e da sorovariedade mais provável, com utilização de 24 sorovariedades de *Leptospira* spp., em cervídeos.

Sorovariedade	método clássico			método da sorovariedade mais			Significância Estatística
	Prevalência	Limite inferior	Limite superior	Prevalência	Limite inferior	Limite superior	
		IC95%	IC95%		IC95%	IC95%	
AND	1,38%	0,29%	3,99%	0,00%	0,00%	1,69%	não
AUS	2,30%	0,75%	5,29%	0,92%	0,11%	3,29%	não
AUT	28,57%	22,66%	35,08%	12,90%	8,75%	18,11%	sim
BAT	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	1,69%	não
BRA	6,45%	3,57%	10,59%	1,84%	0,50%	4,65%	não
BUT	0,92%	0,11%	3,29%	0,00%	0,00%	1,69%	não
CAN	2,30%	0,75%	5,29%	0,00%	0,00%	1,69%	não
CAS	20,28%	15,14%	26,25%	9,22%	5,72%	13,88%	sim
COP	6,91%	3,92%	11,14%	1,38%	0,29%	3,99%	não
CYN	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	1,69%	não
GRI	7,83%	4,63%	12,25%	3,23%	1,31%	6,53%	não
HAR	21,66%	16,37%	27,74%	6,45%	3,57%	10,59%	sim
HEB	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	1,69%	não
ICT	4,15%	1,91%	7,73%	0,00%	0,00%	1,69%	sim
JAV	0,92%	0,11%	3,29%	0,46%	0,01%	2,54%	não
PAN	0,92%	0,11%	3,29%	0,00%	0,00%	1,69%	não
PAT	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	1,69%	não
POM	5,07%	2,56%	8,89%	2,30%	0,75%	5,29%	não
PYR	8,76%	5,35%	13,34%	2,30%	0,75%	5,29%	sim
SEN	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	1,69%	não
SHE	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	1,69%	não
TAR	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	1,69%	não
WHI	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	1,69%	não
WOL	1,84%	0,50%	4,65%	0,92%	0,11%	3,29%	não
reagente*				17,97%	13,10%	23,74%	
negativo				40,09%	33,52%	46,94%	
TOTAL				100,00%			

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariedades.

Em caninos, Tabela 5, não houve diferenças significativas entre as prevalências calculadas pelos dois métodos, o que tornaria plausível a utilização do SMP24 neste estudo. No entanto, a informação de que foram encontrados animais reagentes às sorovariedades Andamana, Bataviae, Bratislava, Butembo, Grippytyphosa, Panama e Wolffi correria o risco de ser omitida, caso os resultados desse estudo fossem publicados apenas com o resultado SMP24.

Nota-se que a quantidade de resultados considerados apenas como reagente no SMP24 foi relativamente baixa, 3,57%, o que indica um número muito pequeno de coaglutinações, logo, pouca distorção.

Outro detalhe a se considerar é que a definição do SMP24 obriga o pesquisador a afirmar que 8,67% das unidades amostrais estão infectadas com a sorovariedade saprófita Patoc, enquanto essa soroprevalência serviria apenas de indicativo de infecções recentes por outra sorovariedade (encobertas pelo SMP24), conforme Picardeau (2013).

Tabela 5: Soroprevalência por sorovariedade pelos métodos clássico e da sorovariedade mais provável, com utilização de 24 sorovarietades de *Leptospira* spp., em caninos.

Sorovariedade	método clássico			método da sorovariedade mais provável			Significância Estatística
	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	
AND	0,26%	0,01%	1,64%	0,00%	0,02%	1,21%	não
AUS	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,02%	1,21%	não
AUT	11,22%	8,36%	14,87%	7,40%	5,09%	10,57%	não
BAT	0,26%	0,01%	1,64%	0,00%	0,02%	1,21%	não
BRA	0,26%	0,01%	1,64%	0,00%	0,02%	1,21%	não
BUT	1,02%	0,33%	2,77%	0,00%	0,02%	1,21%	não
CAN	4,08%	2,43%	6,68%	3,32%	1,85%	5,75%	não
CAS	2,55%	1,30%	4,79%	1,02%	0,33%	2,77%	não
COP	2,55%	1,30%	4,79%	0,51%	0,09%	2,04%	não
CYN	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,02%	1,21%	não
GRI	0,77%	0,20%	2,41%	0,00%	0,02%	1,21%	não
HAR	0,77%	0,20%	2,41%	0,26%	0,01%	1,64%	não
HEB	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,02%	1,21%	não
ICT	0,51%	0,09%	2,04%	0,51%	0,09%	2,04%	não
JAV	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,02%	1,21%	não
PAN	0,26%	0,01%	1,64%	0,00%	0,02%	1,21%	não
PAT	11,48%	8,58%	15,16%	8,67%	6,16%	12,02%	não
POM	1,02%	0,33%	2,77%	0,26%	0,01%	1,64%	não
PYR	0,51%	0,09%	2,04%	0,26%	0,01%	1,64%	não
SEN	1,02%	0,33%	2,77%	0,77%	0,20%	2,41%	não
SHE	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,02%	1,21%	não
TAR	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,02%	1,21%	não
WHI	2,30%	1,12%	4,47%	0,77%	0,20%	2,41%	não
WOL	0,26%	0,01%	1,64%	0,00%	0,02%	1,21%	não
reagente*				3,57%	2,04%	6,06%	
negativo				72,70%	67,96%	77,00%	
TOTAL				100,00%			

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovarietades.

Em suínos, Tabela 6, também não houve diferenças significativas entre as prevalências calculadas pelos dois métodos, o que torna plausível a utilização do SMP24 neste estudo. No entanto, a informação de que foram encontrados animais reagentes às sorovarietades Andamana e Copenhageni correria o risco de ser

omitida, caso os resultados deste estudo fossem publicados apenas com o resultado SMP24.

Nota-se que a quantidade de resultados considerados apenas como reagente no SMP24 foi relativamente baixa, 7,29%, o que indica um número muito pequeno de coaglutinações, logo, pouca distorção.

Tabela 6: Soroprevalência por sorovariedade pelos métodos clássico e da sorovariedade mais provável, com utilização de 24 sorovariedades de *Leptospira* spp., em suínos.

Sorovariedade	método clássico			método da sorovariedade mais			Significância Estatística
	Prevalência	Limite inferior	Limite superior	Prevalência	Limite inferior	Limite superior	
		IC95%	IC95%		IC95%	IC95%	
AND	0,52%	0,01%	2,87%	0,00%	0,00%	1,90%	não
AUS	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
AUT	15,10%	10,35%	20,97%	8,85%	5,24%	13,80%	não
BAT	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
BRA	27,08%	20,94%	33,95%	19,27%	13,95%	25,57%	não
BUT	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
CAN	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
CAS	2,08%	0,57%	5,25%	0,52%	0,01%	2,87%	não
COP	0,52%	0,01%	2,87%	0,00%	0,00%	1,90%	não
CYN	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
GRI	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
HAR	1,56%	0,32%	4,50%	0,52%	0,01%	2,87%	não
HEB	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
ICT	6,25%	3,27%	10,66%	3,65%	1,48%	7,37%	não
JAV	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
PAN	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
PAT	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
POM	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
PYR	0,52%	0,01%	2,87%	0,52%	0,01%	2,87%	não
SEN	5,21%	2,53%	9,37%	1,04%	0,13%	3,71%	não
SHE	2,60%	0,85%	5,97%	2,60%	0,85%	5,97%	não
TAR	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
WHI	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
WOL	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
reagente*				7,29%	4,04%	11,93%	
negativo				55,73%	48,40%	62,88%	
TOTAL				100,00%			

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariedades.

A hipótese de que as reações às sorovariedades omitidas e as soroprevalências distorcidas justificam-se pela ocorrência de reações cruzadas já está refutada.

Como citado anteriormente, a interpretação dos resultados da SAM para leptospirose depende do conhecimento prévio sobre a endemicidade da

sorovariedade na região (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; FAINE, 1993), e a sensibilidade do teste é melhorada com a utilização do maior número de sorovariedades já identificadas na região (FAINE, 1993). Dessa forma, a omissão de prevalências gerada pelo SMP poderia induzir a não utilização de algumas sorovariedades em futuras pesquisas, ou levar um futuro pesquisador a acreditar que descobriu uma epidemia dessas sorovariedades, caso ele não utilize em sua bateria de antígenos a(s) sorovariedade(s) que as encobriram.

Independentemente da significância estatística, o resultado no SMP24 sempre será menor ou igual ao resultado obtido pelo método clássico, uma vez que o primeiro critério para se considerar um animal como positivo na SAM é o mesmo: aglutinar 50% ou mais das leptospiros na titulação 100. Ou seja, o numerador do cálculo de prevalência do SMP é igual ao numerador do método clássico menos as unidades amostrais que apresentaram coaglutinações com titulação igual ou inferior a outra sorovariedade. Na prática, com o SMP, há um ponto de corte relativo na SAM, dependendo da ocorrência de coaglutinações: um título acima de 100 não indicaria se aquela unidade amostral foi ou não exposta ao antígeno, já que depende dos resultados obtidos nas demais. Esse ponto de corte relativo impossibilita a determinação de sensibilidade e especificidade do teste, e a utilização de conceitos epidemiológicos como prevalência aparente e real, ou valores preditivos.

4.3. Comparação entre as prevalências obtidas pelo método da sorovariedade mais provável utilizando uma bateria de 24 (SMP24) e uma bateria de 8 antígenos (SMP8) na SAM

As Tabelas a seguir mostram as prevalências obtidas nos estudos utilizando baterias de 24 ou oito antígenos na SAM, respectivamente. Para facilitar a interpretação, apenas as oito sorovariedades do SMP8 foram listadas, bem como os reagentes e negativos.

Em bovinos, Tabela 7, duas de seis sorovariedades (33,33%) encontradas apresentaram diferenças significativas de prevalências em ambos os estudos, Hardjo e Wolffi. Ambas pertencem ao mesmo sorogrupo, Sejroe, e são constantemente citadas como sendo as de maior prevalência em bovinos. No entanto, os resultados

demonstram como a resposta humoral às 12 sorovariedades que não foram utilizadas no SMP8 subestimou as prevalências de Hardjo e Wolffi no SMP24. Tal fenômeno pode ter ocorrido devido ao fato de a adaptação da sorovariedade ao hospedeiro resultar em resposta humoral mais discreta em relação às sorovariedades menos adaptadas (FAINE, 1993).

Tabela 7: Soroprevalência pelo método da sorovariedade mais provável, com utilização de 8 ou 24 sorovariedades de *Leptospira* spp., em bovinos.

Sorovariedade	com 24 sorovariedades			com 8 sorovariedades			Significância Estatística
	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	
CAN	0,24%	0,01%	1,56%	0,24%	0,01%	1,56%	não
COP	0,00%	0,02%	1,15%	0,48%	0,08%	1,93%	não
GRI	0,73%	0,19%	2,29%	0,73%	0,19%	2,29%	não
HAR	0,48%	0,08%	1,93%	3,39%	1,94%	5,76%	sim
ICT	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,15%	não
POM	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,15%	não
TAR	0,24%	0,01%	1,56%	1,21%	0,45%	2,97%	não
WOL	43,83%	39,00%	48,77%	58,84%	53,91%	63,60%	sim
reagente*	25,18%	21,12%	29,71%	4,36%	2,68%	6,93%	sim
negativo	11,86%	8,99%	15,47%	30,75%	26,38%	35,49%	sim
TOTAL	100,00%			100,00%			

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariedades.

Em cervídeos, Tabela 8, a sorovariedade Hardjo apresentou diferença significativa de prevalência em ambos os estudos. As sorovariedades Canicola e Icterohaemorrhagiae sequer foram identificadas no SMP24, mas foram no SMP8.

Tabela 8: Soroprevalência pelo método da sorovariedade mais provável, com utilização de 8 ou 24 sorovariedades de *Leptospira* spp., em cervídeos.

Sorovariedade	Prevalência	com 24 sorovariedades		com 8 sorovariedades		Significância Estatística	
		Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%		
CAN	0,00%	0,00%	1,69%	0,92%	0,11%	3,29%	não
COP	1,38%	0,29%	3,99%	2,76%	1,02%	5,92%	não
GRI	3,23%	1,31%	6,53%	5,07%	2,56%	8,89%	não
HAR	6,45%	3,57%	10,59%	15,21%	10,71%	20,69%	não
ICT	0,00%	0,00%	1,69%	0,92%	0,11%	3,29%	não
POM	2,30%	0,75%	5,29%	3,23%	1,31%	6,53%	não
TAR	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	1,69%	não
WOL	0,92%	0,11%	3,29%	0,92%	0,11%	3,29%	não
reagente*	17,97%	13,10%	23,74%	8,29%	4,99%	12,79%	sim
negativo	40,09%	33,52%	46,94%	62,67%	55,87%	69,13%	sim
TOTAL	100,00%			100,00%			

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariedades.

Apenas em caninos, Tabela 9, a prevalência de animais reagentes (sem identificação da sorovariedade) não foi significativamente diferente nos estudos com 24 ou oito sorovariedades, devido à baixa quantidade de soros que reagiram a dois ou mais antígenos.

Tabela 9: Soroprevalência pelo método da sorovariedade mais provável, com utilização de 8 ou 24 sorovariedades de *Leptospira* spp., em caninos.

Sorovariedade	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Significância Estatística
CAN	3,32%	1,85%	5,75%	3,57%	2,04%	6,06%	não
COP	0,51%	0,09%	2,04%	1,53%	0,62%	3,47%	não
GRI	0,00%	0,02%	1,21%	0,26%	0,01%	1,64%	não
HAR	0,26%	0,01%	1,64%	0,26%	0,01%	1,64%	não
ICT	0,51%	0,09%	2,04%	0,51%	0,09%	2,04%	não
POM	0,26%	0,01%	1,64%	0,77%	0,20%	2,41%	não
TAR	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,02%	1,21%	não
WOL	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,02%	1,21%	não
reagente*	3,57%	2,04%	6,06%	0,51%	0,09%	2,04%	sim
negativo	72,70%	67,96%	77,00%	92,60%	89,43%	94,91%	sim
TOTAL	100,00%			100,00%			

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariedades.

Em suínos, Tabela 10, não houve diferenças significativas entre as prevalências para cada sorovariedade obtidas com 24 ou oito antígenos.

Tabela 10: Soroprevalência pelo método da sorovariedade mais provável, com utilização de 8 ou 24 sorovariedades de *Leptospira* spp., em suínos.

Sorovariedade	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Significância Estatística
CAN	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
COP	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
GRI	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
HAR	0,52%	0,01%	2,87%	1,56%	0,32%	4,50%	não
ICT	3,65%	1,48%	7,37%	6,25%	3,27%	10,66%	não
POM	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
TAR	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
WOL	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	1,90%	não
reagente*	7,29%	4,04%	11,93%	0,00%	0,00%	1,90%	sim
negativo	55,73%	48,40%	62,88%	92,19%	87,44%	95,56%	sim
TOTAL	100,00%			100,00%			

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariedades.

Nas quatro espécies de hospedeiros estudadas, as prevalências de animais negativos foram significativamente diferentes nos estudos com 24 ou oito sorovariedades, dado que a utilização de uma quantidade maior de antígenos na SAM aumenta a sensibilidade do teste quando se avalia a prevalência total de leptospirose, considerando como casos os animais que reagiram a quaisquer sorovariedades.

Os estudos realizados em bovinos e cervídeos foram influenciados pelo tamanho da bateria de antígenos, o que comprova que a escolha da bateria de antígenos pode influenciar o resultado obtido quando se utiliza o método da sorovariedade mais provável. Vale ressaltar que esse fenômeno não ocorre quando a prevalência é calculada pelo método clássico, já que os resultados para cada sorovariedade são independentes.

Embora em caninos e suínos a utilização de baterias diferentes não tenha influenciado significativamente as prevalências obtidas, deve-se ressaltar que a possibilidade de escolhas de baterias com quantidade indefinida de antígenos entre as mais de 300 sorovariedades já descobertas é enorme, e invariavelmente algumas delas distorceriam os resultados. Para se ter uma ideia, a combinação simples de 24 antígenos em baterias de 8 resulta em 735.471 possibilidades diferentes.

$$C_{24,8} = 24! / 8! (24-8)! = 24! / 8! \cdot 12! = 735.471$$

Não cabe, por ora, testar outras combinações entre os antígenos, pois quebraria a premissa de que a hipótese testada precede os resultados.

4.4. Comparação entre 3 diferentes critérios de escolha do denominador do cálculo do resultado

As Tabelas a seguir mostram os resultados obtidos em bovinos, caninos, cervídeos e suínos, respectivamente.

Tabela 11: Resultados obtidos pelo método da sorovariedade mais provável, com 3 diferentes critérios para inclusão de unidades amostrais no denominador, utilizando a soroglutinação microscópica com 24 sorovariades, em bovinos.

Sorovariedade	Critério A			Critério B			Critério C			Significância Estatística	
	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado inferior do IC95%	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado inferior do IC95%	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%		
AND	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
AUS	6,05%	4,03%	8,92%	6,87%	4,58%	10,10%	9,62%	6,32%	13,87%	13,87%	não
AUT	0,97%	0,31%	2,63%	1,10%	0,35%	2,98%	1,54%	0,42%	3,89%	3,89%	não
BAT	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
BRA	1,94%	0,90%	3,93%	2,20%	1,03%	4,45%	3,08%	1,34%	5,97%	5,97%	não
BUT	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
CAN	0,24%	0,01%	1,56%	0,27%	0,01%	1,76%	0,38%	0,01%	2,12%	2,12%	não
CAS	0,97%	0,31%	2,63%	1,10%	0,35%	2,98%	1,54%	0,42%	3,89%	3,89%	não
COP	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
CYN	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
GRI	0,73%	0,19%	2,29%	0,82%	0,21%	2,59%	1,15%	0,24%	3,33%	3,33%	não
HAR	0,48%	0,08%	1,93%	0,55%	0,10%	2,19%	0,77%	0,09%	2,75%	2,75%	não
HEB	1,45%	0,59%	3,30%	1,65%	0,67%	3,73%	2,31%	0,85%	4,95%	4,95%	não
ICT	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
JAV	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
PAN	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
PAT	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
POM	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
PYR	0,24%	0,01%	1,56%	0,27%	0,01%	1,76%	0,38%	0,01%	2,12%	2,12%	não
SEN	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
SHE	5,81%	3,84%	8,64%	6,59%	4,36%	9,78%	9,23%	6,00%	13,42%	13,42%	não
TAR	0,24%	0,01%	1,56%	0,27%	0,01%	1,76%	0,38%	0,01%	2,12%	2,12%	não
WHI	0,00%	0,02%	1,15%	0,00%	0,02%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	1,41%	não
WOL	43,83%	39,00%	48,77%	49,73%	44,48%	54,97%	69,62%	63,63%	75,15%	75,15%	sim
reagente*	25,18%	21,12%	29,71%	28,57%	24,04%	33,56%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	não
negativo	11,86%	8,99%	15,47%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	não
TOTAL											

Critério A: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total da amostra

Critério B: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total de unidades amostrais que reagiram a uma ou mais

Critério C: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total de unidades amostrais que reagiram a apenas uma sorovariedade ou tiveram uma titulação superior à das demais.

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariades.

Tabela 12: Resultados obtidos pelo método da sorovariedade mais provável, com 3 diferentes critérios para inclusão de unidades amostrais no denominador, utilizando a soroglutinação microscópica com 24 sorovariades, em caninos.

Sorovariedade	Critério A			Critério B			Critério C			Significância Estatística
	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado inferior do IC95%	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado inferior do IC95%	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	
AND	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
AUS	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
AUT	7,40%	5,09%	10,57%	27,10%	18,96%	36,55%	31,18%	21,98%	41,63%	sim
BAT	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
BRA	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
BUT	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
CAN	3,32%	1,85%	5,75%	12,15%	6,63%	19,88%	13,98%	7,66%	22,72%	sim
CAS	1,02%	0,33%	2,77%	3,74%	1,03%	9,30%	4,30%	1,18%	10,65%	não
COP	0,51%	0,09%	2,04%	1,87%	0,23%	6,59%	2,15%	0,26%	7,55%	não
CYN	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
GRI	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
HAR	0,26%	0,01%	1,64%	0,93%	0,02%	5,10%	1,08%	0,03%	5,85%	não
HEB	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
ICT	0,51%	0,09%	2,04%	1,87%	0,23%	6,59%	2,15%	0,26%	7,55%	não
JAV	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
PAN	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
PAT	8,67%	6,16%	12,02%	31,78%	23,11%	41,48%	36,56%	26,81%	47,19%	sim
POM	0,26%	0,01%	1,64%	0,93%	0,02%	5,10%	1,08%	0,03%	5,85%	não
PYR	0,26%	0,01%	1,64%	0,93%	0,02%	5,10%	1,08%	0,03%	5,85%	não
SEN	0,77%	0,20%	2,41%	2,80%	0,58%	7,98%	3,23%	0,67%	9,14%	não
SHE	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
TAR	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
WHI	0,77%	0,20%	2,41%	2,80%	0,58%	7,98%	3,23%	0,67%	9,14%	não
WOL	0,00%	0,02%	1,21%	0,00%	0,00%	3,39%	0,00%	0,00%	3,89%	não
reagente*	3,57%	2,04%	6,06%	13,08%	7,34%	20,98%	100,00%	100,00%	100,00%	sim
negativo	72,70%	67,96%	77,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	sim
TOTAL										

Critério A: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total da amostra

Critério B: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total de unidades amostrais que reagiram a uma ou mais

Critério C: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total de unidades amostrais que reagiram a apenas uma sorovariedade ou tiveram uma titulação superior à das demais.

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariades.

Tabela 13: Resultados obtidos pelo método da sorovariedade mais provável, com 3 diferentes critérios para inclusão de unidades amostrais no denominador, utilizando a soroglutinação microscópica com 24 sorovariiedades, em cervídeos.

Sorovariedade	Critério A				Critério B				Critério C				Significância Estatística
	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	
AND	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	não
AUS	0,92%	0,11%	3,29%	1,54%	0,19%	5,45%	2,20%	0,27%	0,27%	0,27%	0,27%	7,71%	não
AUT	12,90%	8,75%	18,11%	21,54%	14,81%	29,60%	30,77%	21,51%	21,51%	21,51%	41,32%	41,32%	sim
BAT	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
BRA	1,84%	0,50%	4,65%	3,08%	0,84%	7,69%	4,40%	1,21%	1,21%	1,21%	10,87%	10,87%	não
BUT	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
CAN	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
CAS	9,22%	5,72%	13,88%	15,38%	9,66%	22,76%	21,98%	13,97%	13,97%	13,97%	31,88%	31,88%	sim
COP	1,38%	0,29%	3,99%	2,31%	0,48%	6,60%	3,30%	0,69%	0,69%	0,69%	9,33%	9,33%	não
CYN	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
GRI	3,23%	1,31%	6,53%	5,38%	2,19%	10,78%	7,69%	3,15%	3,15%	3,15%	15,21%	15,21%	não
HAR	6,45%	3,57%	10,59%	10,77%	6,01%	17,41%	15,38%	8,67%	8,67%	8,67%	24,46%	24,46%	não
HEB	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
ICT	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
JAV	0,46%	0,01%	2,54%	0,77%	0,02%	4,21%	1,10%	0,03%	0,03%	0,03%	5,97%	5,97%	não
PAN	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
PAT	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
POM	2,30%	0,75%	5,29%	3,85%	1,26%	8,75%	5,49%	1,81%	1,81%	1,81%	12,36%	12,36%	não
PYR	2,30%	0,75%	5,29%	3,85%	1,26%	8,75%	5,49%	1,81%	1,81%	1,81%	12,36%	12,36%	não
SEN	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
SHE	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
TAR	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
WHI	0,00%	0,00%	1,69%	0,00%	0,00%	2,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,97%	3,97%	não
WOL	0,92%	0,11%	3,29%	1,54%	0,19%	5,45%	2,20%	0,27%	0,27%	0,27%	7,71%	7,71%	não
reagente*	17,97%	13,10%	23,74%	30,00%	22,28%	38,66%							
negativo	40,09%	33,52%	46,94%										
TOTAL				100,00%			100,00%					100,00%	

Critério A: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total da amostra

Critério B: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total de unidades amostrais que reagiram a uma ou mais

Critério C: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total de unidades amostrais que reagiram a apenas uma sorovariedade ou tiveram uma titulação superior à das demais.

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariiedades.

Tabela 14: Resultados obtidos pelo método da sorovariedade mais provável, com 3 diferentes critérios para inclusão de unidades amostrais no denominador, utilizando a soroglutinação microscópica com 24 sorovariiedades, em suínos.

Sorovariedade	Critério A				Critério B				Critério C				Significância Estatística
	Prevalência	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	Resultado	Limite inferior do IC95%	Limite superior do IC95%	
AND	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
AUS	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
AUT	8,85%	5,24%	13,80%	20,00%	12,10%	30,08%	23,94%	14,61%	35,54%	0,00%	0,00%	5,06%	sim
BAT	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
BRA	19,27%	13,95%	25,57%	43,53%	32,80%	54,72%	52,11%	39,92%	64,12%	0,00%	0,00%	5,06%	sim
BUT	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
CAN	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
CAS	0,52%	0,01%	2,87%	1,18%	0,03%	6,38%	1,41%	0,04%	7,60%	0,00%	0,00%	5,06%	não
COP	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
CYN	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
GRI	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
HAR	0,52%	0,01%	2,87%	1,18%	0,03%	6,38%	1,41%	0,04%	7,60%	0,00%	0,00%	5,06%	não
HEB	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
ICT	3,65%	1,48%	7,37%	8,24%	3,38%	16,23%	9,86%	4,06%	19,26%	0,00%	0,00%	5,06%	não
JAV	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
PAN	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
PAT	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
POM	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
PYR	0,52%	0,01%	2,87%	1,18%	0,03%	6,38%	1,41%	0,04%	7,60%	0,00%	0,00%	5,06%	não
SEN	1,04%	0,13%	3,71%	2,35%	0,29%	8,24%	2,82%	0,34%	9,81%	0,00%	0,00%	5,06%	não
SHE	2,60%	0,85%	5,97%	5,88%	1,94%	13,20%	7,04%	2,33%	15,67%	0,00%	0,00%	5,06%	não
TAR	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
WHI	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
WOL	0,00%	0,00%	1,90%	0,00%	0,00%	4,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
reagente*	7,29%	4,04%	11,93%	16,47%	9,31%	26,09%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,06%	não
negativo	55,73%	48,40%	62,88%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	não
TOTAL													

Critério A: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total da amostra

Critério B: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total de unidades amostrais que reagiram a uma ou mais

Critério C: dividem-se os casos atribuídos a cada sorovariedade pelo total de unidades amostrais que reagiram a apenas uma

sorovariedade ou tiveram uma titulação superior à das demais.

reagente*: que teve empate entre as maiores titulações em 2 ou mais sorovariiedades.

Ao menos uma sorovariedade em cada espécie hospedeira apresentou resultados significativamente diferentes entre os diferentes critérios comumente utilizados, o que comprova que estudos com diferentes critérios de inclusão de unidades amostrais no denominador não podem ser comparados. Não há a possibilidade de mais de um critério estar correto, caso eles pretendam mensurar o mesmo fenômeno.

O critério A sempre terá um denominador maior que o do critério B, que sempre terá um denominador maior que o do critério C, uma vez que os denominadores são subdivisões um do outro. Sendo assim, os resultados obtidos com o critério A sempre serão menores que os obtidos com o critério B, que serão menores que os obtidos com o Critério C. Pode-se dizer que um estudo com o critério C seja mais alarmista que os demais.

Segundo a definição de Thrusfield (2005), a despeito das distorções causadas pelo SMP no numerador, apenas o critério A poderia ser chamado de prevalência (ou incidência, se os casos tivessem iniciado em um determinado período), uma vez que ele mensura a ocorrência dos reagentes na amostra, o que permite a estimativa da ocorrência dos reagentes na população, caso a amostra seja representativa.

O critério B mensura a quantidade de infecções que podem ser atribuídas a cada sorovariedade entre os reagentes. Não há uma definição desse tipo de coeficiente de morbidade na literatura científica, mas, por analogia com o coeficiente de mortalidade proporcional, pode-se chamá-lo de coeficiente de prevalência proporcional por sorovariedade. Ele serviria apenas para determinar a importância de determinada sorovariedade em relação às demais, sendo de pouca serventia sem os resultados do critério A.

O critério C não tem definição na literatura científica e, mesmo por analogia, é muito difícil defini-lo. Uma vez que ele é uma subdivisão do coeficiente de prevalência proporcional por sorovariedade, poderia ser chamado de coeficiente de prevalência proporcional por sorovariedade entre as unidades amostrais que tiveram uma sorovariedade infectante definida.

Dos 15 trabalhos que utilizam o SMP, citados na revisão de literatura, 11 utilizam os critérios B ou C (contando ou não as amostras que reagiram a Hardjo e

Wolffi com igual intensidade). Alguns chamam erroneamente o resultado de prevalência, induzindo o leitor a avaliar a situação com gravidade maior que a real.

Uma vez que os critérios B e C mensuram apenas a importância de determinada sorovariedade em relação às demais, poderia se argumentar que esses critérios serviriam para ranquear as sorovariedades por ordem de importância. No entanto, nas quatro espécies hospedeiras estudadas, nos três diferentes critérios de cálculo testados, o rol de resultados por sorovariedade permanece imutável, uma vez que esses critérios utilizam o mesmo o numerador. Dessa forma, não há razão para adoção de diferentes critérios de cálculo dos resultados.

5. CONCLUSÕES

A maioria das coaglutinações obtidas na SAM ocorre dentro do esperado, devido à alta prevalência e à alta distribuição das sorovariedades de *Leptospira* spp. Quando ocorrem concordâncias de resultados entre duas ou mais sorovariedades na soroaglutinação microscópica, em uma população, pode estar ocorrendo reação cruzada ou coexposição simultânea a sorovariedades diferentes. Reações cruzadas entre sorovariedades de sorogrupos diferentes demonstram que o conceito de sorovariedade é muito teórico, aplicável a cepas mantidas em laboratório ou em coelhos, devendo ser usado apenas como referência em estudos epidemiológicos de campo e com outras espécies animais. A soroaglutinação microscópica indica se o animal foi exposto a epítomos semelhantes a determinada sorovariedade, não a sorovariedade que o infectou. Dessa forma, não é possível creditar as titulações menores somente a reações cruzadas e considerar que a sorovariedade com maior titulação é a infectante naquela unidade amostral.

O método da sorovariedade mais provável subestima a soroprevalência para cada sorovariedade, uma vez que desconsidera algumas reações positivas em caso de coaglutinação.

Quanto mais antígenos se usar na soroaglutinação microscópica mais subestimada será a prevalência para cada sorovariedade, criando uma paradoxal redução da sensibilidade por sorovariedade enquanto aumenta a sensibilidade para quaisquer sorovariedades. Tal paradoxo ocorre porque o ponto de corte utilizado é relativo, variando de 100 para mais na ocorrência de coaglutinações, impedindo que se estimem sensibilidade, especificidade, valores preditivos, prevalências aparente ou real etc.

A divisão dos casos de determinada sorovariedade por qualquer outro valor que não seja o tamanho da amostra resulta em coeficientes que não estimam a ocorrência da doença atribuída à sorovariedade na população, não havendo motivo para adotá-los. Esses coeficientes não se enquadram na definição prevalência e/ou incidência e devem ser bem definidos nos trabalhos, a fim de não confundir os leitores.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**, 5^a Edition. Saunders, Philadelphia, EUA, 2000. 562p.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In: Acha, P. N.; Szyfres, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed.** Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v.1, p.175-185.

ADLER, B.; DE LA PENÑA MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n.3-4, p. 287-296, 2010. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>> Acesso em 07 jul. 2016.

AGUIAR, D. M.; GENNARI, S. M.; CAVALCANTE, G. T.; LABRUNA, M. B.; VASCONCELLOS S. A.; RODRIGUES A. A. R.; MORAES Z. M.; CAMARGO L. M. A. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. **Pesq. Vet. Bras.** v.26, n.2, p.102-104, 2006. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2006000200007>>. Acesso em 07 jul. 2016.

ALMEIDA, L. P.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S.; GERMANO, P. M. L. Levantamento soropidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.28, n.1, p.76-81, 1994. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101994000100009>> Acesso em 07 jul. 2016.

ARDUÍNO, G. G. C.; GIRIO, R. J. S.; MAGAJEVSKI, F. S.; PEREIRA G. T. Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n.7, 2009. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000700013>> Acesso em 07 jul. 2016.

AZEVEDO, S.S.; OLIVEIRA, R. M.; ALVES, C. J.; ASSIS, D. M., AQUINO, S. F.; FARIAS, A. E. M.; ASSIS, D. M.; LUCENA, T. C. C.; BATISTA, C. S. A.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Prevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in swine slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba state, northeast region of Brazil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.4, p.517-520, 2008. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75_4/azevedo.pdf>. Acesso em 07 jul. 2016.

BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, F. A. L.; LIMA, F. S.; ARAÚJO NETO, J. O. Soroprevalência e fatores de risco para leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, supl. 2, p.179-185, 2005. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000800008>>. Acesso em 07 jul. 2016.

CASTRO, V.; AZEVEDO, S.S.; GOTTI, T. B.; BATISTA, C. S. A.; GENTILI, J.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. E. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biológico**, v.75, n.1, p.3-11, 2008. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75_1/castro.pdf>. Acesso em 07 jul. 2016.

CASTRO, J. R.; SOUZA, M. A.; SALABERRY, S. R. S.; GUIMARÃES E. C.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Cinética da resposta imune humoral de cães jovens imunizados contra *Leptospira interrogans*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.31, n.11, 2011. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011001100011>>.

EPI INFO™, 7.0.9.7. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>>

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis.** CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA, 1993, 353p.

FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arq. Inst. Biológico**, v.68, n.2, p.29-35, 2001. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V68_2/favero.pdf>. Acesso em 07 jul. 2016.

FAVERO, A. C. M; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S.R.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F. F.; FERREIRA NETO, J. S. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.613-619, 2002. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000400011>>.

FIGUEIREDO, A. O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FREITAS, E. B; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** v.29, n.5, p.375-381, 2009. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000500003>>.

GALLI, G.R.O. **Algutininas contra *Leptospira* spp. Em cervos-do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) na área afetada pela construção da usina hidrelétrica Sérgio Motta.** 2011. 40f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

HASHIMOTO, V. Y.; GONÇALVES, D. D.; SILVA, F. G.; OLIVEIRA, R. C.; ALVES, L. A.; REICHMANN, P.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** S. Paulo, v.49, n.5, p.327-330, 2007. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652007000500010>>.

HASHIMOTO, V. Y; DIAS, J. A.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, M. C. P.; ANDRADE M. G. B.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesq. Vet. Bras.** v.32, n.2, p.99-105, 2012. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000200001>>.

KUSUM, M.; BOONSARTHORN, N.; BIAKLANG, M.; SINA, U.; SAWANPANYALERT, P.; NAIGOWIT, P. Comparison of leptospiral serovars identification by serology and

cultivation in north-eastern region, Thailand. **J. Med. Assoc. Thai**, v.88, n.8, p. 1098–102, 2005. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16404838>>. Acesso em 07 jul. 2016.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, p. 159-174, 1977.

LIMMATHUROTSAKUL, D.; TURNER, E.L.; WUTHIEKANUN, V.; THAIPADUNGPANIT, J.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; CHIERAKUL, W.; SMYTHE, L.D.; DAY, N.P.; COOPER, B.; PEACOCK, S.J. Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a re-evaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.55, n.3, p.322–31, 2012. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis403>>.

MASSA, R. **Associação entre concepção e enfermidades infecciosas da reprodução em matrizes nelore**. 2012. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

MINEIRO, A. L. B. B.; BEZERRA, E. E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; COSTA, F. A. L.; MACEDO, N. A. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, p.1103-1109, 2007. Disponível em <<http://dx.doi.org/> <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000500003>> Acesso em 07 jul. 2016.

MINEIRO, A. A. L. B; VIEIRA, R. J.; FEITOSA, L. C. S.; BEZERRA, E. E. A.; COSTA, F. A. L. Pesquisa de sorovares de leptospiros em rebanho bovino leiteiro no estado do Piauí, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.1, p.129-132, 2010. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_1/mineiro.pdf>. Acesso em 07 jul. 2016.

MORAES, F.C. ; MEIRELLES-BARTOLI, R.B. ; CRUZ, C.A. ; SILVA, F. J. ; ASSIS, N. A. ; SOUSA, D.B. ; MATHIAS, L.A. . **Avaliação sorológica de leptospirose em suínos abatidos e trabalhadores em um frigorífico do Estado de São Paulo, Brasil**. Higiene Alimentar, v. 27, p. 4263-4266, 2013.

NATARAJASEENIVASAN, K.; PRIYA, C. L.; VANITHAMANI, S.; SHANMUGHAPRIYA, S.; ANANDHAGIRI, S. Humoral immune response of inactivated bivalent *Leptospira* vaccine among dogs in Tiruchirappalli, Tamilnadu, India. **World Journal of Vaccines**, v.2, p.85-90, 2012. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.4236/wjv.2012.22011>>.

OIE, World Organization of Animal Health. **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals**. CHAPTER 2.01.12. Leptospirosis (Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014). Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_LEPTO.pdf> Acesso em: 23/06/2016.

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; VIEGAS, S. A. R. A.; BATISTA, C. S. A.; COELHO, C. P.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; ALMEIDA, C. A. S.; VASCONCELLOS, S. A. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia. **Arq. Inst. Biológico**, v.76, n.4, p.539-546, 2009. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76_4/oliveira3.pdf>. Acesso em 07 jul. 2016.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**. v.43, n.1, p.1–9, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>>.

ROMERO, E. C.; BERNARDO, C. C.; YASUDA, P. H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.45, n.5, p.245-248, 2003. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652003000500002>> Acesso em 07 jul. 2016.

SAS® 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008.

SILVA, G.C.P. **Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* e reação anti-*Brucella* em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil**. 2010. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, 2010.

SMYTHE, L. D.; WUTHIEKANUN, V.; CHIERAKUL, W.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; TIENGRIM, S.; DOHNT, M.F.; SYMONDS, M.L.; SLACK, A.T.; APIWATTANAPORN, A.; CHUEASUWANACHAI, S.; DAY, N.P.; PEACOCK, S.J. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.81, n.4, p.695–697, 2009. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0252>>.

THRUSFIELD, M. Observational studies. In: Thrusfield, M. **Veterinary Epidemiology**. 3 ed. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido, c. 15, p. 266-288, 2005.

YASUDA, P. H.; SANTA ROSA C. A.; YANAGUITA R. M. Variação sazonal na prevalência de leptospirose em cães de rua da cidade de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, S. Paulo, v. 14, p. 589-96, 1980. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101980000400014>>.

APÊNDICES

Apêndice A: Coeficiente *Kappa* e limites do IC 95% obtidos entre sorovariedades de *Leptospira* spp., em bovinos

Tabella 1A: Limite inferior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de *Leptospira* spp. na soroglutinação microscópica em bovinos.

	AUS	AUT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	HEB	ICT	PYR	SEN	SHE	TAR	WHI	WOL
AUS																	
AUT	0,0720																
BRA	0,3816	0,1998															
BUT	-0,0220	-0,0196	-0,0201														
CAN	-0,0143	-0,0139	-0,0142	-0,0131													
CAS	-0,1167	-0,0665	-0,0674	-0,0771	-0,0135												
COP	-0,0202	-0,0329	-0,0226	-0,0288	-0,0100	-0,0312											
GRI	-0,0376	-0,0348	-0,0371	-0,0288	-0,0100	-0,0312	-0,0166										
HAR	-0,0750	-0,0256	-0,0861	-0,0824	-0,0139	-0,0207	-0,0333	-0,0488									
HEB	0,0841	0,0017	0,1228	0,0523	-0,0143	-0,0716	-0,0377	-0,0296	-0,0060								
ICT	-0,0298	-0,0329	-0,0226	-0,0288	-0,0100	-0,0737	-0,1565	-0,1565	-0,0347	-0,0296							
PYR	-0,0672	-0,1029	-0,0831	-0,0945	-0,0137	-0,0716	-0,0401	-0,0328	0,5804	-0,0454	-0,0328						
SEN	-0,0229	-0,0219	-0,0227	-0,0197	-0,0077	-0,0206	-0,0129	-0,0129	-0,0219	-0,0164	-0,0129	-0,0212					
SHE	0,0037	0,0383	0,0844	0,0056	-0,0143	-0,0319	-0,0290	-0,0379	-0,0269	0,1913	-0,0379	-0,0679	-0,0153				
TAR	0,0056	-0,0504	0,0167	-0,0742	-0,0133	-0,0967	-0,0296	-0,0296	-0,0496	0,0414	-0,0296	-0,0606	-0,0200	0,0899			
WHI	-0,0439	-0,0792	-0,0526	-0,0489	-0,0126	-0,0680	-0,0258	-0,0258	0,0932	-0,0557	-0,0258	0,0708	-0,0184	-0,0461	-0,0513		
WOL	-0,0539	-0,0426	-0,0711	-0,0114	-0,0026	-0,0387	-0,0292	-0,0100	-0,0197	0,0931	-0,0100	0,0032	-0,0021	-0,1033	0,0016	-0,0133	

Tabela 2A: Coeficiente kappa médio entre sorovariades de *Leptospira* spp. na soroglutinação microscópica em bovinos.

	AUS	AUT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	HEB	ICT	PYR	SEN	SHE	TAR	WHI	WOL
AUS																	
AUT	0,1608																
BRA	0,4742	0,3072															
BUT	0,0372	0,1020	0,0555														
CAN	-0,0048	-0,0048	-0,0048	-0,0046													
CAS	-0,0664	0,0387	0,0655	0,0519	-0,0047												
COP	0,0108	0,0617	0,0210	-0,0159	-0,0039	-0,0169											
GRI	-0,0192	-0,0182	-0,0190	-0,0159	-0,0039	-0,0169	-0,0098										
HAR	0,0040	0,0912	0,0014	0,0036	-0,0048	0,1029	0,0633	0,0226									
HEB	0,1826	0,0858	0,2210	0,1185	-0,0048	-0,0125	-0,0192	-0,0046	0,0772								
ICT	-0,0042	0,0617	0,0210	-0,0159	-0,0039	0,0558	0,2427	0,2427	-0,0181	-0,0046							
PYR	0,0013	-0,0149	-0,0062	-0,0121	-0,0047	0,0466	0,0988	-0,0175	0,7004	0,0244	-0,0175						
SEN	-0,0096	-0,0094	-0,0096	-0,0087	-0,0032	-0,0090	-0,0065	-0,0065	-0,0094	0,0050	-0,0065	-0,0092					
SHE	0,1008	0,1180	0,1791	0,0606	-0,0048	0,0274	-0,0062	-0,0192	0,0496	0,2868	-0,0192	-0,0051	0,0035				
TAR	0,0710	0,0596	0,1017	0,0707	-0,0046	-0,0051	-0,0163	-0,0163	0,0620	0,1087	-0,0163	0,0668	-0,0088	0,1529			
WHI	0,0024	-0,0130	0,0029	-0,0353	-0,0045	0,0753	-0,0147	-0,0147	0,2409	-0,0136	-0,0147	0,2475	-0,0084	-0,0054	-0,0369		
WOL	0,0233	0,0049	-0,0030	0,0153	0,0027	-0,0040	-0,0119	0,0031	0,0257	0,1680	0,0031	0,0385	0,0053	-0,0204	0,0284	0,0094	

Tabela 3A: Limite superior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovarietades de *Leptospira* spp. na sorreaçlutinaçã microscópica em bovinos.

	AUS	AUT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	HEB	ICT	PYR	SEN	SHE	TAR	WHI	WOL
AUS																	
AUT	0,250																
BRA	0,567	0,415															
BUT	0,096	0,224	0,131														
CAN	0,005	0,004	0,005	0,004													
CAS	-0,016	0,144	0,078	0,181	0,004												
COP	0,042	0,156	0,065	-0,003	0,002	-0,003											
GRI	-0,001	-0,002	-0,001	-0,003	0,002	-0,003	-0,003										
HAR	0,083	0,208	0,089	0,090	0,004	0,227	0,160	0,094									
HEB	0,281	0,170	0,319	0,185	0,005	0,047	-0,001	0,020	0,160								
ICT	0,022	0,156	0,065	-0,003	0,002	0,185	0,642	0,642	-0,002	0,020							
PYR	0,070	0,073	0,071	0,070	0,004	0,165	0,238	-0,002	0,820	0,094	-0,002						
SEN	0,004	0,003	0,004	0,002	0,001	0,003	0,000	0,000	0,003	0,026	0,000	0,003					
SHE	0,198	0,198	0,274	0,116	0,005	0,087	0,017	-0,001	0,126	0,382	-0,001	0,058	0,022				
TAR	0,136	0,170	0,187	0,216	0,004	0,087	-0,003	-0,003	0,174	0,176	-0,003	0,194	0,002	0,216			
WHI	0,049	0,053	0,059	-0,022	0,004	0,219	-0,004	-0,004	0,389	0,029	-0,004	0,424	0,002	0,035	-0,023		
WOL	0,101	0,052	0,065	0,042	0,008	0,031	0,005	0,016	0,071	0,243	0,016	0,074	0,013	0,063	0,055	0,032	

Apêndice B: Coeficiente *Kappa* e limites do IC 95% obtidos entre sorovariedades de *Leptospira* spp., em caninos

Tabella 1B: Limite inferior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de *Leptospira* spp. na soroglutinação microscópica em caninos.

	AND	AUT	BAT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	ICT	PAN	PAT	POM	PYR	SEN	WHI	WOL
AND																		
AUT	-0,0147																	
BAT	-0,0061	-0,0359																
BRA	-0,0061	-0,0359	-0,0061															
BUT	-0,0106	0,0191	-0,1445	-0,0106														
CAN	-0,0138	-0,0404	-0,0901	-0,0138	-0,0463													
CAS	-0,0130	-0,0659	-0,0130	-0,0130	-0,0255	0,1230												
COP	-0,0130	0,0453	-0,1243	-0,0130	-0,0353	0,0508	-0,1075											
GRI	-0,0096	-0,0294	-0,1020	-0,0096	0,1269	-0,0412	-0,0225	0,1197										
HAR	-0,0096	-0,0462	-0,0096	-0,0096	-0,0156	-0,0935	-0,0225	-0,0139										
ICT	-0,0081	-0,0230	-0,0081	-0,0081	-0,0136	-0,0205	-0,0186	-0,0120	-0,0120									
PAN	-0,0061	-0,0147	-0,0061	-0,0061	-0,0106	-0,0138	-0,0130	-0,0096	-0,0096	-0,0096	-0,0081							
PAT	-0,0350	-0,0419	-0,0147	-0,0350	-0,0365	0,0109	-0,0612	-0,0754	-0,0302	-0,0454	-0,0231	-0,0147						
POM	-0,0106	-0,0346	-0,1445	-0,0106	-0,1570	-0,0946	-0,0255	-0,1201	-0,1609	-0,0156	-0,0136	-0,1445	-0,0365					
PYR	-0,0081	-0,0230	-0,0081	-0,0081	-0,0136	-0,0205	-0,0186	-0,1234	-0,0120	-0,0120	-0,0102	-0,0081	-0,0231	-0,0136				
SEN	-0,0106	-0,0364	-0,0106	-0,0106	-0,0175	-0,0298	-0,0255	-0,0255	-0,0156	-0,0156	-0,0136	-0,0106	-0,0503	-0,0175	-0,0136			
WHI	-0,0128	0,0847	-0,1317	-0,0128	-0,0298	-0,0628	-0,0360	-0,1095	-0,1282	-0,1282	-0,0181	-0,0128	-0,0716	-0,1256	-0,0181	-0,0245		
WOL	-0,0061	-0,0147	-0,0061	-0,0061	-0,0106	-0,0138	-0,0130	-0,0096	-0,1020	-0,0081	-0,0081	-0,0061	-0,0147	-0,0106	-0,0081	-0,0106	-0,0128	

Tabela 2B: Coeficiente kappa médio entre sorovariades de *Leptospira* spp. na soroglutinação microscópica em caninos.

	AND	AUT	BAT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	ICT	PAN	PAT	POM	PYR	SEN	WHI	WOL
AND																		
AUT	-0,0050																	
BAT	-0,0026	0,0397																
BRA	-0,0026	0,0397	-0,0026															
BUT	-0,0041	0,1508	0,3975	-0,0041														
CAN	-0,0048	0,0781	0,1134	-0,0048	0,1867													
CAS	-0,0047	-0,0434	-0,0047	-0,0047	-0,0148	0,3647												
COP	-0,0047	0,1885	0,1780	-0,0047	0,2751	0,2853	0,0764											
GRI	-0,0038	0,0718	0,4981	-0,0038	0,5676	0,2002	-0,0119	0,4551										
HAR	-0,0038	0,0286	-0,0038	-0,0038	-0,0088	0,0936	-0,0119	-0,0119	-0,0077									
ICT	-0,0034	-0,0099	-0,0034	-0,0034	-0,0068	-0,0092	-0,0086	-0,0062	-0,0062									
PAN	-0,0026	-0,0050	-0,0026	-0,0026	-0,0041	-0,0048	-0,0047	-0,0047	-0,0038	-0,0038	-0,0034							
PAT	0,0387	0,0748	-0,0050	0,0387	-0,0191	0,1452	0,0323	-0,0056	-0,0146	0,0277	-0,0099	-0,0050						
POM	-0,0041	0,0659	0,3975	-0,0041	0,2343	0,0851	-0,0148	0,1302	0,2794	-0,0088	-0,0068	0,3975	-0,0191					
PYR	-0,0034	-0,0099	-0,0034	-0,0034	-0,0068	-0,0092	-0,0086	0,1595	-0,0062	-0,0062	-0,0051	-0,0034	-0,0099	-0,0068				
SEN	-0,0041	-0,0191	-0,0041	-0,0041	-0,0103	-0,0166	-0,0148	-0,0148	-0,0088	-0,0088	-0,0068	-0,0041	0,0225	-0,0103	-0,0068			
WHI	-0,0046	0,2350	0,1963	-0,0046	0,2978	0,1346	-0,0248	0,0831	0,1570	0,1570	-0,0084	-0,0046	-0,0013	0,1417	-0,0084	-0,0143		
WOL	-0,0026	-0,0050	-0,0026	-0,0026	-0,0041	-0,0048	-0,0047	-0,0047	-0,0038	0,4981	-0,0034	-0,0026	-0,0050	-0,0041	-0,0034	-0,0041	-0,0046	

Tabela 3B: Limite superior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovarietades de *Leptospira* spp. na soraglutinação microscópica em caninos.

	AND	AUT	BAT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	ICT	PAN	PAT	POM	PYR	SEN	WHI	WOL
AND																		
AUT	0,005																	
BAT	0,001	0,115																
BRA	0,001	0,115	0,001															
BUT	0,002	0,283	0,940	0,002														
CAN	0,004	0,197	0,317	0,004	0,420													
CAS	0,004	-0,021	0,004	0,004	-0,004	0,606												
COP	0,004	0,332	0,480	0,004	0,586	0,520	0,260											
GRI	0,002	0,173	1,000	0,002	1,000	0,442	-0,001	0,791										
HAR	0,002	0,103	0,002	0,002	-0,002	0,281	-0,001	-0,001	-0,002									
ICT	0,001	0,003	0,001	0,001	0,000	0,002	0,001	0,001	0,000	0,000								
PAN	0,001	0,005	0,001	0,001	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,001							
PAT	0,112	0,191	0,005	0,112	-0,002	0,280	0,126	0,064	0,001	0,101	0,003	0,005						
POM	0,002	0,166	0,940	0,002	0,642	0,265	-0,004	0,380	0,720	-0,002	0,000	0,940	-0,002					
PYR	0,001	0,003	0,001	0,001	0,000	0,002	0,001	0,443	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,000				
SEN	0,002	-0,002	0,002	0,002	-0,003	-0,003	-0,004	-0,004	-0,002	-0,002	0,000	0,002	0,095	-0,003	0,000			
WHI	0,004	0,385	0,524	0,004	0,625	0,332	-0,014	0,276	0,442	0,442	0,001	0,004	0,069	0,409	0,001	-0,004		
WOL	0,001	0,005	0,001	0,001	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	1,000	0,001	0,001	0,005	0,002	0,001	0,002	0,004	

Apêndice C: Coeficiente *Kappa* e limites do IC 95% obtidos entre sorovariedades de *Leptospira* spp., em cervídeos

Tabela 1C: Limite inferior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de *Leptospira* spp. na soraglutinação microscópica em cervídeos.

	AND	AUS	AUT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	ICT	JAV	PAN	POM	PYR	WOL
AND																
AUS	-0,0313															
AUT	-0,0275	-0,0498														
BRA	-0,0450	-0,0626	0,0042													
BUT	-0,0218	-0,0270	-0,0158	-0,1041												
CAN	-0,0313	-0,0382	-0,0686	-0,0587	-0,0270											
CAS	-0,0333	-0,0781	-0,1646	-0,0181	-0,0438	-0,0265										
COP	-0,0460	-0,0601	-0,0311	0,0655	-0,0370	-0,0632	0,0052									
GRI	-0,0975	-0,1079	-0,0246	-0,1339	-0,0912	-0,0627	-0,0124	-0,1092								
HAR	-0,0556	-0,0789	-0,0498	-0,0814	-0,0422	-0,0528	0,0858	-0,0329	-0,1295							
ICT	-0,0396	-0,0493	-0,0223	0,1439	-0,0329	-0,0493	-0,0643	-0,0261	-0,0839	-0,0079						
JAV	-0,0218	-0,0270	-0,0339	-0,0365	-0,0184	-0,1628	-0,0438	-0,0370	-0,0378	-0,0416	-0,0329					
PAN	-0,0218	-0,1628	-0,0339	-0,0336	-0,0184	-0,0270	-0,0420	-0,0370	-0,0378	-0,0422	-0,1343	-0,0184				
POM	-0,0424	-0,0535	-0,0423	-0,0923	-0,1207	-0,1276	-0,0533	-0,0872	-0,1276	-0,0560	-0,1295	-0,1207	-0,0347			
PYR	-0,0466	-0,0649	-0,0430	0,1562	-0,0842	-0,0649	0,1019	0,0822	-0,1419	0,1544	0,0199	-0,0385	-0,0385	-0,1270		
WOL	-0,0284	-0,1604	-0,0388	-0,1132	-0,0247	-0,0349	-0,0646	-0,1096	-0,1030	-0,0630	-0,0449	-0,0247	-0,0247	-0,0485	-0,0974	

Tabela 2C: Coeficiente kappa médio entre soroavidades de *Leptospira* spp. na soroaglutinação microscópica em cervídeos.

	AND	AUS	AUT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	ICT	JAV	PAN	POM	PYR	WOL
AND																
AUS	-0,0176															
AUT	0,0361	0,0178														
BRA	0,2175	0,1828	0,1176													
BUT	-0,0112	-0,0133	0,0455	0,1107												
CAN	-0,0176	-0,0236	-0,0134	-0,0351	-0,0133											
CAS	0,0608	-0,0432	-0,0389	0,1208	0,0263	0,0846										
COP	0,2039	-0,0358	0,0793	0,2980	-0,0165	0,1714	0,1496									
GRI	0,0783	0,0573	0,0907	-0,0067	0,0903	-0,0369	0,1313	0,0556								
HAR	-0,0297	-0,0435	0,0870	0,0352	-0,0180	0,0368	0,2355	0,0991	-0,0241							
ICT	-0,0212	-0,0305	0,0738	0,4047	-0,0153	-0,0305	0,0476	0,2090	-0,0573	0,1171						
JAV	-0,0112	-0,0133	0,0136	-0,0164	-0,0093	0,2762	0,0263	-0,0165	-0,0168	0,0236	-0,0153					
PAN	-0,0112	0,2762	0,0136	0,2377	-0,0093	-0,0133	-0,0179	-0,0165	-0,0168	-0,0180	0,1693	-0,0093				
POM	-0,0222	-0,0327	0,0557	0,1094	0,1404	0,0964	0,0700	-0,0621	0,0105	0,0608	0,0570	0,1404	-0,0158			
PYR	0,1618	-0,0379	0,0733	0,3780	0,0799	-0,0379	0,2585	0,2988	-0,0296	0,3076	0,2431	-0,0170	-0,0170	0,0026		
WOL	-0,0161	0,2060	0,0269	0,0849	-0,0124	-0,0209	0,0081	0,0784	0,0674	0,0054	-0,0262	-0,0124	-0,0124	-0,0278	0,0583	

Tabela 3C: Limite superior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sororeações de *Leptospira* spp. na soroglutinação microscópica em cervídeos.

	AND	AUS	AUT	BRA	BUT	CAN	CAS	COP	GRI	HAR	ICT	JAV	PAN	POM	PYR	WOL
AND																
AUS	-0,004															
AUT	0,100	0,085														
BRA	0,480	0,428	0,231													
BUT	-0,001	0,000	0,107	0,325												
CAN	-0,004	-0,009	0,042	-0,012	0,000											
CAS	0,155	-0,008	0,087	0,260	0,096	0,196										
COP	0,454	-0,012	0,190	0,530	0,004	0,406	0,294									
GRI	0,254	0,223	0,206	0,121	0,272	-0,011	0,275	0,221								
HAR	0,002	-0,008	0,224	0,152	0,006	0,126	0,385	0,231	0,081							
ICT	-0,003	-0,012	0,170	0,666	0,002	-0,012	0,160	0,444	-0,031	0,242						
JAV	-0,001	0,000	0,061	0,004	0,000	0,715	0,096	0,004	0,004	0,089	0,002					
PAN	-0,001	0,715	0,061	0,509	0,000	0,000	0,006	0,004	0,004	0,006	0,473	0,000				
POM	-0,002	-0,012	0,154	0,311	0,402	0,320	0,193	-0,037	0,149	0,178	0,243	0,402	0,003			
PYR	0,370	-0,011	0,190	0,600	0,244	-0,011	0,415	0,515	0,083	0,461	0,466	0,005	0,005	0,132		
WOL	-0,004	0,572	0,093	0,283	0,000	-0,007	0,081	0,266	0,238	0,074	-0,008	0,000	0,000	-0,007	0,214	

Apêndice D: Coeficiente *Kappa* e limites do IC 95% obtidos entre sorovariedades de *Leptospira* spp., em suínos

Tabela 1D: Limite inferior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de *Leptospira* spp. na soroaaglutinação microscópica em suínos.

	AND	AUT	BRA	CAS	COP	HAR	ICT	PYR	SEN	SHE
AND										
AUT	-0,0296									
BRA	-0,0303	0,0103								
CAS	-0,1459	-0,0824	-0,0656							
COP	-0,0125	-0,0296	-0,0303	-0,0217						
HAR	-0,0197	-0,0724	-0,0316	-0,0322	-0,0197					
ICT	-0,0274	-0,1208	-0,0254	-0,0567	-0,1091	-0,0493				
PYR	-0,0125	-0,0296	-0,0303	-0,0217	-0,0125	-0,0197	-0,0274			
SEN	-0,0267	-0,1066	0,0276	-0,0474	-0,0267	-0,0466	-0,1363	-0,0267		
SHE	-0,0232	-0,0823	-0,0911	-0,0396	-0,0232	-0,0355	-0,0629	-0,0232	-0,0585	

Tabela 2D: Coeficiente kappa médio entre sorovariedades de *Leptospira* spp. na soroaaglutinação microscópica em suínos.

	AND	AUT	BRA	CAS	COP	HAR	ICT	PYR	SEN	SHE
AND										
AUT	-0,0102									
BRA	-0,0103	0,1576								
CAS	0,3950	0,0249	-0,0031							
COP	-0,0052	-0,0102	-0,0103	-0,0084						
HAR	-0,0079	0,0352	0,0445	-0,0182	-0,0079					
ICT	-0,0097	0,0100	0,0957	-0,0323	0,1456	-0,0256				
PYR	-0,0052	-0,0102	-0,0103	-0,0084	-0,0052	-0,0079	-0,0097			
SEN	-0,0096	0,0272	0,1517	0,2638	-0,0096	-0,0246	0,0361	-0,0096		
SHE	-0,0088	-0,0465	-0,0499	-0,0237	-0,0088	-0,0199	-0,0382	-0,0088	-0,0360	

Tabela 3D: Limite superior do intervalo de confiança de 95% de kappa entre sorovariedades de *Leptospira* spp. na soroaaglutinação microscópica em suínos.

	AND	AUT	BRA	CAS	COP	HAR	ICT	PYR	SEN	SHE
AND										
AUT	0,009									
BRA	0,010	0,305								
CAS	0,936	0,132	0,059							
COP	0,002	0,009	0,010	0,005						
HAR	0,004	0,143	0,121	-0,004	0,004					
ICT	0,008	0,141	0,217	-0,008	0,400	-0,002				
PYR	0,002	0,009	0,010	0,005	0,002	0,004	0,008			
SEN	0,008	0,161	0,276	0,575	0,008	-0,003	0,209	0,008		
SHE	0,006	-0,011	-0,860	-0,008	0,006	-0,004	-0,013	0,006	-0,014	