

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA

**ISOLAMENTO DE *LEPTOSPIRA HARDJO* EM REBANHO
BOVINO COM PROBLEMAS DE REPRODUÇÃO**

MARIA HELENA FRANCO MORAIS

Belo Horizonte
1994

MARIA HELENA FRANCO MORAIS

**ISOLAMENTO DE *LEPTOSPIRA HARDJO* EM REBANHO
BOVINO COM PROBLEMAS DE REPRODUÇÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Medicina Veterinária.

Área: Epidemiologia

Orientador: Prof. Elvio Carlos
Moreira

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1994

m827i Morais, Maria Helena Franco, 1967-

Isolamento de *Leptospira hardjo* em rebanho bovino com problemas de reprodução/Maria Helena Franco Morais.- Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1994.

56p. : il.

Dissertação(Mestrado)

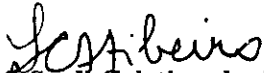
1-Bovino-Doenças-teses.2-*Leptospira*
-Identificação-teses. I.Título.

CDD-636.208 969 2

Dissertação defendida e aprovada em 30/08/94, pela Comissão
Examinadora constituída por:



Prof. Elvio Carlos Moreira
Orientador



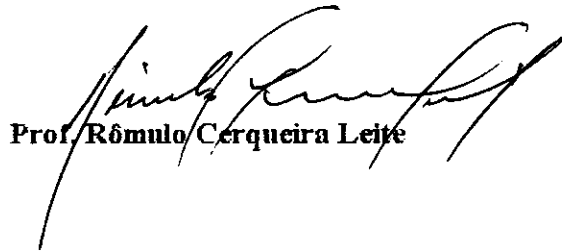
Prof. Sueli Cristina de Almeida Ribeiro



Prof. José Lúcio dos Santos



Prof. Vera Lúcia Viegas Abreu



Prof. Rômulo Cerqueira Leite

Aos meus queridos pais,
Terezinha e Antônio,
com o mesmo amor que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho e por todas as boas amizades conquistadas neste período;

Agradeço aos bons amigos e companheiros de trabalho: Prof. Elvino Carlos Moreira, Antônio Benjamin de Paula, Maria Carmen de Rezende Costa, Isabela Farnezi Veloso, João Paulo Haddad e Livia Nair Casagrande, a grande ajuda na realização deste projeto, fazendo com que mesmo os momentos mais difíceis e pesados fossem transpostos de maneira agradável e prazerosa;

À Prof. Vera Lúcia Viegas de Abreu e ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite pela atenção e ajuda durante toda a elaboração deste projeto;

À Médica Veterinária Cláudia Menecucci Teixeira pela utilização da fazenda e pela grande ajuda nas intermináveis coletas de material, assim como a todos os funcionários da fazenda: Rafael Rezende Faleiros, Marcelo Yukio Kuabara, Edirley Oliveira Maia, Hely Rodrigues da Cruz, José Diego de Lacerda;

À Nádia Maria da Silva pela paciência e ajuda na utilização dos microcomputadores;

À todos os colegas e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva pela atenção e companhia de que compartilhei este tempo todo;

À Hans Korver, Microbiologista do Royal Tropical Institute, Holanda, pela identificação final das leptospiros;

E agradeço também, como não poderia deixar de ser, ao meu noivo Sérgio, por toda a dedicação e carinho com que tem me acompanhado desde muito antes desta empreitada.

“O tempo muito ensinou.
Ensinou amar a vida.
Não desistir da luta.
Recomeçar na derrota.
Renunciar palavras e pensamentos negativos.
Acreditar nos valores humanos.
Ser otimista.

* * *

Acredito nos moços.
Exalto sua confiança, generosidade e idealismo.
Creio nos milagres da ciência e na descoberta de uma profilaxia
futura dos erros e violência do presente.
Aprendi que mais vale lutar do que recolher dinheiro fácil.
Antes acreditar do que duvidar.”

Cora Coralina

SUMÁRIO

	página
1 INTRODUÇÃO	19
2 LITERATURA CONSULTADA	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Seleção da fazenda	29
3.2 Local	29
3.3 Características do rebanho	30
3.4 Pesquisa e isolamento de leptospiras	31
3.5 Testes sorológicos	33
4 RESULTADOS	35
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	47
7 SUMMARY	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS**página**

TABELA 1	Percentual de bovinos positivos de acordo com as sorovariedades de 07/06/91 a 01/12/93. Fazenda Cantagalo - Pitangui - Minas Gerais.....	39
TABELA 2	Títulos de aglutininas anti-leptospiras de acordo com as sorovariedades de 07/06/91 a 01/12/93. Fazenda Cantagalo - Pitangui - Minas Gerais.....	41

LISTA DE FIGURAS**página**

FIGURA 1	Resultado da reação de Polimerase em Cadeia (PCR) com amostras <i>L. norma</i> isolada de bovino na Fazenda Cantagalo, Pitangui, Minas Gerais.....	37
FIGURA 2	Comparação de <i>L. norma</i> com o painel de anticorpos monoclonais do sorogrupo Sejroe.....	38
FIGURA 3	Percentual de bovinos positivos de acordo com as sorovariedades.....	40
FIGURA 4	Títulos de aglutininas anti-leptospiras de acordo com as sorovariedades.....	42

RESUMO

Com o objetivo de verificar a ocorrência da *Leptospira hardjo* no país, pesquisou-se sua presença em rebanho bovino leiteiro com problemas de reprodução e 132 (41,8%) dos bovinos reagentes para esta sorovariedade ao teste de MAR. A realização do primeiro isolamento e tipificação de *hardjo*, genótipo hardjoprajtino (CTG), comprova sua presença em casos clínicos de leptospirose bovina no país. Os resultados da soroaglutinação mostraram menor número de soros reagentes frente à amostra isolada *hardjo* (CTG), quando comparada à amostra de referência *hardjo* (OMS) e existência de reações cruzadas entre *hardjo* e *wolffi*, ambas do sorogrupo Sejroe.

PALAVRAS-CHAVES: isolamento, *hardjo*, bovinos.

1 INTRODUÇÃO

Teoricamente, as diversas sorovariedades de leptospiros pertencentes à espécie *L. interrogans* podem infectar indiferentemente qualquer animal ou o homem. Na realidade, o que se observa é a ocorrência de uma seleção de algumas sorovariedades que passam a infectar com maior frequência determinadas espécies animais.

Entre os bovinos, a sorovariedade *pomona* já foi incriminada como a *Leptospira* de maior importância. Atualmente, a *Leptospira hardjo* tem sido apontada como mais prevalente e também, mais patogênica entre os bovinos.

A *Leptospira hardjo* foi isolada pela primeira vez em 1938, na cidade de Sumatra, Indonésia. O isolamento se deu a partir de amostra sanguínea obtida durante a ocorrência clínica da doença em um trabalhador javanês, cujo nome era Hardjoprajtino. Em 1952, ocorreu o reconhecimento da cepa hardjoprajtino como uma nova sorovariedade (SULLIVAN, 1970). Atualmente, é conhecida pela abreviatura *hardjo* com a cepa de referência hardjoprajtino.

O isolamento de *Leptospira* sp em rebanho bovino infectado, além de ser o diagnóstico de confirmação da infecção animal, com certeza é um passo muito importante para implementação de programas de controle da enfermidade, já que a inclusão de sorovariedades autóctones nas vacinas utilizadas poderá induzir uma imunidade mais efetiva ao rebanho.

Tendo em vista a importância econômica da leptospirose, uma das principais doenças infecto-contagiosas que afetam animais, o seu

controle certamente levará a aumentos dos índices de produção e produtividade animal.

Na implantação de programas de controle e erradicação da doença, o levantamento das sorovariedades mais prevalentes da região, por meio de levantamentos sorológicos, também é medida importante, já que não ocorre imunidade cruzada entre as diferentes sorovariedades e a realização do isolamento tem-se mostrado muito difícil.

No Brasil, apesar de existirem vários trabalhos de levantamentos sorológicos, associados a achados clínicos, não se tem obtido êxito quanto ao isolamento e tipificação da *hardjo* a partir de bovinos infectados.

O objetivo deste trabalho foi isolar e tipificar *Leptospira hardjo* de animais de rebanhos que apresentem aglutininas anti-leptospiras.

2 LITERATURA CONSULTADA

No Brasil, os primeiros trabalhos publicados sobre leptospirose são referentes à pesquisa da doença no homem, realizados por BENTES, ARAGÃO e Mc DOWELL em 1917 (ap. CORREA & MEARIN, 1971). Os primeiros trabalhos com animais domésticos datam de 1940, realizado em cães por DACORSO FILHO e AZEVEDO & SANTOS (ap. SANTA ROSA et al., 1969).

Em bovinos, a infecção foi detectada pela primeira vez em São Paulo, em 1957, por FREITAS et al. que isolaram *pomona* de um feto abortado.

GUIDA & BARROS (1958) encontraram animais sorologicamente positivos frente à *bataviae* e *pomona* entre bovinos de várias procedências, sacrificados em matadouros.

Em 1959, GUIDA et al. examinaram soros de 763 vacas oriundas de rebanhos com problemas de aborto e sorologicamente negativos para brucelose. Os resultados mostraram reações sorológicas positivas frente à *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *grippotyphosa* e com menor prevalência, *canicola*.

LACERDA et al. (1960) apresentaram em sua pesquisa dados sorológicos, anátomo-patológicos e bacteriológicos que confirmaram a presença da sorovariedade *pomona* no conjunto etiológico das leptospiroses no Brasil.

ROTH & GALTON (1960), no Estado da Louisiana, Estados Unidos, realizaram o primeiro isolamento da *hardjo* em bovinos. Até então, *pomona* era considerado o principal agente etiológico

das leptospiroses nos Estados Unidos. Ao mesmo tempo, vários trabalhos de levantamentos sorológicos realizados em bovinos, demonstravam a presença de anticorpos contra *sejroe*, uma sorovariedade pertencente ao mesmo sorogrupo ao qual pertence a *hardjo*. Os autores pesquisaram em um rebanho bovino a presença de aglutininas anti *pomona* e *sejroe*. Como resultado, obtiveram maior prevalência de *pomona*, mas também, dois animais negativos frente à mesma e com altos títulos aglutinantes frente à *sejroe*. No entanto, ao exame de absorção de aglutininas, o resultado foi negativo para as duas sorovariedades. A urina destes animais foi inoculada em bezerros saudáveis. O isolamento da *hardjo* foi realizado a partir de amostras de sangue coletadas dos bezerros entre o quarto e o nono dias após inoculação da urina.

SANTA ROSA et al. (1961) isolaram *icterohaemorrhagiae* de um feto bovino abortado por um animal aos quatro meses de gestação e que posteriormente apresentou icterícia e hemoglobinúria, morrendo 15 dias depois.

A primeira referência em Minas Gerais é de BARBOSA (1962) que verificou, por meio de exames sorológicos, *pomona* como a sorovariedade mais prevalente em bovinos.

SANTA ROSA et al. (1969), em levantamento realizado no período de 1960 a 1968, observaram prevalência de 23,6% de reações sorológicas positivas entre os bovinos, com predominância da sorovariedade *wolffi*.

SULLIVAN & STALLMAN (1969), em Queensland, Austrália, durante investigação sorológica de um rebanho frente à *hyos* e *pomona*, encontraram uma novilha sorologicamente negativa eliminando grande quantidade de leptospiras viáveis na urina. Ao ser testada sorologicamente contra *hardjo*, apresentou títulos 1:30.000. Os pesquisadores conseguiram isolar *hardjo* de amostras de urina deste animal. Foi o primeiro isolamento da *hardjo* na Austrália e os autores consideraram que o pequeno número de

isolamentos obtidos em relação ao número de tentativas iniciais, deveu-se à sensibilidade e exigência da *hardjo* quanto à sua manutenção em laboratório. O restante do rebanho também apresentou alta prevalência de aglutininas contra *hardjo* em exames sorológicos subsequentes.

Em São Manuel, Estado de São Paulo, CORRÊA et al. (1972) realizaram inquérito sorológico para brucelose e leptospirose, e encontraram em 53% das granjas leiteiras, animais reagentes à leptospiras, sendo *wolffi* a sorovariedade mais prevalente.

REIS et al. (1973), pesquisaram a presença de aglutininas anti-leptospiras em bovinos e suínos em Minas Gerais. Foram analisados 23 rebanhos bovinos, com um total de 720 amostras de soro. Destas, 39 apresentaram resultados positivos (5,4%) e a sorovariedade mais prevalente foi *hebdomadis* (89,7%), seguido das sorovarietades *pomona* e *australis* (5,12%).

Durante o ano de 1973, TERUYA et al. (1974) examinaram soros sanguíneos de várias espécies animais, oriundos de diversos Estados do Brasil. Os resultados mostraram maior prevalência de *wolffi* (15,42%) entre os bovinos.

WILLIAMS et al. (1975), examinaram clínica e sorologicamente, 63 bovinos de uma propriedade no Rio Grande do Sul, onde ocorreram 22 abortos. Dezesete dos animais que abortaram apresentaram sorologia positiva para *sejroe*, com maior prevalência, seguida de *wolffi*, *hardjo* e *pomona*.

No Rio de Janeiro, em trabalho realizado por CORDEIRO et al. (1975), a fim de verificar a presença de aglutininas anti-leptospiras no soro de bovinos, observou-se maior prevalência da sorovariedade *wolffi* (10,88%).

MYERS & JELAMBI (1975), realizaram um estudo para o estabelecimento da prevalência da leptospirose em bovinos na

Argentina. Foram coletadas 1857 amostras sanguíneas e os exames sorológicos mostraram presença de aglutininas anti-leptospiras em 59,1% dos soros testados. A sorovariedade *hardjo* apresentou a maior prevalência (45,8%), com títulos variando de 1:100 a 1:25.600. Foram realizados seis isolamentos em rins de bovinos coletados em abatedouros locais e tipificados como *hardjo*. Foi o primeiro isolamento desta sorovariedade na Argentina e segundo os autores, os seis isolamentos obtidos a partir de 161 rins de bovinos processados, demonstram a dificuldade existente no processo de isolamento da *hardjo*.

VAZ & OLIVEIRA (1978) pesquisaram presença de aglutininas anti-leptospiras em touros usados em inseminação artificial no Rio Grande do Sul. Foram detectados 38 animais positivos, entre 71 examinados. Os títulos encontrados variaram entre 1:100 e 1:3.200 e as sorovariedades predominantes foram *sejroe* e *wolffi*.

ÁVILA et al. (1978), no município de Jaboticabal, São Paulo, examinaram soros de 474 bovinos, com o teste de microaglutinação rápida para leptospiras. Destes, 130 (27,4%) mostraram-se positivos para uma ou mais sorovariedades. A sorovariedade mais prevalente foi *wolffi* (60,7%).

Em Minas Gerais, MOREIRA et al. (1979), analisaram 6429 amostras de soros bovinos de ambos os sexos, oriundos de várias regiões de Estado. Os soros foram divididos em dois grupos (I e II) e testados frente à uma bateria com seis sorovariedades de leptospiras. No grupo I (3727 amostras), observou-se maior prevalência de *pomona* (16,29%), seguida de *wolffi* (12,10%) e *hardjo* (11,11%). No grupo II, a sorovariedade mais prevalente foi *wolffi* (27,83%), seguida de *hardjo* (24,12%) e *pomona* (11,55%).

SANTA ROSA et al. (1980), examinaram 500 rins de bovinos aparentemente saudáveis, oriundos de diferentes Estados. Conseguiram realizar o isolamento de duas novas sorovariedades de leptospiras,

pertencentes ao sorogrupo *Hebdomadis* que foram denominadas *guaicururus* e *goiano*.

Com o objetivo de determinar a frequência de aglutininas anti-leptospiras em bovinos da região do cerrado no sul do Estado do Mato Grosso, MADRUGA et al. (1980), obtiveram amostras sanguíneas de 670 bovinos, em 62 propriedades distribuídas em nove municípios. O sorogrupo que apresentou maior frequência de títulos aglutinantes foi *Hebdomadis*, com 216 animais (40,6%) reagentes a *hardjo*, 214 (40,6%) a *sejroe*, 202 (30,6%) a *wolffi* e 32 (4,8%) a *hebdomadis*.

No Rio Grande do Sul, OLIVEIRA et al. (1980) realizaram um levantamento sorológico em rebanho bovino com problemas reprodutivos e encontraram títulos variando de 1:50 a 1:3.200 para *hardjo* e de 1:400 a 1:800 para *wolffi*. A partir de amostra de sangue de um animal soro-positivo realizaram isolamento de *Leptospira* sp., pertencente ao sorogrupo *Hebdomadis*. Segundo os autores, este trabalho confirma a exigência da *hardjo* quanto ao crescimento em meios de cultura, já que também foi obtida baixa porcentagem de isolamentos.

Na Colômbia, AYCARDI et al. (1980) isolaram *hardjo* pela primeira vez no país. Os isolamentos foram obtidos de bovinos que apresentaram títulos sorológicos baixos, entre 1:100 a 1:200. Segundo os autores, este trabalho confirma a evidência sorológica de que a *hardjo* é a mais importante causadora das leptospiroses em bovinos de corte criados extensivamente naquela região do país.

GIORGI et al. (1981) , num período de sete anos, examinaram 100.080 soros contra leptospirose, pertencentes a várias espécies e oriundos dos Estados de Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Pará. Com relação aos bovinos, os resultados mostraram mais de 50% dos soros positivos reagentes frente à *wolffi*. Observaram também, em várias regiões em que foi constatada esta

sorovariedade, que não havia qualquer sinal clínico da doença, estando os animais aparentemente normais. O que se observa neste e em outros trabalhos de levantamento sorológico citados anteriormente onde a sorovariedade *wolffi* resultou a mais prevalente, é a não inclusão da *hardjo* na bateria de antígenos utilizada.

Vários autores (AYCARDI et al., 1980, ELLIS et al., 1981, ELLIS et al., 1982, THIERMANN, 1982) relataram que *hardjo* tem sido frequentemente isolada de animais soronegativos ou com títulos aglutinantes muito baixos.

Os levantamentos sorológicos são boa medida para avaliação da doença no rebanho. O diagnóstico conclusivo necessita do isolamento do agente, já que existe uma correlação baixa entre o estado de portador e a presença de soroaglutininas, principalmente no caso de infecção por *hardjo* (ELLIS et al., 1981).

DÓRIA et al. (1982), coletaram 1666 amostras de soro bovino de 18 municípios do Estado da Bahia, abrangendo 34 propriedades. As amostras foram submetidas a exame sorológico frente a uma bateria de dezessete sorovariedades de leptospiros. Como resultado, obteve-se em 69,09% dos soros, reação negativa e em 30,01% reação positiva. A sorovariedade mais prevalente foi *wolffi* (48,47%), com títulos variando entre 1:100 a 1:6.400.

AYCARDI et al. (1982) e GIRIO & MATHIAS (1988), relataram a ocorrência de aglutininas anti-*wolffi* respectivamente em bovinos e cobaios, inoculados com cepa pura de *hardjo*.

WHITE et al. (1982) obtiveram amostras de sangue e rins de 306 bovinos abatidos, para realização de estudos microbiológicos e sorológicos sobre a ocorrência da leptospirose bovina na Flórida. Obtiveram uma taxa de isolamento de leptospiros de 26,8% a partir dos animais examinados, enquanto a sorologia demonstrou que 71,2% dos mesmos apresentaram títulos sorológicos de 1:100 ou

maior. O principal problema observado pelos pesquisadores na realização deste trabalho foi exatamente a adaptação e manutenção em laboratório das amostras isoladas que pertenciam ao sorogrupo *Hebdomadis* (*hardjo* e *balcanica*).

RIBEIRO (1983), em trabalho realizado em uma fazenda de gado de corte em Minas Gerais, observou que 53,3% dos bovinos examinados apresentaram aglutininas anti-leptospiras, com maior prevalência para *hardjo* (31,7%). No mesmo estudo, entre 18 vacas que abortaram no ano de 1977, 77,8% apresentaram reação sorológica positiva frente à *hardjo* e no ano seguinte, o fato se repetiu com 91,7% de positividade para *hardjo* entre 12 animais que abortaram.

O isolamento da *Leptospira* sp. em bovinos infectados a partir de tecidos ou secreções contaminadas é o diagnóstico de confirmação da ocorrência de infecção animal, pressuposta a partir da observação de sintomas clínicos e/ou resultado positivo frente ao teste sorológico (EGAN & O'REILLY, 1985).

Segundo ELLIS (1984), muitos aspectos da leptospirose bovina ainda não estão bem definidos. No rebanho bovino das regiões tropicais e subtropicais a literatura mostra, por meio de levantamentos sorológicos que a leptospirose se encontra amplamente difundida, mas poucos estudos microbiológicos ou clínicos têm sido descritos.

Em trabalho de levantamento sorológico para leptospirose realizado por ABUCHAIM & DUTRA (1985), na bacia leiteira de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, pode-se concluir que a leptospirose está presente no rebanho de leite da Grande Porto Alegre como infecção, numa prevalência de 49,8%, sendo *hardjo* a mais prevalente em três dos quatro municípios estudados.

ZAMORA et al. (1988), realizaram exames sorológicos e bacteriológicos para leptospirose em 82 bovinos aparentemente

sadios, abatidos em Valdivia , Chile. O resultado sorológico demonstrou que 43,9% dos animais eram positivos, sendo *hardjo* a sorovarietade mais prevalente (72,2%). Nos exames bacteriológicos, conseguiram isolar *hardjo* dos rins de dois animais. Na sorologia, um destes animais foi positivo com título 1:100 frente à *hardjo*, enquanto o outro apresentou resultado negativo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DA FAZENDA

Em maio de 1991, com o acompanhamento da rotina de exames de leptospiroses em bovinos, realizados no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (D.M.V.P.) da Universidade Federal de Minas Gerais (U.F.M.G.), foi detectada uma fazenda com animais apresentando altos títulos aglutinantes frente à *hardjo*, além de problemas reprodutivos como abortos, natimortos, nascimentos de crias fracas com icterícia, repetições de cio e mamites.

3.2 LOCAL

A fazenda selecionada se localiza no município de Pitangui, Estado de Minas Gerais. O município pertence à Mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte e Microrregião de Pará de Minas. Está situado a 130 Km de Belo Horizonte, com altitude média de 630 metros acima do nível do mar e coordenadas geográficas de 19° 40' 24" de latitude sul e 44° 52' 32" de longitude oeste (FIBGE, 1982). Possui área total de 563 km² e densidade demográfica de 35,83 hab/Km². Em 1991, a população total era de 20173 habitantes, sendo 16005 residentes na área urbana e 4168 na área rural, segundo FIBGE (1991).

A propriedade, de 295 hectares de área, fica próxima do Rio Pará e possui topografia acidentada com áreas de várzea. Os dados climáticos são típicos da região do cerrado mineiro com período quente e chuvoso nos meses de outubro a abril, e período seco de maio a setembro. A temperatura média anual observada durante o

período de 1980 a 1990 foi de 24° C, segundo o Instituto Regional de Meteorologia de Belo Horizonte do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. O sistema de produção empregado era o de produção leiteira do tipo empresarial.

3.3 CARACTERÍSTICAS DO REBANHO

O rebanho bovino da fazenda era constituído, à época, de Gado Pardo Suíço (Puro de Origem Importado / POI e Puro de Origem / PO) e mestiço (Holandez x Zebu, Pardo Suíço x Zebu). A fazenda utilizava as técnicas de Transferência de Embriões e Inseminação Artificial para renovação do plantel e venda de novilhas e tourinhos puros. No início da pesquisa, em 07/06/91 existiam 316 bovinos na propriedade.

Com bases nos resultados observados nos exames sorológicos que possibilitaram a detecção da fazenda, pôde-se selecionar 30 vacas que apresentaram altos títulos sorológicos frente à *hardjo* e histórico de problemas reprodutivos. Este grupo foi submetido à coleta de urina para pesquisa de leptospiras e posteriormente foram tratadas com 25 mg/Kg_{pv} de estreptomicina e vacinadas com vacina produzida no D.M.V.P. da Escola de Veterinária, que continha as sorovarietades que se mostraram mais prevalentes no mesmo exame. Este tratamento foi realizado visando o controle da leptospirose na fazenda, uma vez que o sistema de produção empregado tinha como objetivo a obtenção de ganhos econômicos a partir da produtividade animal. Este grupo de animais foi submetido à dez coletas de urina, que foram realizadas com intervalos de aproximadamente dois meses. Nas mesmas datas, foram realizadas coletas de sangue de todo o rebanho para a realização dos exames de leptospirose, além das duas últimas coletas onde somente se obteve amostras de sangue.

3.4 PESQUISA E ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS

Trabalhou-se com amostras de urina coletadas em frascos de 100 ml esterilizados. A urina era obtida após massagem na região do períneo, desprezando-se o jato inicial.

A pesquisa de leptospiiras na urina foi feita por meio de microscopia direta com objetiva 40 x, ocular 10 x e condensador de campo escuro a seco. Foram examinados os sedimentos de amostras de 20 ml de urina, após centrifugação em centrífuga com coroa de 12 centímetros de diâmetro, a 1000 rpm durante 10 minutos.

Para o isolamento de leptospiiras, a urina era imediatamente diluída a 1:10 em solução salina tamponada estéril. Após repouso de uma hora, semeou-se 0,5 ml desta diluição em duas séries de cinco tubos cada, contendo meios de Fletcher (MYERS, 1985) e EMJH modificado (ELLINGHAUSEN & McCULLOUGH, 1965) adicionados de 30 mcg de neomicina conforme metodologia proposta por MYERS (1985).

Esta parte do experimento foi realizada em laboratório montado na própria fazenda. No Laboratório de Zoonoses do D.M.V.P., os tubos contendo as culturas foram incubados em estufa a 28° C e passaram à observação semanal em microscópio de campo escuro com condensador à seco para detecção de crescimento de leptospiiras.

Os tubos nos quais se observou crescimento de leptospiiras, foram submetidos à descontaminação por meio das técnicas descritas por MYERS (1985). Foram utilizadas as técnicas de diluição, filtração e inoculação em animais de laboratório.

A técnica de diluição consiste em produzir diluições decimais (10^{-1} a 10^{-8}) do cultivo contaminado. Isto foi feito com a transferência de 0,5 ml da cultura a ser diluída para um tubo com 4,5 ml de solução salina tamponada e posterior homogeneização. Este procedimento

foi repetido, utilizando-se sempre pipetas estéreis para cada diluição, até a obtenção das oito diluições. Em seguida, inoculou-se 0,5 ml de cada diluição em dois tubos de ensaio contendo meio de Fletcher, sendo um tubo previamente tratado com 30 mcg de neomicina. O mesmo procedimento foi realizado para tubos contendo meio de EMJH modificado. Após homogeneização, estes novos cultivos foram incubados a 28° C e examinados diariamente para observação de crescimento de leptospiras.

Como as leptospiras, e não outras bactérias, podem atravessar membranas filtrantes com poros de 0,22 e 0,45 μ m (*Milipore* 0,22 ou 0,45 μ m de porosidade com 4,5 centímetros de diâmetro) pode-se realizar a descontaminação de culturas utilizando-se a técnica de filtração. Para isto, colocou-se 0,5 ml de meio líquido sobre placa de petri estéril e sobre este, um disco de filtro, também estéril. Após a absorção do líquido pela membrana do filtro, depositou-se 0,5 ml da cultura contaminada sobre o centro da membrana filtrante. Tampou-se a placa de petri, mantendo-a em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas. Após este período, o material filtrado foi coletado com pipeta de Pasteur estéril e inoculado em duas séries de tubos com meios de Fletcher e EMJH modificado, incubado à 28° C e observado diariamente para verificação de crescimento de leptospiras.

Outra maneira de se isolar leptospiras de cultivos contaminados é a utilização de animais de laboratório. Isto é possível devido ao fato das leptospiras invadirem a corrente sanguínea rapidamente após a inoculação intraperitoneal enquanto as outras bactérias patógenas necessitam de período maior de tempo. Foram utilizados hamsters de 21 dias com inóculo de 0,5 a 1,0 ml de cultura contaminada. A partir de dez minutos após a inoculação, foram tomadas amostras sanguíneas por punção cardíaca e inoculou-se uma gota de sangue em duas séries de cinco tubos de ensaio contendo meio de Fletcher e EMJH modificado. Os tubos foram incubados à 28 ° C e observados diariamente.

Após purificação, as leptospiiras isoladas passaram a fazer parte da bateria de antígenos utilizada nos testes sorológicos a fim de se obter uma identificação preliminar dos sorogrupos envolvidos. Posteriormente foram enviadas para tipificação final ao Royal Tropical Institute (KIT), 39 Meibergdreef 1105 A2, Amsterdam, Holanda, Laboratório Internacional de Referência da Organização Internacional de Epizootia, credenciado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Mundial de Agricultura e Alimentos (FAO).

3.5 TESTES SOROLÓGICOS

Para prova sorológica foram utilizados como antígenos, culturas vivas das sorovarietades *hardjo/hardjoprajitno* e *wolffi/3705*, pertencentes ao sorogrupo Sejroe, fornecidas pelo Centro Panamericano de Zoonoses. As culturas são mantidas em meio de EMJH modificado e utilizadas após cinco a sete dias de crescimento, com aproximadamente 100 microorganismos vivos por campo microscópico de 400 vezes de aumento, sem autoaglutinação, sem contaminação e com mobilidade.

A pesquisa de aglutininas anti-leptospiiras foi feita utilizando-se o Método de Microaglutinação Rápida (MAR) descrito por RYU (1970). Os soros bovinos a serem testados foram diluídos a 1:50 em solução salina tamponada estéril. Desta diluição tomou-se uma gota de aproximadamente 0,05 ml, que foi colocada em placa de porcelana escavada à qual acrescentou-se o mesmo volume de antígeno, chegando-se à diluição final de 1:100. A placa foi então agitada e colocada em repouso por seis a oito minutos, em temperatura ambiente. Após este período, com uma alça de platina tomava-se uma gota da mistura que foi colocada sobre lâmina de vidro (7,5 x 2,5) e examinada em microscópio de campo escuro com condensador à seco, oculares de 10 x e objetivas de 16 x.

O critério utilizado para leitura foi descrito por GALTON et al. (1962), onde o grau de aglutinação e lise é dado em cruces,

variando de negativo até quatro cruze. A reação quatro cruze (4+) ocorre quando cerca de 100% das leptospiras no campo estão aglutinadas. A reação três cruze (3+), quando há aproximadamente 75% de aglutinação das leptospiras no campo. A reação duas cruze (2+) ocorre quando aproximadamente 50% dos microorganismos no campo se encontram aglutinados. Por fim, a reação uma cruz (1+), ocorre com aproximadamente 25% de aglutinação das leptospiras no campo. Os soros são considerados positivos quando ocorre, no mínimo, 50% de aglutinação, ou seja, a partir da reação duas cruze.

4 RESULTADOS

Na primeira coleta de urina, 18 amostras foram positivas ao exame direto em microscópio de campo escuro. Na coleta seguinte, em 13/08/91, 11 vacas ainda se mostraram positivas, mesmo após o primeiro tratamento, ao exame direto da urina realizado na própria fazenda e foram tratadas novamente com dose única de 25 mg/KPV de estreptomicina. Após esta data, todas as amostras de urina obtidas foram negativas aos exames diretos e nas culturas para isolamento.

As amostras de urina semeadas nos tubos contendo meio de Fletcher, resultaram negativas para isolamento de *Leptospira* sp. Entre os tubos contendo meio de EMJH modificado, houve crescimento de leptospiros em 13 frascos semeados com amostras de urina da primeira coleta.

Conseguiu-se a purificação de uma amostra que foi denominada *L. norma* e tipificada como *hardjo* genótipo *hardjoprajitno* (CTG) do sorogrupo *Sejroe*, por KORVER (1993)* (Figura 1 e Gráfico 1).

O isolamento foi realizado utilizando-se a técnica de passagem em hamsters para descontaminação das culturas com isolamento primário. As técnicas de filtração e diluição não apresentaram resultados satisfatórios para a descontaminação das culturas com crescimento primário de leptospiros.

*KORVER, H. Investigations leptospirosis. Carta enviada em 20/08/93 ao professor Elvio Carlos Moreira. (Royal Tropical Institute. N. H. Swellengrebel Laboratory of Tropical Hygiene. 39 Meibergdreef 1105 A2 Amsterdam The Netherlands).

Os resultados dos exames com *hardjo* (CTG), mostram menor número de soros positivos (Tabela 1 e Gráfico 2), assim como, títulos mais baixos, quando comparados com os resultados obtidos para *hardjo* (OMS) e *wolffi* (Tabela 2 e Gráfico 3).

SorovarietadeAmostra Referência

- | | |
|-----------------------|-------------------|
| 1. <i>copenhageni</i> | Wijnberg |
| 2. <i>hardjo</i> | Hardjoprajitno |
| 3. <i>hardjo</i> | Hardjobovis |
| 4. <i>hardjo</i> | L. norma (Brasil) |
| 5. <i>ballum</i> | Mus 127 |
| 6. <i>coxi</i> | Cox |
| 7. <i>georgia</i> | LT 117 |
| 8. <i>tarassovi</i> | Perepelicin |
| 9. controle | Negativo |
| 10. controle | Negativo |

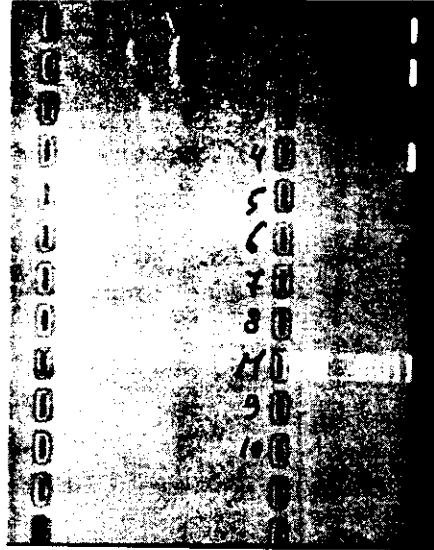
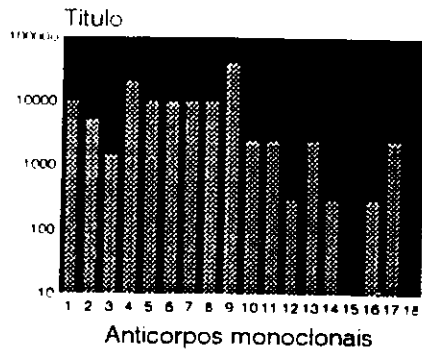


FIGURA 1 Resultado da reação de Polimerase em Cadeia (PCR) com amostras *L. norma* isolada de bovino na Fazenda Cantagalo, Pitangui, Minas Gerais.

Fonte: Hans Kover. Royal Tropical Institute (KIT)
39. Meibergdreef
1105 AZ Amsterdam
The Netherlands

**Painel de anticorpos monoclonais para
L. norma (Brasil)/sorovariedade hardjo**



**Painel de anticorpos monoclonais para
Hardjoprajitno / sorovariedade hardjo**

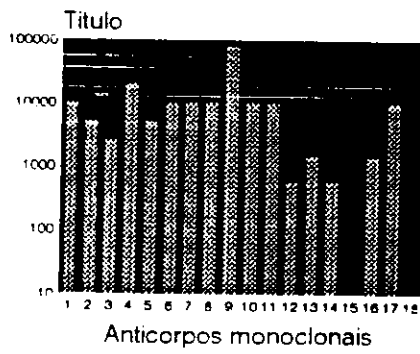


GRÁFICO 1 Comparação de *L. norma* com o painel de anticorpos monoclonais do sorogrupo SEJROE

TABELA 1 Percentual de bovinos positivos de acordo com as sorovarietades no período de 07/06/91 a 01/12/93. Fazenda Cantagalo - Pitangui - Minas Gerais

Data	hardjo (OMS)	hardjo (CTG)	wolffi
1991			
07/06	41,8%	ND	38,6%
13/08	33,2%	25,4%	30,2%
10/10	33,3%	23,5%	31,5%
09/12	31,1%	25,5%	29,0%
1992			
04/02	40,0%	26,9%	39,5%
07/04	26,7%	24,1%	20,6%
22/06	30,5%	27,0%	22,3%
20/10	12,0%	11,1%	14,2%
1993			
04/02	3,4%	1,4%	5,8%
29/04	4,9%	4,0%	3,1%
30/06	7,9%	7,0%	4,4%
01/12	1,6%	1,6%	2,4%

ND - Não determinado

GRÁFICO 2 Percentual de bovinos positivos de acordo com as sorovariiedades

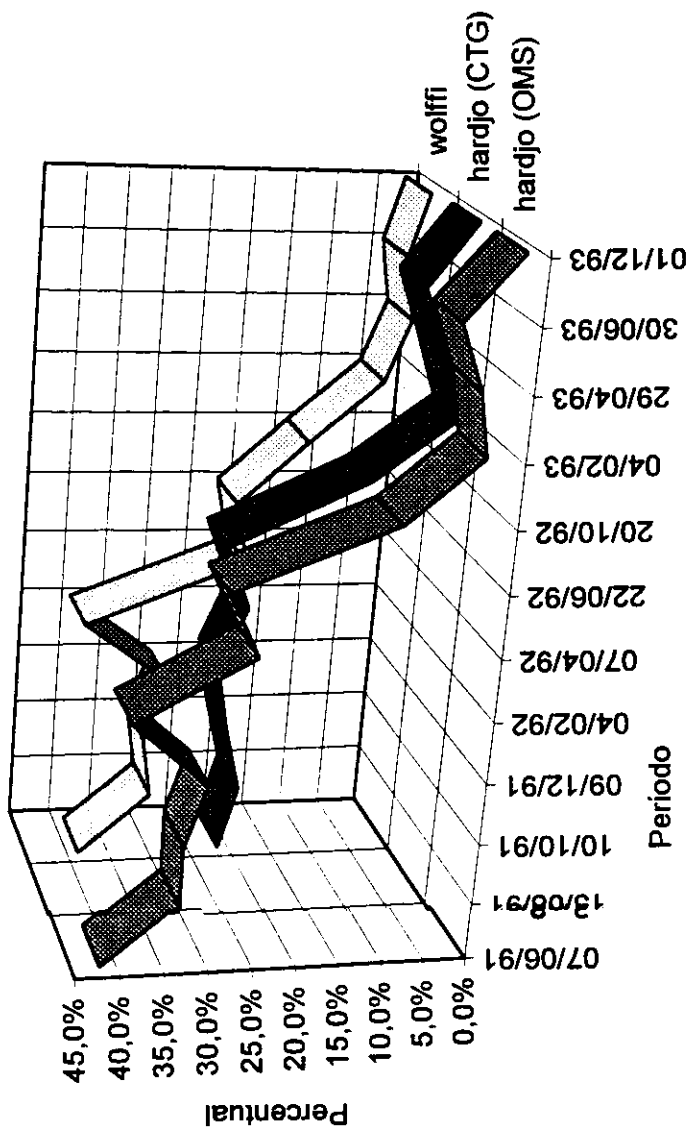
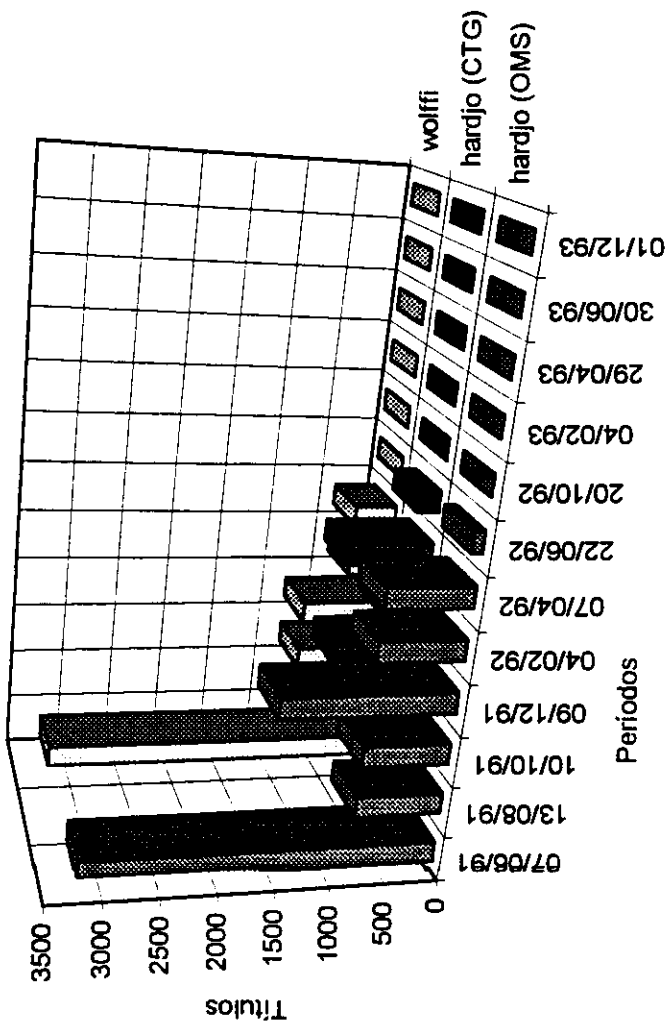


TABELA 2 - Títulos de aglutinina anti-leptospira de acordo com as sorovariedades no período de 07/06/1991a
01/12/1993. - Fazenda Cantagalo - Pitangui - Minas Gerais

Data	hardjo (OMS)					hardjo (CTG)					wolffi					
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	a)	1:200	1:400	1:800	a)	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	
1991																
07/06	47	32	27	27	10	2	ND	ND	ND	ND	17	28	26	11	4	1
13/08	79	71	44	10	-	-	ND	ND	ND	ND	77	68	35	17	-	-
10/10	51	41	21	6	-	-	20	18	14	7	51	35	18	12	-	-
09/12	41	38	33	19	3	-	18	17	15	9	35	30	18	6	-	-
1992																
04/02	9	9	9	3	-	-	7	7	6	-	22	11	5	-	-	-
07/04	16	14	12	5	-	-	5	4	2	1	5	3	3	-	-	-
22/06	6	-	-	-	-	-	6	1	-	-	0	-	-	-	-	-
20/10	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-
1993																
04/02	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-
29/04	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-
30/06	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-
01/12	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-

a) Número de soros na diluição 1:100 com três ou quatro cruces
ND. Não determinado

GRÁFICO 3 Títulos de aglutininas anti-leptospiras de acuerdo com as sorovariedades



5 DISCUSSÃO

Nos países onde a leptospirose bovina tem sido estudada, a *Leptospira hardjo* é descrita como a *Leptospira* de maior prevalência entre os bovinos e a principal causadora de abortos, mamites e infertilidade (ap. THIERMANN, 1982).

Os primeiros trabalhos de levantamento sorológico realizados em bovinos no país utilizavam pequeno número de sorovariedades como antígenos e não era incluído o sorogrupo ao qual pertence a *hardjo* (FREITAS et al., 1957, GUIDA & BARROS, 1958, GUIDA et al., 1959, LACERDA et al., 1960, BARBOSA, 1962). Este pode ser um dos motivos pelos quais *pomona* já foi identificada como mais prevalente em bovinos, associado aos sistemas de produção existentes na época

Posteriormente, sorovariedades do mesmo sorogrupo ao qual pertence a *hardjo* foram incluídas na bateria de antígenos e observa-se alta prevalência das mesmas (REIS et al., 1973, MADRUGA et al., 1980).

A alta prevalência de *wolffi* no rebanho estudado coincide com vários levantamentos sorológicos de bovinos realizados no país (SANTA ROSA et al., 1969, TERUYA et al., 1974, CORRÊA et al., 1972, REIS et al., 1973, CORDEIRO et al., 1975, ÁVILA et al., 1978, VAZ & OLIVEIRA, 1978, GIORGI et al., 1981, DÓRIA et al., 1982), porém nestes trabalhos não houve inclusão da *hardjo* na bateria de antígenos utilizada. Segundo demonstrado por AYCARDI et al. (1982) e GIRIO & MATHIAS (1988), a infecção com *hardjo* leva à ocorrência de reações sorológicas cruzadas com outras sorovariedades pertencentes ao sorogrupo Sejroe. Estes

resultados sugerem ocorrência de reações antigênicas cruzadas com *hardjo*, pois no presente trabalho e em levantamentos da mesma época e subsequentes (WILLIAMS et al., 1975, MOREIRA et al., 1979, RIBEIRO, 1983, ABUCHAIM & DUTRA, 1985, ZAMORA et al., 1988), onde esta foi utilizada como antígeno, apresentou a maior prevalência.

A ocorrência de casos clínicos de leptospirose no rebanho estudado, coincide com os achados de OLIVEIRA et al. (1980), que isolaram uma amostra de *Leptospira* sp., pertencente ao sorogrupo Hebdomadis, de um rebanho bovino no Rio Grande do Sul, e apesar de não ter sido realizada a tipificação final, a amostra isolada apresentou títulos de 1:12.800 quando testada frente ao antisoro específico *hardjo*/hardjoprajitno. Todos estes dados vêm confirmar a hipótese levantada por MOREIRA et al. (1979), durante estudo sorológico da leptospirose em bovinos de Minas Gerais, que supõem que o isolamento da *hardjo* depende muito mais da intensidade de busca, do que de sua ocorrência nos bovinos. Estes dados estão de acordo também com os achados de ELLIS et al. (1984), onde o autor coloca que nem sempre as cepas isoladas nos trópicos são necessariamente as mais prevalentes, e sim, aquelas que foram possíveis de se isolar com os métodos existentes. Com isso, os antígenos utilizados nos levantamentos sorológicos de aglutininas anti-leptospiras em bovinos podem não representar adequadamente as sorovariedades presentes na região.

Até o momento, os isolamentos de *Leptospira* sp. em bovinos realizados no país estão restritos às sorovariedades *pomona* (FREITAS et al., 1957), *icterohaemorrhagiae* (SANTA ROSA et al., 1961) e duas cepas do sorogrupo Hebdomadis denominadas *guaicurus* e *goiano* (SANTA ROSA et al., 1980). Com este trabalho foi realizado o isolamento e tipificação final da *hardjo*, genótipo hardjoprajitno, pela primeira vez no Brasil. Este resultado está de acordo com EGAN & O'REILLY (1985), pois confirma a presença da mesma, anteriormente indicada por meio de

levantamentos sorológicos e ocorrência da doença em várias regiões do país.

Segundo os resultados observados no presente trabalho (Tabelas 1 e 2, Gráficos 2 e 3), a cepa isolada *hardjo* (CTG), detectou um menor número de soros positivos e com títulos mais baixos, quando comparada com a cepa de referência *hardjo* (OMS), o que discorda dos achados de ELLIS et al. em 1978 (ap. EGAN & O'REILLY, 1985), onde a cepa por eles isolada apresentou maior sensibilidade do que a cepa utilizada como referência em seus estudos.

Segundo ELLIS et al. (1981), ELLIS et al. (1982) e THIERMANN (1982), a *hardjo* é uma *leptospira* pouco imunogênica. Este fato, associado à maior sensibilidade demonstrada pela *hardjo* (OMS) neste trabalho, justifica a utilização da mesma em casos de levantamentos primários, a fim de se evitar a ocorrência de falsos negativos, o que pode ocorrer principalmente quando se tem uma baixa prevalência da doença, correndo-se neste caso, o risco de não se diagnosticar a mesma se a cepa utilizada for pouco sensível.

A utilização da *hardjo* (CTG) em levantamentos sorológicos é mais indicada quando já se tem conhecimento prévio de alta prevalência da doença no rebanho ou se está em andamento com o programa de controle da leptospirose, já que as chances de se obterem animais falsos positivos com a utilização desta cepa como antígeno serão menores e assim pode-se avaliar se as medidas de controle utilizadas têm-se mostrado efetivas. Outra indicação para o uso da cepa isolada como antígeno, seria nas situações onde existem evidências da ocorrência da doença no rebanho, como a existência de casos clínicos. Neste caso, o teste sorológico positivo (MAR) frente à *hardjo* (CTG) pode servir como diagnóstico de confirmação da ocorrência da infecção animal, visto que o isolamento é uma técnica difícil e pouco prática e os soros reagentes neste caso, dificilmente seriam falsos positivos.

Sabe-se que a utilização de vacinas autóctones deverá induzir uma melhor resposta imunológica, garantindo uma proteção mais efetiva do rebanho vacinado. Neste caso, o uso da *hardjo* (CTG) para produção de vacinas é medida importante a ser adotada nos programas de controle da leptospirose bovina no país.

Com relação ao isolamento, a amostra isolada foi obtida de um animal que apresentou títulos sorológicos baixos frente à *hardjo* (1:100). Estes resultados coincidem com os observados por ZAMORA et al. (1988) que isolaram *hardjo* a partir de um bovino soronegativo e de outro que apresentou títulos de 1:100.

Entre as técnicas de filtração, diluição e passagem em hamsters, utilizadas para descontaminação das culturas com isolamentos primários, somente com a técnica de inoculação intraperitoneal em hamsters foi obtida a descontaminação total da cultura e isolamento da *hardjo*. Este resultado coincide com o apresentado por SULLIVAN & STALLMAN (1969), que com a mesma técnica realizaram o isolamento de *hardjo*.

O isolamento final foi obtido em apenas uma amostra, o que pode ser devido à alta exigência e sensibilidade da *hardjo* quanto à sua manutenção em laboratórios (SULLIVAN & STALLMAN, 1969, MYERS & JELAMBI, 1975, OLIVEIRA et al., 1980, WHITE et al., 1982).

6 CONCLUSÕES

- 1 O isolamento com tipificação da *Leptospira hardjo*, pela primeira vez no Brasil, confirma sua presença no país.
 - 2 A infecção por *Leptospira hardjo/hardjoprajitno* (CTG), foi responsável pela ocorrência de casos de abortos, reabsorção embrionária, infertilidade e mamites no rebanho estudado.
 - 3 A sorovariedade *hardjo/hardjoprajitno* (CTG) deverá ser incluída nos inquéritos sorológicos e nas vacinas utilizadas para bovinos no Brasil.
-

7 SUMMARY

The occurrence of *Leptospira hardjo* was tested in a bovine dairy herd with reproduction problems. 132 animals (41,8%) had positive reactions to that serotype and to microagglutination rapid test. The first isolate and tipification of *hardjo* hardjoprajtino genotype (CTG) proves its presence in clinical cases of bovine leptospirosis in Brazil. The seroagglutination with the reference sample of *hardjo* (OMS) and with the Brazilian isolate were positive, respectively, in 40 and 26,9% of the tested animals. Cross reactions were found between *hardjo* and *wolffi* from the Sejroe serum group.

KEY-WORDS: isolation, *hardjo*, bovine.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUCHAIM, D. M., DUTRA, N. L. F. Prevalência da leptospirose em bovinos da bacia leiteira de Porto Alegre-RS. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, v. 13, p. 55-60, 1985.
- ÁVILA, J. A., COSTA, A. J., MORAES, F. R., PINHEIRO, L. E. L., MANGERONA, A. C. S. Pesquisa de aglutininas anti-*leptospira* em soros de bovinos do município de Jaboticabal, Brasil. **Científica**, v. 6, n. 3, p. 451-453, 1978.
- AYCARDI, E. R., RIVIERA, B., TORRES, B. DE BOHORQUEZ, V. Experimental infection with a *Leptospira hardjo* strain isolated from cattle of the eastern plains of Colombia. **Veterinary Microbiology**, v.7, n. 6, p. 545-550, 1982.
- AYCARDI, E. R., TORRES, B., GUZMÁN, V. H., CORTÊS, M. Leptospirosis in Colombia. Isolation of *Leptospira hardjo* from beef cattle grazing tropical savannas. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 22, p. 73-77, 1980.
- BARBOSA, M., Aglutininas e lisinas anti-leptospiras em soros de bovinos, equinos e suínos em Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária U. M. G.**, v. 14, p. 1-27, 1962.
- CORDEIRO, F., GUIDA, H. G., RAMOS, A. DE A., MENDOZA, T. R. Aglutininas anti-leptospiras em soros de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, v. 10, n. 8, p. 9-19, 1975.
-

CORRÊA, C. N. M., GOTTSCHALK, A. F., CORRÊA, W. M., SILVA, A. S., TERUYA, J. M. Brucelose e leptospirose bovina em São Manuel, Estado de São Paulo. Inquérito sorológico. *O Biológico*, n. 2, p. 46-51, 1972.

CORREA, M. O. A., MEARIN, A. B. Leptospirose no Brasil. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 31, p. 87-101, 1971.

DÓRIA, J. D., VIEGAS, S. A. R. A., VIEGAS, E. A., VIRGENS, N. C., SANTOS, N. M. Estudo sorológico sobre a leptospirose em bovinos, no Estado da Bahia, 1977. *Arquivos E. M. V.-UFBA*, v. 7, n.1, p. 105-113, 1982.

EGAN, J., O'REILLY, F. P. Antibodies to *leptospira interrogans* serovar *hardjo* in sera from aborting cattle in the Republic of Ireland. *Irish Veterinary Journal*, v. 39, n. 9-10, p. 143-145, 1985.

ELLINGHAUSEN JR., H. C., McCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *American Journal of Veterinary Research*, v. 26, n. 110, p. 45-51, 1965.

ELLIS, W. A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 2, p. 411-421, 1984.

ELLIS, W. A., O'BRIEN, J. J., CASSELLS, J. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype *hardjo* infection in Northern Ireland. *The Veterinary Record*, v. 108, n. 26, p. 555-557, 1981.

ELLIS, W. A., O'BRIEN, J. J., NEILL, S. D., HANNA, J. Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. *The Veterinary Record*, v. 110, n. 8, p. 178-180, 1982.

FREITAS, D. C., LACERDA JR., P. M. G., VEIGA, J. S., LACERDA, J. P. G., Identificação da leptospirose bovina no Brasil. *Revista Faculdade Medicina Veterinária São Paulo*, v. 6, n. 1, p. 81-83, 1957.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Informações Básicas Municipais. Rio de Janeiro. 1982.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sinopse Preliminar do Censo Demográfico, Minas Gerais 1991. Rio de Janeiro, v. 6, 255 p.

GALTON, N. M., MENGES, R. W., SHOTTS JR, E. B., NAHMIA, A. J., HEATH, C. W. Leptospirosis; epidemiology clinical manifestation in man and animals, and methods in laboratory diagnosis. *Public Health Series, 951*. Washington, D. C., Public Health Organization, 1962.

GIORGI, W., TERUYA, J. M., SILVA, A. S., GENOVEZ, M. E. Leptospire: resultados das soro-aglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1974/1980. *Biológico*, v.47, n.11, p. 299-309, 1981.

GIRIO R. J. S., MATHIAS, L. A. Use a saprophytic *Leptospira* strain in the serodiagnosis of experimental leptospirosis in guinea-pigs. *Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo*, v. 30, n.2, p. 91-94, 1988.

GUIDA, V. O., BARROS, W. M. Pesquisa de aglutininas e lisinas anti-leptospira, em soro de bovinos aparentemente normais, sacrificados no matadouro. *O Biológico*, v. 26, p. 26-27, 1958.

GUIDA, V. O., SANTA ROSA, C. A., D'APICE, M., CORRÊA, M. O., NATALE, V. Pesquisa de aglutininas anti-leptospiras no soro de bovinos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 26, p.109-117, 1959.

LACERDA JR., P. M. G., FREITAS, D. C., LACERDA, J. P. G. Notas sobre leptospirose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 27, p. 86-91, 1960.

MADRUGA, C. R., AYCARDI, E., PUTT, N. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em bovinos de corte da região sul de cerrado do Estado de Mato Grosso. **Arquivos Escola Veterinária UFMG**, v. 32, n. 2, p. 245-249, 1980.

MOREIRA, E. C., SILVA, J. A., VIANA, F. C., SANTOS, W. L. M., ANSELMO, F. P., LEITE, R. C. Leptospirose bovina: I - Aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. **Arquivos Escola Veterinária UFMG**, v. 31, n. 3, p. 373-388, 1979.

MYERS, D. M. **Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis**. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis, 1985. 47p. (Nota Técnica n. 30).

MYERS, D. M., JELAMBI, F. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Argentina. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 27, p. 63-70, 1975.

OLIVEIRA, S. J., PIANTA, C., GOMES, M., SANTIAGO, C. Abortos em bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. Isolamento de leptospiras do sorogrupo Hebdomadis. **Boletim Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"**, v. 7, p.51-56, 1980.

- REIS, R., RYU, E., PENA, C. M. Pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em bovinos e suínos em Minas Gerais, Brasil. *Arquivos Escola Veterinária UFMG*, v. 25, n. 1, p. 11-14, 1973.
- RIBEIRO, S. C. A. Alguns Aspectos Epidemiológicos da Infecção por *Leptospira interrogans*, numa fazenda de Minas Gerais, Brasil. Belo Horizonte: Escola Veterinária da UFMG, 1983. 42 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- ROTH, E. E., GALTON, M.M. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Louisiana. *American Journal of Veterinary Research*, v.21, n.80-82, p. 422-427, 1960.
- RYU, E. Rapid microscopic agglutination test for leptospirosis based on 400 x magnification of dark field examination. *Journal Veterinary Medicine and Animal Illustrated*, n. 17, p. 1-9, 1970.
- SANTA ROSA, C. A., PESTANA DE CASTRO, A. F., SILVA, A. S., TERUYA, J. M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v.29-30, p. 19-27, 1969/70.
- SANTA ROSA, C. A., PESTANA DE CASTRO, A. F., TROISE, C. Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de bovino em São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 28, p. 114-118, 1961.
- SANTA ROSA, C. A., SULZER, C. R., PESTANA DE CASTRO, A. F., YANAGUITA, R. M., GIORGI, W. Two new leptospiral serovars in the *Hebdomadis* group isolated from cattle in Brazil. *International Journal Zoonosis*, v. 7, n. 2, p. 158-163, 1980.
-

- SULLIVAN, N. D. Experimental infection of cattle with *Leptospira hardjo*. **Australian Veterinary Journal**, v. 46, p. 121-125, 1970.
- SULLIVAN, N. D., STALLMAN, N. D. The isolation of a strain of *Leptospira*, serotype *hardjo*, from cattle in Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 45, p. 281-283, 1969.
- TERUYA, J. M., SILVA, A. S., PESTANA DE CASTRO, A. F., GIORGI, W. Soro-aglutinações para leptospirose realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante o ano de 1973. **O Biológico**, v. 40, p. 228-232, 1974.
- THIERMANN, A. B. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 5, p. 780-784, 1982.
- VAZ, A. K., OLIVEIRA, S. J. DE Títulos aglutinantes para leptospira de touros usados em inseminação artificial no Rio Grande do Sul. **Boletim Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"**, v. 5, p. 23-26, 1978.
- WHITE, F. H., SULZER, K. R., ENGEL, R. W. Isolations of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, *balcanica*, and *pomona* from cattle of slaughter. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, n.2, p.1172-1173, 1982.
- WILLIAMS, H. A., OLIVEIRA, S. J., RIBEIRO, L. A. O. Leptospirose como causa de aborto em um rebanho bovino no Rio Grande do Sul. **Boletim Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"**, v. 3, p. 73-81, 1975.
- ZAMORA, J., RIEDEMANN, S., FRÍAS, M. Leptospirosis bovina. Aislamiento de los serovares *hardjo bovis A* y *portlanvere*. **Archiv Medicine Veterinary**, v. 20, n. 2, p 136-140, 1988.
-