

José Leonides Ribeiro

VERIFICAÇÃO DA FREQUÊNCIA E VIAS DE ELIMINAÇÃO DE *LEPTOSPIRA*  
*SPP* EM REBANHO LEITEIRO DA FAZENDA FEDERAL DE PEDRO LEOPOLDO,  
MINAS GERAIS

Tese apresentada ao Departamento de  
Medicina Veterinária Preventiva da  
Escola de Veterinária da Universida-  
de Federal de Minas Gerais, como re-  
quisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre.

Área: Medicina Veterinária Preventi-  
va

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
1974

R484v

Ribeiro, José Leonides, 1941-

Verificação da frequência e vias de eliminação da *Leptospira spp* em rebanho leiteiro da Fazenda Federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1974.

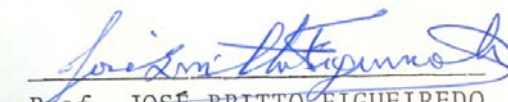
37p. ilust.


Tese, Mestre em Medicina Veterinária

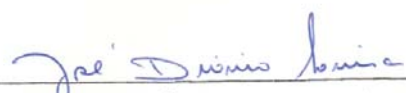
1. Medicina Veterinária Preventiva. 2. Leptospira - Rebanho leiteiro. 3. Leptospira - Frequência e vias de eliminação. I. Título.

CDD- 636.214 089 692

APROVADA EM 23/12/1974

  
Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO  
- Orientador -

  
Prof. RONALDO REIS

  
Prof. JOSÉ DIVINO LIMA

## AGRADECIMENTOS

O autor agradece:

- ao Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO pela orientação segura e amiga;
- ao Prof. RONALDO REIS pelas sugestões oferecidas durante o curso e o desenvolvimento do trabalho;
- a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram no presente trabalho;
- à Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de Bolsa que nos permitiu fazer o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

JOSÉ LEONIDES RIBEIRO, filho de Mário Pereira Ribeiro e Natalina Siqueira Pereira, nasceu no município de Silvânia, Goiás, aos 15 de junho de 1941. Em 1967 diplomou-se em Medicina Veterinária pela Escola de Agronomia e Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Em março de 1968 foi contratado pela Universidade Federal de Goiás, na função de Auxiliar de Ensino da disciplina de Microbiologia, transferindo-se em 1970 para a disciplina de Doenças Infecto-Contagiosas e Parasitárias dos Animais Domésticos. Em 1971 foi promovido à categoria de Professor Assistente, através de concurso de títulos. Participou dos seguintes cursos: Curso de Orientação Pedagógica, Orientação e Pesquisa Biológica, Diagnóstico, Profilaxia e Combate às Parasitoses dos Animais Domésticos, Doenças das Aves Transmissíveis por Alimentos, Treinamento Especial no Laboratório de Doenças Infecciosas da Escola de Veterinária da UFMG e Curso de Pós-Graduação (Mestrado na área de Medicina Veterinária Preventiva, junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG, desde 1º de março de 1971).

## SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO . . . . .	1
2. REVISÃO DE LITERATURA . . . . .	3
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	15
3.1. Material . . . . .	15
3.1.1. Animais de trabalho . . . . .	15
3.1.1.1. Colheita de sangue para a micro-aglutinação . . . . .	15
3.1.1.2. Obtenção de leite e lácteo-soro . . . . .	15
3.1.2. Meios de cultura . . . . .	16
3.1.3. Antígenos para reações de aglutinação . . . . .	16
3.2. Métodos . . . . .	17
3.2.1. Provas sorológicas . . . . .	17
3.2.2. Provas bacteriológicas . . . . .	17
4. RESULTADOS . . . . .	19

	<u>Página</u>
5. DISCUSSÃO . . . . .	24
6. CONCLUSÕES . . . . .	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	30

LISTA DAS TABELAS

	<u>Página</u>
TABELA I - Prevalência da leptospirose bovina, no Brasil, diagnosticada entre 1957 a 1973 por métodos sorológicos, segundo alguns aspectos . . . . .	14
TABELA II - Número de bovinos com hemo-soro-aglutinações positivas pelo TMAR, frente a vários sorotipos de <i>Leptospira spp</i> do total de 84 testados, na Fazenda Federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. 1974 . . . . .	20
TABELA III - Vacas simultaneamente positivas a dois sorotipos de <i>Leptospira spp</i> pelo TMAR, na Fazenda Federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. 1974 . . . . .	21
TABELA IV - Idades, atividades procriativas, títulos de hemo e lácteo-soro-aglutinação, pelo TMAR, de vacas da Fazenda Federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. 1974 . . . . .	22
TABELA V - Comparação de títulos da hemo e lácteo soro-aglutinação, intervalada de 11 meses, pelo TMAR, frente a vários sorotipos de leptospira. Pedro Leopoldo, Minas Gerais. 1974 . . . . .	23



## 1. INTRODUÇÃO

As leptospiroses são infecções que afetam o homem e os animais, domésticos e selvagens.

Os bovinos são incluídos, com destaque, entre os suscetíveis.

Sob o ponto de vista econômico é de grande importância a leptospirose bovina, pois está relacionada com aborto, surtos de mastite e, conseqüentemente, queda na produção de leite.

Nos bezerros há piroxia, icterícia, hemoglobinúria e anemia, com alta morbidade. A mortalidade atinge 90%.

Por se tratar de uma zoonose, muito encontrada na espécie humana e descrita como doença de Weil, febre canícola, febre dos pântanos, febre de Hasami, doença de Weil indonésica, febre dos arrozais, febre dos canaviais, manukayami, febre dos sete dias, leptospiroses febrilis ictérica infecciosa, doenças dos tratadores de porco, febre pré-tibial ou de Brag (BURROWS et alii, 1965) assume grande interesse em saúde pública.

Sua importância social e econômica aumenta em áreas onde se erradicaram ou está em vias de erradicação a brucelose bovina.

No âmbito internacional a prevalência oscila entre 28,2 a 67,0% nas diversas regiões onde se procurou diagnosticar

a doença (CAFFAREMA et alii, 1968; GENIS et alii, 1969; MICHNA, 1971; CORBOULD, 1971).

No Brasil são relativamente poucos os trabalhos publicados. No entanto, podemos afirmar que a taxa de prevalência está compreendida entre 3,4 e 28,3% (FREITAS et alii, 1957; GUIDA & BARROS, 1958; GUIDA et alii, 1959; SANTA ROSA et alii, 1961a; BARBOSA, 1962; SANTA ROSA et alii, 1969; CORDEIRO, 1973; REIS et alii, 1973).

O presente trabalho objetiva o encontro da prevalência da leptospirose em vacas, de raças leiteiras e em plena lactação, do rebanho da Fazenda Federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais (Brasil), e verificar a possível eliminação do agente pelo leite, com base nos títulos obtidos através da prova sorológica de microaglutinação rápida e provas bacteriológicas. Como objetivos secundários procurar-se-á estabelecer correlação entre estes dados e a vida reprodutiva dos animais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A primeira suspeita de que espiroquetas fossem responsáveis por doenças em bovinos foi levantada por SARGENT et alii (1919), que assinalaram uma "febre hemoglobinúrica", distinta da piroplasmose, em bovinos, na Argélia.

MICHIN & AZINOV (1935), no Cáucaso isolaram, pela primeira vez, leptospira de cultura de sangue puncionado do coração de bezerro que morrera com hemoglobinúria. A essa leptospira foi dado o nome de *Leptospira icterohaemoglobinuræ* ou *L. vitulorum*.

TERSKIKH (1940) estudando uma amostra de espiroqueta isolada na Rússia, de uma vaca, verificou a semelhança existente entre esta amostra e a *L. grippothyphosa*, responsável pela "febre dos pântanos", doença humana também freqüente na Rússia.

JUNGER (1944) constatou a presença de leptospirose em bovinos, nos Estados Unidos, estudando três animais de um rebanho leiteiro. As vacas apresentavam anorexia, temperatura subnormal e evidência de congestão pulmonar. Através da coloração de Levaditti verificou-se a presença de organismos argento-fílicos com formas semelhantes à leptospira.

BERNKOPF (1946) pesquisando em Israel, diagnosticou epidemia em bovinos devido à *L. grippctyphosa*.

NIKOLAJEV (1946) descreveu surto epidêmico, em bovinos, causado por *Leptospira grippotyphosa*, na Rússia.

BAKER & LITTLE (1946) relataram o primeiro isolamento do agente etiológico das leptospiroses em bovinos nos Estados Unidos e, subsequentemente, o microorganismo foi identificado como sendo *L. pomona*.

QUEVEDO & QUEVEDO (1947) notificaram surto de leptospirose em bovinos, ocorrido em Tandil, Argentina. A doença se caracterizou por hemoglobinúria, icterícia e teve como agente etiológico, a *L. icterohaemorrhagiae*.

BAKER & LITTLE (1948) observaram espiroqueta não identificada no fluido corioalantóide de embrião de galinha, inoculado com sangue de cobaia, o qual fora inoculado com leite originário de úbere anormal, e reproduziram, em condições experimentais, a doença em uma vaca lactante.

REINHARD (1951) mostrou que as leptospirosas estão bastante disseminadas nos rebanhos bovinos dos Estados Unidos da América do Norte.

BOHL & FERGUSON (1952), também nos Estados Unidos, verificaram que 3,5% de 352 bovinos eram sorologicamente positivos para *L. pomona*.

SMITH & PERRY (1952) demonstraram, pela primeira vez, a existência de leptospirose no Canadá, através de coloração de tecidos de rins, de touros que morreram, provavelmente de leptospirose.

VARELA et alii (1958) notificaram, através de provas sorológicas, casos de leptospirose bovina no México.

HOAG & BELL (1954) descreveram a ocorrência natural de um caso de meningite em bovino, verificando que se tratava do sorotipo *pomona*. O título obtido atingiu a 1:102.400. Sintomas clínicos assinalados: febre, rigidez do passo, conjuntivite bilateral, excessiva salivação e expressão facial alterada.

KIRSCHNER & MAGUIRE (1955) e KIRSCHNER et alii (1957) demonstraram que o leite normal de bovinos possui efeito anti-



leptospira, o qual impede a possibilidade de veiculação de leptospira pelo mesmo.

VAN der HOEDEN (1955) utilizou o soro lácteo de cabra na investigação de anticorpos contra leptospiros, obtendo bons resultados.

VAN der HOEDEN (1955a) encontrou endemias, bem como surtos esporádicos de infecção por *L. canicola*, em Israel. Os animais apresentavam febre, anorexia, redução na produção de leite, debilidade, fraqueza, icterícia e hemoglobinúria. A perda de peso nos bezerros foi bastante acentuada.

BORG-PETERSEN & FENNESTAD (1956) reportaram que 6,0 a 7,0% do rebanho bovino dinamarquês, de um ano de idade, apresentavam título para o sorogrupo *sejroe-saxkoebing* e o nível de anticorpos era de 1:100 a 1:3.000. Interpretavam títulos de 1:100 com indicação de infecção presente ou passada, sem que houvesse necessariamente aborto.

MOORRE & RICE (1956) constataram a presença de anticorpos anti-leptospira por exames sorológicos (fixação de complemento) usando antígeno para *L. pomona*. A incidência foi em torno de 6,0% num total de 1.001 animais examinados, de 45 rebanhos, em Ontário e Quebec, no Canadá.

FERGUSON et alii (1957) demonstraram que 12 bovinos inoculados com *L. pomona*, via intramuscular, todos apresentavam a doença. Um animal de um ano adoeceu rapidamente morrendo no sétimo dia após a inoculação. As lesões, nesse animal, foram típicas de leptospirose. De nove vacas em gestação, três abortaram 19, 20 e 47 dias após a exposição a *L. pomona*.

FISH & GRINGER (1957) no Canadá, investigaram cinco rebanhos bovinos e apenas em um foi isolado o microorganismo. O diagnóstico foi baseado em exames clínicos e sorológicos. No rebanho "A", foram colhidas amostras de sangue dos animais que abortaram. Todas foram positivas para *L. pomona* com um título mínimo de 1:10.000. No rebanho "B", verificou-se quatro abortos que ocorreram em estágios diversos. Estes animais apresentaram título de anticorpos bem elevado. O sorotipo presente foi a *L.*

*pomona*. O isolamento do germe não foi tentado. No rebanho "C", a doença foi encontrada em bezerros. Os animais adultos não foram afetados. Os sintomas eram de marcada hemoglobinúria, depressão, tremores e anorexia, seguido por morte 18 horas após os primeiros sintomas. Material foi inoculado em animais de laboratório, isolando leptospira. Mais tarde constatou-se a presença de aglutininas anti-leptospira *pomona*. No rebanho "D", os primeiros sintomas foram queda na produção de leite, mastite branda, acompanhada de fraqueza e ligeira anorexia, mas não havia hemoglobinúria e não houve mudanças consideráveis do leite. Alguns dos animais mostraram debilidade. Sorologicamente todos os animais foram positivos para a *L. sejroe*. No rebanho "E", a primeira evidência de doença foi o aborto seguido de hemoglobinúria, anorexia e pirexia, com temperatura aumentada para 42° C. Houve baixa produção de leite e títulos altos de anticorpos no lácteo-soro.

BOULANGER et alii (1958) examinando 20 rebanhos bovinos, no Canadá, com problemas reprodutivos, verificaram que seis desses rebanhos apresentavam leptospirose. Em quatro outros, reações sorológicas foram obtidas, mas não correlacionadas com dificuldades reprodutivas. Reações sorológicas e isolamento indicaram que, na maioria desses rebanhos infectados, o sorotipo *pomona* estava presente. Também foram obtidas, em uns poucos rebanhos, reações com *L. sejroe*.

HENGL et alii (1958), na Hungria, descreveram mastite como uma das manifestações de infecção em bovinos por *L. pomona* ou *L. hyos*. Eles reproduziram a doença experimentalmente e isolaram o microrganismo do leite, dias após a inoculação.

TURNER et alii (1958) isolaram o sorotipo *canicola* da urina de bezerro doente, com dois dias de idade.

BYRNE & CHAMBERS JR (1959) trabalhando com 15 dos 23 distritos do Estado de Maryland, examinaram 1.998 bovinos de 128 rebanhos. Verificaram que 25% do total de soros e 66% dos rebanhos trabalhados foram positivos, a diluição de 1:100 ou mais, contra um ou mais antígenos empregados. Estes autores

trabalharam com sete sorotipos.

JONES (1959) trabalhando com 25.663 bovinos de 1.665 rebanhos, encontrou 332 positivos. A incidência foi de 1,3% em termos globais, enquanto que em rebanhos isolados foi de 7,4%. Este trabalho foi realizado em Indiana, nos Estados Unidos.

MITCHELL & BOULANGER (1959), no Canadá, através de exames bacteriológicos e sorológicos em dois rebanhos com surto de mastite atípica, atribuíram sua etiologia a *L.pomona*. O microrganismo foi isolado do leite de duas vacas de um desses rebanhos.

CLARK et alii (1960) isolaram leptospiras a partir do sangue de animais que apresentavam anorexia, marcada hipogalâxia e temperatura aumentada de 38 para 40°C. A doença experimental foi obtida através da inoculação de três gotas de sangue colhido, assepticamente, de bovinos que apresentaram títulos sanguíneos de 1:400 ou mais.

MITCHELL et alii (1960) verificaram, no Canadá, que além da *L. pomona* existiam outros sorotipos de leptospiras. Isto foi demonstrado através de reações de aglutinação-lise de 20 amostras de soro que reagiram positivamente para o sorogrupo *hebdomadis*. *Leptospira* foi, também, observada microscopicamente nas secções de rins de hamsters inoculados com urina de três bovinos infectados. Reações sorológicas para *L. sejroe* foi verificada em cobaias inoculados com urina e leite anormal. Uma mastite atípica foi provocada em novilha, em lactação ativa, pela inoculação intramamária de leite anormal. Esse animal desenvolveu a formação de anticorpos para *L. sejroe*.

ROTH & GALTON (1960) descreveram o isolamento e identificação de *L. hardjo* de bovinos, na Louisiana, nos Estados Unidos, usando antígenos no grupo *hebdomadis*. Mostraram a relação antigênica existente entre os sorotipos *hardjo* e *sejroe* em animais natural e experimentalmente infectados com os respectivos sorotipos.

BURKI & WIESMANN (1963), na Suíça, encontraram anticorpos anti-*pomona*, *grippotyphosa*, *australis*, *hyos* e *sejroe* em soro de vacas que abortaram.



STOENNER et alii (1963) encontraram manifestação sorológica causada por infecção por *L. pomona* em vaca leiteira que apresentou os seguintes sintomas: febre, anemia, hemoglobinúria e úbere flácido com ligeira coloração do leite. Nos dias seguintes, sintomas de meningite apareceram na forma de retração da cabeça e pescoço para um lado, movimentos circulares, salivação, espasmos dos músculos dos membros, escápula e pescoço e, a seguir, movimentos pedalativos dos membros. Necropsia revelou icterícia, fígado aumentado com necrose centrolobular e petéquias nos rins e no pericárdio. *L. pomona* foi isolada do fluido cérebro-espinhal da vaca e também do fígado e rins do feto.

BODI et alii (1964) relataram que, na Hungria, 72,4% de 105 vacas leiteiras eram positivas para o sorotipo *grippotyphosa*. Vinte dessas vacas (19,0%) apresentaram febre, anorexia, fraqueza, queda na produção do leite, hemoglobinúria, icterícia e necrose da pele.

KEAST et alii (1964) examinaram 1.458 rebanhos, na Austrália, dos quais 7.304 animais foram trabalhados. Desses rebanhos 333 ou 23,0% apresentaram reações com título de 1:300 ou superior. Isso demonstrou que a leptospirose é endêmica em algumas regiões daquele país. Essa pesquisa foi realizada em um período de 10 anos e o aborto foi o sintoma mais comum. Foram encontrados, também em grande escala, icterohemoglobinúria em bezerros nos rebanhos infectados. Mastite não foi frequentemente encontrada.

SPRADBROW (1964) examinando 464 soros de bovinos, na Austrália (Queensland), usando 13 sorotipos de leptospiros, encontrou os seguintes resultados: 11,4% reagiram para *L. hyos* e 9,5% para *L. pomona* em uma diluição de 1:100 ou maior. Uma alta percentagem de animais em um rebanho possuía anticorpos contra o sorogrupo *hebdomadis*.

VAN der HOEDEN (1964) descreveu, em Israel, casos de abortos provocados pelo sorotipo *hebdomadis*. As vacas apresentaram febre ligeira e redução leiteira. Leite ligeiramente semelhante ao colostro com flocos e coágulos de sangue. Um tra-



tador, apresentando sintomas semelhantes a influenza, foi sorologicamente positivo para o grupo *hebdomadis*.

HORVATH et alii (1965) encontraram aborto em 12 de 420 bovinos húngaros (3,0%). Retenção de placenta, verificada em oito casos, foi devida a infecção por *L. pomona*. O microrganismo foi também isolado da urina de animais de dois destes rebanhos.

SATALHEIM (1965) verificou que o leite de vaca contém um fator lítico, anti-leptospira, que julga ser o fracasso da transmissão de leptospira pelo leite. O fator é estável quando o leite é aquecido a 80°C por cinco minutos e difere de lizozima e lactina.

DOHERTY (1966) utilizando a técnica do campo escuro, examinou sedimento de urina formalizada e concluiu ser tão sensível como a inoculação em cobaias para demonstrar a leptospirose bovina. Inoculação direta de urina fresca, em cobaias, é método mais seguro para detectar *L. pomona* do que a centrifugação de urina e inoculação do depósito, ressuscitado no meio de Stuart, em animais da mesma espécie. A presença de anticorpos aglutinantes no "inoculum" não previne o desenvolvimento de anticorpos para *L. pomona* em cobaias.

LUBASZENKO et alii (1966) descreveram a difusão de aborto causado pelo grupo *hebdomadis* em bovinos, numa fazenda próxima a Moscou. Os animais afetados mostraram parada de ruminação, ocasional icterícia e hemoglobinúria. Os títulos de anticorpos variaram de 1:160 a 1:3200 e leptospira foi isolada dos rins e fígado de dois animais sacrificados, sete dias após o aborto.

BOTES & GARRIFALLOU (1967), descreveram a presença de anticorpos anti-leptospira no soro de suínos, eqüinos, cães, ovinos e bovinos, na África do Sul. A incidência, em bovinos, variou de 14,4 a 17,7%. Nesta espécie, a doença foi causada por *L. pomona* na proporção de 48,0 e 24,0% de *L. hyos* e, menos frequente, por *L. icterohaemorrhagiae* e *L. canicola*.

MICHNA (1967) verificou, através de teste de aglutinação em vacas com história de aborto natimorto, retenção de

placenta e infertilidade, a presença de *L. sejroe* um membro do grupo *hebdomadis*.

KNOTT & DADSWELL (1970) verificaram a presença de severo surto de aborto bovino afetando 50,0% dos animais do rebanho, na Austrália. Evidências sorológicas sugerem que o surto foi devido a leptospirose.

SULLIVAN & CALLAN (1970) descreveram o surto de mastite em Queensland, na Austrália, associado com *L. hardjo*. Os sintomas apresentados pelos animais afetados foram: febre, depressão, inapetência, baixa na produção de leite e flacidez do úbere com secreção amarelada contendo coágulos. Uma vaca e dois bezerros foram inoculados, intravenosamente, com urina infectada. Um dos bezerros apresentou reação febril e ambos desenvolveram anticorpos para *L. hardjo*. Leptospirúria não ocorreu. Inoculação intraperitoneal de urina infectada em 20 cobaias resultou na elevação da temperatura. Somente sete dos cobaias desenvolveram títulos para *L. hardjo*. Culturas foram preparadas de todas as cobaias entre dois e 10 dias após a inoculação e os organismos foram isolados de dois desses cobaias. Evidências sorológicas sugeriram que o aborto foi em consequência de leptospirose. Fatores epidemiológicos associados com aborto foram: a) introdução de vacas infectadas em população suscetível; b) prática da parição estacional a qual resultou na suscetibilidade da população, e, c) condições ambientais propícias para a disseminação da doença.

SULLIVAN & STALLMAN (1970) trabalharam com amostras de urina de uma novilha clinicamente normal, com intensa leptospirúria e título aglutinante de 1:30.000 para o sorotipo *hardjo*. Conseguiram o isolamento desse sorotipo. Procederam da seguinte maneira: urina coletada de diferentes períodos foi inoculado em dois bezerros, 26 camundongos e 28 cobaias. Os bezerros e os camundongos não se infectaram, mas quatro dos 28 cobaias apresentaram febre, com leptospira no líquido peritoneal e os organismos foram cultivados a partir do sangue dos cobaias.

CORBOULD (1971) verificou, na Tasmânia, Austrália, a presença de sorotipo do sorogrupo *hebdomadís* em bovinos de corte e bovinos de leite associado com a baixa na produção de leite, mastite e aborto. Houve evidência de infecção no homem produzindo uma síndrome semelhante a influenza. A baixa na produção de leite e mastite em bovino associado com altos títulos de anticorpos com o sorogrupo *hebdomadís* foi primeiro observado na primavera de 1968 e, desde então, surtos envolvendo de um a 17 animais foram relatados em vários rebanhos. Na maioria dos casos não há evidência clínica específica. Nas vacas envolvidas o sintoma de mastite foi o mais comum.

MICHNA (1971) examinou um total de 2.036 soros, pertencendo a quatro grupos de bovinos, usando antígenos vivos dos sorotipos: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *sejroe*, *ballum*, *bratslava*, *pomona* e *grippotyphosa*. Reações positivas não foram observadas com os dois últimos antígenos. *L. sejroe* (sorogrupo *hebdomadís*) foi detectada em 62,6% dos soros obtidos de bovinos que abortaram. A incidência dos outros quatro sorotipos variava de 28,3 a 59,3%.

HOARE & CLAXTON (1972) descreveram um surto de leptospirose causada pelo sorotipo *hardjo*, na Austrália, afetando vacas leiteiras, com os seguintes sintomas clínicos: ataque súbito de febre, mastite e marcada queda na produção de leite. O aborto ocorreu em alguns animais recuperados e em animais que não apresentaram nenhuma sintomatologia da doença. Subseqüentes testes sorológicos mostraram que a infecção estava largamente disseminada em todo o país.

TWIGG et alii (1972) examinando o soro de 861 vacas leiteiras verificaram que 116 animais (12,3%) eram portadores de anticorpos para leptospira, na Inglaterra. A taxa de infecção em um rebanho é um reflexo de vários componentes do meio ambiente, principalmente o contato com espécies de mamíferos e selvagens. O papel do rato marron (*Rattus norvegicus*) e do camundongo caseiro (*Mus musculus*) é, particularmente, importante: 91 das 133 reações positivas (69,4%) são veiculados



por essas duas espécies.

No Brasil pouco tem sido feito com respeito ao estudo da leptospirose em bovinos.

FREITAS et alii (1957) examinando 150 amostras de soro no Estado de São Paulo, encontraram 18 bovinos positivos, sendo que 16 o foram para *L. pomona* ficando, assim, configurada sorologicamente, a existência da infecção em nosso meio. Conseguiram, posteriormente, verificar a presença de leptospira em líquido estomacal, sangue do coração, pulmão e rins de feto abortado entre o 4º e 5º meses de gestação, através de microscopia de campo escuro. Esses materiais foram inoculados em meio de cultura, em cobaias e em bovinos, culminando finalmente com o isolamento de *L. pomona*.

GUIDA & BARROS (1958) trabalhando com 88 amostras de soros de 763 vacas de rebanhos localizados em várias zonas do Estado de São Paulo, onde a ocorrência de aborto era freqüente e as provas sorológicas para brucelose negativas, encontraram 57 animais positivos (7,4%). O sorotipo de maior predominância foi a *L. icterohaemorrhagiae*, seguindo-se *L. pomona*, *L. grippotyphosa* e *L. canicola*.

SANTA ROSA et alii (1961) trabalhando material de feto proveniente de vaca que abortara, conseguiram visualizar, através de microscópio de campo escuro, leptospira no sangue cardíaco. Esse material foi inoculado em cobaias e em meios de cultura resultando o isolamento do sorotipo *L. icterohaemorrhagiae*.

SANTA ROSA et alii (1961a) trabalharam com animais de 14 fazendas no município de Campinas (São Paulo), e delas tomaram amostras de soro correspondentes a 5,0 e 10,0%. O total de soros examinados foi de 279, encontrado 79 animais positivos (28,3%). O sorotipo prevalente foi *icterohaemorrhagiae* seguido de *grippotyphosa*.

BARBOSA (1962) em Minas Gerais, pesquisou a ocorrência de aglutininas e lisinas anti-leptospira, examinando 120 soros de bovinos, provenientes de cinco municípios. Foram encontrados 18,3% positivos e a predominância de reações para os

sorotipos *pomona* e *icterohaemorrhagiae*.

SANTA ROSA et alii (1969) examinaram 15.080 amostras de soros bovinos no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1960 a 1968, encontrando 3.561 animais positivos (23,6%) sendo que o sorotipo de maior prevalência foi a *L. wolffii* (53,3%).

CORDEIRO (1973) trabalhando com 1.562 hemo-soros de bovinos provenientes de 27 municípios do Estado do Rio de Janeiro, pelo teste de microaglutinação com 17 antígenos, encontrou 312 soros positivos (19,9%) envolvendo, principalmente, os sorotipos *wolffii*, *tarassovi*, *grippotyphosa*, *pomona* e *bratslava*.

REIS et alii (1973) estudaram a presença de aglutininas anti-leptospira em bovinos e suínos em Minas Gerais, pelo "Teste de Micro-aglutinação Rápida" e encontraram 39 amostras bovinas positivas de um total de 720 (5,4%) provenientes de 23 rebanhos estudados. Os sorotipos mais prevalentes foram *L. hebdomadis* (89,8%) e *L. pomona* (87,5%), respectivamente, para bovinos e suínos.

A TAB. I resume as informações bibliográficas brasileiras que nos foi possível coligir.

TABELA I - Prevalência da leptospirose bovina, no Brasil, diagnosticada entre 1957 a 1973, por métodos sorológicos, segundo alguns autores

Autores	Estados	Sorotipo prevalente	Nº de animais		%
			Testados	Positivos	
FREITAS et alii (1957)	SP	<i>pomona</i>	150	18	12,0
GUIDA & BARROS (1958)	SP	<i>pomona</i>	88	3	3,4
GUIDA et alii (1959)	SP	<i>icterohaemorrhagiae</i>	763	57	7,4
SANTA ROSA et alii (1961)	SP	<i>icterohaemorrhagiae</i>	279	79	28,3
BARBOSA (1962)	MG	<i>pomona</i>	120	22	18,3
SANTA ROSA et alii (1969)	SP	<i>wolffi</i>	15.080	3.561	23,6
CORDEIRO (1973)	RJ	<i>wolffi</i>	1.562	312	19,9
REIS et alii (1973)	MG	<i>hebdomadis</i>	720	39	5,4
SOMA e MÉDIA			18.762	4.091	21,8

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Animais de trabalho

Foram usadas 84 vacas, em meio-estágio de lactação, do rebanho da Fazenda Federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais - Brasil, composto de animais em idades diversas, das raças Jersey, Guernsey e Schwyz. Todos os animais estavam em bom estado, clinicamente saudáveis e com resultado negativo para brucelose, através da hemo-soro-aglutinação.

Dos animais positivos à hemo-soro-aglutinação foram escolhidas 20 vacas, 12 com títulos de 1:2.000 e o restante ao acaso entre os de títulos 1:200, para trabalho bacteriológico e de inoculação.

##### 3.1.1.1. Colheita de sangue para a micro-aglutinação

As amostras foram colhidas através de punção das veias jugular ou mamária. Em tubo estéril colheu-se 5 ml de cada animal e se deixou coagular, em inclinação, para se obter maior quantidade de soro

##### 3.1.1.2. Obtenção de leite e lacto-soro

O leite, após limpeza e desinfecção das tetas, era

obtido ao final da ordenha e recolhido em tubos de ensaio, estéreis, com tampa de rosca como no item anterior.

Trabalhou-se com amostras compostas de pequenas frações de cada teta perfazendo o total, aproximado, de 5 ml para cada animal.

O lácteo-soro, obtido com a utilização de renina, proveio dos animais anteriormente selecionados para tentativa de isolamento.

### 3.1.2. Meios de cultura

Durante o transcurso do trabalho, utilizamos os meios semi-sólido de FLETCHER (1928), com 8,0 a 10,0% de soro de coelho e distribuído em tubos e esterilizados a 121°C por 15 minutos e o meio de STUART (1946), com igual quantidade de soro, distribuído e esterilizado da mesma maneira.

### 3.1.3. Antígenos para reações de aglutinação

Foram usadas culturas vivas de leptospira, com idade de 3 a 8 dias, para o teste de aglutinação. Os sorotipos utilizados foram os seguintes:

<u>Sorogrupos</u>	<u>Sorotipos</u>
1. <i>australis</i>	<i>australis</i>
2. <i>autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>
3. <i>bataviae</i>	<i>bataviae</i>
4. <i>bratslava</i>	<i>bratslava</i>
5. <i>canicola</i>	<i>canicola</i>
6. <i>ballum</i>	<i>castellones</i>
7. <i>grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>
8. <i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
9. <i>javanica</i>	<i>javanica</i>
10. <i>hebdomadis</i>	<i>mini</i>
	<i>wolffi</i>
11. <i>panamá</i>	<i>panamá</i>
12. <i>semaranga</i>	<i>patoc</i>



<u>Sorogrupos</u>	<u>Sorotipos</u>
13. <i>pomona</i>	<i>pomona</i>
14. <i>pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>
15. <i>tarassoví</i>	<i>tarassoví</i>

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Provas sorológicas

Para as reações de látceo e soro-aglutinação o Teste da Micro-Aglutinação Rápida (TMAR), desenvolvido por RYU (1970), com algumas modificações, que consiste no seguinte:

- 1) diluir o soro sanguíneo ou látceo em salina tamponada, pH 7,1, a títulos de 1:100 e 1:10.000;
- 2) uma gota de cada diluição foi colocada em orifícios de placa de porcelana utilizando-se pipetas de 1 ml;
- 3) adicionou-se uma gota de antígeno (cultura com 3 a 8 dias de crescimento);
- 4) deixar a placa à temperatura ambiente, em repouso, por cinco minutos;
- 5) com uma alça de platina colocar uma porção da suspensão diluída de antígeno-soro em uma lâmina e cobri-la com uma lâmina (18 mm x 18 mm);
- 6) levar ao microscópio com condensador de campo escuro, a seco, e examinar com ocular 10X e objetiva 10X;
- 7) a leitura e a interpretação eram obtidas através da presença de grumos de aglutinação nos campos microscópicos examinados; assim, 10 ou mais com grumos considerava-se resultado positivo; número menor de campo interpretava-se como negativo não havendo, portanto, interpretação intermediária ou suspeita.

#### 3.2.2. Provas bacteriológicas

Uma gota de leite foi inoculada em tubos contendo meio de Fletcher sem diluir e em diluições de 1:10, 1:100 e 1:

1.000. Incubação a 30°C, por 30 dias, com leituras semanais, em campo escuro e a seco (GALTON et alii , 1968).

### 3.2.3. Provas de inoculação

O leite inoculado em dois cobaios jovens, de 200 a 250 g, de qualquer sexo, imediatamente após a colheita, ainda no campo. Foi utilizada a via intraperitoneal e dose de 1 ml.

Do 3º ao 10º dia da inoculação, submetia-se os animais à termometria duas vezes por dia. Nos animais com 40°C ou mais, fazia-se punção cardíaca inoculando-se o material em tubos contendo meio de Fletcher.

#### 4. RESULTADOS

Dos 84 hemo-soros examinados, 44 (54,38%) apresentaram reações positivas com títulos de 1:200 ou maior (TAB. II).

À hemo-soro-aglutinação, o sorotipo *wolffii* foi o de maior prevalência, seguido de *icterohaemorrhagiae*, *autumnalis*, *patoc* e *pyrogenes* (TAB. II). Tanto as provas bacteriológicas como as de inoculação, realizadas com materiais obtidos deste grupo de 20 vacas sorologicamente positivas, apresentaram resultados negativos.

Nestes mesmos 20 animais verificamos que os títulos de anticorpos na lácteo-soro-aglutinação foram bastante elevados, prevalecendo o sorotipo *icterohaemorrhagiae*.

Aos títulos 1:200, 1:2.000 e 1:20.000, os resultados positivos para o sorotipo *icterohaemorrhagiae* foram, respectivamente, 15, 2 e 2 somando 19 reações dentre as 84 realizadas. Para o sorotipo *wolffii*, aos mesmos títulos, na mesma ordem e número de reações realizadas, foram obtidos 2, 12 e 2 resultados positivos. Percentualmente, o primeiro sorotipo corresponde a 54,28 e o segundo a 45,71 do total de resultados positivos.

TABELA II - Número de bovinos com hemo-soro-aglutinações positivas pelo TMAR, frente a vários sorotipos de *Leptospira spp* do total de 84 testados, na Fazenda Federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. 1974

Sorotipos <sup>(1)</sup>	Títulos			Reações	
	1:200	1:2.000	1:20.000	Total	%
<i>autumnalis</i>	2	negativo	negativo	2	2,32
<i>icterohaemorrhagiae</i>	4	negativo	negativo	4	4,76
<i>patoc</i>	2	negativo	negativo	2	2,38
<i>pytogenes</i>	1	negativo	negativo	1	1,19
<i>wolffii</i>	15	25	negativo	40	47,61
SOMA*	24	25		49	

(<sup>1</sup>) Quanto aos demais sorotipos testados (item 3.1.3), os resultados foram negativos a todos os títulos (35/84 = 41,66%)

\* Cinco ou mais positivos a mais de um sorotipo

TABELA III - Vacas simultaneamente positivas a dois sorotipos de *Leptospira* spp pelo TMAR, na Fazenda Federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. 1974

Nome do animal	Sorotipos e títulos encontrados		
	<i>wolffii</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>autumnalis</i>
Trama	1:200	1:200	negativo
Ababa	1:200	1:200	negativo
Valentia	1:200	1:200	negativo
Ximira	1:2.000	negativo	1:200
Zaragata	1:200	negativo	1:200

TABELA IV - Idades, atividades procriativas, títulos de hemo e lacto-soro aglutinação, pelo TMAR, de vacas da Fazenda Federal de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 1974

Nome do animal	Data do nascimento	Nº de partos normais	Nº de abortos ou natimortos***	Títulos	
				Hemo-soro	Lacto-soro
Xilabia	5-11-64	6	0	1:2.000	1:2.000
Advenia	4-09-66	5	0	1:2.000	1:2.000
Salamandra	25-01-60	10	1	1:2.000	1:2.000
Trama*	1-02-61	8	0	1:2.000	1:20.000
Abada*	1-04-66	4	0	1:200	1:200
Codorna	20-02-68	1	1**	1:2.000	1:2.000
Abeta	16-05-66	3	1	1:2.000	1:2.000
Valentia*	1-08-63	6	1	1:2.000	1:2.000
Xibrapa	15-12-64	6	0	1:200	1:200
Zenda	21-08-65	4	0	1:200	1:2.000
Ametista	22-03-66	4	0	1:200	1:200
Vênus	23-04-63	6	0	1:2.000	1:2.000
Catiara	3-02-68	3	0	1:200	1:200
Bacora	28-12-67	1	1	1:2.000	1:2.000
Xeura	2-10-64	4	1**	1:2.000	1:2.000
Alfena	9-12-66	3	0	1:200	1:200
Zaragata*	28-08-65	5	0	1:200	1:2.000
Epona	30-03-70	1	0	1:2.000	1:20.000
Ximira*	20-11-64	5	1	1:2.000	1:2.000
Denise	18-01-69	2	0	1:200	1:200

\* Aglutinação frente a dois sorotipos

\*\* Natimortos

\*\*\* Todos no terço final da gestação (230 a 285 dias)



TABELA V - Comparação de títulos da hemo e lacto-soro-aglutinação, intervalada de 11 meses, pelo TMAR, frente a vários sorotipos de leptospira. Pedro Leopoldo, Minas Gerais. 1974

Nome do animal	Hemo-soro-aglutinação		Lacto-soro-aglutinação	
	1a. prova (21/11/73)	2a. prova (1º/11/74)	1a. prova (21/11/73)	2a. prova (1º/11/74)
Xilabia	1:2.000	negativo	1:2.000	negativo
Advenia	1:2.000	negativo	1:2.000	negativo
Salamandra*	1:2.000	1:200	1:2.000	1:200
Trama**	1:2.000	-	1:20.000	-
Abada	1:200	negativo	1:200	negativo
Codorna*	1:2.000	1:200	1:2.000	1:200
Abeta */**	1:2.000	-	1:2.000	-
Valentia	1:2.000	negativo	1:2.000	negativo
Xibrapa	1:200	negativo	1:200	negativo
Zenda	1:200	negativo	1:2.000	negativo
Ametista	1:200	negativo	1:200	negativo
Vênus	1:2.000	negativo	1:2.000	negativo
Catiara	1:200	1:200	1:200	1:200
Bacora*	1:2.000	1:200	1:2.000	negativo
Xeura */**	1:2.000	-	1:2.000	-
Alfena	1:200	negativo	1:200	negativo
Zaragata	1:200	1:200	1:2.000	1:2.000
Epona	1:2.000	1:200	1:20.000	negativo
Ximira*	1:2.000	1:200	1:2.000	1:200
Denise	1:200	negativo	1:200	negativo

\* Animais que abortaram ou pariram nati-mortos

\*\* Vacas não encontradas no rebanho por ocasião do 2º teste

## 5. DISCUSSÃO

A percentagem de 52,38 de reações positivas ao TMAR anti-leptospira por nós obtida, neste trabalho, através de 84 bovinos examinados, constitui índice bastante elevado sendo, mesmo, o maior verificado na amostragem brasileira, compilada de vários autores. Esta percentagem ultrapassa, em muito, a média verificada nesta compilação (21,9%) e distoa, fortemente, dos índices 23,6 e 19,9% encontrados nas duas maiores amostragens envolvendo, respectivamente, 15.080 e 1.562 animais (TAB. I).

A nossa explicação estaria em torno do tipo de manejo, que é o de semi-estabulação, da presença de grandes várzeas, do alto grau de confinamento do rebanho e das instalações velhas e bastante ultrapassadas em alguns pontos. A divergência não nos parece estar condicionada à técnica de diagnóstico por nós selecionada (TMAR), a qual oferece bastante confiança e elimina a quase totalidade das reações inespecíficas. Idêntico método foi utilizado por REIS et alii (1973), trabalhando com rebanhos de diversas procedências e obtendo uma percentagem bastante baixa (5,4).

No âmbito internacional a prevalência oscila entre 28,2 a 67,0%, nas diversas regiões onde se procurou diagnosticar a doença (CAFAREMA et alii, 1968; GENIS et alii, 1969; CORBOULD et alii, 1970; MICHNA, 1971). Os achados desta pesqui-



sa se situam dentro dessa faixa ocupando o seu terço superior.

Com relação a frequência de sorotipos, com base na hemo-soro-aglutinação, nossa tipagem (TAB. II) mostra bastante semelhança com os sorotipos prevalentes relacionados na TAB. I. O tipo *wolffii* apareceu em 40/49 dos soros positivos ao título de 1:200 ou maior (81,63%) e em 25/25 dos títulos 1:2.000 (100,00%).

Na lácteo-soro-aglutinação, onde 35/84 (41,66%) dos animais mostraram títulos positivos, a frequência do aparecimento do mesmo sorotipo *wolffii* foi muito menor aos títulos 1:200 (2/35), pronunciada a diluição 1:2.000 (12/35) e novamente muito baixo ao título extremo - 1:20.000 (2/35) sem dúvida não será fácil explicar a grande dominância do tipo *icterohaemorrhagiae* na lácteo-soro-aglutinação, onde aos títulos de 1:200 ou mais, apareceram em 19/35 casos positivos, o que nos dá a percentagem de 54,28. Poder-se-ia aventar a hipótese de ser este sorotipo de maior patogenicidade e especificidade do que o sorotipo *wolffii* com relação à glândula mamária onde produziria processo inflamatório duradouro.

O que se torna de difícil explicação é a baixa incidência dos casos positivos ao título de 1:20.000 (4/35) com a percentagem de 11,42. Pode-se admitir que o germe seja pouco aglutinogênico. Entretanto, sua maior patogenicidade corresponderia a maior permanência nos tecidos da glândula mamária e uma produção constante de anticorpos. A permanente drenagem de anticorpos pelo leite poderia ser responsabilizada pelo fato.

A combinação dos achados da hemo-lacteo-aglutinação nos dá alta frequência de anticorpos na glândula mamária (35/49) o que nos leva a acreditar qm histotropismo positivo de alguns sorotipos. O afirmado é facilmente comprovado no caso do sorotipo *icterohaemorrhagiae* e *wolffii* presente em 4/49 na hemo-soro-aglutinação a 1:200 ou maior e 19/35 na lácteo-soro-aglutinação aos mesmos títulos.

Hemo-soro-reações concomitantemente a mais de um sorotipo foram observadas em cinco animais. Quatro desses deram

reações positivas frente ao sorotipo *wolffi* a 1:200 e o último ao mesmo sorotipo a 1:2.000 (TAB. III). Três destes soros também reagiram frente ao sorotipo *icterohaemorrhagiae* e os dois restantes ao sorotipo *autumnalis*, todos ao título de 1:200. O número de animais relativamente pequeno, 5/20 (25,0%) e os títulos baixos impedem de conclusões sobre o significado real do achado que é normal em levantamentos sorológicos.

Os dados relativos à idade e atividades procriativas das 20 vacas trabalhadas, colocados na TAB. IV, frente aos títulos e hemo e lácteo-soro-aglutinação põem em evidência sete abortos ou parto a termo com natimortos, todos em animais com títulos de 1:2.000 à hemo-soro-aglutinação. Exceto um aborto, que ocorreu em 1962, todos os outros foram verificados nos últimos três anos. Estes animais que abortaram, o fizeram uma só vez contrastando com um a 10 partos normais. Ao que parece, e com base nessa pequena amostragem composta de animais não brucêlicos, o aborto teve como causa a infecção por *Leptospira* spp. Sem dúvida, outras causas, infecciosas ou não, poderiam ser responsabilizadas pelo aborto.

Dado interessante e que merece estudos posteriores, é a significação da lacteo-soro-aglutinação frente ao número de abortos. Todos os animais que abortaram tinham ao lácteo e hemo-soro o título de 1:2.000. Os títulos de 1:20.000, encontrados na lácteo-soro-aglutinação, ocorreram em duas vacas, ambas com título de 1:2.000 ao hemo-soro, uma delas comum e a outra com oito partos, todos normais. Poder-se-ia, ao que parece, afirmar ser esta prova pouco conclusiva quanto a aborto, devido a leptospiroses, muito embora nenhum animal com título de lácteo-soro-aglutinação baixa tenha abortado.

Em síntese, discutida a significação dos testes frente a manifestações clínicas de aborto e admitindo-se estes como devido a infecção por *Leptospira* spp, sete em 94 gestações (7,4%) - teríamos que incluir a leptospirose como doença de interesse econômico por interferir diretamente na atividade procriativa dos rebanhos (TAB. IV).

Todos os títulos abaixaram por ocasião da segunda prova de hemo e de lácteo-soro-aglutinação, a ponto de 10/17 (58,82%) animais anteriormente positivos ao teste sanguíneo oferecerem resultados negativos. Entranto, dos sete animais que exibiram títulos de 1:200 ou maior ao hemo-soro, quatro abortaram ou pariram natimortos. Quanto a prova de lácteo-soro-aglutinação, resultados negativos foram observados em 12/17 animais trabalhados (70,5%) incluindo-se um animal com título anterior de 1:20.000. Dos cinco reagentes à segunda prova, aproximadamente 11 meses depois, três tinham histórico de aborto ou natimortos. É difícil discutir a significação desse teste, a menos que se admita um estado de tolerância imunitária após longo tempo de infecção. Qualquer conclusão será prejudicada pelo pequeno número de casos trabalhados.

As tentativas de isolamento de *Leptospira spp* a partir de leite integral foram todas infrutíferas, embora cuidados especiais tenham sido tomados para se evitar contaminação de germes presentes, através de sementeira e inoculação em cobaios, imediatamente após a colheita do material e feita no próprio estábulo.

KIRSCHNER et alii (1955, 1957) demonstraram a presença, no leite do animal, de elementos com acentuado efeito anti-leptospira, impedindo a possibilidade de sobrevivência do germe no leite. Também STALHEIM & WILSON (1964) demonstraram que as leptospirosas são lisadas por baixa concentração de lípidos e treoninas. É de se supor que o fracasso na tentativa de isolar a leptospira no nosso caso, deve-se aos fatores acima referidos e agravados pelo pequeno número de amostras trabalhadas.

Por outro lado, a nossa grande falha nesta tentativa de isolamento está no pequeno número de cobaios utilizados - dois por amostra de leite - contra 28 utilizados por SULLIVAN & STALLMAN (1970). Também, por razões financeiras, não foram repetidas as provas de inoculação o que poderia diminuir a influência de possível ciclicidade na eliminação do patógeno.



## 6. CONCLUSÕES

1) O número de hemo-soro-aglutinações positivas, 44/84 (54,38%) é bastante elevado se comparado com as porcentagens verificadas em outros trabalhos brasileiros relativos a leptospirose bovina (4.091/18.762

2) à prova de hemo-soro-aglutinação e aos títulos de 1:200 ou maior, o sorotipo *wolffii* foi o de maior prevalência (81,63%) seguindo-se os sorotipos *icterohaemorrhagiae* (8,16%), *autumnalis* (4,08%) e *pyrogenes* (2,04%);

3) hemo-soro-aglutinações simultaneamente positivas a mais de um sorotipo são de baixa frequência. Somente 5/49 dos animais testados (10,20%) as exibiram;

4) títulos bastante significativos foram encontrados no lácteo-soro - 35/84 - de animais positivos ao teste sanguíneo de micro-aglutinação rápida (41,66%);

5) à prova de lácteo-soro-aglutinação e aos títulos de 1:200 ou maior, o sorotipo *icterohaemorrhagiae* foi o de maior prevalência (54,28%), seguindo-se o sorotipo *wolffii* (45,75%);

6) parece ocorrer diminuição progressiva de títulos a ponto de um segundo teste, intervalado de 11 meses, apresentar 10/17 (58,82%) resultados negativos à hemo-soro-aglutina -

ção e 12/17 (70,58%) à lácteo-soro-aglutinação. Anteriormente estes índices negativos eram de 47,61 e 58,38, respectivamente;

7) houve correlação de títulos de anticorpos sanguíneos e lácteos com deficiências procriativas traduzidas por abortos ou nati-mortos em 7/94 partos normais (7,44%);

8) todos os animais que abortaram apresentaram a hemo e lácteo-soro-aglutinação ao título de 1:2.000;

9) nos animais que sofreram aborto, este ocorreu no terço final da gestação, talvez dado ao curso lento e insidioso da doença;

10) a julgar pela negatividade das provas de isolamento e inoculação do patógeno, é provável que animais com altos títulos no hemo e lácteo-soro podem não eliminar leptospiras pelo leite ou o fazem com irregularidade. Também fatores inibidores podem ser responsabilizados por esta negatividade.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, A.D. Distribución de la Leptospirose en America Latina. Bol. Ofic. Sanit. Panam., Washington, 49:149-64, 1960.
2. BAKER, J.A. & LITTLE, R.B. Proc. Soc. Exp. Bid. Med., New York, 1946 apud BAKER, J.A. & LITTLE, R. Leptospirosis in cattle. J. Exp. Med., New York, 88:295-307, 1948.
3. BAKER, J.A. & LITTLE, R.B. Leptospirosis in cattle. J. Exp. Med., New York, 88:295-308, 1948.
4. BARBOSA, M. Aglutininas e lisinas anti-leptospira em soros de bovinos, equinos e suínos em Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 14:1-26, 1962.
5. BERNKOPF, H. Experimental work on leptospirosis in man and cattle in Palestine. Refuah Vet., Tel Aviv, 3:49-54, 1946 apud MICHNA, S.W. Leptospirosis. Vet. Rec., London, 86:484-96, 1970.
6. BODI, A.; ERROS, I.; KEMENES, F. (*Leptospira grippotyphosa* infection in dairy cattle in western Hungary). Nary Alatory, Lap., Hungary, 19:329-32, 1964 apud MICHNA, S.W. Leptospirosis. Vet. Rec., London, 86:484-96, 1970.

7. BOHL, E.H. & FERGUSON, L.C. Leptospirosis in domestic animals. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 121:421-8, 1952.
8. BORG-PETERSEN, C. & FENNESTAD, K.L. Studies on bovine leptospirosis and abortion. I. Serological examination of aborting and "Normal" cattle in Denmark. Nord.Vet. Med., Copenhagen, 14:609, 1956 apud MICHNA, S.W. Leptospirosis. Vet. Rec., London, 86:484-96, 1970.
9. BOTES, H.J.W. & GARIFALLOU, A. Leptospirosis: A brief, general considerations and incidence in South Africa. J.S. Afr. Med. Ass., Pretoria, 38:67-75, 1967.
10. BOULANGER, P.; MITCHELL, D.; SMITH, A.N.; RICE, C.E. Leptospirosis in Canada. III. A study of the importance of the disease in cattle as shown in combined serological, clinical and bacteriological investigations. Canad. J. Comp. Med., Gardenvale, 22:127-143, 1958.
11. BURKI, F. & WIESMANN, E. Schewiz, Arch. Tierheilk, 105 :491, 1963 apud MICHNA, S.W. Leptospirosis. Vet. Rec., London, 86:484-96, 1970.
12. BURROWS, W.; MOULDER, J.W.; LEWERT, R.M. Tratado de microbiologia. 8ed., London, W.B. Saunders, 1965. 1155p.
13. BYRNE, R.J. & CHAMBERS Jr., C.F. A serological survey for leptospiral antibodies in Maryland cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 134:498-502, 1959.
14. CAFAREMA, R.M.; CACCHIONE, R.A.; CASCELLI, E.S.; MARTINEZ, E.S.; AGORIO, M.; BARRIOLA, J. Leptospiroses in Uruguay. Rev. Fac. Cienc. Vet., La Plata, 10:247-54, 1968 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 40:485, 1970.
15. CLARK, L.G.; KRESSE, J.I.; MARSHAK, R.R.; HOLLISTER, C.J. *Leptospira pomona* isolations by direct blood culture

- of clinically infected cattle. J. Amer. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 137:668-9, 1960.
16. CORBOULD, A. *Leptospira hardjo* in Tasmania. Aust. Vet. J., Brunswick, 47:26, 1971.
17. CORDEIRO, F. Aglutininas anti-leptospira em soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1973. 50p. (Tese, Mestrado)
18. DOHERTY, P.C. Comparison of direct microscopie and guinea inoculation techniques for demonstrating leptospiras in bovine urine. Aust. Vet. J., Brunswick, 42:466-7, 1966
19. FERGUSON, L.C.; RANGE, J.C.; SANGER, V.R. Experimental bovine leptospirosis. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 18:43-9, 1957.
20. FISH, N.A. & GRINGER, I. A reprot on investigational studies of bovine leptospirosis in Ontario. Canad. J. Comp. Med., Gardenvale, 21:267-75, 1957.
21. FLETCHER, W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay states. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyp., 21:265-87 apud GALTON et alii. Manual sobre metodos de laboratório para leptospirose. Ramos Mejia, Centro Panamericano de Zoonosis, 1968. 60p. (Nota Tecnica nº 9).
22. FREITAS, D.C.; VEIGA, J.S.; LACERDA, P.M.G.; LACERDA, J.P. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. Rev. Fac. Med. Vet., São Paulo, 6:81-4, 1957.
23. GENIS, A.I.; TYNALIEVA, K.I.; ZAPOL'SIKH, L.M.; VOROB'EVA, L.M. [Leptospiroses in animals in Kirgizia]. Veterinarya, Moscou, (9):34-5, 1969.
24. GUIDA, V.O. & BARROS, W.M. Pesquisa de aglutininas e lisinas anti-leptospira, em soros de bovinos aparentemente



- te normais, sacrificados no matadouro. O Biológico, São Paulo, 24:26-7, 1958.
25. GUIDA, V.O.; SANTA ROSA, C.A.; D'APICE, M.; CORREIA, M.O.; NATALE, V. Pesquisa de aglutininas anti-leptospira no soro de bovinos do Estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 26:109-17, 1959.
  26. HENGL, R.; KASZA, L.; KEMENES, A. A lejolo tehenek elapsztasa (togyulladása) Leptospirosis Kovetkezteben. Mag. Allantory Lap., Hungary, 13:33-7, 1958.
  27. HOAG, W.G. & BELL, W.B. Bovine leptospiral meningitis. J. Amer. Med. Assoc., Schaumburg, 124(5):379-80, 1954.
  28. HOARE, R.J. & CLAXTON, P.D. Observations on *Leptospira hardjo* infection in New South Wales. Aust. Vet. J., Brunswick, 48:228-32, 1972.
  29. HORVARTH, G.; KEMENES, F.; L.KOLLAI, F. Mag. Allantory Lap., Hungaria, 20:548, 1965 apud MICHNA, S.W. Leptospirosis. Vet. Rec., London, 86:484-96, 1970.
  30. JONES, R.K. A random serological survey for evidence of infection in Indiana cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 134:503-6, 1959.
  31. JUNGHERR, E. Bovine leptospirosis. J. Am. Vet. Assoc., Schaumburg, 105:276-81, 1974.
  32. KEAST, J.C.; FORBES, B.R.V.; WANNAN, J.S. Bovine leptospirosis in New South Wales including the results of a 10 year survey. Aust. Vet. J., Brunswick, 40:19-26, 1964.
  33. KIRSCHNER, L. & MAGUIRE, T. Antileptospiral effect of milk. N.Z. Med. J., 54:560-4, 1955 apud MITCHELL, D. & BOULANGER, P. Leptospirosis in Canada. IV. An atypical mastitis in

- cattle due to *Leptospira pomona*. Canad. J. Comp. Med., Gardenvale, 23:250-5, 1959.
34. KIRSHNER, L.; MACHINE, R.S.; BERTAUD, W.S. Further evidence of the antileptospiral effect of milk. Electron microscopic studies. Brit. J. Exp. Path., 38:357-61, 1957.
  35. KNOTT, S.G. & DADSWELL, L.P. An outbreak of bovine abortions associated with leptospirosis. Aust. Vet. J., Brunswick, 46:385-6, 1970.
  36. LUBASZENKO, S.; NIECEPLAJEV, S.V.; KOSTRIKINA, L.G.; LOGINOV, I.A. Veterinaria. Moscou (2):34 apud MICHNA, S.W. Leptospirosis. Vet. Rec., London, 86:484-96, 1970.
  37. MICHIN, N.A. & AZINOV, S.A. [Spirochaetal jaundice of cattle in North Caucasus]. Soveget. Vet., 10:23-27, 1935 apud Vet. Bull., 7:419, 1937.
  38. MICHNA, S.W. Animal leptospirosis in the British Isles. A serological survey. Vet. Rec., London, 80:394-401, 1967.
  39. MICHNA, S.W. Leptospirosis in British cattle. Vet. Rec., London, 88:384-6, 1971.
  40. MITCHELL, D. & BOULANGER, P. Leptospirosis in Canada. IV. An atypical mastitis in cattle due to *Leptospira pomona*. Canad. J. Comp. Med., Gardenvale, 23:250-5, 1959.
  41. MITCHELL, D.; BOULANGER, P.; SMITH, A.N.; BANNISTER, G.L. Leptospirosis in Canada. V. Infection in cattle with a serotype of the *hebdomadis* group. Canad. J. Comp. Med., Gardenvale, 24:229-34, 1960.

42. MOORE, T. & RICE, C.E. Leptospiral investigations of leptospirosis in Canada. I. Introductions and preliminary complement fixation studies of cattle sera with commercially-prepared *Leptospira pomona* antigen. Canad. J. Comp. Med., Gardenvale, 20:362-73, 1956.
43. NIKOLAJEV, I.I. Leptospirosis in the U.S.S.R. Med. Parasit., Moscou, 1565-74, 1946 apud MICHNA, S.W. Leptospirosis. Vet. Rec., London, 86:484-96, 1970.
44. QUEVEDO, M.J. & QUEVEDO, C. Bovine leptospirosis: A new disease in Argentina. Rev. Med. Vet., Buenos Aires, 29:604-13, 1947.
45. REINHARD, K. A clinical pathological study of experimental leptospirosis of calves. Am. J. Vet. Res., Schaumburgh, 12:282-91, 1951.
46. REIS, R.; RYU, E.; PENA, C.M. Pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em bovinos e suínos em Minas Gerais, Brasil. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 25:11-14, 1973
47. ROTH, E.E. & GALTON, M.M. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle, in Louisiana. Am. J. Vet. Res., Schaumburgh, 21:422-427, 1960.
48. RYU, E. Rapid microscopic agglutination test for *Leptospira* without non-specific reaction. Bull. Off. Int. Epiz., Paris, 73(1-2):49-58, 1970.
49. SANTA ROSA, C.A.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; TROISE, C. Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de bovino em São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 28:113-8, 1961a
50. SANTA ROSA, C.A.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; TROISE, C. Leptospirose bovina. Inquérito sorológico na região de Campinas. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 28:169-73, 1961b.

51. SANTA ROSA, C.A.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; SILVA, A.S.; TEUYA, J.M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 29/30:19-27, 1969/70.
52. SERGENT, E.; SERGENT, E.; L'HERITIER, A. Fiever bilieuse hemoglobinurique du boeuf d'Algerie, maladie distincte des piroplasmoses. Bull. Soc. Pathol. Exot., Paris, 12: 108-20, 1919.
53. SMITH, D.L. & PERRY, D.A. Bovine leptospirosis. Canad. J. Comp. Med., Gardenvale, 16:294-299, 1952.
54. SPRADBROW, P.B. Leptospiral antibodies in sera of domestic animals in Queensland. Aust. Vet. J., Brunswick, 40:254-6, 1964.
55. STALHEIM, O.H.V. Leptospiral lysis by lipids of renal tissue and milk. J. Bacteriol., Washington, 89(2):545, 1965
56. STOENNER, H.G.; HADLOW, W.J.; WORD, J.K. Neurologic manifestations of leptospirosis in a dairy cow. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburgh, 142:491-3, 1963.
57. STUART, R.D. The preparation and use of a simple culture medium for leptospirae. J. Path. Bact., 58:543-9, 1946.
58. SULLIVAN, N.D. & CALLAN, D.P. Isolation of *Leptospira hardjo* from cows with mastitis. Aust. Vet. J., Brunswick, 46:537-9, 1970.
59. SULLIVAN, N.D. & STALMAN, N.D. The isolation of a strain of *Leptospira*, serotype *hardjo* from cattle in Queensland. Aust. Vet. J., Brunswick, 45:281-3, 1970.
60. TERSKIKH, V.I. [The etiology of infections icterus among the cattle]. J. Microb., Moscou, 8:66-8, 1940 apud BOHL & FERGUSON. Bull. Hyg., Ottawa, 16:335, 1941.



61. TURNER, L.W.; ROBERTS, C.S.; WIGGINS, A.M.; ALEXANDER, A. D.; MURPHY, L.C. A bacteriologically verified *L.canicola* infection in a calf. Am. J. Vet. Res., Schaumburgh, 19: 781-4, 1958.
62. TWIGG, G.I.; HUGHES, D.M.; McDIARMID, A. Leptospiral antibodies in dairy cattle: Some ecological considerations. Vet. Rec., London, 90:598-602, 1972.
63. VAN der HOEDEN, J. A milk agglutination test in leptospirosis. Cornell Vet., Cornell University, 45:190-2, 1955.
64. VAN der HOEDEN, J. Epizootiology of leptospirosis (canicola) in the bovine and other species in Israel. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 126:207-10, 1955a.
65. VAN der HOEDEN. Refuah Vet., Tel Aviv, 21:107, 1964 apud MICHNA, S.W. Leptospirosis. Vet. Rec., London, 86:484-86, 1970.
66. VARELA, G.; VASQUEZ, A.; MANCERA, L. Rev. Inst. Salud y Enf. Trop., Mexico, 18:31, 1958 apud ALENAWDER, A.D. La distribución de la leptospirosis en America Latina. Bol. Off. Sanit. Panam., Washington, 49:149-64, 1960.