

JOSÉ ANTÔNIO PAIM SCHENK

ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRA DO SOROGRUPO *HEBDOMADIS* DE
TATUS (*Dasypus novemcinctus*) CAPTURADOS NO ESTADO DE
MINAS GERAIS

FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA
EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

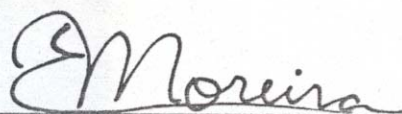
Tese apresentada ao Departamento
de Medicina Veterinária Preventiva
da Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Ge-
rais como requisito parcial para
obtenção do Grau de Mestre em Me-
dicina Veterinária.

Belo Horizonte
Minas Gerais - BRASIL

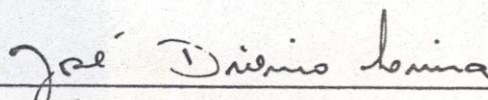
1976

Tese aprovada em 26/05/1976

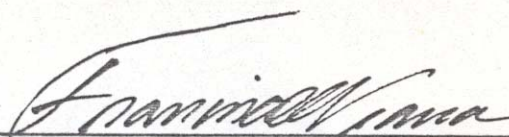
BANCA EXAMINADORA:



Professor ELVIO CARLOS MOREIRA



Professor JOSE DIVINO LIMA



Professor FRANCISCO CECÍLIO VIANA

O autor agradece sinceramente àqueles que tornaram possível a realização desse trabalho e, em especial, ao amigo e orientador Professor ELVIO CARLOS MOREIRA.

Aos meus pais, pela dedicação e sacrifício na minha formação profissional;

À minha esposa e filhos, pelo amor e compreensão;

Ao tio Ruy, pelo exemplo (*in memoriam*).

	<u>Página</u>
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	4
3. Material e Métodos	11
4. Resultados	21
5. Discussão	38
6. Conclusões	47
7. Resumo	49
8. Referências Bibliográficas	52

Atualmente, está demonstrado que além de ratos e cães, a maioria dos mamíferos domésticos e silvestres se infectam por leptospira, mantendo o ciclo da doença na natureza.

No Brasil, a primeira referência de isolamento de leptospira em animais é de ARAGÃO (1977), que trabalhou com ratos (*Rattus norvegicus*) capturados na cidade do Rio de Janeiro. Embora desde essa data a leptospirose venha sendo estudada, poucas são as pesquisas em nosso meio que não se restringiram a ratos de várias espécies, enquanto outros animais silvestres, ou mesmo domésticos, ficaram relegados a um segundo plano. Provavelmente, CASTRO & cols. (1961) e SANTA ROSA (1970), tenham sido os primeiros a pesquisar leptospira em outras espécies de roedores e marsupiais.

Entre o grupo de animais silvestres, algumas espécies de tatu foram investigadas como possíveis reservatórios de leptospira para os animais domésticos. Assim, ROTH & cols. (1964), nos Estados Unidos,

demonstraram a infecção em tatu (*Dasypus novemcinctus*) por leptospira do grupo *autumnalis*, enquanto que na Argentina, as pesquisas de CACCHIONE & cols. (1966) e SZYFRES & cols. (1967) mostraram que a espécie *Chaetophractus villosus* é reservatório de leptospiras do sorogrupo *canicola* e *bataviae*.

O papel que o tatu pode representar na difusão da leptospirose em nosso meio, necessita ser investigado, pois, ocupando o mesmo habitat dos animais domésticos de maior expressão econômica, como bovinos, suínos, eqüinos, ovinos e caprinos, facilmente poderia contaminar os pastos e a água de beber consumidos por essas espécies.

Neste sentido, objetivou-se com este trabalho determinar:

- os sorotipos de leptospiras mais frequentes em tatus, através da microaglutinação rápida (MAR);
- a comparação existente entre os sorotipos mais frequentes em tatu com os sorotipos encontrados em bovinos, suínos e eqüinos;
- a presença de leptospiras em rins de tatu, através do isolamento e da imunofluorescência direta (IFD).

1. Isolamento de *Leptospira* e sorologia

BARBOSA & HIPÓLITO (1952) isolaram *Leptospira icterohaemorrhagiae* de ratos (*Rattus norvegicus*) capturados na cidade de Belo Horizonte. Dos 61 ratos examinados, foi constatado leptospira em 27 animais (44,3%).

McKEEVER & cols. (1958) estudaram a incidência de leptospiros em 820 mamíferos silvestres capturados na Georgia (USA), isolando dos rins desses animais 44 (5,4%) amostras de leptospiros

ROTH & GALTON (1960) isolaram *L. hardjo* do sangue de vacas sorologicamente positivas a esse sorotipo. As hemoculturas foram feitas em meio de Fletcher e de Stuart, esse último acrescido de 0,3% de ágar nutriente.

CORREA & cols. (1965/67) isolaram *L. wolffi* do líquido espinhal de um homem hospitalizado com sintomas de leptospirose e dos rins de dois roedores, capturados na área onde residia o paciente. Examinando 150 soros humanos da mesma região, verificaram cinco positivos para o sorogrupo *wolffi*.

MICHNA & CAMPBELL (1969 e 1970) na Escócia, isolaram *L. sejroe* dos rins de quatro vacas que abortaram. Num inquérito sorológico de 319 bovinos com histórico de aborto, verificaram 60,8% de positivos para leptospira, sendo que entre esses, 75,7% apresentaram reações para o sorotipo *sejroe*. Em outro rebanho de 192 vacas com oito casos de aborto, 74,4% foram positivos para o mesmo sorotipo. Esses autores, pesquisando leptospira em 295 mamíferos silvestres capturados nesta mesma área, isolaram sete amostras, sendo uma do sorogrupo *hebdomadis* e seis não identificadas.

SULLIVAN & STALLMAN (1969) isolaram *L. hardjo* de uma novilha clinicamente normal que se apresentava, entretanto, com intensa leptospirúria e título de 1:30.000 para esse sorotipo. Esse animal pertencia a um rebanho com histórico de nefrite intersticial e alta frequência de anticorpos *L. hyos*.

SANTA ROSA (1970) pesquisou leptospira em 900 animais silvestres, entre roedores e marsupiais, capturados no Estado de São Paulo, conseguindo isolar 27 (3,0%) amostras. Dessas, 26 foram isoladas de rim, sendo 17 somente por cultura direta do rim em meio de Fletcher, duas por cultura direta de rim e hemocultura

de cobaio e sete apenas por hemocultura de cobaio. A restante foi isolada por urocultura do animal e hemocultura do cobaio. Das culturas isoladas, 21 pertenciam ao sorotipo *grippothyphosa*, duas ao *ballum*, duas ao *brasiliensis*, uma ao *icterohaemorrhagiae* e, uma *szwajizak*, que pertence ao sorogrupo *hebdomadis*.

CARRILLO & cols.(1972), pesquisando leptospira em 59 tatus da espécie *Dasypus hybridus* e 438 de *Chaetophractus villosus* capturados na Província de Buenos Aires, isolaram 24 amostras de leptospira dos rins dessa última espécie, sendo 14 do sorotipo *argentinensis*, nove do *paidjan* e uma do *bataviae*. Dos 438 tatus, 23 deram reações positivas ao teste de microaglutinação lenta, sendo que os sorotipos prevalentes foram *sejroe*, *hebdomadis* e *bataviae*. De 198 amostras de urina, somente uma foi positiva para leptospira. Entre os 59 *D. hybridus*, houve dois reagentes ao teste de microaglutinação, sendo isolada uma amostra, que, entretanto, foi perdida antes da tipificação.

Soros de 170 bovinos foram testados, sendo que 168 foram reagentes (98,0%) dos quais 164 apresentaram títulos de 1:100 a 1:12.800 para *L. hardjo*.

SANTA ROSA & cols. (1969/70), utilizando a técnica de microaglutinação lenta, examinaram 15.080 soros bovinos, obtendo 23,6% de positivos, predominando o sorotipo *wolffi* em 53,3%. Entre os 3.242 soros de suínos examinados, 19,5% deram reações positivas, predominando o sorotipo *pomona* em 54,6%. Da espécie eqüina foram examinados 811 soros, com 29,7% de positivos, predominando a *L. pomona*, seguido da *L. canicola* e da *L. sejrøe*.

REIS & cols. (1973) realizaram uma pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em 720 soros de bovinos e 134 soros de suínos do Estado de Minas Gerais. Entre os bovinos examinados, 5,4% deram reações positivas, sendo que 89,7% ao sorotipo *hebdomadis*, seguido do *pomona* e do *australis*. Os soros de suínos apresentaram 11,9% de positividade, predominando *L. pomona* em 87,5% dos positivos, seguido de *L. hebdomadis* com 12,5% e *L. javanica* com 6,25%.

ÁVILA (1976) examinou 770 soros de suínos, abatidos em Belo Horizonte e procedentes de 26 municípios do Estado de Minas Gerais. Ao teste de microaglutinação rápida, 82,4% revelaram reações positivas e os sorotipos mais prevalentes foram *autumnalis* (38,5%);

wolfii (33,5%); *ballum* (32,9%); *butembo* (27,5%); *bratislava* (22,6%); *bataviae* (16,4%); *javanica* (13,9%); *icterohaemorrhagiae* (12,8%) e *pomona* (10,6%).

2. Demonstração de *Leptospira* pela imuno fluorescência direta e por histopatologia

MOULTON & HOWARTH (1957), utilizando a IFD, demonstraram *L. canicola* em cortes de rins de hamsters inoculados experimentalmente com esse sorotipo. Concluíram os autores que a IFD é sorotipo específica, pois quando usaram conjugado inespecífico, não ocorria fluorescência dos organismos.

WHITE & RISTIC (1959) através da IFD, demonstraram *L. pomona* nos rins de cobaias e na urina de bovinos, ambos infectados experimentalmente. A inespecificidade do método foi demonstrada pelo fato de sorotipos heterólogos ao conjugado terem apresentado fluorescência. Concluíram ainda que a IFD possui vantagens sobre as técnicas usuais de isolamento e visualização da leptospira.

COFFIN & MAESTRONE (1962), demonstraram leptospiras na urina, em esfregaços de rim e em cortes histológicos de órgãos de cães com leptospirose. Os au-

tores compararam a IFD com outras técnicas de isolamento e campo escuro, demonstrando que a IFD é mais eficiente, principalmente quando se trabalha com material contaminado, congelado e estocado por muito tempo em formalina. Observaram ainda, que os conjugados *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. canicola* coram esfregaços de sorotipos heterólogos, não apresentando grandes diferenças, quando aplicados em sorotipos homólogos.

REINHARD & HARDLOW (1954) estudando os efeitos patológicos de *L. pomona* em bovinos, encontraram densa infiltração de células mononucleares em redor dos canais biliares, associada com descamações do epitélio. Nos rins ocorreram áreas de infiltração intersticial com início de fibrose.

SANGER & cols. (1961) estudaram a patogenicidade da *L. pomona* em hamster, verificando, através da histopatologia, áreas de degeneração turva no fígado e nefrite aguda.

STALHEIM (1967 e 1968) inoculou hamster com *L. pomona*, observando como característica básica da infecção o aparecimento da nefrite.

3. Material e Métodos

1. Animais

1.1. Tatus

Foram colhidas 97 amostras de rins e 136 amostras de sangue de tatus (*Dasypus novemcinctus*) capturados nos municípios de Desterro de Entre Rios, Entre Rios de Minas, Formiga, Itaguara, Passa Tempo e abatidos em matadouro de Belo Horizonte, Minas Gerais.

1.2. Bovinos

Foram colhidas amostras de sangue de bovinos em fazendas situadas nos municípios de Cordisburgo, Corinto, Felixlândia, Governador Valadares e Pedro Leopoldo, no Estado de Minas Gerais.

1.3. Eqüinos

Foram colhidas amostras de sangue de 50 eqüinos procedentes dos municípios de Arcos, Belo Horizonte, Cordisburgo, Entre Rios de Minas, Formiga, Governador Valadares, Montes Claros, Pedro Leopoldo, San-

ta Maria do Suassuí, Salto da Divisa, no Estado de Minas Gerais.

1.4. Suínos

Foram colhidas amostras de sangue de 50 suínos abatidos em matadouros de Belo Horizonte, provenientes dos municípios do Estado de Minas Gerais: Contagem, Felixlândia, Formiga, Montes Claros e Ponte Nova.

Todas essas amostras de sangue eram colhidas em vidros de boca larga (6 x 4,5 cm) previamente esterilizados e colocados em refrigerador a 5°C por uma hora para melhor dessoramento. O sangue era centrifugado a 1.500 rpm, por 10 minutos e o soro obtido era estocado em congelador a -20°C até o momento do exame.

2. Isolamento e identificação

Para o isolamento trabalhou-se com 46 rins de tatus colhidos assepticamente e colocados em placas de Petri esterilizadas.

De cada rim era retirada a cápsula de Bowman e a metade era triturada em gral esterilizado. Esse triturado era suspenso em solução de Sorensen, pH 7.6, estéril e semeado em meio semi-sólido de Fletcher (1928),

seguindo-se a técnica de diluição proposta por GALTON & cols. (1962). As culturas eram incubadas em estufa a 28°C. Ao terceiro dia de cultivo eram examinadas macro e microscopicamente. Semanalmente eram reexaminadas e, ao final de 30 dias, aquelas que não apresentavam crescimento eram descartadas.

Para a descontaminação das culturas foi utilizada a técnica descrita por GALTON & cols. (1962) que consistiu na inoculação de hamsters, via intraperitoneal e uso de filtro de Swinny e passagem em placas de Petri contendo meio sólido de COX & LARSON (1957).

3. Imunofluorescência direta

3.1. Preparação do conjugado

Os conjugados foram preparados a partir de soros hiperimunes anti *L. autumnalis*, *L. hebdomadis* e *L. pomona*, liofilizados, fornecidos pelo "WHO/FAO-Reference Leptospirosis Laboratories". Todos os soros possuíam títulos de 1:25.000 pelo teste de aglutinação-lise.

Um dos conjugados foi preparado com mistura de partes iguais de soros hiperimunes anti *L. autumnalis*.

L. hebdomadis, sendo que o outro somente com soro anti-*L. pomona*. Cada soro foi reconstituído com 1 ml de água destilada estéril, conforme recomendação do fornecedor. Em seguida as globulinas foram extraídas pelo sulfato de amônia 3,52 M e marcadas com isotiocianato de fluoresceína, conforme técnica de COONS & KAPLAN (1950).

3.2. Preparo dos cortes de rins

O estudo de IFD foi efetuado em 97 rins de tatus. Cada rim era seccionado no sentido transversal, retirando-se um fragmento que abrangesse a camada cortical e medular. Em cada fragmento eram feitos dois cortes de 4 μ de espessura, utilizando micrótomo de congelação, de acordo com a técnica descrita por COONS (1956). Os cortes, em número de dois por lâmina, eram secos em temperatura ambiente e fixados com acetona p.a., durante 10 minutos, conforme técnica descrita por HODGES & EKDAHL (1973). Após fixados e completamente secos, eram delimitados com esmalte branco, não cintilante. Alguns cortes histológicos de rim foram corados pelo método de Levaditi (LUNA, 1968).

3.3. Preparação da reação

O conjugado era diluído da 1:15 em solução

de salina tamponada pH 7.2, contendo 20% de rim de hamster e colocado sobre os cortes a fim de remover a fluorescência inespecífica, de acordo com a técnica descrita por MOULTON & HOWARTH (1957). As lâminas eram incubadas em câmara úmida a 37°C por 40 minutos e após levadas em imersão com salina tamponada, pH 7.2, durante 10 minutos e, rapidamente, em água destilada. Depois de completamente secas eram montadas com glicerina tamponada e lamínula. Foram, também, preparadas lâminas controles positivo e negativo do método, conforme técnica de MOULTON & HOWARTH (1957).

3.4. Leitura

Considerava-se como reação positiva o aparecimento de leptospiras fluorescentes, isoladas ou agrupadas no campo microscópico. Utilizou-se microscópio binocular, objetiva de imersão 40 X; oculares 10 X; condensador de campo escuro, a óleo; filtro de excitação 4 G₂ e de barreira 0/41. Como fonte de iluminação uma lâmpada ultravioleta HBO-200 (Osram).

Amostras da *Leptospira* isolada foi enviada ao Professor Carlos Almeida Santa Rosa, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São

Paulo, para a tipificação inicial e ao Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO) - República Argentina, para a tipificação final.

4. Preparo de aglutininas

4.1. Antígenos

As culturas de *Leptospira* foram gentilmente cedidas pelo CEPANZO, cujas amostras estão relacionadas no Quadro I. Estas culturas recebidas em meio de Fletcher foram posteriormente repicadas em meio líquido de STUART (1946) acrescido de 10% de soro de coelhos, clinicamente normais.

Os antígenos utilizados no teste de microaglutinação (Quadro I) eram incubados a 28°C durante cinco a sete dias, em meio de Stuart, isentos de autoaglutinação e com aproximadamente 100 organismos vivos por campo microscópico de 400 X.

4.2. Sorologia

Para a pesquisa de aglutininas antileptospiras foi utilizado essencialmente o Método de Microaglutinação Rápida (MAR) descrito por RYU (1970) que, basicamente, consistia em diluir os soros em solução de

Sorensen (pH 7.6) inicialmente a 1:50 e depois na razão dois (2) tantas vezes quanto necessário para alcançar o título final.

De cada diluição do soro era tomado uma gota (\pm 0,05ml), que era colocada em placa de louça esca- vada. Igual volume de antígeno era colocado frente às diluições, agitava-se a placa e deixava-se em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente. Uma gota dessa mistura era colocada em lâmina de vidro (7,5 x 2,5 cm) e examinada em microscópio binocular, equipado de condensador de campo escuro, a seco, oculares de 10 X e objetiva de 16 X.

4.3. Leitura e interpretação

O critério de leitura das reações de MAR utilizado foi o descrito por GALTON & cols. (1962) que consiste no seguinte:

- o grau de aglutinação e lise é dado em cruces, variando de uma a quatro cruces (1+ a 4+) e negativo. A reação é considerada quatro cruces (4+) quando 75% a 100% das leptospi- ras aparecem agrupadas; três cruces (3+) quando aproximadamente 75% dos organismos estão aglutinados; duas cruces (2+) quando acima de 50% aglutinaram e uma cruz (1+) quando ocorre, no mínimo,

25% de leptospiras aglutinadas.

5. Teste de patogenicidade para hamster

As culturas de leptospira eram inoculadas em hamsters segundo a técnica de STALHEIM (1967). Ao 45º dia após a inoculação, os animais eram sangrados e necropsiados. Cortes histológicos dos rins e fígados eram corados pela hematoxilina e eosina (HE). Os soros eram testados pelo método de MAR frente ao sorotipo inoculado.

QUADRO I

Sorotipos de *Leptospira* usados como antígeno no teste de microaglutinação (MAR)

SOROGRUPO	SOROTIPO	AMOSTRA
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>	Valdrat Batavia 46
<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>	Hond Utrecht VI
<i>Ballum</i>	<i>ballum</i>	Mus 127
<i>Ballum</i>	<i>castelloni</i>	Castellón 3
<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	Salinem
<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>	Perepelicin
<i>Cynopteri</i>	<i>butembo</i>	Butembo
<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>	Akyiami A
<i>Australis</i>	<i>bratislava</i>	Jez bratislava
<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	Pomona
<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>	Van Tienen
<i>Bataviae</i>	<i>argentiniensis</i>	LT 1019
<i>Bataviae</i>	<i>brasiliensis</i>	LT 966
<i>Hebdomadis</i>	<i>wolffi</i>	3705
<i>Hebdomadis*</i>		L 10

* Amostra L 10 tipificada como pertencente ao sorogrupo *Hebdomadis* dependendo ainda da classificação final pelo CEPANZO.

1. Isolamento e identificação

Dos triturados de rins de 46 tatus (*Dasypus novemcinctus*), semeados em meio de Fletcher, foi observado o crescimento de leptospiras ao quarto e nono dias de cultivo, em duas (4,3%) culturas, codificadas como L 10 e L 11. Ambas encontravam-se contaminadas e somente foi possível a descontaminação de uma das (2,1%) culturas, a L 10, após uma única passagem de filtro Swinny de 0,25 micra. Essa amostra foi adaptada em meio de Stuart após 15 repiques intervalados de cinco dias.

As tentativas de descontaminação da cultura L 11, através da inoculação intraperitoneal em hamster e passagens em meio sólido de Cox, foram infrutíferas.

Do total de 46 culturas, 41 (89,1%) apresentaram-se contaminadas por bactérias e fungos.

A amostra L 10 foi inicialmente classificada pelo Prof. SANTA ROSA como pertencente ao sorogrupo *hebdomadis*, através do teste de Microaglutinação Lenta (GALTON & cols., 1962).

Os soros dos tatus L 10 e L 11 apresentaram ã MAR, títulos para vários sorotipos (Quadro II).

Não foram observadas lesões macroscópicas nos rins utilizados no isolamento.

2. Sorologia

Dos 136 soros de tatu examinados pelo teste de MAR, 132 (97,0%) reagiram a um ou mais sorotipos (Quadro III). Os sorotipos predominantes foram *autumnalis* (60,2%); *brasiliensis* (62,9%); amostra L 10 (44,8%); *argentinensis* (42,6%) e *tarassovi* (41,8%) (Gráfico 1).

Verifica-se ainda pelo Quadro III, que dos 50 soros bovinos examinados, 49 (98,0%) reagiram a um ou mais sorotipos, o mesmo ocorrendo com as 50 amostras de sangue de suínos; quanto aos 50 soros de eqüinos, todos reagiram a um ou mais sorotipos.

Os títulos finais dos soros de tatus, bovinos, eqüinos e suínos, encontrados no teste de MAR, estão registrados nos Quadros IV, V, VI e VII, respectivamente, e os percentuais para cada sorotipo nessas espécies estão representados nos Gráficos 1, 2, 3 e 4.

3. Imunofluorescência direta

Das 97 amostras de rins examinados, 45(46,4%) apresentaram leptospiros fluorescentes. Em alguns cortes predominavam leptospiros isoladas e em outros apresentavam-se agrupadas. Os cortes de rim L 10, corados com conjugado anti *L. pomona*, apresentaram fluorescência semelhante à observada nos outros rins (Fig. 1).

À IFD e ao estudo histológico através de método de impregnação pela prata (Levaditi), realizados em cortes do rim positivo (L 10) revelaram a presença de grande número de leptospiros localizadas nos espaços intersticiais da cortical e no interior dos túbulos da medular (Fig. 2).

4. Teste de patogenicidade para hamsters

Dos quatro hamsters inoculados com a amostra L 10, dois por via subcutânea e dois por via intraperitoneal, três sobreviveram até o 45º dia, quando foram sangrados e necropsiados. Um dos animais morreu ao 4º dia após a inoculação e não foi examinado. Nos demais não foi observada mudança de comportamento.

O exame histopatológico dos hamsters revelou focos de degeneração turva e de necrose no fígado;

nefrite intersticial focal aguda em dois animais e nefrite intersticial focal crônica em um animal (Figs. 3 e 4).

Os soros dos hamsters examinados pelo MAR apresentaram títulos que variaram de 1:12.800 a 1:25.600 frente à amostra L 10.

QUADRO II

Títulos finais à MAR dos soros de tatus positivos
ao isolamento

Sorotipos	Soros	
	L 10	L 11
<i>icterohaemorrhagiae</i>	-	-
<i>javanica</i>	-	-
<i>canicola</i>	-	-
<i>ballum</i>	-	-
<i>castelloni</i>	1:100	-
<i>pyrogenes</i>	-	-
<i>tarassovi</i>	1:100	1:200
<i>butembo</i>	1:100	1:100
<i>autumnalis</i>	1:800	-
<i>bratislava</i>	1:200	-
<i>pomona</i>	-	-
<i>grippotyphosa</i>	-	-
<i>wolffi</i>	-	-
L 10*	1:3200	-
<i>bataviae</i>	1:800	1:400
<i>argentinensis</i>	-	-
<i>brasiliensis</i>	-	-

* Amostra tipificada como pertencente ao sorogrupo *hebdomadis*.

QUADRO III

Percentagem de animais reagentes ao teste de MAR para leptospirose em 136 soros de tatus, 50 soros de bovinos, 50 soros de eqüinos e 50 soros de suínos

Soro tipos	Tatus		Bovinos		Eqüinos		Suínos	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>icterohaemorrhagiae</i>	-	-	4	8,0	20	40,0	6	12,0
<i>javanica</i>	1	0,7	15	30,0	32	64,0	7	14,0
<i>canicola</i>	1	0,7	3	6,0	16	32,0	3	6,0
<i>ballum</i>	7	5,1	11	22,0	29	68,0	16	32,0
<i>castelloni</i>	12	8,8	1	2,0	22	44,0	3	6,0
<i>pyrogenes</i>	-	-	2	4,0	20	40,0	2	4,0
<i>tatassovi</i>	56	41,8	4	8,0	24	48,0	5	10,0
<i>butembo</i>	21	15,4	32	64,0	23	46,0	14	28,0
<i>autumnalis</i>	82	60,2	7	14,0	42	84,0	20	40,0
<i>bratislava</i>	40	29,4	39	78,0	21	42,0	11	22,0
<i>pomona</i>	1	0,7	1	2,0	12	24,0	5	10,0
<i>grippyotiphosa</i>	13	9,5	2	4,0	9	18,0	4	8,0
<i>wolffi</i>	16	11,7	26	52,0	37	74,0	18	36,0
L 10*	61	44,8	30	60,0	24	48,0	7	14,0
<i>bataviae</i>	24	17,6	42	84,0	43	86,0	8	16,0
<i>argentinensis</i>	58	42,6	2	4,0	14	28,0	1	2,0
<i>brasiliensis</i>	72	52,9	2	4,0	8	16,0	3	6,0

* Amostra tipificada como pertencente ao sorogrupo *hebdomadis*.

QUADRO IV

Teste de MAR em soros de tatus (*Dasypus novemcinctus*) de alguns municípios de Minas Gerais, abatidos em Belo Horizonte, 1974/75

Sorotipos	Títulos							Total
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1.600	1:3.200		
<i>icterohaemorrhagiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>javanica</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>canicola</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>ballum</i>	7	-	-	-	-	-	-	7
<i>castelloni</i>	12	-	-	-	-	-	-	12
<i>pyrogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tarassovi</i>	40	13	1	1	1	-	-	56
<i>butembo</i>	17	-	2	2	-	-	-	21
<i>autumnalis</i>	26	29	18	5	4	-	-	82
<i>bratislava</i>	26	11	2	1	-	-	-	40
<i>pomona</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>grippotyphosa</i>	10	2	-	1	-	-	-	13
<i>wolffi</i>	14	-	1	-	-	1	-	16
L 10*	24	17	7	4	5	4	-	61
<i>bataviae</i>	-	1	7	8	8	-	-	24
<i>argentinensis</i>	47	6	5	-	-	-	-	58
<i>brasiliensis</i>	69	3	-	-	-	-	-	72

* Amostra tipificada como pertencente ao sorogrupo *hebdomadis*.

QUADRO V

Teste de MAR em soros de bovinos de alguns municípios de Minas Gerais, conhecidos em 1975

Sorotipos	Títulos						Total
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1.600	1:3.200	
<i>icterohaemorrhagiae</i>	2	1	-	1	-	-	4
<i>javanica</i>	11	1	1	2	-	-	15
<i>canicola</i>	2	-	-	1	-	-	3
<i>ballum</i>	10	-	1	-	-	-	11
<i>castelloni</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>pyrogenes</i>	1	1	-	-	-	-	2
<i>tarassovi</i>	2	1	-	-	1	-	6
<i>butembo</i>	19	11	2	-	-	-	32
<i>autumnalis</i>	6	1	-	-	-	-	7
<i>bratislava</i>	16	15	8	-	-	-	39
<i>pomona</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>grippotyphosa</i>	2	-	-	-	-	-	2
<i>wolffi</i>	14	6	5	1	-	-	26
L 10*	12	10	4	4	-	-	30
<i>bataviae</i>	22	12	3	4	-	1	42
<i>argentinensis</i>	1	1	-	-	-	-	2
<i>brasiliensis</i>	-	2	-	-	-	-	2

* Amostra tipificada como pertencente ao sorogrupo *hebdomadis*

Teste de MAR em soros de eqüinos de alguns municípios de Minas Gerais, co-
nhecidos em 1975

Sorotipos	Títulos										Total
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1.600	1:3.200	1:6.400	1:12.800	1:25.600		
<i>icterohaemorrhagiae</i>	8	3	5	2	1	-	-	-	1	20	
<i>javanica</i>	18	8	6	-	-	-	-	-	-	32	
<i>canicola</i>	5	6	1	3	-	-	-	1	-	16	
<i>ballum</i>	16	6	3	3	1	-	-	-	-	29	
<i>castelloni</i>	3	9	5	3	1	-	-	1	-	22	
<i>pyrogenes</i>	-	11	5	2	1	-	-	1	-	20	
<i>tarassovi</i>	8	3	9	4	-	-	-	-	-	24	
<i>butembo</i>	13	9	-	1	-	-	-	-	-	23	
<i>autumnalis</i>	6	16	9	9	2	-	-	-	-	42	
<i>bratislava</i>	15	2	2	2	-	-	-	-	-	21	
<i>pomona</i>	2	4	3	2	1	-	-	-	-	12	
<i>grippotyphosa</i>	4	5	-	-	-	-	-	-	-	9	
<i>wolffi</i>	11	9	10	4	3	-	-	-	-	37	
L 10*	5	-	1	11	7	-	-	-	-	24	
<i>bataviae</i>	11	5	7	11	8	1	-	-	-	43	
<i>argentinensis</i>	5	4	2	2	1	-	-	-	-	14	
<i>brasiliensis</i>	3	2	-	3	-	-	-	-	-	8	

* Amostra tipificada como pertencente ao sorogrupo *hebdomadis*.

QUADRO VII

Teste de MAR em soros de suínos de alguns municípios de Minas Gerais,
abatidos em matadouro de Belo Horizonte, 1974/75

Sorotipos	Títulos							Total
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1.600	1:3.200		
<i>icterohaemorrhagiae</i>	5	1	-	-	-	-	-	6
<i>javanica</i>	4	1	2	-	-	-	-	7
<i>canicola</i>	2	1	-	-	-	-	-	3
<i>ballum</i>	14	1	1	-	-	-	-	16
<i>castelloni</i>	3	-	-	-	-	-	-	3
<i>pyrogenes</i>	2	-	-	-	-	-	-	2
<i>tarassovi</i>	3	-	-	-	-	-	-	3
<i>butembo</i>	9	4	1	-	-	-	-	14
<i>autumnalis</i>	12	4	4	-	-	-	-	20
<i>bratislava</i>	11	-	-	-	-	-	-	11
<i>pomona</i>	4	1	-	-	-	-	-	5
<i>grippoxyphosa</i>	4	-	-	-	-	-	-	4
<i>wolffi</i>	12	4	2	-	-	-	-	18
L 10	3	1	2	-	-	-	1	7
<i>bataviae</i>	6	2	-	-	-	-	-	8
<i>argentinensis</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>brasiliensis</i>	3	-	-	-	-	-	-	3

* Amostra tipificada como pertencente ao sorogrupo *hebdomadis*.

SOROTIPOS

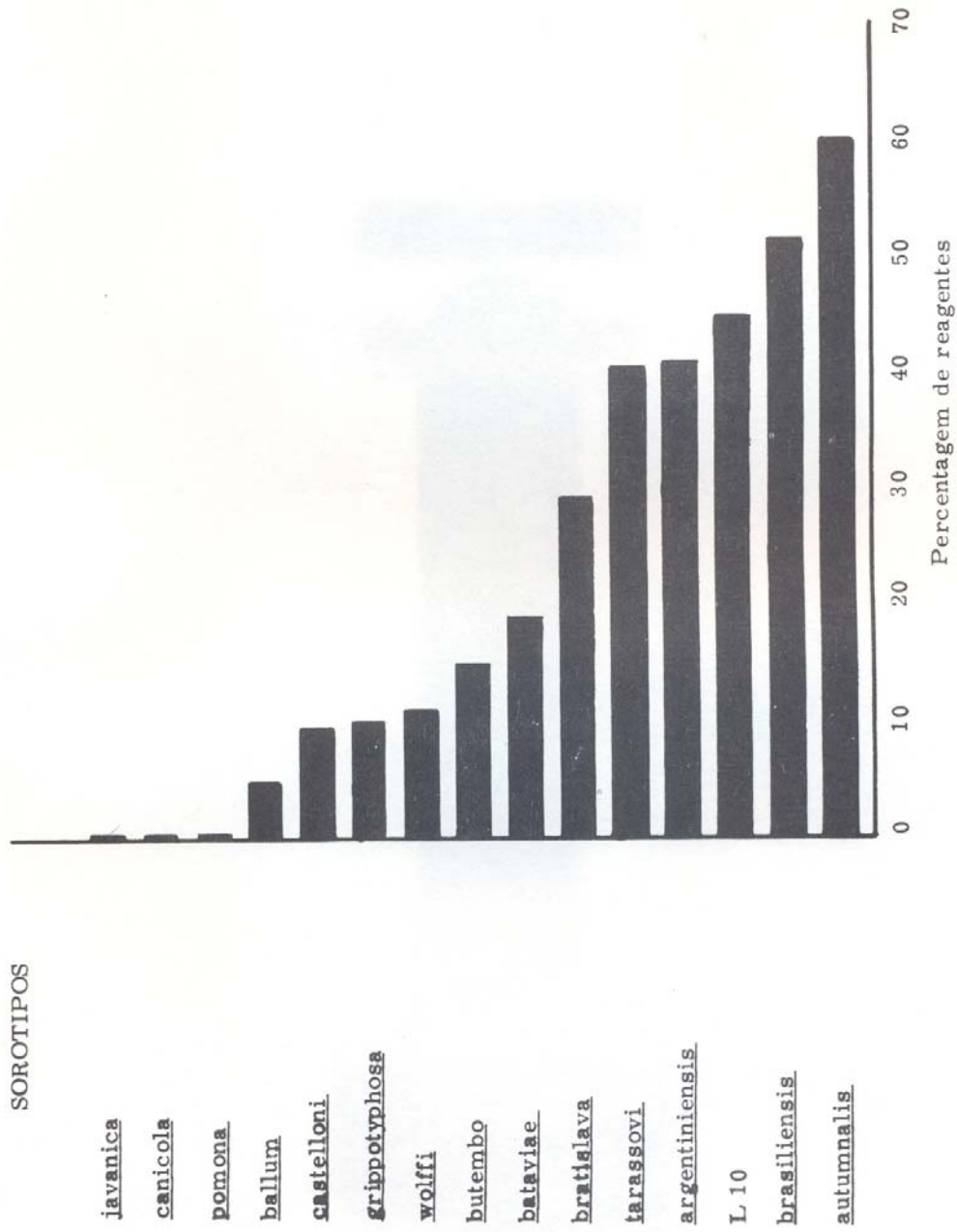


Gráfico 1 - Percentagem de reagentes à MAR para leptospira em 136 soros de tatu (Dasyus novemcinctus) do Estado de Minas Gerais.

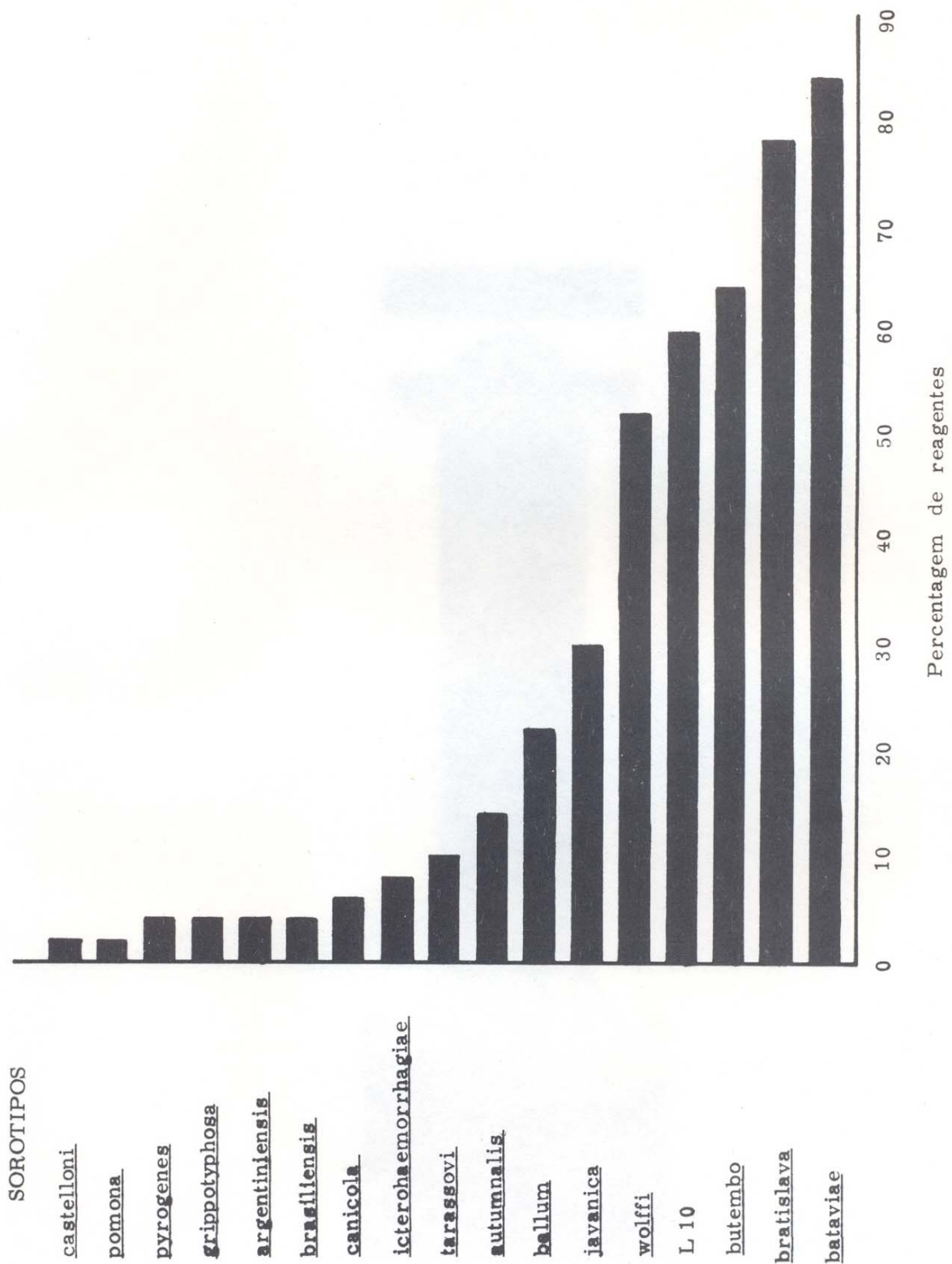


Gráfico 2 - Percentagem de reagentes à MAR para leptospira

em 50 soros de bovinos do Estado de Minas Gerais.

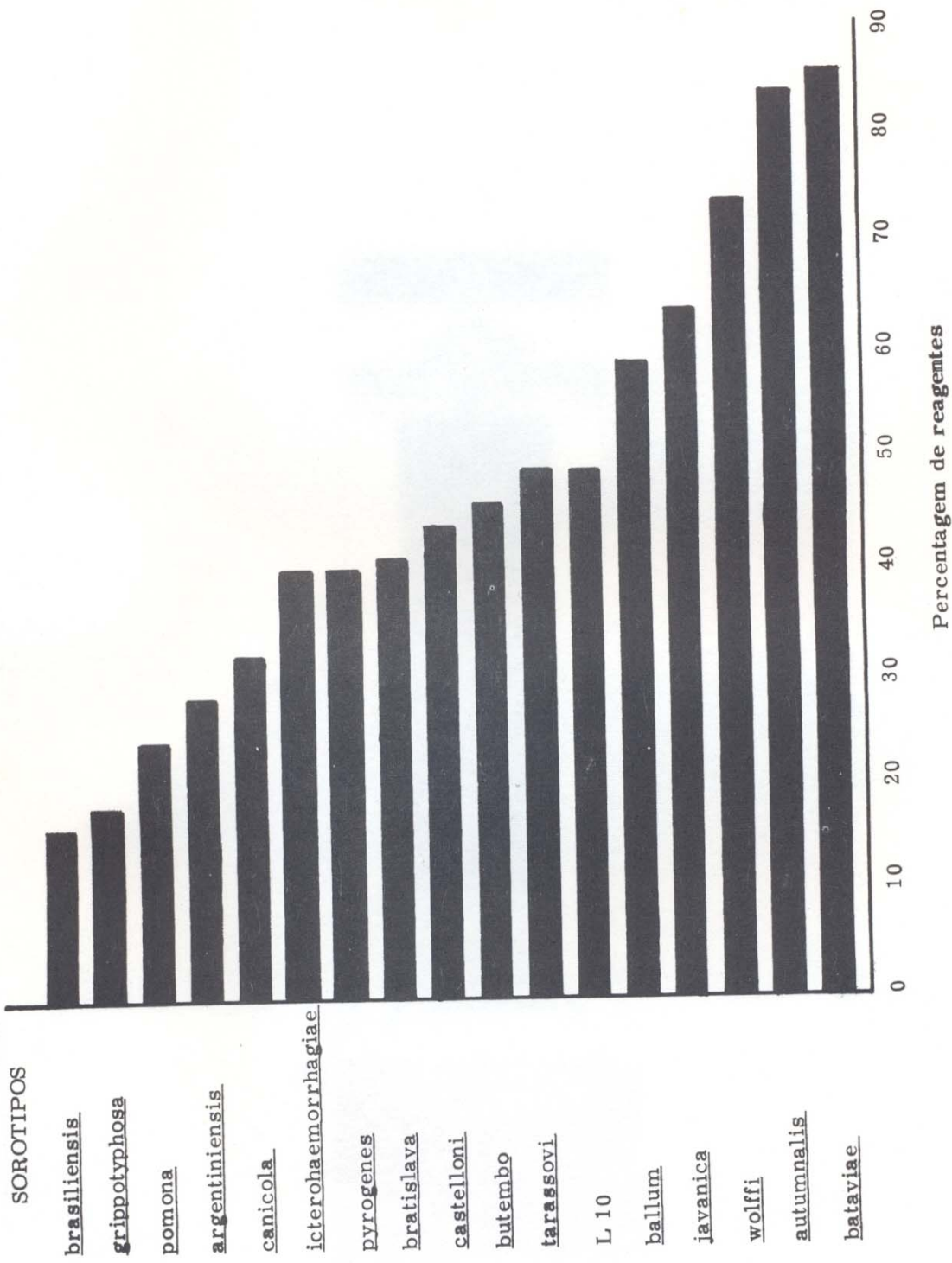


Gráfico 3 - Percentagem de reagentes à MAR para leptospira em 50 soros de equinos do Estado de Minas Gerais.

SOROTIPOS

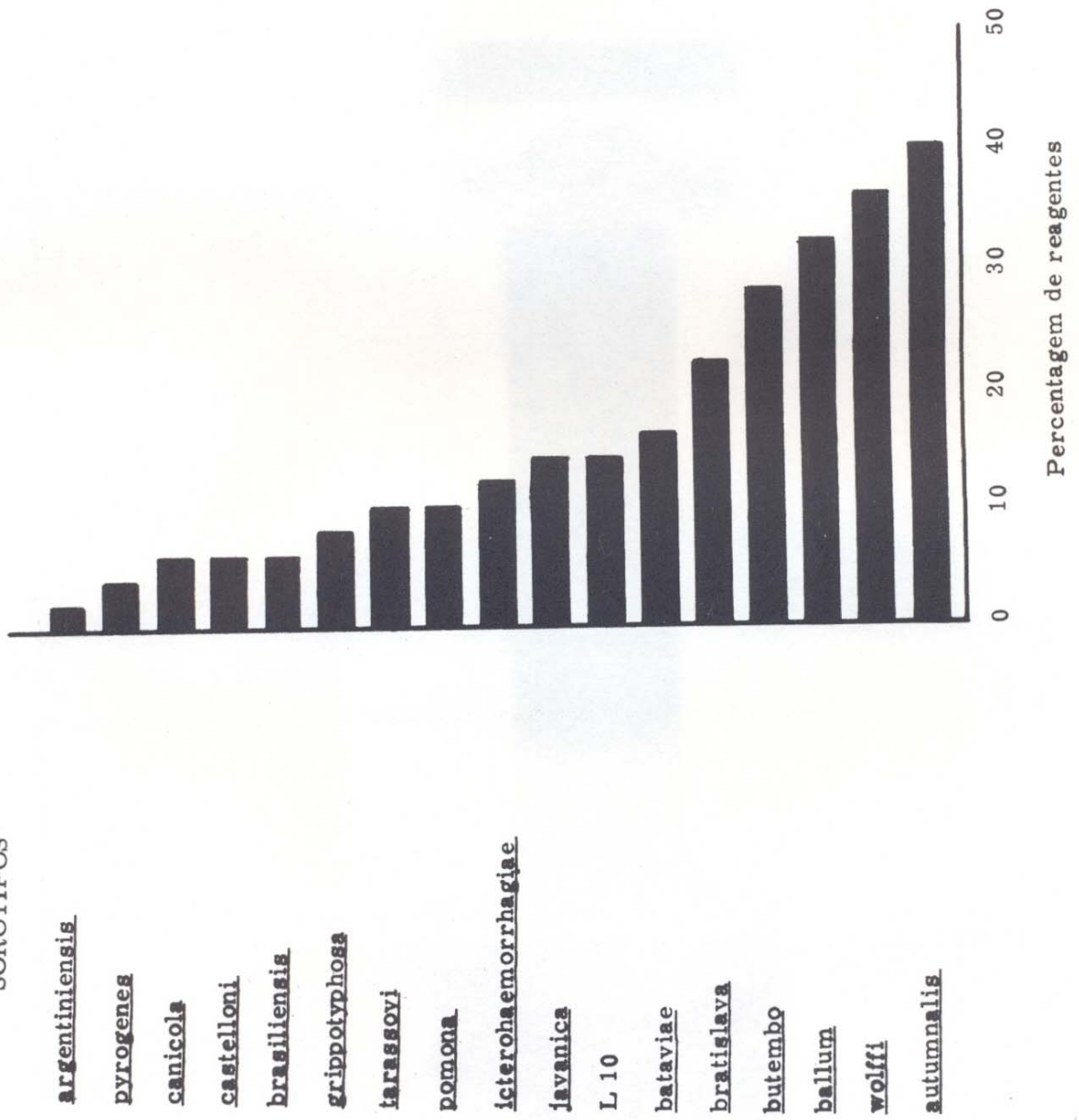


Gráfico 4 - Percentagem de reagentes à MAR para leptospira em 50 soros de suínos do Estado de Minas Gerais

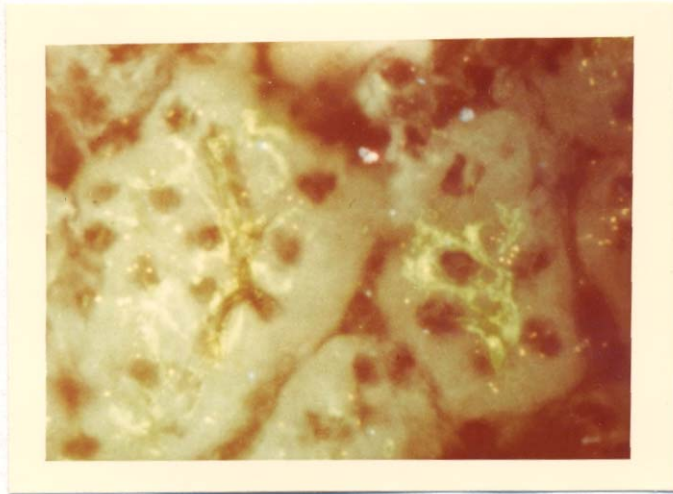


Fig. 1 - Rim de tatu (*D. novemcinctus*)
Amostra L 10 - *Leptospiras*
fluorescentes. 800 X.

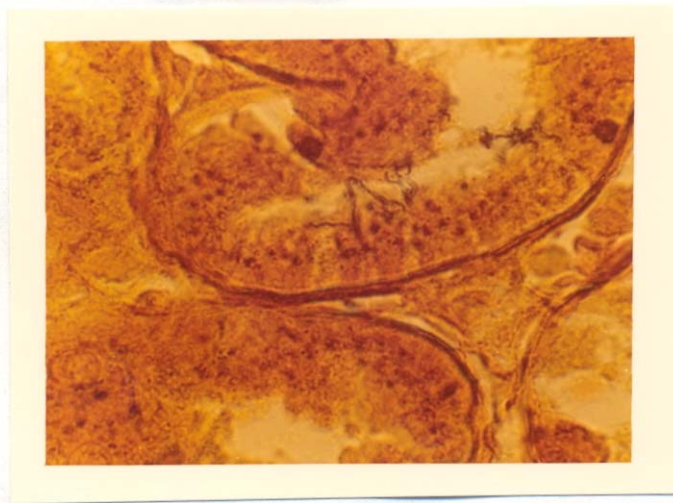


Fig. 2 - Rim de tatu (*D. novemcinctus*)
Amostra L 10 - *Leptospira*
dentro do túbulo renal
Levaditi. 800 X.

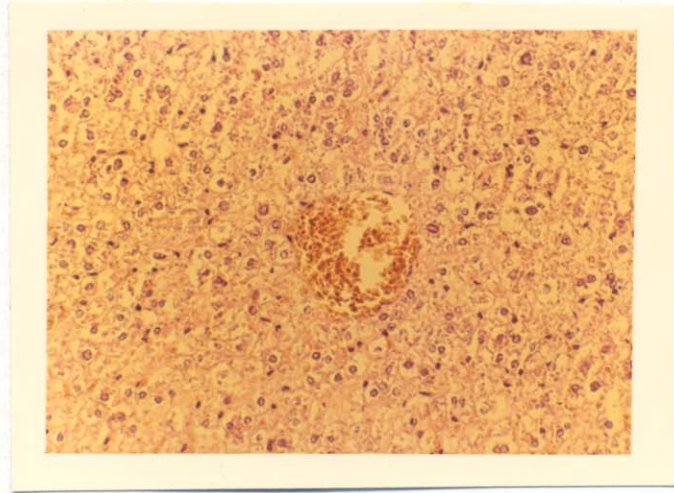


Fig. 3 - Fígado de hamster. Degeneração turva e discreta metamorfose gordurosa. HE 50 X

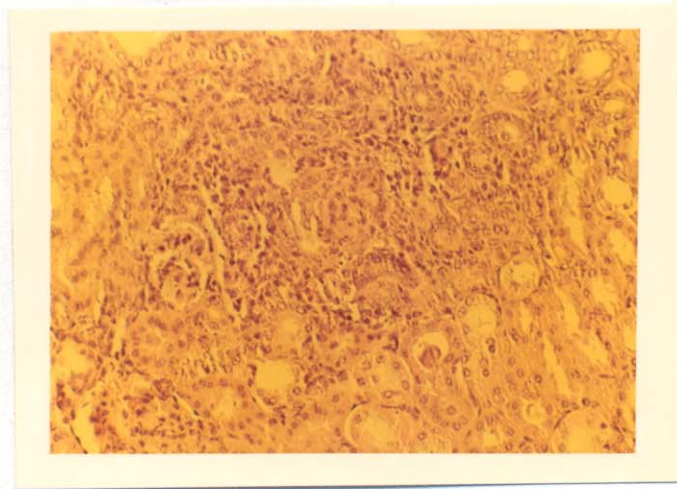


Fig. 4 - Rim de hamster. Nefrite intersticial. HE 50 X

5. Discussão

O isolamento de leptospiiras a partir de tatus não é freqüente e, entre os trabalhos realizados com estes animais, destacam-se os de ROTH & cols. (1964), CACCHIONE & cols. (1966), SZYFRES & cols., (1967) e CARRILLO & cols. (1972).

As taxas de isolamento são baixas e variáveis pois enquanto CARRILLO & cols. (1972) trabalhando com *Chaetophractus villosus* isolaram 5,4% de amostras de leptospira, no presente trabalho foi isolada uma amostra (2,2%) de tatus da espécie *Dasypus novemcinctus*. Essa diferença na taxa de isolamento pode ser atribuída às diferenças de espécie de animais trabalhados, considerando que elas apresentam hábitos alimentares e habitat diferentes, fatores esses que influen na taxa de infecção. Nesse sentido, CARRILLO & cols. (1972) admitem que as diferentes taxas de infecção, ocorrida entre as espécies por eles pesquisadas (*Ch. villosus* e *D. hybridus*), possam ser atribuídas à dieta alimentar. Enquanto a espécie *Ch. villosus* é onívora, alimentando-se

de ratos, animais em putrefação, ovos, pássaros, bem como de vegetais, as espécies *D. hybridus* e *D. novemcinctus* alimentam-se quase que exclusivamente de insetos e vegetais.

Provavelmente a baixa percentagem de isolamento obtida, seja devido à contaminação de 41 culturas (89,1%) por fungos e bactérias, fator esse considerado limitante por muitos autores. Além da contaminação dessas culturas ocorreu a perda de uma amostra (L 11), que possivelmente seria do grupo *bataviae* (Quadro II). Esse fato não é raro pois, CARRILLO & cols. (1972), também perderam a única cultura que isolaram de *D. hybridus*, tatu do mesmo gênero dos aqui utilizados. Além disso, COFFIN & MAESTRONE (1962), demonstraram a existência nos tecidos, principalmente no renal, de anticorpos inibidores das leptospiras que dificultam o crescimento, tanto em meios de cultura como em animais sensíveis. Pode-se supor ainda, que alguns sorotipos não sejam facilmente isolados, porque, à semelhança de *L. hardjo*, isolada por ROTH & GALTON (1960), é possível que outros sorotipos desenvolvam-se, de preferência, em meios especiais.

• Essas dificuldades de isolamento foram também

verificadas por McKEEVER & cols. (1958) que, utilizando meios de Fletcher e CHANG (1947) para semear fragmentos de 820 rins de mamíferos silvestres, isolaram leptospiras em apenas 44 das culturas (5,4%). SANTA ROSA (1970) também encontrou dificuldades pois, além de utilizar meio de Fletcher, inoculou cobaios com urina e suspensão de 900 rins de mamíferos silvestres, conseguindo isolar apenas 27 amostras de leptospira (3,0%).

A microaglutinação rápida, utilizada para testar os 136 soros de tatus, mostrou que 132 (97%) foram reagentes a um ou mais sorotipos (Quadro III), superando as taxas encontradas por CARRILLO & cols. (1972), que obtiveram 102 reagentes (23,2%), entre 438 tatus examinados pelo teste de microaglutinação lenta (GALTON & cols., 1962).

Provavelmente, essa discordância de dados possa ser atribuída a fatores diversos, como: diferença de região onde foram capturados os animais, número e tipos de antígenos utilizados nos testes sorológicos. Convém salientar que CARRILLO & cols. (1972) usaram uma técnica de microaglutinação diferente da utilizada no presente levantamento. Todavia, já se sabe que estas

técnicas de microaglutinação são equivalentes em sensibilidade e especificidade, como observou RYU (1970).

As reações sorológicas com *L. pyrogenes* são raras nos animais domésticos e silvestres conforme demonstraram SANTA ROSA & cols. (1969/70) e SANTA ROSA (1970). Vê-se também no Quadro IV que nenhum tatu apresentou título para esse sorotipo. Por outro lado, a *L. icterohaemorrhagiae*, muito comum em ratos de esgotos em nosso meio, (BARBOSA & HIPÓLITO, 1952), também não foi encontrada em tatus no presente experimento. Possivelmente, isso possa ser explicado por diferenças de habitat e de alimentação, como foi salientado anteriormente.

Ainda no Quadro IV, pode-se verificar as baixas percentagens de reagentes para os sorotipos *javanica*, *canicola* e *pomona*. No Brasil, reações positivas para estes sorotipos são frequentemente encontradas em animais domésticos (REIS & cols., 1973) e raramente em animais silvestres (SANTA ROSA, 1970).

As taxas de reagentes ao sorotipo *bataviae* foram da ordem de 17,6%, apresentando títulos altos que variaram de 1:200 a 1:1.600, enquanto que os sorotipos *argentinensis* e *brasiliensis*, pertencentes ao mesmo so-

sorogrupos *bataviae*, deram percentagens de 42,6% e 52,9%, respectivamente, entretanto, com títulos mais baixos.

Deve ser ressaltado a ocorrência de reações cruzadas em baixas diluições entre os sorotipos *argentinensis* e *brasiliensis* (Quadro IV).

Como os sorotipos *autumnalis*, *brasiliensis*, amostra L 10, *argentinensis* e *tarassovi* apresentaram as maiores taxas de reagentes (60,2%, 52,9%, 44,8%, 42,6% e 41,8%), respectivamente, e com títulos até 1:3.200 (Gráfico 1 e Quadro IV), pode-se pensar que as infecções dos tatus por estes sorotipos sejam as mais frequentes.

As taxas de reagentes ao sorogrupo *hebdomadis* (*L. wolffi* e L 10) apresentadas nos Gráficos 1, 2, 3 e 4, para as quatro espécies estudadas, torna-se um dos achados dos mais importantes do presente trabalho, principalmente considerando os achados de vários autores como SANTA ROSA & cols. (1969/70) que demonstraram a predominância de reagentes ao sorotipo *wolffi* em 53,3% dos 3.561 soros bovinos positivos. Ainda SANTA ROSA & cols. (1969/70) verificaram que, entre 811 soros equinos examinados, 11,9% foram reagentes ao sorotipo

sejroe, pertencente ao sorogrupo *hebdomadis*.

Em Minas Gerais, REIS & cols. (1973) observaram que 89,8% das reações positivas entre 720 bovinos e em 12,5% de 16 suínos positivos, pertenciam ao sorotipo *hebdomadis*, enquanto que ÁVILA (1976), examinando 770 suínos, observou que 35,5% eram reagentes ao sorotipo *wolffii*.

Na Austrália, a importância do sorogrupo *hebdomadis* como problema de saúde animal foi demonstrado por SULLIVAN & STALLMAN (1969), através do isolamento de *L. sejroe* de uma novilha clinicamente sadia, proveniente de um rebanho com histórico de nefrite.

Aliás, MICHNA & CAMPBELL (1970) na Escócia, isolaram leptospiros do sorogrupo *hebdomadis* em animais silvestres capturados numa fazenda onde ocorrera abortos em vacas por esse sorogrupo (MICHNA & CAMPBELL, 1969). Tais achados vieram dar ênfase à importância dos animais silvestres como possíveis reservatórios de leptospiros desse sorogrupo naquele país.

Em São Paulo, CORREA & cols. (1965/67) isolaram *L. wolffii* do homem e de ratos que habitavam a mesma área, indicando a possibilidade do homem ter se infectado através de ratos. Entretanto, em nosso meio, até o

presente, ainda não se relacionou a infecção de animais domésticos com animais silvestres, pelo sorogrupo *hebdomadis*. Todavia, CORREA & cols. (1965/67); SANTA ROSA (1970) e no presente trabalho foram encontrados animais silvestres reagentes a esse sorogrupo, o que demonstra a possibilidade desses animais servirem, também, como fonte de infecção para animais domésticos, com respeito ao sorogrupo *hebdomadis*.

MOULTON & HOWARTH (1957) citam que o método de IFD é específico para os diferentes sorotipos. Entretanto, no presente experimento, parece não ter ocorrido essa especificidade, pois foi observada a presença de leptospiras fluorescentes em 45 dos 97 cortes de rins examinados (46,4%), provavelmente por se ter usado conjugado preparado a partir do sorotipo *autumnalis*, o mais prevalente nas reações sorológicas dos tatus e do *hebdomadis*, como representante do sorogrupo *hebdomadis*.

Outro achado, que mostra a possível falta de especificidade do método, foi a fluorescência observada em cortes do rim corados com conjugado *L. pomona* e de onde foi isolada a amostra L 10. Esses resultados concordaram plenamente com os observados por WHITE & RISTIC (1959) e COFFIN & MAESTRONE (1962).

Como era de se esperar, o número de rins positivos à IFD foi muito maior do que os isolamentos conseguidos. Certamente, isso pode ser explicado pelo fato da IFD detectar leptospiras, independente de estarem vivas ou não, da baixa concentração nos tecidos e líquidos, da presença de anticorpos específicos e da destruição dos organismos por mudanças de pH, de temperatura, autólise e contaminações, conforme observaram COFFIN & MAESTRONE (1962).

As lesões histopatológicas observadas nos fígados e rins dos hamsters inoculados com a amostra L 10, assemelham-se aos achados de SANGER & cols. (1961) e STALHEIM (1967 e 1968), nos mesmos órgãos de hamsters infectados por leptospira e por eles examinados e ainda por REINHARD & HADLON (1954), em rins e fígados de bovinos infectados. Esse fato demonstra que a amostra L10 foi patogênica para hamster, embora sem êxito letal, o que, entretanto, não exclui a possibilidade de ser, também, patogênica para outros mamíferos domésticos.

6. Conclusões

1. Os tatus (*Dasypus novemcinctus*) apresentam elevada freqüência de reagentes para os principais sorogrupos de leptospira.
2. A IFD é bastante efetiva para demonstrar leptospiras em cortes de rim.
3. A alta percentagem de rins infectados com leptospira, inclui os tatus (*Dasypus novemcinctus*) como reservatórios de leptospira em nosso meio.
4. Os soros de bovinos, eqüinos e suínos, apresentam elevada percentagem de reagentes para a amostra do sorogrupo *hebdomadis*, isolada de tatu.
5. A amostra do sorogrupo *hebdomadis*, codificada como L-10, é patogênica para hamster.

Foi pesquisada a infecção por *leptospira* em 136 tatus (*Dasypus novemcinctus*) capturados no Estado de Minas Gerais, através de provas bacteriológicas, de microaglutinação rápida (MAR) e imunofluorescência direta (IFD).

De 46 suspensões de rins de tatus, cultivadas em meio de Fletcher, foi isolada uma amostra de *Leptospira* (2.1%), codificada como L 10, pertencente ao sorogrupo *hebdomadis*.

Dos 136 soros de tatus, examinados pela MAR, 132 (97%) foram reagentes a um ou mais sorotipos de *leptospira*, com predominância para *autumnalis* (60,2%), *brasiliensis* (52,9%), amostra L 10 (44,8%), *argentinensis* (42,6%) e *tarassovi* (41,8%).

Foram examinados 97 rins de tatus através da IFD para *leptospira* e 45 deles (46,4%) apresentaram reações positivas.

Cortes do rim, onde foi isolada a amostra L 10, apresentaram fluorescência, quando corados por conjugado *L. pomona*.

O exame histopatológico dos órgãos de hamsters infectados experimentalmente com a amostra L 10, revelou lesões de necrose e degeneração turva no fígado e nefrite intersticial focal aguda e crônica.

Foram testados pela MAR 50 soros de bovinos, 50 soros eqüinos e 50 soros suínos, apresentando 98% a 100% de reagentes para um ou mais sorotipos de leptospira, incluindo a amostra L 10.

8. Referências Bibliográficas

- ARAGÃO, B.H., 1917. Sobre a pesquisa do *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* nos ratos do Rio de Janeiro. Brasil Med., Rio de Janeiro, 31:219-23.
- ÁVILA, F.A., 1976. Comunicação pessoal. (Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Jaboticabal "Prof. Antonio Ruete" Jaboticabal, São Paulo).
- BARBOSA, M. & HIPÓLITO, O., 1952. *Leptospira icterohaemorrhagiae* em ratos (*Rattus norvegicus*) em Belo Horizonte. Arq. Esc. Sup. Vet. U.R.E.M.G., Belo Horizonte, 5:12-5.
- CACCHIONE, R.A.; CASCELLI, E.; MARTINEZ, E.S.; ZUBERBUHLER, J.M., 1966. Leptospirosis en animales silvestres. Aislamiento de una cepa de *Leptospira canicola* de un peludo (*Chaetophractus villosus*). Rev. Invest. Gan., Buenos Aires, 5:51-5.
- CARRILLO, C.G.; MEYERS, D.M.; SZYFRES, B., 1972. *Bataviae* group *Leptospirae* isolated from armadillos in Argentina. Trop. Geogr. Med., Haarlem, 24:377-81.

- CASTRO, A.F.P.; SANTA ROSA, C.A. & TROISE, C., 1961. Preãs (*Cavia aperea azarae*, Lich)-(Rodentia-Cavidae) como reservatório de *Leptospira* em São Paulo. Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 28:219-23.
- CHANG, S.L., 1947. Culture medium for leptospiras. J. Infect. Dis., Chicago, 81:28-34.
- COFFIN, D.L. & MAESTRONE, G., 1962. Detection of leptospires by fluorescent antibody. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 23:159-64.
- CORREA, M.O.H.; HYAKYTAKE, S.; NATALE, V.; GALVÃO, P.A. A. & AGUIAR, H.A., 1965/67. Estudos sobre a *Leptospira wolffi* em São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 25/27:11-25.
- COONS, A.H. & KAPLAN, M.H., 1950. Localization of antigen in tissue cells. Improvements in a method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med., New York, 91:1-13.
- COONS, A.H., 1956. Histochemistry with labelled antibody. Int. Rev. Cytol., New York, 5:1-21.
- COX, C.D. & LARSON, A.D., 1957. Colonial growth of leptospirae. J. Bacteriol., Washington, D.C., 73: 587-9.

- FLETCHER, W., 1928. Recent work on leptospirosis, Tsutsugamuchi disease and tropical typhs in the Federated Malaya State. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, 21:265-73.
- GALTON, M.M.; MENGES, R.W.; SHOTTS Jr., E.B.; NAHMIAS, A.J.; HEATH, C.W., 1962. Leptospirosis. Epidemiology clinical manifestation in man and animals, and methods in laboratory diagnosis. Public Health Serv., 951, Washington, D.C.
- HODGES, R.T. & EKDAHL, M.O., 1973. Use of fluorescent antibody technique for the serological serotypes in culture and bovine urine. N.Z. Vet. J., Wellington, 21:109-15.
- LUNA, L.G. ed., 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3 ed. New York, Mc Graw-Hill, pag. 238.
- McKEEVER, S.; GORMAN, G.W.; CHAPMAN, J.F.; GALTON, M.M.; POWER, D.K., 1958. Incidence of leptospirosis in wild mammals from Southwestern Georgia with report of news hosts for six serotypes of leptospire. Am. J. Trop. Med., Lawrence, 7:646-75.

- MICHNA, S.W. & CAMPBELL, R.S.F., 1969. The isolation of *Leptospira sejroe* from the kidneys of aborting cattle. Vet. Rec., London, 84:83-6.
- MICHNA, S.W. & CAMPBELL, R.S.F., 1970. Leptospirosis in wild animals. J. Comp. Pathol., Liverpool, 80:101-6.
- MOULTON, J.E. & HOWARTH, J.A., 1957. The demonstration of *Leptospira canicola* in hamster kidney by means of fluorescent antibody. Cornell Vet., Ithaca, 47:524-32.
- REINHARD, K.R. & HADLOW, W.J., 1954. Experimental bovine leptospirosis: pathological, hematological and serological studies. Proc. Annu. Meet. Am. Vet. Med. Ass., Seattle, 91:203-6.
- REIS, R.; RYU, E. & PENA, C.M., 1973. Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em bovinos e suínos em Minas Gerais, Brasil. Arq. Esc. Vet. U.F.M.G., Belo Horizonte, 25:11-4.
- ROTH, E. & GALTON, M.M., 1960. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Louisiana. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 21:422-7.

- ROTH, E.E.; GREER, B.; MOORE, M.; NEWMAN, K.; SANFORD, G.E.; ADAMS, W.V., 1964. Serological analysis of the new related leptospiral serotypes isolated in Louisiana. Zoonoses Res., New York, 3:31-8.
- RYU, E., 1970. Rapid microscopic agglutination test for leptospira based on 400 X magnification of darkfield examination, Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husb., Taipei, 17:1-9.
- SANGER, L.L.; DANDY, A.H.; FIZETTE, W.B.; BOHL, E.H.; FERGSON, L.C., 1961. *Leptospira pomona*; infection in hamster. Cornell Vet., Ithaca, 51:489-98.
- SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; SILVA, A.S.; TERUYA, J.M., 1969/70. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 29/30:19-27.
- SANTA ROSA, C.A., 1970. Leptospirose em animais silvestres; isolamento de um novo sorotipo, *brasiliensis*, no sorogrupo *bataviae*. São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu. (Tese).
- STALHEIM, O.H.V., 1967. Vaccination against leptospirosis protection of hamster and swine against renal leptospirosis by killed but intact Gamma-irradiated or Dihydrostreptomycin-exposed *Leptospira pomona*. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 28:1971-6.

- STALHEIM, O.H.V., 1968. Vaccination against leptospirosis; immunogenicity of viable avirulent *L. pomona* in hamster, swine and cattle. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 29:473-8.
- STUART, R.D., 1946. The preparation and use of a simple culture medium for leptospirae. J. Pathol. Bacteriol., London, 58:343-9.
- SULLIVAN, N.D. & STALLMAN, N.D., 1969. The isolation of a strain of *Leptospira* serotype *hardjo* from cattle in Queensland. Aust. Vet. J., Artarmon, 45:281-3.
- SZYFRES, R.; SALZER, C.R. & GALTON, M.M., 1967. A new leptospiral serotype in the *bataviae* serogroup from Argentina. Trop. Geogr. Med., Haarlem, 19:344-6.
- WHITE, F.H. & RISTIC, M., 1959. Detection of in guinea pig and bovine urine with fluorescein-labeled antibody. J. Infect. Dis., Chicago, 105:118-23.