

FERNANDO CORDEIRO

AGLUTININAS ANTILEPTOSPIRA EM SOROS  
DE BOVINOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Mario Barbosa

Tese apresentada ao DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos do Curso de Pós-graduação para obtenção do grau de:

MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA

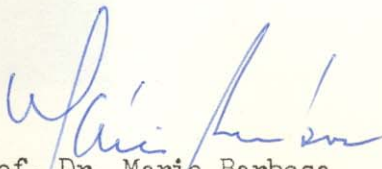
(Medicina Veterinária Preventiva)


Belo Horizonte  
Minas Gerais - Brasil


- 1973 -

TESE APROVADA EM: 14/08/1973

BANCA EXAMINADORA:

  
as.) Prof. Dr. Mario Barbosa

  
as.) Prof. Dr. José Britto Figueiredo

  
as.) Prof. Dr. Ronaldo Reis

À memória de meu pai.

À minha mãe, esposa e filhos.

## AGRADECIMENTOS



Nossos primeiros agradecimentos são dirigidos ao Dr. Hélio Gustavo Guida, Diretor do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS), que nos acolheu e contribuiu decisivamente para que pudéssemos desenvolver o presente trabalho de pesquisa.

Ao Professor Dr. Carlos Almeida Santa Rosa, que nos iniciou no campo das leptospiroses, os nossos maiores agradecimentos.

Ao Professor Dr. Mario Barbosa, a nossa gratidão pela orientação e demonstrações de amizade recebidas.

Agradecemos também no caso especial desta tese:

aos Drs. Auvanir de Almeida Ramos e Teophilo Reyes M. pela inestimável colaboração prestada;

aos Drs. Jerome Langenegger e Jürgen Döbereiner, pelo apoio e incentivo, e pelas sugestões apresentadas a esta tese;

à Dra. Dirce Pinto Pacca de Souza Britto e aos Drs. Lamartine A. da Cunha Filho e Carlos Alberto Meneguelli, pela orientação e revisão da análise estatística;

ao Professor Osvaldo Duarte Gonçalves, pela cuidadosa leitura e revisão deste texto;

ao Dr. João Brito Jorge, pela revisão do texto em inglês;

ao Sr. Homero Martins de Oliveira, Srta. Vania Lucia Baêta da Cruz, Sra. Maria Lúcia Pinto da Silva e demais funcionários da Seção de Patologia da Reprodução do IPEACS que direta ou indiretamente colaboraram na realização do presente trabalho.

Finalmente, ao Conselho Nacional de Pesquisas e à Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão das bolsas que nos permitiram a realização deste trabalho e do Curso de Mestrado em Medicina Veterinária.

FERNANDO CORDEIRO, nascido a 06 de julho de 1930, no Rio de Janeiro, Estado da Guanabara, filho de FRANCISCO CORDEIRO e de MARIA DEOLINDA CORDEIRO, concluiu o curso de Veterinária na Escola Nacional de Veterinária da Universidade Rural do Brasil em 21 de dezembro de 1967. Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas na categoria de Aperfeiçoamento, junto ao Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul, Itaguaí, Rio de Janeiro, de 01/04/1968 a 28/02/1971. Bolsista da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, para o Curso de Pós-graduação, Mestrado, na área de Medicina Veterinária Preventiva, junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, a partir de 01/03/1971.

Este trabalho foi executado na Seção de Patologia da Reprodução do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, órgão do Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária do Ministério da Agricultura, de setembro de 1968 a dezembro de 1971.

I: INTRODUÇÃO .....	1
II: LITERATURA .....	5
III: MATERIAL E MÉTODOS .....	13
IV: RESULTADOS .....	22
V: DISCUSSÃO .....	36
VI: CONCLUSÕES .....	40
VII: RESUMO .....	42
VIII: SUMMARY .....	44
IX: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## I. INTRODUÇÃO



Desde as primeiras observações da leptospirose bovina descritas na Rússia (MICHIN & AZINOV, 1935), vários autores têm relatado a ocorrência natural da doença, o isolamento de diversos sorotipos de Lep tospira e as evidências sorológicas de infecção em várias partes do mundo (van der HOEDEN, 1958).

Em diversas regiões, na Rússia, Israel, Austrália, Argentina e Estados Unidos, esta doença apresentou características enzoóticas, afetando muitos rebanhos, com prejuízos vultosos, caracterizados principalmente por abortos, queda de lactação e morte de bezerras. Neste último país, a leptospirose foi considerada como a terceira mais importante doença dos bovinos, causando perdas consideráveis à sua economia (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1954).

Os estudos relacionados com leptospiroses no Brasil (ARAGÃO, 1917; BENTES, 1917) datam quase que do descobrimento do seu agente etiológico, efetuado por INADA & cols. (1916). Entretanto, ficaram limitados por mais de duas décadas às observações clínicas e anatomopatológicas da medicina humana e à evidência do espiroqueta em roedores comensais, com raras exceções. A partir de 1940 surgiram os primeiros trabalhos sobre a doença em animais domésticos. Primeiramente em cães (DACOR SO FILHO, 1940; AZEVEDO & SANTOS, 1946), depois em suínos (GUIDA, 1947/1948), eqüinos (CORREA & cols., 1955) e bovinos (FREITAS & cols., 1957). Todavia, esses estudos, em sua quase totalidade, ficaram circunscritos ao Estado de São Paulo.

Não temos maior conhecimento da frequência das leptospiroses em nosso rebanho bovino, dos sorotipos responsáveis, bem como dos reais prejuízos que causam. Sabemos, porém, que diversos animais silvestres, particularmente roedores e marsupiais encontrados com grande frequência nas fazendas, albergam o espiroqueta e o eliminam pela urina, sendo, portanto, disseminadores em potencial da doença (CASTRO & cols., 1961; SANTA ROSA, 1970; CORDEIRO, 1970). Outros animais domésticos criados em promiscuidade com bovinos, especialmente os suínos, que muitas vezes funcionam como portadores do germe sem que este lhes cause danos, podem contribuir para a disseminação da doença. Os próprios bovinos podem transmitir entre si o espiroqueta através da urina, de alimentos, da água e do coito. Também o fato de ocorrerem abortos em diversas fases da gestação (SIEGRIST & cols., 1963), muitas vezes de etiologia desconhecida, nos leva a acreditar em processos leptospirósicos.

Segundo BRYAN (1955), os sintomas atribuídos à leptospirose dos bovinos, por ordem de frequência, são:

aborto	58%
redução de lactação	47%
febre	38%
hemoglobinúria	30%
anemia	19%
icterícia	15%

O instrumento mais largamente usado para o diagnóstico laboratorial de leptospiroses é o teste de aglutinação microscópica ou modificações dele (ALEXANDER & EVANS, 1962). Por este meio pode-se avaliar o grau de disseminação da doença nos rebanhos, verificando-se a presença de aglutininas contra leptospiras nos soros sanguíneos dos animais.

Considerando-se a exigüidade de trabalhos brasileiros sobre o assunto, propusemo-nos a verificar a ocorrência das leptospiroses em bovinos, por método sorológico, em diversos municípios do Estado do Rio de Janeiro, visto tratar-se de importante zoonose, quer pelos prejuízos que acarreta em algumas regiões, quer pelo perigo potencial em saúde pública.



## II. LITERATURA

A primeira suspeita de que espiroquetas fossem responsáveis por doença em bovinos teria sido levantada por SERGENT & cols. (1919), que assinalaram uma "febre biliosa hemoglobinúrica" do boi na Algéria, moléstia distinta das piroplasmoses. Entretanto, coube a MICHIN & AZINOV (1935) na Rússia, a confirmação da etiologia, isolando o germe do sangue de um bezerro. Posteriormente, outros autores russos (TERSKIHK, 1940; SEMSKOW, 1941; AWOROW, 1941; MIKHIN & cols., 1941) melhor estudaram o assunto, descrevendo as formas clínicas, a patologia, patogênica e epidemiologia, além de isolarem outras amostras de bovinos doentes. Estas amostras, provavelmente idênticas, foram chamadas L. vitulina, L. icterohaemoglobinuriae, L. icterohaemoglobinuriae vitulorum. Sorologicamente foi demonstrado que eram estreitamente relacionadas com L. grippotyphosa.

O interesse pela leptospirose bovina foi estimulado novamente em 1941, quando FREUND & cols., em Israel, descreveram uma epizootia de bovinos com os mesmos sintomas observados na União Soviética (WOLFF & BOHLANDER, 1952). Observações posteriores (BERNKOPF & cols., 1947; FREUND, 1947; BERNKOPF & cols., 1948; van der HOEDEN & cols., 1953) demonstraram que o sorotipo grippotyphosa era o maior responsável pelas epizootias de leptospirose bovina em Israel. Quatro surtos provocados pelo sorotipo canicola também foram estudados por van der HOEDEN (1955a, b).

Outro grande foco de leptospirose bovina é a Austrália, onde uma doença de bezerros, "redwater", já era conhecida desde longa data em algumas fazendas de gado leiteiro em Queensland, causando hemoglobinúria e ocasionalmente icterícia e mastite (WOLFF & BOHLANDER, 1952). SUTHERLAND & cols. (1949) isolaram o sorotipo pomona, pela primeira vez, de bovino, mostrando que a "redwater" era causada por esse organismo. Esse sorotipo tem sido demonstrado com freqüência em sucessivos testes sorológicos e responsabilizado por abortos e doença em bezerros (PETERSON, 1951; SIMONS & cols., 1952; WINKS, 1962; MCTACCKETT, 1963; KEAST & cols., 1964; EMMANUEL & cols., 1964; LUCAS, 1966; KNOTT & DADSWELL, 1970). Também o sorotipo hyos (tarassovi) aparece com destaque nos inquéritos sorológicos. Ultimamente têm sido descritos casos de leptospirose bovina atribuídos ao sorotipo hardjo (SULLIVAN & STALLMANN, 1969; SULLIVAN & CALLAN, 1970; CORBOULD, 1971; DAVIDSON, 1971; SULLIVAN, 1972; HOARE & CLAXTON, 1972).

Volumosa bibliografia demonstra a larga distribuição das leptospiroses nos vários continentes, conforme RYU (1971). As pesquisas de aglutininas nos soros de bovinos se multiplicaram em diversos países nos últimos trinta anos. A distribuição geográfica dessas aglutininas antileptospiras em bovinos foi bem estudada por WOLFF & BOHLANDER (1952), VAN RIEL & BIENFET (1953), FARINA (1957), e LATASTE-DOROLLE (1965).

Nos Estados Unidos a doença foi descrita pela primeira vez por JUNGHERR (1944) em Connecticut. Seguiram-se os trabalhos de MARSH (1945), em Montana, MATHEWS (1946), no Texas, e SUTHERLAND E MORRIL (1948), no Illinois. Nestes surtos, as leptospiras foram demonstradas em exames histopatológicos. BAKER & LITTLE (1948) conseguiram isolar um agente de vacas sofrendo de uma doença febril, caracterizada pela produção de leite sangüinolento. O organismo demonstrou ser patogênico para bezerros e animais de laboratório. Posteriormente foi identificado como sendo Leptospira pomona (COCHENOUR & cols., 1950). Desde então, a leptospirose bovina passou a ser observada com mais atenção. Diversos surtos foram descritos em diferentes Estados: LITTLE & cols., (1950), na Pensylvania, REINHARD & cols. (1950), em New York, SIPPEL &



cols. (1952), na Georgia, BELL & cols. (1953), na Virginia, entre outros. Todos eles foram atribuídos ao sorotipo pomona. Até 1953, a leptospirose bovina tinha sido descrita em cerca de 20 Estados americanos (GILLESPIE & cols., 1953).

Inquéritos sorológicos para determinar a prevalência da infecção pelo sorotipo pomona em bovinos foram conduzidos em diversos Estados (THOMAS & RADFORD, 1962). Entretanto, a suspeita de que outros sorotipos fossem responsáveis por processos leptospiróticos, a exemplo do que ocorria em vários países, fez com que diversos pesquisadores passassem a utilizar, nos testes sorológicos, outros sorotipos como antígeno, entre eles, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, canicola, hyos seiroe, australis e autumnalis. GALTON & cols. (1956), utilizando o teste de aglutinação-lise, examinaram o soro de 802 vacas de 54 rebanhos da Florida, revelando a presença de anticorpos contra seiroe em 310, pomona em 85, grippotyphosa em 25, icterohaemorrhagiae em 20 e canicola em 10. HANSON & PICKARD (1958) determinaram a incidência de pomona e outros sorotipos em bovinos e suínos do Illinois. BYRNE & CHAMBERS (1959) examinaram 1.998 amostras de 125 rebanhos, provenientes de 15 dos 23 municípios de Maryland, utilizando sete sorotipos de Leptospira como antígeno. Os sorotipos predominantes foram seiroe, pomona e autumnalis. ROBERTS & cols. (1961) encontraram aglutininas contra diversos sorotipos em soros de bovinos do Alabama. Os mais evidentes foram pomona e seiroe, e em menor frequência, grippotyphosa, canicola, icterohaemorrhagiae e autumnalis. PIKE & cols. (1961), utilizando 11 sorotipos, examinaram 294 amostras de soro bovino, representando mais de 100 rebanhos do nordeste do Texas. Apesar de a maioria das amostras reagir com diversos tipos, reações predominantes foram observadas com pomona em 182 amostras, seiroe em 150 e grippotyphosa em 30. CLARK & cols. (1962) encontraram evidências sorológicas de infecção por grippotyphosa em três rebanhos na Pensylvania, correlacionando-as com o isolamento do mesmo sorotipo de sete roedores silvestres (Microtus pensylvanicus). SULZER & cols. (1964), num estudo de adsorção de aglutininas com soros de bovinos de oito Estados, encontraram fortes evidências de que o sorotipo hardjo era o responsável pelas aglutininas. Estes achados sugeriram que esse sorotipo é largamente distribuído nos Estados Unidos.

Paralelamente, vários trabalhos foram conduzidos no sentido de caracterizar a doença e correlacioná-la com as aglutininas encontradas. SLATTER & cols. (1949) descreveram casos de leptospirose em bezerros Holstein procedentes de Wisconsin. As leptospiras foram vistas em exame de campo escuro. DE LAY & cols. (1955) recuperaram Leptospira, sorotipo pomona de tecidos de bezerro e de amostra de leite de vacas na California. PODGWAITE & cols. (1955) isolaram o mesmo sorotipo de três fetos abortados. TURNER & cols. (1958) isolaram o sorotipo canicola de um bezerro recém-nascido, no Alabama. DACRES & KIESEL (1958) obtiveram cultivo do sorotipo pomona de material proveniente de um feto abortado. Em 1960, ROTH & GALTON isolaram o sorotipo hardjo de bovinos em Louisiana. CLARK & cols. (1961) obtiveram o mesmo resultado na Pennsylvania. STOENNER (1961) descreveu o isolamento de pomona e hardjo de vacas num rebanho de gado Hereford, no qual sérias perdas por aborto ocorreram durante duas estações de cria. CARROL & CLAIR (1969) obtiveram o isolamento do sorotipo patoc, considerado saprófita (complexo Biflexa), de duas vacas com sinais clínicos de leptospirose, de rebanhos do sul da California. SCHNURENBURGER & cols. (1970), estudando a ocorrência de leptospiroses em uma fazenda do Illinois durante quatro anos, conseguiram o isolamento do sorotipo hardjo de seis bovinos de carne e icterohaemorrhagiae de três bovinos de leite.

No Canadá, as primeiras investigações sobre leptospirose bovina foram feitas por MOORE & RICE (1956), que encontraram 83 (6,3%) reagentes positivos de 583 soros testados por fixação de complemento com antígeno, sorotipo pomona. Este sorotipo foi isolado de um bezerro, pela primeira vez no país, por BARNUN & GRINYER (1957). FISH & GRINYER (1957), em estudos de laboratório e de campo, responsabilizaram o sorotipo sejroe pelo surto num rebanho. Reações sorológicas com esse antígeno foram obtidas por MITCHELL & cols. (1960). Achados clínicos, bacteriológicos e sorológicos, em surtos de leptospirose bovina cuja manifestação mais comum era mastite atípica, responsabilizaram o sorotipo pomona (MITCHELL, 1959; MITCHELL & BOULANGER, 1959). ROBERTSON & cols. (1964) obtiveram o isolamento de hardjo da urina de uma vaca.



No México, DIKKEN (1967) verificou a incidência de leptospirose bovina, estudando 574 soros pela prova de aglutinação-lise. Cada soro foi examinado com vinte diferentes sorotipos de leptospira. Foram encontrados 114 (19,8%) soros com reações positivas (título 1:100). Os sorotipos reagentes com maior frequência foram hardjo (24%) hyos (tarassovi) (19%), pomona (17%), wolffi (12%) e icterohaemorrhagiae (12%). VARELA e VELASCO (1969) realizaram uma investigação sorológica com 1.714 soros sanguíneos de diferentes espécies animais, utilizando como antígeno culturas vivas de leptospiras, sorotipos icterohaemorrhagiae, pomona e canicola. Títulos positivos foram encontrados mais frequentemente em bovinos, cães e suínos.

A ocorrência de anticorpos contra leptospira em bovinos no Panamá foi constatada por WOLFF & cols. (1960) e MURNANE & cols. (1963). O sorotipo predominante foi hebdomadis.

MANRIQUE & SIERRA (1966), na Colômbia, isolaram uma amostra, sorotipo canicola, de bovino. Pelo teste de aglutinação microscópica, encontraram título mais alto de 1:400 para o sorotipo pomona.

No Peru, RADO (1959) demonstrou pela primeira vez a presença de anticorpos para pomona em bovinos dos arredores de Lima. CASTAGNINO (1960) isolou esse sorotipo de um feto bovino. Seguiram-se os trabalhos de VILCHES CARDENAS (1961), FERNÁNDEZ & ACOSTA (1966) e CASTAGNINO & VARGAS (1967). LICERAS DE HIDALGO & HIDALGO (1970) examinaram 202 soros de bovinos abatidos em Tumbes, encontrando 57 com reações positivas. Os sorotipos mais evidente foram pomona e sejroe. Obtiveram também o isolamento de um novo sorotipo (peruviana) do grupo australis, proveniente de rim de bovino. Posteriormente, LICERAS DE HIDALGO & cols. (1971), em estudo semelhante com 379 soros de bovinos abatidos em Chimbote, encontraram 86 (22,8%) positivos. Estes soros reagiram predominantemente com os sorotipos do grupo hebdomadis e com pomona. Obtiveram também o isolamento de duas amostras identificadas como pomona.

Em comunicação preliminar, GRUEBLER & cols. (1960) se reportaram ao isolamento de duas amostras de leptospiras de bovinos no Chile.

Na Argentina, SAVINO & RENELLA (1945/48) foram os primeiros a estudar a doença em bovinos. Cultivaram material de rins de 142 vacas, sem resultados positivos. Títulos sorológicos de 1:50 a 1:12.500 foram observados para os sorotipos hyos e suis (pomona). Maria JR. & QUEVEDO (1947) descreveram casos ocorridos nas imediações de Tandil, província de Buenos Aires. Provas sorológicas evidenciaram anticorpos contra icterohaemorrhagiae e suis em títulos altos. BONINO & PEREYRA (1956) estudaram epizootias em bovinos de San Justo, província de Santa Fé. EPSTEIN (1957) se ocupou de casos de leptospirose bovina nas províncias de Córdoba e Santa Fé. MURTAGH (1959) descreveu epizootias ocorridas no país entre 1953 e 1958. CACCHIONE & cols. (1959) comentaram o isolamento de uma amostra de leptospira de bovino. CEDRO & cols. (1961), utilizando a prova de aglutinação com treze sorotipos, examinaram 2.110 soros de bovinos, dos quais 1.149 (54,45%) resultaram positivos. Predominaram os sorotipos hebdomadis (42%), pomona (31%), hyos (18%) e icterohaemorrhagiae (4%). CACCHIONE & cols. (1961) se reportaram a investigações efetuadas em duas epizootias ocorridas na província de Córdoba e outra em Santa Fé, onde conseguiram isolar três amostras: uma pomona e duas canicola. AGUIRRE & cols. (1968) encontraram alta percentagem de soros positivos com títulos predominantemente superiores a 1:1.000 em vacas que abortaram e bezerros que adoeceram, em propriedades pastoris do nordeste da província de Buenos Aires. Os sorotipos envolvidos eram pomona, hebdomadis e hyos. Conseguiram isolar uma amostra proveniente de água de bebedouro, que foi identificada como pomona. CACCHIONE & cols. (1968) apresentaram resultados de um estudo sistemático realizado para o conhecimento da prevalência da infecção leptospirósica em animais domésticos na Argentina. Examinando 17.816 amostras de soro bovino, pela prova de microaglutinação em tubos com antígenos de leptospirosas vivas, encontraram 9.664 positivos (52,92%), sendo o sorotipo wolffi (65,27%) o mais freqüente. Os mesmos autores (CACCHIONE & cols., 1970), utilizando a prova de microaglutinação com 609 amostras de soros bovinos da Terra do Fogo, provenientes de dezesseis propriedades, encontraram 79 (12,97%) positivos. O sorotipo ballum e borincana mais se evidenciaram; bataviae, pyrogenes, gripotyphosa, wolffi e copenhageni estiveram presentes em menor número.



ECHENIQUE & SOSA DE CARUSO (1958), no Uruguai, descreveram a presença de leptospirose em bovinos de três currais no Departamento de Colonia. CAFFARENA & cols. (1968) examinaram 1.048 amostras de soro de gado de corte e 398 de gado de leite. Resultados positivos foram encontrados para seis sorotipos, em 256 (24%) e 141 (35%) dos soros, respectivamente. O sorotipo mais freqüente foi hebdomadis.

No Brasil, FREITAS & cols. (1957) identificaram a leptospirose bovina, isolando o germe de um feto abortado em uma granja de São Paulo, classificando-o como pertencente ao sorotipo pomona. A sorologia rápida com antígeno polivalente, feita com 150 amostras de soros da mesma granja, indicou 18 reagentes positivos, dos quais, 16 aglutinaram o sorotipo pomona. GUIDA & BARROS (1958) examinaram, pelo método de aglutinação-lise, 88 soros de bovinos aparentemente normais, sacrificados em matadouro, encontrando somente três positivos: um para o sorotipo bataviae e dois para pomona. GUIDA & cols. (1959) pesquisaram, pelo método de aglutinação-lise, anticorpos contra leptospiras no soro sanguíneo de 763 vacas, encontrando 30 soros com títulos acima de 1:200 para o sorotipo icterohaemorrhagiae, 14 para pomona, 11 para grippotyphosa e 2 para canicola. LACERDA JR. & cols. (1960), examinaram 495 soros de vacas, pela técnica de aglutinação rápida com antígeno sorotipo pomona, encontrando título de 1:20 a 1:320. SANTA ROSA & cols. (1961a), isolaram uma amostra de leptospira proveniente de feto bovino, identificada como pertencente ao sorotipo icterohaemorrhagiae. SANTA ROSA & cols. (1961b), com o intuito de avaliar o índice de positividade para leptospirose na região de Campinas, realizaram um inquérito sorológico com material proveniente de 14 fazendas leiteiras. Dos 279 soros examinados por microaglutinação, 79 (28,3%) apresentaram reações positivas, predominando o sorotipo icterohaemorrhagiae. BARBOSA (1962), em Minas Gerais, pesquisou a ocorrência de aglutininas e lisinas antileptospira, examinando 120 soros de bovinos, provenientes de cinco municípios. Foram encontrados 18,3% de reagentes, com maior predominância para os sorotipos pomona e icterohaemorrhagiae. SANTA ROSA & cols. (1969/70), reportando-se aos estudos sobre leptospirose no período de 1960 a 1968, em São Paulo, apresentaram os resultados sorológicos da microaglutinação com 15.080 soros de bovinos, com um índice



de positividade de 23,6% (3.561 soros), predominando o sorotipo wolf-fi, além de pomona, icterohaemorrhagiae, tarassovi, grippotyphosa e outros.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

### Origem e colheita do material

Foram utilizados 1.562 soros sanguíneos de bovinos adultos, colhidos no período de 1968 a 1971, provenientes de 64 propriedades, a gro-pastoris, localizadas em 28 municípios do Estado do Rio de Janeiro (Fig. 1, Quadro I). A amostragem de soros de cada propriedade correspondeu a cerca de 10% dos seus rebanhos, que oscilavam entre 10 a 400 cabeças. Os animais, em sua grande maioria, eram mestiços de raças europeias leiteiras com zebu. O sangue, para obtenção de soro, era colhido diretamente da jugular, em tubos de vidro esterilizados, de 10 x 120 mm, e refrigerados após a coagulação.

### Sorologia

Depois de separar por pipetagem e preparar combinações ("pools") de cinco soros, eram todos guardados em congelador a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização da prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras. As combinações de soros consistiram na mistura de cinco amostras utilizando 0,5 ml de cada uma.

A técnica de soro-aglutinação microscópica com leptospiras utilizada, foi a descrita por GALTON & cols. (1960), com ligeiras modificações: a 0,5 ml da combinação de soros (soro a+b+c+d+e = 1:5) eram adicionados 4,5 ml de salina tamponada estéril, pH 7,4, dando uma diluição de 1:50 para cada soro presente (1+4+45 = 1:50). Em 17 tubos de hemólise eram distribuídos 0,2 ml destes soros diluídos. A cada um desses tubos adicionavam-se 0,2 ml de antígeno (diluição final = 1:100).

Eram também utilizados 17 tubos testemunhas, nos quais se misturavam 0,2 ml de salina com 0,2 ml de cada antígeno. Os antígenos usados, culturas de leptospiras de 4 a 14 dias em meio de KORTHOFF (1932) modificado (BABUDIARI & ZARDI, 1959) ou de STUART (1946), foram os indicados pelo grupo de técnicos da Organização Mundial de SAÚDE (WHO, 1967), com pequenas alterações (Quadro II). Dois sorotipos foram substituídos no decorrer dos trabalhos: ballum e australis. Em seus lugares, passou-se a usar os sorotipos castelloni e bratislava, respectivamente. Outros dois foram suprimidos: guidae e andamana. Também incluímos na bateria de antígenos uma amostra (Mm-2) isolada em 1969 de camundongo, Mus musculus brevisrostris (CORDEIRO, 1970). Os tubos eram agitados manualmente e levados à estufa a 30°C por três horas, após o que eram examinados. Uma gota da mistura de cada tubo era colocada em lâmina de vidro por meio de alça de platina e examinada em microscópio com condensador de campo escuro, ocular 10x e objetiva 16x. O grau de aglutinação era lido como 1+ (menos de 50% de leptospiras aglutinadas), 2+ (cerca de 50% de aglutinação), 3+ (de 50 a 75% de aglutinação), 4+ (de 75 a 100% de aglutinação) e - (o campo microscópico apresentava-se idêntico ao testemunha).

Eram consideradas positivas as reações quando 50% ou mais das leptospiras apresentavam-se aglutinadas.

Os soros componentes das combinações com reações positivas eram testados em separado, para se confirmar qual ou quais amostras eram positivas à soro-aglutinação microscópica. Para isso, cada soro era diluído a 1:50 (0,1 ml de soro + 4,9 ml de salina); a técnica restante era idêntica à descrita anteriormente. Uma vez identificados os soros positivos com título de 1:100, estes eram retestados a fim de se verificar seus títulos. Uma série de diluições ao dobro era preparada com o soro e salina desde 1:200 até 1:6.400 ou maiores, se necessário.

#### Análise estatística

Para efeito da análise estatística, as amostras de soro foram grupadas de acordo com sua origem, observando-se as micro-regiões

omogêneas<sup>+</sup>, os municípios e as altitudes dos mesmos (ENCICLOPÉDIA OS MUNICÍPIOS BRASILEIROS, 1959).

Foi aplicado o teste do  $X^2$  em tabelas de contingência para estudo do efeito das micro-regiões homogêneas e as diversas altitudes sobre a prevalência das reações positivas na prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras.

A análise de variância foi feita para testar o efeito entre municípios que apresentavam repetições de amostras de soro, ou seja, entre aqueles nos quais se colheu amostras de duas ou mais propriedades (Quadro I).

---

<sup>+</sup> O espaço homogêneo, definido como "forma de organização em torno da produção", foi expresso por combinações de fatos físicos, sociais e econômicos. DIVISÃO DO BRASIL EM MICRO-REGIÕES HOMOGENEAS, 1968 (1970).



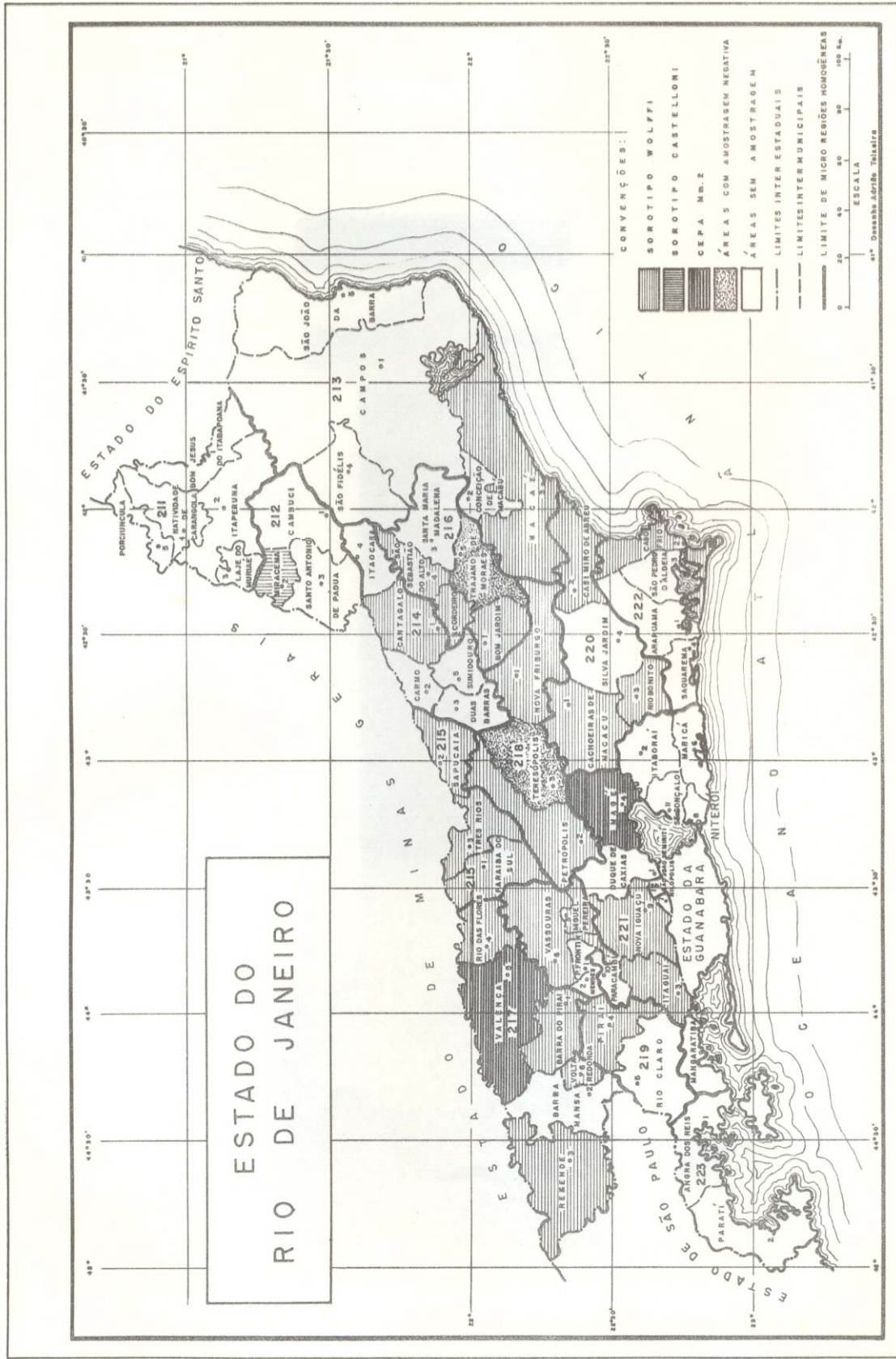


FIG. 1 - PROCEDÊNCIA DOS SOROS EXAMINADOS, COM INDICAÇÃO DAS ÁREAS DE PREDOMINÂNCIA DE ALGUNS SOROTIPOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO-BRASIL

QUADRO I

Distribuição dos hemo-soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro por propriedades, municípios e micro-regiões homogêneas, usados na prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras.

Micro região homogênea Nº	Municípios			Propriedades visitadas			Soros examinados		
	Nº Ord	Nome	Altitude (metros)	Nº Ord	Totais		Por Prop.	Por Mun.	Por MRH
					P/Mun	P/MRH			
212	1	Miracema	137	1	1	1	17	17	17
213	2	Macaé	5	2	2	2	25	43	43
				3			18		
214	3	Cantagalo	376	4	1	1	29	29	29
215	4	Paraíba do Sul	280,3	5	3	8	36	51	170
				6			7		
				7			8		
	5	Sapucaia	214,6	8	1		13	13	
	6	Três Rios	273	9	4		11	106	
				10			61		
				11			29		
				12			5		
216	7	Bom Jardim	574	13	6	15	27	75	211
				14			16		
				15			12		
				16			12		
				17			3		
				18			5		
	8	Cordeiro	486	19	7		26	94	
				20			15		
				21			2		
				22			9		
				23			10		
				24			11		
				25			21		
	9	S. Sebastião do Alto	310	26	1		24	24	
	10	Trajano de Moraes	679	27	1		18	18	
217	11	Barra do Piraí	357	28	2	14	17	29	577
				29			12		
	12	Resende	394,6	30	1		166	166	
	13	Rio das Flores	511,7	31	1		10	10	
	14	Marquês de Valença	541,2	32	7		76	321	
				33			81		
				34			99		
				35			3		
				36			29		
				37			25		
				38			8		
	15	Volta Redonda	417,7	39	3		21	51	
				40			19		
				41			11		
218	16	Nova Friburgo	847	42	1	9	61	61	232
	17	Petrópolis	840	43	7		27	164	
				44			51		
				45			17		
				46			5		
				47			15		
				48			5		
				49			44		
	18	Teresópolis	902	50	1		7	7	
219	19	Miguel Pereira	614	51	1	4	8	8	95
	20	Piraí	370	52	1		43	43	
	21	Vassouras	416,8	53	2		22	44	
				54			22		
220	22	Cachoeiras de Macacu	40	55	1	3	50	50	84
	23	Casimiro de Abreu	17	56	1		25	25	
	24	Rio Bonito	51	57	1		9	9	
221	25	Itaguaí	3,8	58	3	6	1	24	94
				59			18		
				60			5		
	26	Magé	431	61	1		12	12	
	27	Nova Iguaçu	26,2	62	2		52	58	
				63			6		
222	28	Cabo Frio	2	64	1	1	10	10	10

## QUADRO II

Sorotipos de leptospira usados como antígeno na prova de soro-aglutinação microscópica.

Sorogrupo	Sorotipo	Amostra
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	RGA
Javanica	javanica	Veldrat Batavia 46
Canicola	canicola	Hond Utrecht IV
Ballum	ballum	Mus 127
	castelloni	Castellón 3
Pyrogenes	pyrogenes	Salinem
Cynopteri	butembo	butembo
Autumnalis	autumnalis	Akiyami A
Australis	australis	Ballico
	bratislava	Jez bratislava
Pomona	pomona	Pomona
Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V
Hebdomadis	mini	Sari
	wolffi	3705
Bataviae	bataviae	Van Tienen
Tarassovi	tarassovi <sup>a</sup>	Perepelicin
	guidae	RP 29
Panama	panama	CZ 214 K
Semaranga	patoc	Patoc I
Andamana	andamana	CH II
?	pomona? ballum?	Mm-2

<sup>a</sup> Anteriormente chamado hyos.



Solução de Sorensen para pH 7.4

## Composição

fosfato dissódico .....	8,33 g
fosfato monopotássico .....	1,09 g
água destilada .....	1.000ml

Salina tamponada estéril pH 7.4

## Composição

Salina a 8,5 ‰ .....	920ml
Solução de Sorensen .....	80ml

Meio de KORTHOFF (1932) modificado (Babudieri & Zardi, 1959)

## Composição

Peptona (Bacto) .....	0,8 g
Cloreto de sódio .....	1,4 g
Bicarbonato de sódio .....	0,02 g
Cloreto de cálcio .....	0,04 g
Cloreto de potássio .....	0,04 g
Fosfato monopotássico .....	0,24 g
Fosfato dissódico .....	0,70 g
Ácido nicotínico .....	0,001 g
Vitamina B <sub>12</sub> .....	0,001 g
Água destilada .....qsp.	1.000ml
Soro de coelho inativado .....	10%

Meio de STUART<sup>+</sup> (1946)

## Composição

Asparagina (Bacto) .....	0,132	g
Cloreto de amônio .....	0,268	g
Cloreto de magnésio .....	0,406	g
Cloreto de sódio .....	1,808	g
Fosfato dissódico .....	0,666	g
Fosfato monopotásico .....	0,087	g
Vermelho-fenol (Bacto) .....	0,010	g
Glicerina .....	4	ml
Água destilada .....	qsp.	1000 ml
Soro de coelho inativado .....	10%	

<sup>+</sup> Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

#### IV. RESULTADOS

Das 64 propriedades visitadas, 54 (84,37%) tinham em seus rebanhos animais positivos à prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras (Quadro III).

Somente dois dos 28 municípios do Estado do Rio de Janeiro com amostragem de soros não apresentaram animais reagentes (Quadro IV).

Dos 1562 soros examinados, 312 (21,85%) apresentaram reações positivas com títulos de 1:100 ou maior (Quadros V e VI). O sorotipo wolffi (10,62%) foi o de maior evidência, seguido de tarassovi (2,62%), amostra Mm-2 (2,48%), grippotyphosa (1,28%), pomona (1,28%) e bratislava (1,14%). Outros sorotipos apresentaram menor número de reações. Os títulos aglutinantes mais elevados encontrados foram com a amostra Mm-2 (1:102.400) e os sorotipos wolffi (1:12.800) e pomona (1:3.200). Co-aglutinações foram observadas com frequência (Quadro VII).

O quadro VIII mostra a prevalência de reações positivas com distribuição por micro-regiões homogêneas. O sorotipo predominante foi wolffi. Somente uma micro-região homogênea (212) apresentou o sorotipo castelloni com predominância.

A significância a um nível menor do que 0,1% do valor calculado para o  $\chi^2$ , no quadro IX, indica que a prevalência de animais reagentes a leptospiras no Estado do Rio de Janeiro, medida pela prova de soro-aglutinação microscópica, é afetada pelas micro-regiões homogêneas.

Também no quadro X indica que a prevalência de animais reagentes é afetada pelas micro-regiões situadas até 350 metros de altitude. No quadro XI, a não significância ao nível de 5% do valor calculado para o  $X^2$  indica que essa prevalência não é afetada pelas micro-regiões acima de 350 metros.

A significância a um nível menor do que 0,1% do valor calculado para o  $X^2$ , no quadro XII, indica que a prevalência de animais reagentes é afetada pelas diversas altitudes do Estado do Rio de Janeiro.

A não significância ao nível de 5% do valor calculado para o teste da análise de variância, no quadro XIII, indica que a prevalência de animais reagentes não foi afetada pelos municípios.



QUADRO III

Prevalência de reações positivas em soros de bovinos pela prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras, e predominância de sorotipos por propriedades do Estado do Rio de Janeiro, no período de 1968 a 1971.

Municípios	Propriedades Nº	Soros			Predominância	
		Examinados Nº	Positivos		Sorotipo	%
			Nº	%		
Miracema	1	17	9	52,94	Castelloni	44,44
Macaé	2	25	5	20,00	wolffi	80,00
	3	18	12	66,66	"	50,00
Cantagalo	4	29	6	20,68	"	83,33
Paraíba do Sul	5	36	8	22,22	"	62,50
	6	7	2	28,57	"	100,00
	7	8	2	25,00	bratislava	50,00
Sapucaia	8	13	2	15,38	wolffi	50,00
Três Rios	9	11	0	---	---	---
	10	61	5	8,19	wolffi	100,00
	11	29	3	10,34	"	66,66
	12	5	1	20,00	"	100,00
Bom Jardim	13	27	4	14,81	Mm-2	50,00
	14	16	1	6,25	wolffi	100,00
	15	12	7	58,33	"	85,71
	16	12	3	25,00	tarassovi	100,00
	17	3	0	---	---	---
	18	5	0	---	---	---
Cordeiro	19	26	6	23,07	wolffi	50,00
	20	15	1	6,66	"	100,00
	21	2	0	---	---	---
	22	9	2	22,22	wolffi	100,00
	23	10	5	50,00	"	60,00
	24	11	1	9,09	grippotyphosa	100,00
	25	21	2	9,52	wolffi	100,00
S. Sebastião do Alto	26	24	8	33,33	"	62,50
Trajano de Moraes	27	18	0	---	---	---
Barra do Piraí	28	17	4	23,52	wolffi	75,00
	29	12	2	16,66	"	100,00
Resende	30	166	45	27,10	"	37,77
Rio das Flores	31	10	2	20,00	"	100,00
Marquês de Valença	32	76	6	7,89	australis	33,33
	33	81	16	19,75	Mm-2	68,75
	34	99	18	18,18	pomona	33,33
	35	3	1	33,33	wolffi	100,00
	36	29	0	---	---	---
	37	25	8	32,00	wolffi	75,00
	38	8	3	37,50	pomona	66,66
Volta Redonda	39	21	0	---	---	---
	40	19	2	10,52	wolffi	50,00
	41	11	1	9,09	"	100,00
Nova Friburgo	42	61	10	16,39	"	60,00
Petropolis	43	27	3	11,11	tarassovi	66,66
	44	44	12	27,27	wolffi	33,33
	45	51	4	7,84	"	100,00
	46	17	1	5,88	"	100,00
	47	5	0	---	---	---
	48	15	2	13,33	wolffi	100,00
	49	5	0	---	---	---
Teresópolis	50	7	0	---	---	---
Miguel Pereira	51	8	1	12,50	wolffi	100,00
Piraí	52	43	7	16,27	"	42,85
Vassouras	53	22	2	9,09	tarassovi	100,00
	54	22	5	22,72	wolffi	80,00
Cachoeiras de Macacu	55	50	8	16,00	"	62,50
Casimiro de Abreu	56	25	9	36,00	"	100,00
Rio Bonito	57	9	1	11,11	"	100,00
Itaguaí	58	1	1	100,00	"	100,00
	59	18	2	11,11	"	50,00
	60	5	1	20,00	"	100,00
Magé	61	12	4	33,33	Mm-2	100,00
Nova Iguaçu	62	52	23	44,23	wolffi	73,91
	63	6	5	83,33	tarassovi	100,00
Cabo Frio	64	10	8	80,00	wolffi	100,00

Total de propriedades visitadas: 64

Total de propriedades com animais reagentes: 54 (84,37%)

Total de soros examinados: 1562

Total de soros positivos: 312 (19,97%)

QUADRO III

Prevalência de reações positivas em soros de bovinos pela prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras, e predominância de sorotipos por propriedades do Estado do Rio de Janeiro, no período de 1968 a 1971.

Municípios	Propriedades Nº	Soros			Predominância	
		Examinados Nº	Positivos		Sorotipo	%
			Nº	%		
Miracema	1	17	9	52,94	Castelloni	44,44
Macaé	2	25	5	20,00	wolffi	80,00
	3	18	12	66,66	"	50,00
Cantagalo	4	29	6	20,68	"	83,33
Paraíba do Sul	5	36	8	22,22	"	62,50
	6	7	2	28,57	"	100,00
	7	8	2	25,00	bratislava	50,00
Sapucaia	8	13	2	15,38	wolffi	50,00
Três Rios	9	11	0	---	---	---
	10	61	5	8,19	wolffi	100,00
	11	29	3	10,34	"	66,66
	12	5	1	20,00	"	100,00
Bom Jardim	13	27	4	14,81	Mm-2	50,00
	14	16	1	6,25	wolffi	100,00
	15	12	7	58,33	"	85,71
	16	12	3	25,00	tarassovi	100,00
	17	3	0	---	---	---
	18	5	0	---	---	---
Cordeiro	19	26	6	23,07	wolffi	50,00
	20	15	1	6,66	"	100,00
	21	2	0	---	---	---
	22	9	2	22,22	wolffi	100,00
	23	10	5	50,00	"	60,00
	24	11	1	9,09	grippotyphosa	100,00
	25	21	2	9,52	wolffi	100,00
S. Sebastião do Alto	26	24	8	33,33	"	62,50
Trajano de Moraes	27	18	0	---	---	---
Barra do Pirai	28	17	4	23,52	wolffi	75,00
	29	12	2	16,66	"	100,00
Resende	30	166	45	27,10	"	37,77
Rio das Flores	31	10	2	20,00	"	100,00
Marquês de Valença	32	76	6	7,89	australis	33,33
	33	81	16	19,75	Mm-2	68,75
	34	99	18	18,18	pomona	33,33
	35	3	1	33,33	wolffi	100,00
	36	29	0	---	---	---
	37	25	8	32,00	wolffi	75,00
	38	8	3	37,50	pomona	66,66
Volta Redonda	39	21	0	---	---	---
	40	19	2	10,52	wolffi	50,00
	41	11	1	9,09	"	100,00
Nova Friburgo	42	61	10	16,39	"	60,00
Petropolis	43	27	3	11,11	tarassovi	66,66
	44	44	12	27,27	wolffi	33,33
	45	51	4	7,84	"	100,00
	46	17	1	5,88	"	100,00
	47	5	0	---	---	---
	48	15	2	13,33	wolffi	100,00
	49	5	0	---	---	---
Teresópolis	50	7	0	---	---	---
Miguel Pereira	51	8	1	12,50	wolffi	100,00
Pirai	52	43	7	16,27	"	42,85
Vassouras	53	22	2	9,09	tarassovi	100,00
	54	22	5	22,72	wolffi	80,00
Cachoeiras de Macacu	55	50	8	16,00	"	62,50
Casimiro de Abreu	56	25	9	36,00	"	100,00
Rio Bonito	57	9	1	11,11	"	100,00
Itaguaí	58	1	1	100,00	"	100,00
	59	18	2	11,11	"	50,00
	60	5	1	20,00	"	100,00
Magé	61	12	4	33,33	Mm-2	100,00
Nova Iguaçu	62	52	23	44,23	wolffi	73,91
	63	6	5	83,33	tarassovi	100,00
Cabo Frio	64	10	8	80,00	wolffi	100,00

Total de propriedades visitadas: 64

Total de propriedades com animais reagentes: 54 (84,37%)

Total de soros examinados: 1562

Total de soros positivos: 312 (19,97%)





## QUADRO IV

Prevalência de reações positivas em soros de bovinos pela prova de soroglutinação microscópica com leptospiras, e predominância de serotipos por municípios do Estado do Rio de Janeiro, no período de 1968 a 1971.

Município	Soros			Predominância	
	Examinados	Positivos		Serotipo	%
	Nº	Nº	%		
Miracem	17	9	52,94	castelloni	44,44
Macaé	43	17	39,53	wolffi	58,82
Cantagalo	29	6	20,68	"	83,33
Paraíba do Sul	51	12	23,52	"	58,33
Sapucaia	13	2	15,38	"	50,00
Três Rios	106	9	8,49	"	88,88
Bom Jardim	75	15	20,00	"	53,33
Cordeiro	94	17	18,08	"	64,70
S. Sebastião do Alto	24	8	33,33	"	62,50
Trajano de Moraes	18	0	---	---	---
Barra do Pirai	29	6	20,68	wolffi	66,66
Resende	166	45	27,10	"	37,77
Rio das Flores	10	2	20,00	"	100,00
Marquês de Valença	321	52	16,19	Mm-2	28,84
Volta Redonda	51	3	5,88	wolffi	66,66
Nova Friburgo	61	10	16,39	"	60,00
Petropolis	164	22	13,41	"	54,54
Teresopolis	7	0	---	---	---
Miguel Pereira	8	1	12,50	wolffi	100,00
Pirai	43	7	16,27	"	42,85
Vassouras	44	7	15,90	"	57,14
Cachoeira de Macacu	50	8	16,00	"	62,50
Casimiro de Abreu	25	9	36,00	"	100,00
Rio Bonito	9	1	11,11	"	100,00
Itaguaí	24	4	16,66	"	75,00
Magé	12	4	33,33	Mm-2	100,00
Nova Iguaçu	58	28	48,27	wolffi	64,28
Cabo Frio	10	8	80,00	"	100,00
Totais	1562	312	19,97		

## QUADRO V

tígenos de leptospira substituídos, suprimidos ou incluídos na bateria e número de soros de bovinos testados por soro-aglutinação microscópica, com percentual de positivos correspondentes.

Antígeno	Soros				
	Testados	Positivos <sup>a</sup>		Positivos <sup>b</sup>	
		Nº	%	Nº	%
allum	533	94	17,63	-	-
astelloni	1.029	218	21,18	5	0,48
australis	256	32	12,50	2	0,78
ratislava	1.306	280	21,43	15	1,14
uidae	968	162	16,73	3	0,30
ndamana	740	125	14,89	-	-
n=2	1.045	224	21,46	26	2,48

<sup>a</sup> Total de soros positivos com todos os antígenos da bateria (Quadro II);

<sup>b</sup> Total de soros positivos com cada antígeno constante deste quadro.

QUADRO VI

Títulos dos hemo-soros de bovinos positivos na prova de soro-aglutinação microscópica com vários sorotipos como antígeno.

Antígenos	Diluições dos soros										Totais	% por sorotipo
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:102400			
wolffi	34	53	32	26	12	3	4	2	-	-	166	10,62
tarassovi	9	23	6	1	2	-	-	-	-	-	41	2,62
Mm-2	9	3	8	1	2	-	1	1	1	-	26	2,48 <sup>a</sup>
grippotyphosa	14	2	4	-	-	-	-	-	-	-	20	1,28
pomona	11	4	3	-	1	1	-	-	-	-	20	1,28
bratislava	10	3	1	1	-	-	-	-	-	-	15	1,14 <sup>a</sup>
butembo	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	8	0,51
castelloni	3	-	2	-	-	-	-	-	-	-	5	0,48 <sup>a</sup>
guidae	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,30 <sup>a</sup>
australis	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,78 <sup>a</sup>
canicola	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,12
autumnalis	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,12
mini	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,06
javanica	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,06
Totais:	100	97	56	29	17	4	5	3	1	1	312	21,85 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Percentual corrigido, conforme quadro V.

<sup>b</sup> Percentual total corrigido



## QUADRO VII

Co-aglutinações encontradas na prova de soro-aglutinação microscópica com soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro.

Scrotipos	Títulos 1:	Frequência
wolffi, bratislava	100, 100	6
	200, 100	2
	200, 200	1
	400, 100	3
	400, 200	4
	400, 400	1
	800, 100	1
	800, 200	2
	800, 400	4
	1600, 100	1
	12800, 200	2
	wolffi, mini, bratislava	6400, 800, 800
1600, 100, 200		1
800, 400, 400		1
400, 100, 100		1
200, 200, 200		1
200, 100, 100		1
wolffi, mini	100, 100	1
	1600, 100	1
	1600, 200	1
	6400, 1600	1
wolffi, tarassovi	100, 100	1
	400, 100	2
	400, 400	1
	1600, 200	1
wolffi, canicola	800, 800	1
	400, 100	1
wolffi, Mm-2	800, 100	1
	400, 100	1
wolffi, grippotyphosa	400, 100	1
	200, 100	1
wolffi, tarassovi, guidae	200, 200, 200	1
wolffi, mini, bratislava, tarassovi	800, 400, 200, 100	1
wolffi, butembo	100, 100	1
butembo, wolffi	200, 100	1
butembo, bratislava	100, 100	1
butembo, bratislava, tarassovi	200, 100, 100	1
butembo, wolffi, bratislava	200, 100, 100	1



## Cont. QUADRO VII

Sorotipos	Títulos 1:	Frequência
butembo, autumnalis	100, 100	1
tarassovi, guidae	200, 200	6
	400, 200	1
	800, 400	1
tarassovi, bratislava	400, 100	1
tarassovi, grippotyphosa	100, 100	1
	200, 100	2
	1600, 100	1
tarassovi, wolffi, guidae	400, 200, 200	1
tarassovi, grippotyphosa, wolffi	1600, 200, 200	1
tarassovi, wolffi	200, 100	1
Mm-2, pomona	400, 200	1
	800, 200	1
	1600, 100	1
	12800, 800	1
	102400, 3200	1
Mm-2, butembo, bratislava	400, 100, 100	1
Mm-2, pomona, bratislava	400, 100, 100	1
Mm-2, pomona, wolffi, grippotyphosa	1600, 200, 200, 100	1
Mm-2, pomona, wolffi, bratislava	3200, 3200, 400, 200	1
grippyphosa, bratislava	400, 100	1
grippyphosa, butembo	400, 100	1
grippyphosa, bratislava, javanica	100, 100, 100	1
pomona, wolffi	1600, 400	1
	100, 100	1
pomona, butembo	200, 100	1
bratislava, mini, wolffi	400, 400, 100	1
castelloni, canicola	400, 400	1
	Total	89

## QUADRO VIII

Prevalência de reações positivas em soros de bovinos pela prova de soros -aglutinação microscópica com leptospiras e predominância de sorotipos por micro-regiões homogêneas do Estado do Rio de Janeiro, no período de 1968 a 1971.

Micro-regiões homogêneas Nº	Soros			Predominância	
	Examinados Nº	Positivos		Sorotipo	%
		Nº	%		
212	17	9	52,94	castelloni	44,44
213	43	17	39,53	wolffi	58,82
214	29	6	20,68	"	83,33
215	170	23	13,52	"	69,56
216	211	40	18,95	"	60,00
217	577	108	18,71	"	36,11
218	232	32	13,79	"	56,25
219	95	15	15,78	"	53,33
220	84	18	21,42	"	83,33
221	94	36	38,29	"	58,33
222	10	8	80,00	"	100,00
<b>Totais:</b>	<b>1562</b>	<b>312</b>	<b>19,97</b>		

## QUADRO IX

Tabela de contingência das frequências observadas nos resultados da prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras, para teste do efeito das micro-regiões homogêneas do Estado do Rio de Janeiro sobre a prevalência das reações positivas.

Micro-regiões homogêneas	Reações de soro-aglutinação	
	Positivas	Negativas
212	9	8
213	17	26
214	6	23
215	23	147
216	40	171
217	108	469
218	32	200
219	15	80
220	18	66
221	36	58
222	8	2

$$\chi^2 = 76,90$$

$$P < 0,1\%$$

## QUADRO X

Tabela de contingência das frequências observadas nos resultados da prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras, para teste de efeito das micro-regiões homogêneas do Estado do Rio de Janeiro, situadas até 350 metros de altitude, sobre a prevalência das reações positivas.

Micro-regiões homogêneas Nº	Reações de soro-aglutinação	
	Positivas	Negativas
212	9	8
213	17	26
215	23	147
220	18	66
221	36	58
222	8	2

$$\chi^2 = 46,56$$

$$P < 0,1\%$$



## QUADRO XI

Tabela de contingência das frequências observadas nos resultados da prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras, para teste do efeito das micro-regiões homogêneas do Estado do Rio de Janeiro, situadas acima de 350 metros, sobre a prevalência das reações positivas.

Micro-regiões homogêneas Nº	Reação de soro-aglutinação	
	Positivas	Negativas
214	6	23
216	40	171
217	108	469
218	32	200
219	15	80

$$\chi^2 = 3,70$$

$$P > 5\%$$

## QUADRO XIII

Tabela de contingência das frequências observadas e esperadas nos resultados da prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras, para teste do efeito de altitudes no Estado do Rio de Janeiro, sobre a prevalência das reações positivas.

Altitude em metros	Reações de soro-aglutinação			
	Positivas		Negativas	
	fo	fe	fo	fe
0 - 200	84	47,1	152	188,9
201 - 400	95	92,1	366	368,9
401 - 600	100	121,2	507	485,8
601 - 800	1	5,2	25	20,8
801 - 1000	32	46,3	200	185,7

$$\chi^2 = 50,62$$

$$P < 0,1\%$$

## QUADRO XIII

Quadro da análise da variância para teste do efeito entre município sobre a prevalência das reações positivas.

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Entre municípios	11	5.298,72	481,70	1,88
Resíduo	36	9.223,02	256,19	
Total	47	14.521,74		

$$P > 5\%$$

## V. DISCUSSÃO

O objetivo primordial deste trabalho foi o de verificar a presença de aglutininas antileptospira no soro de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. Pelos resultados encontrados, observa-se que as infecções por leptospiras são bastante difundidas em nosso meio, pois das 64 propriedades visitadas, 54 (84,37%) apresentavam em seus rebanhos animais reagentes à prova de soro-aglutinação microscópica. Verifica-se também, pelos dados do quadro III, que há uma variação de predominância de sorotipos, de região para região, apesar de que o sorotipo wolffi aparece com mais freqüência.

A prevalência de reações positivas indicadas no quadro IV sugere que os municípios de Cabo Frio, Miracema, Nova Iguaçu e Macaé são os de maior importância com relação a infecções por leptospiras.

A percentagem de soros de bovinos positivos encontrada (19,97%) pode ser comparada com os resultados de SANTA ROSA (1969/70) que, embora trabalhando com uma amostragem muito maior (15.080 soros) e título mínimo de 1:200, encontrou 23,60%. Se, entretanto, considerarmos os percentuais corrigidos das reações positivas com os antígenos substituídos, suprimidos ou incluídos (Quadro V), esse resultado eleva-se para 21,85% (Quadro VI). O sorotipo predominante, wolffi (10,88%), é comum aos dois Estados brasileiros. Este sorotipo foi isolado de ser humano e de um pequeno roedor silvestre (Akodon arviculoides), no Estado de São Paulo (CORREA & cols., 1965/67). Embora este sorotipo tenha sido assinalado freqüentemente e com títulos altos (1:12.800), não se conhece sua



patogenicidade para os bovinos. O sorotipo wolffi pertence ao sorogrupo hebdomadis, que congrega cerca de 20 sorotipos, dos quais o hardjo tem sido responsabilizado por vários casos de leptospirose bovina, comprovada pelo isolamento do microorganismo (ROTH & GALTON, 1960; CLARK & cols., 1961; STOENNER, 1967; SULLIVAN & STALLMANN, 1969; SULLIVAN & CALLAN, 1970; CORBOULD, 1971; SULLIVAN, 1972; HOARE & CLAXTON, 1972). SANTA ROSA (1971) obteve uma cultura proveniente de rim de bovino que nos primeiros testes parecia tratar-se do sorotipo wolffi. Posteriormente foi classificada como um novo sorotipo (guaiurus) do mesmo sorogrupo.

O sorotipo tarassovi (hyos) foi o segundo mais importante, apresentando 2,62% de positividade sobre o total de soros testados, o que nos levou a acreditar na possibilidade de estar o problema ligado à criação de bovinos em promiscuidade com suínos, por ser comum nesta espécie animal. Aliás, diversas propriedades visitadas mantinham pequenas criações de porcos.

A amostra Mm-2, isolada de camundongo, constitui, na realidade, duas; uma pertencente ao sorogrupo ponona e outra ao ballum (BABUDIERI, 1971). Encontra-se atualmente em fase de tipificação em laboratório de referência da Organização Mundial de Saúde. Uma vez incluída entre os antígenos usados no presente trabalho, demonstrou ser mais sensível que o sorotipo ponona, pois além de evidenciar maior número de reações positivas (2,48%), em casos de co-aglutinação com este sorotipo, apresentou títulos mais elevados (Quadro VI e VII).

O sorotipo gripotyrphosa, o quarto em importância no presente inquérito, é conhecido como responsável por epizootias em bovinos na Rússia (NIKOLAJEV, 1946). No Brasil, este sorotipo foi isolado de diversos animais silvestres, principalmente o roedor Akodon arviculoides, o qual poderia ser responsável por algum surto de leptospirose em animais domésticos, nas áreas onde eles habitam (SANTA ROSA, 1970).

O sorotipo ponona também responsabilizado por surto de aborto com retenção de placenta e redução acentuada de produção de leite numa granja de São Paulo (FREITAS & cols., 1957), parece ser frequente em nosso meio. No presente levantamento, aparece com um índice de positiv

dade de 1,28%. Outros trabalhos nacionais (FREITAS & cols., 1960; SANTA ROSA & cols., 1962) indicam o sorotipo pomona como causando danos também à espécie suína e eqüina.

Após a inclusão do sorotipo bratislava (1,14%) que substituiu o australis (0,78%) na bateria de antígenos, observou-se que o número de soros positivos para o representante desse sorogrupo aumentou sensivelmente. Verifica-se, assim, a necessidade de se desenvolverem maiores estudos sobre os sorotipos que predominam nesta região.

Sete outros sorotipos apresentaram reações positivas em menor número, o que atribuímos a infecções esporádicas, como pelo sorotipo ca nicola, ou afinidades antigênicas.

As co-aglutinações relacionadas no quadro VII permitem admitir a ocorrência de infecções por múltiplos sorotipos. Algumas, entretanto, como wolffi, mini, tarasovi, guidae, Mm-2, pomona, correm a conta de afinidades antigênicas por pertencerem a mesmos sorogrupos.

A utilização de combinações de soros no teste de triagem dos positivos demonstrou ser de grande utilidade, proporcionando uma economia acentuada de tempo e material.

A análise estatística permitiu demonstrar o efeito das micro-regiões homogêneas e das altitudes na prevalência de animais reagentes a leptospiras. Provavelmente, as micro-regiões e as altitudes em si não seriam os fatores determinantes na prevalência dos animais reagentes, mas sim o conjunto de fatores ecológicos e climáticos que ocorrem nas diversas áreas, além de outros relativos ao manejo dos animais. Verificou-se, ao exame do quadro XII, que as regiões baixas, até 400 metros de altitude, foram as que apresentaram maior número de animais reagentes em relação ao esperado, sob a hipótese da independência.

## VI. CONCLUSIONS



Os resultados obtidos permitiram concluir que:

1) o índice de positividade (21,85%) encontrado pela prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiros nos soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro é bastante expressivo;

2) predominaram as aglutininas contra os sorotipos wolffi (10,62%), tarassovi (2,62%), grippotyphosa (1,28%), pomona (1,28%), bratislava (1,14%), e a amostra Mm-2 (2,48%);

3) o grande número de propriedades com animais reagentes à leptospira (54 em 64 = 84,37%) demonstra que as infecções por esse microorganismo nesse Estado são bastante difundidas;

4) as micro-regiões homogêneas, assim como as altitudes, afetam a prevalência de animais reagentes, ocorrendo um percentual mais alto nas regiões com altitude até 400 metros;

5) os municípios de maior prevalência de reações positivas foram Cabo Frio, Miracema, Nova Iguaçu e Macaé, embora essa afirmação não esteja apoiada em qualquer análise estatística.

Face as conclusões acima, seria recomendável:

1) maiores estudos no sentido de se confirmarem os prejuízos causados por leptospiroses na espécie bovina, no Estado do Rio de Janeiro, particularmente, com os sorotipos wolffi e outros componentes do grupo hebdomadis, tarassovi, pomona e bratislava;

2) observações epidemiológicas relacionadas com reservatórios silvestres e sua ecologia.



Foram examinados 1.562 soros sanguíneos de bovinos, provenientes de 64 propriedades agro-pastoris, localizadas em 28 municípios do Estado do Rio de Janeiro, pela prova de soro-aglutinação microscópica com 17 culturas vivas de leptospiras como antígeno. Reações positivas com títulos a partir de 1:100 foram observadas em 21,85% dos soros, envolvendo principalmente os sorotipos wolffi, tarassovi, grippotyphosa, pomona, bratislava e a amostra Mm-2. Os títulos aglutinantes mais elevados encontrados foram com a amostra Mm-2 (1:102.400) e os sorotipos wolffi (1:12.800) e pomona (1:3.200). Có-aglutinações também foram observadas com frequência. Em 54 das 64 propriedades visitadas (84,37%) foram encontrados bovinos com reações positivas contra Leptospira. A prevalência de animais reagentes foi mais alta nas regiões com altitude até 400 metros. Os municípios de maior prevalência de reações positivas foram Cabo Frio, Miracema, Nova Iguaçu e Macaé. A utilização de combinações de soros na prova de triagem dos positivos demonstrou ser de grande utilidade, proporcionando uma economia acentuada de tempo e material.

"Antileptospira agglutinins in bovine sera of  
Rio de Janeiro State, Brazil"

By the microscopic agglutination test with 17 live antigens of leptospiras, 1,562 bovine sera from 28 municipalities of the State of Rio de Janeiro were examined. Positive reactions with titres starting at 1:100 were observed in 21.85% of the sera, involving mainly wolffi, tarassovi, grippotyphosa, pomona, bratislava serotypes and Mm-2 strain. The most elevated titres were found with the Mm-2 strain (1:102,400) and the serotypes wolffi (1:12,800) and pomona (1:3,200). Co-agglutinations were also observed. In 54 of 64 farms studied (84.37%), cows with positive reactions were observed. The prevalence of reactive animals were more high in the regions up to an altitude of 400 m. The municipalities of the highest prevalence of positive reactions were those of Cabo Frio, Miracema, Nova Iguaçu and Macaé. The utilization of pools of sera in the screening of the positive sera was very useful, as it signified an economy in time and material.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, W.G., GALLO, G.G., JENSEN, A.D. & TOBIA, M.B., 1968 - Brotes de leptospirosis bovina en la provincia de Buenos Aires. Revta. Fac. Cienc. vet. La Plata, 10:83-88.
- ALEXANDER, A.D. & EVANS, L.B., 1962 - The significance of Leptospira seiroe agglutinins in bovine serums. Amer. J. vet. Res., 23:267-273.
- ALSTON, J.M. & BROOM, J.C., 1958 - Leptospirosis in man and animals. E. & S. Livingstone, Edinburgh & London, 367 p.
- ARAGÃO, H.B., 1917 - Sobre a presença de Spirochaeta icterohaemorrhagiae nos ratos no Rio de Janeiro. Brasil Med., 31:329-330.
- AWROROW, A.A., 1941 - Einige ergebnisse der erforschung der pathologischen anatomie und pathogenese des ikterus infectiosus der rinder. Zeitsch. f. Veter., 53:32-40. Em Vet. bull., 12:338-339, 1942.
- AZEVEDO, A.G. & SANTOS, J.A., 1946 - Sobre a ocorrência de leptospirose no Rio de Janeiro. An. 3º Congr. bras. Med. vet. Porto Alegre, p. 115-163.
- BABUDIERY, B., 1971 - Comunicação pessoal.
- BABUDIERY, B. & ZARDI, O., 1959 - Alcuni fattori di crescita delle leptospire. Nuovi Ann. Ig. Microb., 10:121-128.
- BAKER, J.A. & LITTLE, R.B., 1948 - Leptospirosis in cattle. J. exp. Med 88:295-308.
- BARBOSA, M., 1962 - Aglutininas e lisinas anti-leptospira em soros de bovinos, eqüinos e suínos em Minas Gerais. Arg. Esc. Vet. Belo Horizonte, 14:1-26.



- BARNUM, D.A. & GRINYER, I., 1957 - Isolation of Leptospira pomona from a calf. Report of a case in Ontario. Can. J. comp. Med., 21:267-275.
- BELL, W.B., RICE, A.W. & CONNOR, B.V., 1953 - An outbreak of bovine leptospirosis in Virginia. Vet. Med., 48:87-88.
- BENTES, J.A., 1917 - Da leptospirose de Inada ou Icterus hemorrhagiae. Estudo clínico e experimental. Tese, Fac. Med. Rio de Janeiro, 83 p.
- BERNKOPF, H., OLITZKI, L. & STUCZYNSKI, L.A., 1947 - Studies on bovine and human leptospirosis. J. infect. Dis., 80:53-63.
- BERNKOPF, H., STUCZYNSKI, L.A., GOTLIEB, T. & HALEVY, C. H., 1948 - Serological examination of human and cattle sera from Palestine for the presence of antibodies against a bovine strain of Leptospira. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 42:259-265.
- BOHL, E.H. & FERGUSON, L.C., 1952 - Leptospirosis in domestic animals. J. Amer. vet. med. Ass., 121:421-428.
- BONINO, A.S. & PEREYRA, M.O., 1956 - Leptospirosis bovina natural y experimental. Revta. Med. vet. B. Aires, 38:163-172.
- BRYAN, H.S., 1955 - Leptospirosis in cattle and swine. Circular 750, University of Illinois.
- BYRNE, R.J. & CHAMBERS JR., C.F., 1959 - A serological survey for leptospiral antibodies in Maryland cattle. J. Amer. vet. med. Ass., 134:498-502.
- CACCHIONE, R.A., CASCELLI, E.S., MARTINEZ, E.S., 1968 - Epidemo-epizootiología y difusión de la leptospirosis en Argentina. Primeras Jornadas Argentinas de Microbiología, Buenos Aires. Em Zoonosis, 11:99.1969.
- CACCHIONE, R.A., CEDRO, V.C.F., BULGINI, M.J., BARRANTES, R. & MARTINEZ, E., 1959 - Aislamiento de una cepa de leptospira de ganado bovino. Revta. Invest. Ganad., 7:287. Cit. por Cedro & cols., 1961.
- CACCHIONE, R.A., CEDRO, V.C.F., BULGINI, M.J.D., MARTINEZ, S.E. & CASCELLI, E.S., 1961 - Leptospirosis bovina. Aislamiento y clasificación de cepas de ganado bovino en la Argentina. Revta. Invest. Ganad., 11:41-50.

- CACCHIONE, R.A., GENTILE, F.A., CASCELLI, E.S. & MARTINEZ, E.S., 1970 - Difusion de la leptospirosis en bovinos de Tierra del Fuego. Encuesta sorológica., Revta. Med. vet., B. Aires. 51:21-24.
- CAFFARENA, R.M., CACCHIONE, R.A., CASCELLI, E.S., MARTINEZ, E.S., AGORIO, M. & BARRIOLA, J., 1968 - Leptospirosis in Uruguay. Rev. Fac. Cienc. vet. La Plata, 10:247-254. Em Vet. Bull 40, Ref. 485, 1970.
- CARROL, R.E. & LE CLAIR, R.A., 1969 - Isolation of leptospiral serotype patoc from cattle in Southern California. Amer. J. vet. Res., 30:2231-2232.
- CASTAGNINO, D. & VARGAS, A., 1967 - Serologic inquiry into bovine leptospirosis in dairy cattle in the Lima region of Peru. Proc. 5th panamerican Congr. vet. med. Zootech. Caracas, 1966. 139-144. Em Ryu, ref. 3462, 1971.
- CASTAGNINO, D., 1960 - Leptospira pomona, nuevo agente causal de abortos, en el Peru. An. I. Congr. nac. med. vet. Lima, p. 77. Cit. por Liceras de Hidalgo & Hidalgo, 1970.
- CASTRO, A.F.P., SANTA ROSA, C.A. & TROISE, C., 1961 - Preás (Cavia aperea azarea lich. Rodentia-cavidae) como reservatório de leptospira em São Paulo. Isolamento de Leptospira icterohaemorrhagiae. Arqs. Inst. biol. São Paulo., 28:219-223.
- CEDRO, V.C.F., CACCHIONE, R.A., BULGINI, M.J. & MARTINEZ, E.S., 1961 - Leptospirosis en la Argentina. Difusion morbilidad y mapa nosológico. Revta. Invest. ganad., 10:317-336.
- CLARK, L.G., KRESSE, J.I., CARREY, E.A., MARSHAK, R.R. & HOLLISTER, C. J., 1961 - Leptospirosis in cattle and wildlife on a Pennsylvania farm. J. Amer. vet. Med. Ass., 139:889-891.
- CLARK, L.G., KRESSE, J.I., MARSHAK, R.R. & HOLLISTER, C.J., 1962 - Leptospira grippotyphosa infections in cattle and wildlife in Pennsylvania. J. Amer. vet. med. Ass., 141:710-712.
- CORBOULD, A., 1971 - Leptospira hardjo in Tasmania. Aust. vet. J. 47: 26. Em Vet. Bull 41, ref. 3877, 1971.



- CORDEIRO, F., 1970 - Leptospiras isoladas do camundongo Mus musculus brevirostris no Estado do Rio de Janeiro. Pesq. agropecuária. bras., 5:461-464.
- CORREA, M.O.A., AMATO NETO, V., VERONESI, R. & FABBRI, O. S., 1955 - Leptospirosis em eqüinos: Inquéritos sorológico. Revta. Inst. Adolfo Lutz., 15:186-193.
- CORREA, M.O.A., HYAKUTAKE, S., NATALE, V., GALVÃO, P.A.A. & AGUIAR, H. A., 1965/67 - Estudos sobre a Leptospira wolffi em São Paulo. Revta. Inst. Adolfo Lutz, 25/27:11-25.
- DACORSO FILHO, P., 1940 - Leptospirose canina. Hospital, Rio de Janeiro, 18:797-809.
- DACRES, W.G. & KIESEL, G.K., 1958 - Isolation of Leptospira pomona from a bovine fetus. J. Amer. vet. med. Ass., 132:525-526.
- DAVIDSON, K.R., 1971 - Leptospira hardjo infection in man associated with an outbreak in a dairy herd. Aust. vet. J., 47:408. Em Vet. Bull. 42, ref. 1233, 1972.
- DELAY, P.D., HOWORTH, J.A. & EDDIE, B., 1955 - The recovery of Leptospira pomona from two herds of cattle and observations on selected cases from thirty-eight infected herds in California. J. Amer. vet. med. Ass., 127:68-72.
- DIKKEN, H., 1967 - Encuesta sobre la incidencia de leptospirosis bovina en México. Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias S.A.G. 18-20 de diciembre. Em Zoonosis, 10:47, 1968.
- DIVISÃO DO BRASIL EM MICRO-REGIÕES HOMOGÊNEAS, 1968 (1970) - Fundação IBGE, Rio de Janeiro, 564 p.
- ECHENIQUE, L. & SOSA DE CARUSO, N., 1958 - Leptospirosis bovina. An. Fac. Vet. Montevideo, 8:67.
- EMANUEL, M.L., MACKERRAS, I.M. & SMITH, D.J.W., 1964 - The epidemiology of leptospirosis in North Queensland. I. General survey of animal hosts. J. Hyg. Camb., 62:451.

- ENCICLOPEDIA DOS MUNICÍPIOS BRASILEIROS, 1959 - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, vol. XXII, Rio de Janeiro, 470 p.
- EPSTEIN, B., 1957 - Leptospirosis bovina en Argentina y reproducción experimental. Cienc. vet. 2:617. Cit. por Cedro & cols., 1961.
- FARINA, R., 1957 - Epidemiologia delle infezioni da Leptospira nei bovini in Italia. Indagini sierologiche su 1820 animali. Vet. ital., 8: 567-590.
- FERNÁNDEZ, C.L. & ACOSTA, A.M., 1966 - Bovine leptospirosis in Peru. Revta. Cent. nac. Patol. anim. Lima, 5:36-41. Em Ryu, ref. 3260, 1971.
- FISH, N.A. & GRINYER, I., 1957 - A report on investigational studies of bovine leptospirosis in Ontario. Canad. J. comp. Med. 21:267-275.
- FREITAS, D.C., VEIGA, J.S., LACERDA JR., P.M.G. & LACERDA, J.P., 1957 - Identificação de leptospirose bovina no Brasil. Revta. Fac. Med. vet. São Paulo, 6:81-84.
- FREITAS, D.C., GOMES, C.E.S., LACERDA, J.P.C. & LIMA, F.P., 1960 - Notas sobre leptospirose eqüina. Arqs. Inst. biol. São Paulo, 27:93-96.
- FREUND, S., 1947 - Leptospirosis in cattle in Palestine. J. comp. Path., 57:62-66.
- GALTON, M.M., ACREE, J.A., LEWIS, A. & PRATHER, E.C., 1956 - Leptospirosis in domestic animals in Florida with reference to cattle. J. Amer. vet. med. Ass., 128:87-91.
- GALTON, M.M., MENGES, R.W. & SHOTTS JR., E.B., 1960 - Leptospirosis. Methods in laboratory diagnosis. U.S. Dep. Health, Education and Welfare. Public Health Service, Atlanta, 31 p.
- GILLESPIE, R.W., RINGEN, L.M. & KENZY, S.G., 1953 - Isolation of Leptospira from cattle in Washington. A preliminary report. J. Amer. vet. med. Ass., 123:322.
- GOCHENOUR JR., W.S., YAGER, R.H. & WETMORE, P.W., 1950 - Antigenic similarity of bovine strains of leptospirae (United States) and Leptospira pomona. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 74:199-202.



- GRUEBLER, R., CASTELLI, M., FUENSALIDA, G.E. & CONTRERAS, A., 1960 - Aislamiento de dos cepas de leptospiras de bovinos. Comunicacion preliminar. Revta. Soc. Med. vet. Chile, 10:11-12. Em Leptospiral Serotype Distribution Lists 1966.
- GUIDA, V.O., 1947/48 - Sobre a presença de leptospira em suínos no Brasil. Arqs. Inst. biol. São Paulo. 18:285-287.
- GUIDA, V.O., & BARROS, W.M., 1958 - Pesquisa de aglutininas e lisinas anti-leptospira em soros de bovinos aparentemente normais, sacrificados em matadouro. Biológico, São Paulo, 24:26-27.
- GUIDA, V.O., SANTA ROSA, C.A., D'APICE, M., CORREA, M.O.A. & NATALE, V., 1959 - Pesquisa de aglutininas antileptospira no soro de bovinos do Estado de São Paulo. Arqs. Inst. biol. São Paulo, 26:109-117.
- HANSON, L.E., 1960 - Bovine leptospiral. A review. J. Dairy Sci., 43: 453-463.
- HANSON, L.E., & PICKARD, J.R., 1958 - Incidence of leptospira pomona and other leptospiral species serotypes in cattle and swine in Illinois. Illinois vet., 1:41-42.
- HOARE, R.J. & CLAXTON, P.D., 1972 - Observation on Leptospira hardjo in fection in New South Wales. Aust. vet. J., 48:228-232. Em Vet. Bull. 42, ref. 6199, 1972.
- HOEDEN, J. van der, 1955a - Leptospira canicola in cattle. J. comp. Path. 65:278-283.
- HOEDEN, J. van der, 1955b - Epizootiology of leptospirosis (canicola) in the bovine and other species in Israel. J. Amer. vet. med. Ass., 126:207-210.
- HOEDEN, J. van der, 1958 - Epizootiology of leptospirosis. Advances in Veterinary Science, Academic Press, New York, 277-339.
- HOEDEN, J. van der, HALEVY, C. & DAFNI, I., 1953 - Leptospirosis in cattle in Israel. J. comp. Path., 63:93-100.
- YADA, R., IDO, Y., HOKI, R., KANEKO, R. & ITO, H., 1916 - The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spiro-

- chaetosis icterohaemorrhagica). J. exp. Med., 23:377. Cit. por Alston & Broom, 1958.
- JUNGHERR, E., 1944 - Bovine leptospirosis. J. Am. vet. med. Ass., 105: 276-281.
- KEAST, J.C., FORBES, B.R.V. & WANNAN, J.S., 1964 - Bovine leptospirosis in New South Wales including the results of a 10-year survey., Aust. vet. J. 40:19-26.
- KNOTT, S.G. & DADSWELL, L.P., 1970 - An outbreak of bovine abortions as associated with leptospirosis. Aust. Vet. J., 46:385-386.
- KORTHOFF, G., 1932 - Experimentelles schlammfieber beim Menschen. Zbl. Bakt., 125:425. Cit. por Alston & Broom, 1958.
- LACERDA JR, P.M.G., FREITAS, D.C. & LACERDA, J.P.G., 1960 - Notas sobre leptospirose bovina. Arqs. Inst. biol. São Paulo., 27:87-91.
- LEPTOSPIRAL SEROTYPE DISTRIBUTION LISTS 1966 - Communicable Disease Center, U.S. Dep. Health, Education and Welfare, Atlanta, Ga.
- LATASTE-DOROLLE, C., 1965 - Agglutinines anti-leptospire chez les bovins apparemment normaux. Bull. Off. int. Epiz., 63:891-905.
- LICERAS DE HIDALGO, J. & HIDALGO, R., 1970 - Leptospirosis em el ganado y matarifes de Tumbes, Peru. Bol. Ofic. sanit. Pan-amer., 68:297-306.
- LICERAS DE HIDALGO, J., HIDALGO, R. & AZNARÁN, G., 1971 - Leptospirosis en animales beneficiados em Chimbote, Peru. Bol. Ofic. sanit. Pan-amer., 70:429-435.
- LITTLE, R.B., BECK, J.D. & MACCAHON, J.V., 1950 - An outbreak of bovine leptospirosis in Pennsylvania. Vet. Med., 45:104.
- LUCAS, M.H., 1966 - Antibodies to leptospiral serotypes in sera of North Queensland cattle. Queensland J. Agr. Anim. Sci. 23:309-315.
- MANRIQUE, G. & SIERRA, P., 1966 - Leptospirosis. II. Aislamiento de una cepa de leptospira del grupo Canicola em bovinos. Revta. Inst. Colombiano. Agrop., 1:109-116. Em Biol. Abstr. 50, ref. 3777, 1969.
- MARIA JR., J. & QUEVEDO, C., 1947 - Somera description de una enfermedad de reciente comprobación en la Argentina: leptospirosis bovina,



- o icterohemoglobinuria infecciosa de los bovinos. Revta. Med. vet. B. Aires., 29:904-913.
- MARSH, H., 1945 - Leptospira in bovine icterohemoglobinuria. J. Amer. vet. med. Ass., 107:119-121.
- MATHEWS, F.P., 1946 - A contagious disease of cattle associated with Leptospira. Amer. J. vet. Res., 7:78-93.
- MCTACKETT, A.R., 1963 - The incidence of infectious diseases associated with abortion and service return in dairy herds of south-eastern Queensland. Aust. vet. J. 39:438-440.
- MICHIN, N.A. & AZINOV, S.A., 1935 - Spirochaetal jaundice of cattle in North Caucasus (título traduzido). Sovvet. vet., 10:23-27. Em Vet. Bull. 7:419, 1937.
- MIKHIN, N.A., AZHINOV, & SALIKOV, 1941 - Morphological and cultural characters and virulence of Leptospira icterohaemoglobinuriae vitulorum (título traduzido). Veterinariya, Moscow. 1:51-55. Em Vet. Bull. 12: 531, 1942.
- MITCHELL, D., 1959 - Bovine leptospirosis in Canada. Allied Vet., 30: 54-58.
- MITCHELL, D., & BOULANGER, P., 1959 - Leptospirosis in cattle due to Leptospira pomona. Canad. J. comp. Med. 23:250-255.
- MITCHELL, D., BOULANGER, P., SMITH, A.N. & BANNISTER, G.L., 1960 - Leptospirosis in Canada. V. Infection in cattle with a serotype of the hebdomadis group. Canad. J. comp. Med. 24:229-234.
- MOORE, T. & RICE, C.E., 1956 - Serological investigations of leptospirosis in Canada. I. Introduction and preliminary complement fixation studies of cattle sera with commercially-prepared Leptospira pomona antigen. Canad. J. comp. Med. 20:362-373.
- MURNANE, T.G., ALEXANDER, A.D., MURPHY, L.C., EVANS, L.B., & GERARDINO MEDINA, R., 1963 - The occurrence of leptospiral antibodies in cattle in Panamá. Zoonoses Res. 2:83-90.



- MURTAGH, R., 1959 - Nuevos casos de leptospirosis. Gac. vet. B. Aires., 21:259. Cit. por Cedro & cols., 1961.
- NIKOLAJEV, I.I., 1946 - Leptospirosis in the U.S.S.R., Med. Parasit. Moscow, 15:65. Cit. por Alston & Broom, 1958.
- PETERSON, J.E., 1951 - Leptospirosis of cattle and pigs in Western Australia. Aust. vet. J. 27:40-43.
- PIKE, R.M., PATON, I.M. & SCHULZE, M.L., 1961 - Agglutinating for 11 types of leptospire in serum from cattle in northeastern Texas. Amer. J. vet. Res. 22:906-911.
- PODGWAITE, G.D., TOURTELLOTE, M.E., JACOBS, R.E., HELMBOLDT, C.F., EASTERBROOKS, H.L., WILLIAMS, L.F., JUNGHER, E.L. & PLASTRIDGE, W.N., 1955 - Isolation of Leptospira pomona from three aborted bovine fetuses. Vet. Med. 50:164-165.
- RADO, R., 1959 - El método de Stoerner en la investigación serológica de la leptospirosis bovina. Tesis mimeografiada. Facultad Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima. Cit. por Liceras de Hidalgo & Hidalgo, 1970.
- REINHARD, K.R., TIERNEY, W.F., & ROBERTS, S.J. 1950 - A study of two enzootic occurrences of bovine leptospirosis. Cornell Vet. 40:148-164.
- RIEL, J. van & BIENFET, V., 1953 - Enquête sur l'existence de la leptospirose bovina en Belgique. Bull Acad. Méd. Belg. 18:472-488.
- ROBERTS, C.S., TURNER, L.W. & LIVINGSTON, J.H., 1961 - Bovine leptospirosis in Alabama-A five-year study. J. Amer. vet. med. Ass. 139:877 - 883.
- ROBERTSON, A., BOULANGER, P. & MITCHELL, D., 1964 - Isolation and identification of a leptospire of the hebdemadis serogroup (L. hardjo) from cattle in Canada. Canad. J. comp. Med. 28:13-18.
- ROTH, E.E. & GALTON, M.M., 1960 - Isolation and identification of Leptospira hardjo from cattle in Louisiana. Amer. J. vet. Res. 21: 422 - 427.



- RYU, E., 1971 - Chronological reference of leptospire and leptospirosis. Taipei. 145 p.
- SANTA ROSA, C.A., 1970 - Leptospirose em animais silvestres. Isolamento de um novo sorotipo, Brasiliensis, no sorogrupo Bataviae. Tese. Fac. Ciências. Med. Biol. Botucatu São Paulo. mimeograf. 55p.
- SANTA ROSA, C.A., 1971 - Comunicação pessoal.
- SANTA ROSA, C.A., CASTRO, A.F.P. & TROISE, C., 1961a - Isolamento de Leptospira icterohaemorrhagiae de bovino em São Paulo. Arqs. Inst. biol. São Paulo, 28: 113-118.
- SANTA ROSA, C.A., CASTRO, A.F.P. & TROISE, C., 1961b - Leptospirose bovina. Inquérito sorológico na região de Campinas. Arqs. Inst. biol. São Paulo, 28:169-174.
- SANTA ROSA, C.A., CASTRO, A.F.P. de & TROISE, C., 1962 - Isolamento de Leptospira pomona de suíno em São Paulo. Arqs. Inst. Biol., S. Paulo, 29:165-174.
- SANTA ROSA, C.A., CASTRO, A.F.P. de, SILVA, A.S. da & TERUYA, J.M., 1969/70 - Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Revta. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 29/30:19-27.
- SAVINO, E. & RENELLA, E., 1945/48 - Estudios sobre leptospiras. VIII. Leptospira en animales vacunes, equinos y lanares de la República Argentina. Rev. Inst. bact. Malbran., 13:72.
- SCHUNURRENBERGER, P.R., HANSON, L.E. & MARTIN, R.J., 1970 - Leptospirosis: Long-term surveillance on an Illinois farm. Am. J. Epidemiol. 92: 223-239.
- SEMSKOW, M.W., 1941 - Die aetiologie, Klinische formen und die epizootologie des ikterus infectiosus der rinder. Z. Veterinärk 53:7-23. Em Vet. Bull 12:338, 1942.
- SERGEANT, E., SERGEANT, E., & L'HERITIER, A., 1919 - Fièvre bilieuse hémoglobinurique du boeuf d'Algerie, maladie distincte des piroplasmoses. Bull. Soc. Pat. exot. 12:108-120.



- SIEGRIST, J.J., BURKI, F. & HESS, E., 1963 - A la recherche des etiologies de l'avortement des bovides autres que la Brucellose en Suisse. Bull. Off. int. Epiz. 60:321-340.
- SIMMONS, G.C., LAWRENCE, J.J. & FORBES, B.R.V., 1952 - The identification of Leptospira pomona isolated from calves in Queensland. Aust. Vet. J. 28:227-228.
- SIPPEL, W.L., BOYER Jr., C.I. & CHAMBERS, E.E., 1952 - Bovine leptospirosis in Georgia. J. Amer. vet. med. Ass. 120:278-282.
- SLATTER, E.E., BRASMER, T.H. & SHIDELER, R.K., 1949 - Leptospirosis in calves. N. Amer. Vet., 30:439-441.
- STOENNER, H.G., 1967 - Leptospiral abortion of beef cattle caused by Leptospira pomona and Leptospira hardjo. J. Amer. vet. med. Ass., 151:1087-1090.
- STUART, R.D., 1946 - The preparation and use of a simple culture medium for leptospirae. J. Path. Bact. 58:343
- SULLIVAN, N.D., 1972 - Further observations on Leptospira hardjo infections in pregnant cows. Aust. vet. J. 48:388-390. Em Vet. Bull. 42, 6797, 1972.
- SULLIVAN, N.D. & CALLAN, D.P., 1970 - Isolation of Leptospira hardjo from cows with mastitis. Aust. vet. J. 46:537-539.
- SULLIVAN, N.D. & STALLMAN, N.D., 1969 - The isolation of a strain of leptospira, serotype hardjo, from cattle in Queensland. Aust. Vet. J. 45:281-283.
- SULZER, C.R., SHOTTS, E.B., Jr., OLSEN, C.D., GALTON, M.M. & STEWART, M. A., 1964 - Leptospirosis due to serotype hardjo in cattle. J. Amer. vet. med. Ass. 144:888-890.
- SUTHERLAND, A.K. & MORRILL, C.C., 1948 - An outbreak of leptospirosis in cattle. J. Amer. vet. Ass. 113:468-471.
- SUTHERLAND, A.K., SIMMONS, G.C. & KENNY, G.C., 1949 - Bovine leptospirosis. Three outbreaks in calves in Queensland. Aust. vet. J. 25:197-202



- SIEGRIST, J.J., BURKI, F. & HESS, E., 1963 - A la recherche des etiologies de l'avortement des bovides autres que la Brucellose en Suisse. Bull. Off. int. Epiz. 60:321-340.
- SIMMONS, G.C., LAWRENCE, J.J. & FORBES, B.R.V., 1952 - The identification of Leptospira pomona isolated from calves in Queensland. Aust. Vet. J. 28:227-228.
- SIPPEL, W.L., BOYER Jr., C.I. & CHAMBERS, E.E., 1952 - Bovine leptospirosis in Georgia. J. Amer. vet. med. Ass. 120:278-282.
- SLATTER, E.E., BRASMER, T.H. & SHIDELER, R.K., 1949 - Leptospirosis in calves. N. Amer. Vet., 30:439-441.
- STOENNER, H.G., 1967 - Leptospiral abortion of beef cattle caused by Leptospira pomona and Leptospira hardjo. J. Amer. vet. med. Ass., 151:1087-1090.
- STUART, R.D., 1946 - The preparation and use of a simple culture medium for leptospirae. J. Path. Bact. 58:343
- SULLIVAN, N.D., 1972 - Further observations on Leptospira hardjo infections in pregnant cows. Aust. vet. J. 48:388-390. Em Vet. Bull. 42, 6797, 1972.
- SULLIVAN, N.D. & CALLAN, D.P., 1970 - Isolation of Leptospira hardjo from cows with mastitis. Aust. vet. J. 46:537-539.
- SULLIVAN, N.D. & STALLMAN, N.D., 1969 - The isolation of a strain of leptospira, serotype hardjo, from cattle in Queensland. Aust. Vet. J. 45:281-283.
- SULZER, C.R., SHOTTS, E.B., Jr., OLSEN, C.D., GALTON, M.M. & STEWART, M. A., 1964 - Leptospirosis due to serotype hardjo in cattle. J. Amer. vet. med. Ass. 144:888-890.
- SUTHERLAND, A.K. & MORRILL, C.C., 1948 - An outbreak of leptospirosis in cattle. J. Amer. vet. Ass. 113:468-471.
- SUTHERLAND, A.K., SIMMONS, G.C. & KENNY, G.C., 1949 - Bovine leptospirosis. Three outbreaks in calves in Queensland. Aust. vet. J. 25:197-202



- TERSNIK, V.I., 1940 - The etiology of infectious icterus among the cattle (título traducido). J. Microbiol. Moscow, 8:66-68. Em Bull. Hyg. 16:335, 1941. Cit. por Bohl & Ferguson, 1950.
- THOMAS, G.M., & RADFORD, M.A., 1962 - Serologic survey of Leptospira pomona infection in Wyoming cattle. J. Amer. vet. med. Ass. 140:684-686.
- TURNER, L.W., ROBERTS, C.S., WIGGINS, A.M., ALEXANDER, A. D. & MURPHY, L. C., 1958 - Leptospira canicola infection in a new born calf. Am. J. vet. Res. 19:780. Cit. por Hanson, 1960.
- U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1964 - Losses in Agriculture. A preliminary appraisal for review. A.R.S., USDA, 127. Cit. por Hanson, 1960.
- VARELA, G. & VELASCO, R., 1969 - Serological investigation in the Mexican Republic of leptospirosis in animals. (Título traducido). Revta. invest. Salud. publ., México 29: 101-103. Em Vet. Bull. 40, ref. 39, 1970.
- VILCHES CARDENAS, F., 1961 - Encuesta sobre la difusión leptospirosis bovina en hato del valle de Lima. Vet. Zootec. 13:31-32. Em Ryu, ref. 2303, 1971.
- WINKS, R., 1962 - Incidence of Leptospira pomona and Leptospira hyos titres in beef cattle in Central Queensland. Aust. vet. J., 38:185-189.
- WOLFF, J.W. & BOHLANDER, H., 1952 - Bovine leptospirosis. A survey of the epidemiology and serology and an investigation on the possible occurrence in bovines in the Netherlands. Docum. Med. geogr. trop. 4:257-265.
- WOLFF, J.W., HEIRMAN, A.L. & BOHLANDER, H.J., 1960 - A survey of the occurrence of leptospirosis in a dairy herd in the Republic of Panama. Trop. Geogr. Med. 12:82-90.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1967 - Current problems in leptospirosis research. Report of a WHO expert group. Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser. 380.