

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CONSELHO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
ESCOLA DE VETERINÁRIA

ALGUNS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *LEPTOSPIRA*  
*INTERROGANS*, NUMA FAZENDA DE MINAS GERAIS, BRASIL.

SUELI CRISTINA DE ALMEIDA RIBEIRO

BELO HORIZONTE  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1983

Sueli Cristina de Almeida Ribeiro

ALGUNS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR LEPTOSPIRA  
INTERROGANS, NUMA FAZENDA DE MINAS GERAIS. BRASIL.

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

BELO HORIZONTE  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1983

R484a Ribeiro, Sueli Cristina de Almeida  
Alguns aspectos epidemiológicos da infecção por  
*Leptospira interrogans*, numa Fazenda de Minas Ge-  
rais, Brasil. Belo Horizonte, Escola de Veteri-  
nária da UFMG, 1983.  
42p. ilustr.  
Tese, Mestre em Medicina Veterinária

1. Epidemiologia. 2. Leptospirose - Bovinos.  
3. *Leptospira interrogans*. I. Título.

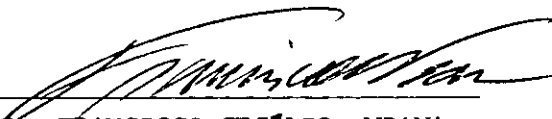
CDD - 636.208 969 2

TESE APROVADA EM: 17/02/83

BANCA EXAMINADORA:



Prof. ELVIO CARLOS MOREIRA



Prof. FRANCISCO CECÍLIO VIANA



Prof. JOSÉ ATILTON DA SILVA

Aos meus pais

Ao meu marido

Aos meus filhos

Alessandra, Ana Maria e Breno

Pelo sacrifício, estímulo e amor.

---

*AGRADECIMENTOS*

Ao professor HUMBERTO EUSTÁQUIO COELHO, pela colaboração e estímulo que tornaram possível a redação deste e pela preciosa elaboração dos gráficos.

À professora MARIA IGNEZ DE ASSIS MOURA, que gentilmente, orientou a Análise Estatística.

Ao professor ÉLVIO CARLOS MOREIRA, que como orientador foi um grande amigo.

A autora, na impossibilidade de citar tantos nomes, agradece, de coração, a todos aqueles que colaboraram na realização deste trabalho.

À Fundação de Estudos e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva (FEP-MVP), ao Programa de Saúde Animal do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro recebido.

## RESUMO

Foi analisada a infecção por *Leptospira* em 657 bovinos machos e fêmeas de várias faixas etárias, 30 vacas pós-aborto e 20 cavalos da Fazenda Experimental da EPAMIG em Governador Valadares, Estado de Minas Gerais; os soros sanguíneos dos animais foram examinados para 14 sorotipos de *Leptospira*, através da Microaglutinação rápida (MAR).

Dos 657 bovinos de várias faixas etárias, 350 (53,3%) reagiram a um ou mais sorotipos, predominando *hardjo* (31,1%).

Das 30 vacas pós-aborto, 26 (86,6%) reagiram a um ou mais sorotipos, predominando o sorotipo *hardjo* com incidência média de 84,7%.

Dos 20 eqüinos, 18 (90%) reagiram a um ou mais sorotipos, predominando *canicola* (65%), *castelloni* (60%) *bratislava* (55%) e *pyrogenes* (50%).

Através da Microaglutinação rápida (MAR), cultivo em meio de Fletcher e imunofluorescência direta (IFD) foi pesquisada a infecção por *Leptospira* em 87 roedores peridomiciliares e silvestres da mesma propriedade.

O número de reações positivas e a frequência dos sorotipos encontrados a MAR não foram significativas, estatisticamente comparadas à sorologia dos bovinos e eqüinos e analisadas pela prova NÃO PARAMÉTRICA DO "Q" de Cochran.

De 87 rins triturados e suspensos em meio de Fletcher, não foi possível isolar *Leptospira*; não foi observada *Leptospira* em 87 cortes renais corados para IFD com conjugado *L. pomona*.



## SUMÁRIO

	Página
1. <i>INTRODUÇÃO</i> .....	1
2. <i>LITERATURA CONSULTADA</i> .....	3
3. <i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	10
4. <i>RESULTADOS</i> .....	19
5. <i>DISCUSSÃO</i> .....	29
6. <i>CONCLUSÕES</i> .....	32
7. <i>SUMMARY</i> .....	33
8. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

As leptospiroses são, no momento, uma das enfermidades mais difundidas e multiformes que afetam o homem e animais, causadas por grande número de sorogrupos, com mais de 150 sorotipos e amostras da bactéria *Leptospira* da espécie *interrogans*; ocorre em todo o mundo.

Várias espécies de animais domésticos são infectadas por diferentes sorotipos de *Leptospira*. A presença de aglutininas anti- *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. australis*, *L. sejroe* e principalmente *L. pomona* no soro de eqüinos tem sido citada por BARBOSA (1962).

Bovinos de várias partes do mundo, como também do Brasil, têm sido alvo das pesquisas sorológicas, que comprovam a ampla distribuição dos sorotipos de *Leptospira* na espécie. A leptospirose bovina acarreta perdas por abortos, natimortos, bezeros fracos, retenção de placenta, endometrite, queda na fertilidade e mamite. Os sorotipos mais incriminados como causa destas alterações têm sido a *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. wolffii*, *L. sejroe*, *L. hebdomadis* e *L.*

*icterohaemorrhagiae* SUMMERS *et alii* (1974).

Uma característica importante nas leptospiroses é que homens e animais infectados tornam-se portadores da *Leptospira* a nível renal. É eliminada pela urina, durante períodos que variam de meses a anos, com possibilidade de se estender por toda a vida, como é o caso de roedores peridomiciliares e silvestres assintomáticos CORREA & MEARIN (1971).

A leptospira, encontrando no meio ambiente fatores climáticos, favoráveis à sua sobrevivência, como estação do ano, chuva, temperatura e umidade relativa do ar, pode infectar e prevalecer e se manter nos bovinos ALEXANDER (1973).

A interrelação da presença de *Leptospira* nos roedores e sua transmissão aos bovinos próximos foi citada por SCHNURRENBERGER *et alii* (1970).

A essência das infecções por leptospirosas consiste portanto na excreção dos microrganismos na urina de animais infectados; da sobrevivência destes microrganismos em locais úmidos e de sua difusão a outros animais.

No presente trabalho, propôs-se analisar um foco de infecção por *Leptospira* em Minas Gerais, durante o período de 1977 e 1978, em uma Estação Experimental da Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG), no município de Governador Valadares, pretendendo-se como objetivos:

- Determinar os sorotipos prevalentes de *Leptospira interrogans* em animais domésticos e silvestres.
- Identificar roedores como fonte de infecção.
- Isolar em roedores silvestres e peridomiciliares, os sorotipos patogênicos.
- Demonstrar as *Leptospirosas* em tecido renal de roedores.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 - Prevalência dos Sorotipos de *Leptospira* em bovinos e eqüinos.

LACERDA *et alii* (1960), no Brasil, examinando soros de 495 vacas adultas, com o emprego de cultura de *L. pomona* como antígeno, encontraram, de 332 animais provenientes de rebanhos, com histórico de aborto e retenção de placenta, 95 positivos a *L. pomona*, concluindo que este sorotipo é importante no nosso meio.

SANTA ROSA *et alii* (1961), trabalhando com 279 amostras de soros bovinos provenientes de 14 propriedades, da Região de Campinas, SP, algumas, até com histórico de aborto em seus rebanhos, encontraram 79 reações positivas, com 35 para *L. icterohaemorrhagiae*; 29 para *L. grippotyphosa*; 06 para *L. pomona* e 01 para *L. canicola*.

BARBOSA (1962), analisando soros de 120 bovinos e 112 eqüinos provenientes de vários municípios do Estado de Minas Gerais, encontrou uma incidência média de reações positivas a *Leptospira* em 27,7% dos eqüinos e 18,3% dos bovi

nos. Em maior escala, os soros de ambas as espécies reagiram para *L. pomona* e *L. icterohaemorrhagiae*. Em ordem decrescente, encontrou ainda *L. sejroe*, para bovinos e *L. grippotyphosa*, para eqüinos. A *L. canicola*, entre os sorotipos usados, foi a que apresentou resultados mais baixos.

SULZER *et alii* (1964), testando bovinos de oito estados americanos, encontraram ampla distribuição do sorotipo *hardjo*.

SILVA *et alii* (1972), analisando 810 amostras de soro de eqüinos sadios, do Estado de São Paulo, pela sorologiação rápida, encontraram 9,6% de positivos e maior incidência dos sorotipos *canicola*, *pomona* e *wolffi*.

WILLIAMS *et alii* (1975) examinaram clínica e sorologicamente 63 bovinos de uma propriedade do Rio Grande do Sul, onde 22 abortos ocorreram em nove semanas. Os soros de 17 animais, que abortaram, reagiram positivamente para *L. sejroe*, com reações cruzadas para *L. wolffi*, *L. hardjo* e *L. pomona*.

MYERS & JALAMBI (1975), avaliando sorologicamente a prevalência da leptospirose bovina, na Argentina, encontraram aglutininas leptospirais com mais frequências para o sorogrupo *Hebdomadis*, dentro do qual 45,8% reagiram para o sorotipo *hardjo*.

ARUNASALAM (1975), na Malásia, submetendo 163 soros bovinos ao exame de aglutinação microscópica, encontrou 50 soros reagentes (30,67%). Os sorotipos mais frequentemente encontrados foram *L. pomona*, *L. hebdomadis* e *L. hyos*.

JELAMBI *et alii* (1976) verificaram, na Venezuela, de 1968 a 1974, a predominância dos sorotipos *hardjo*, *wolffi*, *sejroe*, *hebdomadis* e *ballum*, em bovinos e *pyrogenes*, *ballum*, *pomona* e *canicola*, em eqüinos.

LÉON VÍZCAÍNO & MIRANDA GARCIA (1976), examinando 560 soros bovinos de 95 rebanhos, na Espanha, verificaram que 46,5% dos bovinos e 70,5% dos rebanhos foram positivos para leptospirose. A reação mais comum foi para os sorotipos

de *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona*. Uma frequência relativa de reações ocorreu para *L. sejrøe*. Mais, raramente, encontraram reações para *L. ballum* e *L. grippotyphosa*. Investigando ainda 5 surtos de abortos em vacas, diagnosticaram *L. pomona* como causadora de 3, *L. sejrøe* causadora de um e *L. icterohaemorrhagiae* a causadora do último.

TAWFIC (1977), no Egito, testando 394 amostras de soros bovinos para os sorotipos *pomona* e *hardjo*, encontrou 3,5% de reação a *L. hardjo* e todas as amostras negativas à *L. pomona*.

ZAMORA & RIEDEMANN (1978), examinando abortos em vacas no Sul do Chile, encontraram o envolvimento de *L. hardjo* e *L. pomona*.

HUSSAIN *et alii* (1978), reagindo 286 amostras de soros bovinos do Alabama, pela técnica de microaglutinação, contra 12 sorotipos de *Leptospira*, encontraram 47% de reação a *L. hardjo*; 34% a *L. wolffii*; 12% a *L. canicola*; 10% a *L. pomona* e 10% a *L. ballum*. Os sorotipos *autumnalis*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *pyrogenes* e *tarassovi* reagiram em menos de 5% das amostras.

ELDER & WARD (1978), estudando a prevalência e distribuição de títulos leptospirais em bovinos, na Austrália, relataram maior presença de sorotipo *hardjo* em relação ao sorotipo *pomona*.

LÉON VÍZCAÍNO *et alii* (1978), examinando 2850 amostras de soro de várias espécies animais, na Espanha, revelaram dados de 32% de anticorpos leptospirais, em bovinos e 64%, em cavalos. As reações mais frequentes foram aos sorotipos *icterohaemorrhagiae*, *pomona* e *sejrøe*, seguida, em importância decrescente, para *grippotyphosa* e *ballum*.

TOLARI *et alii* (1979), testando 649 amostras de soros de bovinos abatidos, na Itália, encontraram 21% positivas para *L. hardjo*, 10% positivas para *L. grippotyphosa* e 8% positivas para *L. hyos*.

GORDON (1979), estudando bovinos sadios na Austrália

lia, revelou que títulos à *L. hardjo* ocorreram com grande frequência e são difundidos entre a população bovina.

DAMUDE *et alii* (1979), testando, pela microaglutinação para leptospirose, durante 1971 e 1972, soros de equinos, em Barbados, encontraram 64% de reações, com predominância do sorogrupo *Pyrogenes*.

MOREIRA *et alii* (1979), em Minas Gerais, testando 6.429 amostras de soro bovino, divididas em dois grupos (I e II), para seis sorotipos de *Leptospira*, encontraram no grupo I (3727 amostras) 16,29% de reações à *L. pomona*; 12,10% à *L. wolffii*; 11% à *L. hardjo*; 5,85% para *L. grippotyphosa*, 5,15% para *L. icterohaemorrhagiae* e 2,20% à *L. canicola*. Já no grupo II (2702 amostras) 27,83% de reações à *L. wolffii*, 24,12% à *L. hardjo*; 11,55% à *L. pomona*; 4,48% à *L. icterohaemorrhagiae*; 3,61% à *L. canicola* e 2,20% à *L. grippotyphosa*.

ELLIS (1980), estudando bovinos na Irlanda do Norte, revelou ser a infecção pela *L. hardjo* o maior fator na etiologia do aborto bovino.

HIGGINS *et alii* (1980) isolaram *Leptospira* do sorotipo *hardjo* de leite e urina de vacas leiteiras afetadas por mamite e aborto, num grande rebanho bovino americano.

MILNER *et alii* (1980), estudando 1355 amostras de soro bovino, na Austrália, verificaram a prevalência do sorotipo *hardjo* (86,3%); seguida de *tarassovi* (7,8%), *ballum* (3,7%); *pomona* (2,4%); *autumnalis* (1,8%) e *bataviae* (1,2%).

MADRUGA *et alii* (1980), analisando 670 amostras de soro sanguíneo de bovinos de nove municípios do Estado de Mato Grosso, pela microaglutinação rápida, encontraram 74,3% de aglutinas anti-leptospiras. Os sorotipos mais encontrados foram *L. hardjo* (41%), *L. sejroe* (40%) e *L. wolffii* (30%).

FERGUSON & HANNA (1981), trabalhando com fetos bovinos abortados, nos U.S.A., diagnosticaram leptospirose, isolando *Leptospira* do rim e olhos fetais. Realizando estudos sorológicos e de imunofluorescência, verificaram que 56,

das 58 amostras de *Leptospira* isoladas dos fetos, pertenciam ao sorogrupo *Hebdomadis*, eram idênticas antígenicamente a *L. hardjo* e uma amostra (AB56) foi tipificada especificamente como sorotipo *hardjo*.

2.2 - Prevalência dos sorotipos de *Leptospira* em roedores e intertransmissibilidade entre roedores e bovinos.

BARBOSA & HIPÓLITO (1952) examinando 61 ratos da espécie *Rattus norvegicus*, em Belo Horizonte, através de exames de triturados de rim em microscópio de campo escuro, encontraram 27 (44,3%) positivos para *L. icterohaemorrhagiae*.

PESTANA DE CASTRO *et alii* (1961) encontraram 26 (50,09%) preãs reagentes à microaglutinação rápida, em 51 preãs capturadas no Estado de São Paulo.

GORDON *et alii* (1961), num estudo epodemiológico em ratos na Malásia, concluíram que, embora espécies diferentes possam viver lado a lado, o contato real pode ser menor que o necessário para passar leptospiros.

CLARCK *et alii* (1962), analisando 3 rebanhos bovinos da Pensylvannia, encontraram reações sorológicas a *L. grippotyphosa* e relacionaram o achado com o isolamento deste sorotipo em 7 roedores silvestres (*Microtus pensylvanicus*).

DOHERTY (1967), analisando experimentalmente a infecção e difusão de *L. pomona* num rebanho bovino da Austrália, verificou que a incidência da infecção esteve em função do número de bovinos susceptíveis, nível de contaminação ambiente a quantidade e distribuição das chuvas. Não houve relacionamento com roedores, desde que a infecção não foi detectada em 62 roedores, presos em gaiolas, na área geográfica do experimento.

CORDEIRO (1970), examinando 116 camundongos do Estado do Rio de Janeiro, isolou *L. pomona* de 46 (39,6%).

TWIGG & McDIARMID (1972), encaminhando soros bovi-



nos leiteiros para leptospirose, na Inglaterra, encontraram 12,3% de animais reagentes, relacionando este índice com fatores ambientes, como, presença de roedores (*Rattus norvegicus* e *Mus Musculus*) com altos índices de infecção (64,8%).

PINHEIRO *et alii* (1974) encontraram, em 222 soros de marsupiais e roedores capturados em vários lugares da Rodovia Transamazônica, 15 (6,7%) soros com aglutininas anti-leptospira para *L. grippotyphosa*, *L. wolffii*, *L. bataviae* e *L. butembo*.

SANTA ROSA *et alii* (1975), observando a ocorrência de Leptospirose em roedores do Estado de São Paulo, isolou sorotipos *ballum*, *szwajizak*, *icterohaemorrhagiae* e *grippotyphosa* de muitas espécies animais silvestres.

LÉON VIZCAÍNO *et alii* (1977) estudando cinco surtos de leptospirose com hamoglobinúria e aborto em bovinos, na Espanha, encontraram *L. pomona* em três fazendas. *L. ballum* foi isolada de um bezerro com nefrite, em outra fazenda e neste caso sugeriram que esta leptospira foi mantida numa grande variedade de roedores desta fazenda ou das proximidades.

TAWIFIC *et alii* (1977), testando, sorologicamente, 220 ratos e camundongos, no Egito, contra 10 sorotipos de *Leptospira*, encontraram títulos de 1:200 em 13% das amostras. Os sorotipos que mais predominaram foram *L. hardjo* (50%); *L. javanica* (21%); *L. sejroe* (14%) e *L. ballum* (15%).

ARORA & BAXI (1978/9) detectaram anticorpos leptospirais para *L. bataviae* em uma de 30 cobaias e para *L. icterohaemorrhagiae* em 2 de 15 ratos gigantes, na Índia.

NEDUNCHELLIYANS *et alii* (1979), na Índia, testando amostras de soros de 32 ratos gigantes da Índia (marsupiais) e 31 ratos comuns para onze sorotipos de *Leptospira*, encontraram 6 (19,3%) ratos comuns positivos para *L. icterohaemorrhagiae*, *L. semaranga* e *L. andamana* e 14 (43,7%) dos ratos gigantes (marsupiais) positivos para *L. hebdomadis*, *L. pyrogenes*, *L. grippotyphosa*, *L. bataviae*, *L.*

*icterohaemorrhagiae*, *L. tarassovi*, *L. semaranga*, *L. canicola* e *L. autumnalis*.

CARTER & CORDES (1980), estudando 160 ratos (112 da área urbana e 48 da área rural) na Nova Zelândia, encontraram 38,4% de ratos urbanos infectados com *Leptospira*, comparados com 41,7% dos ratos rurais. No total, 63 ratos (39,4%) tinham infecção leptospírica recente e 33% excretaram *Leptospira* na urina; isolaram *L. copenhageni* de 36 ratos e *L. ballum* de 15.

HATHAWAY & BLACLMORE (1981), trabalhando com *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*, na Nova Zelândia, isolaram *Leptospira* do sorogrupo *ballum* em 21 dos 61 *Rattus rattus* (34%) e em 63 dos 243 *Rattus norvegicus* (26%).

LICERAS HIDALGO (1981), investigando a epidemiologia da leptospirose em animais selvagens no Peru, encontraram em 15 roedores (*Philander opossum*) 9 (60%) sorologicamente positivos e de 11 (73,3%) isolaram leptospira do sorogrupo *Hebdomadis*, *Cynopteri*, *Tarassovi* e *Pomona*.

### 2.3 - Demonstração de *Leptospira* pela Imunofluorescência Direta.

WHITE & RISTIC (1959), através da IFD, demonstraram *L. pomona* nos rins de cobaio e na urina de bovinos, ambos infectados, experimentalmente. A inespecificidade do método foi demonstrada pelo fato de sorotipos heterólogos ao conjugado terem apresentado fluorescência.

COFFIN & MAESTRONE (1962) observaram que os conjugados *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. canicola* coram esfregaços de sorotipos heterólogos, não apresentando grandes diferenças, quando comparados aos sorotipos homólogos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Local e Características do Rebanho

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), de área de 1936 hectares e localizada no município de Governador Valadares, Região Vale do Mucuri em Minas Gerais. O Município se localiza a 310 km de Belo Horizonte, MG, tem uma altitude média de 167 m acima do nível do mar e coordenadas geográficas de 180° 51' de latitude sul e 41° 55' de longitude Oeste.

A fazenda, de topografia acidentada com elevações abruptas e pronunciadas intercaladas com áreas de várzea, apresentava dados climáticos como os da região: período quente e chuvoso de outubro a abril e período seco de temperatura amena de maio a setembro, embora pudesse haver variações acentuadas durante o ano. A temperatura média anual observada, durante o período de 1960 a 1980, foi de 24°C segundo Instituto Regional de Meteorologia de Belo Horizonte - Ministério da Agricultura.

O rebanho bovino da fazenda era constituído de gado de corte Nelore (PC e PO) e mestiços (Nelore x Indubrasil); além desta espécie havia, apenas eqüinos e muares. A estação de monta era de outubro a janeiro e o sistema de criação era extensivo com bezerros criados ao "pê da vaca" e desmamados em torno de 8 meses de idade.

### 3.2 - Descrição do surto

No final do ano de 1977, começaram a ocorrer abortos e mamites em vacas (18 abortos) e mortes em bezerros com sintomas de icterícia, febre e urina avermelhada. Embora existisse suspeita clínica de Leptospirose, os animais foram submetidos a exames de brucelose pelo método da soroaglutinação em placa, vibriose pela mucoaglutinação lenta e trichomonose pela pesquisa do protozoário apresentando em todos, resultados negativos.

Em 1978, continuavam as mortes de bezerros com os mesmos sintomas citados anteriormente e encontramos 12 vacas que abortaram até o mês de maio, daquele ano.

### 3.3 - Animais

#### 3.3.1 - Bovinos

Foram coletadas amostras de sangue de 657 bovinos (animais jovens, fêmeas e machos adultos - GRUPO I) que representavam a população total exposta ao surto, já que o restante do rebanho bovino se encontrava, totalmente isolado em piquetes especiais para experimentos na área de Nutrição Animal. Coletaram-se, também, amostras de sangue das 18 vacas que abortaram no ano de 1977 (GRUPO II) e das 12 vacas que abortaram no ano de 1978 (GRUPO III).

### 3.3.2 - *Equinos*

Foram coletadas amostras de sangue dos 20 cavalos que estavam em contato com os bovinos (GRUPO IV).

### 3.3.3 - *Roedores*

Foram capturados, através de gaiolas tipo túnel com alçapão, estrategicamente colocadas em vários pontos da fazenda (ao longo dos córregos, próximas às lagoas e próximas ao paiol) usando-se como iscas banana e milho, 87 roedores silvestres e peri-domiciliares (GRUPO V), dos quais foram retiradas 174 amostras de rins (duas de cada roedor) e 87 amostras de sangue (Quadro I).

## 3.4 - *Prova Sorológica*

### 3.4.1 - *Preparo do Antígeno*

As culturas de *Leptospira* foram gentilmente cedidas pelo Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO) - República Argentina, cujos sorotipos e amostras estão relacionadas no Quadro II.

As culturas recebidas no meio semi-sólido de FLETCHER (1928) foram, "a posteriori", repicadas no meio líquido de STUART (1946), acrescentado de 10% de soro de coelhos, clinicamente saudáveis.

Os antígenos eram representados pelas culturas vivas dos sorotipos de *Leptospira* (Quadro II) em meio de Stuart, com 5-7 dias de idade, obtendo-se assim, aproximadamente, 100 microorganismos vivos, por campo microscópico de 400 x de aumento, sem autoaglutinação, sem contaminação e com mobilidade.

### 3.4.2 - Sorologia

Para pesquisar aglutininas anti-leptospira, utilizou-se o Método de Micriaglutinação rápida (MAR) descrito por RYU (1970).

As amostras de sangue foram dessoradas e o soro diluído em solução de Sorensen (pH 7,6) na diluição 1/50 e adicionado ao antígeno meio a meio, alcançando a diluição final de triagem 1/100. (De cada diluição do soro 1/50 tomou-se uma gota  $\pm$  0,05 ml que foi colocada em placa de porcelana escavada e adicionou-se igual volume de antígeno, numa mesma escavação).

Agitou-se a placa e deixou-se em repouso por 5-8 minutos, em temperatura ambiente.

Uma gota da mistura, tomada com alça de platina, foi colocada sobre uma lâmina de vidro para microscopia (7,5 x 2,5 cm) e examinada em microscópio com condensador de campo escuro a seco, usando-se oculares de 10 x e objetiva de 16 x.

### 3.5 - Leitura e Interpretação

O critério de leitura das reações de MAR utilizado foi o descrito por GALTON *et alii* (1962):

- o grau de aglutinação e lise é dado em cruces, variando de negativo até 4 cruces;
- reação 4 cruces ( $4^+$ ) quando de 75 a 100% das leptospiras estão aglutinadas;
- reação 3 cruces ( $3^+$ ) quando, aproximadamente, 75% dos microorganismos estão aglutinados;
- reação 2 cruces ( $2^+$ ) quando, aproximadamente, 50% dos microorganismos estão aglutinados;
- reação 1 cruz ( $1^+$ ) quando ocorre, aproximadamente, 25% de aglutinação;
- os soros são considerados positivos à *Leptospira*

quando ocorre, um mínimo de 50% de aglutinação, ou seja, a partir da reação 2 cruces ( $2^+$ ).

### 3.6 - Isolamento de *Leptospira*

Para isolamento, trabalhou-se com 87 rins de roedores, colhidos assepticamente, em placas de Petri, previamente esterelizadas.

Cada rim, após retirada da cápsula de Bawman, foi triturado em gral estéril. O triturado era suspenso em 10 ml de salina tamponada pH 7,6 e uma gota deste material foi semeada em meio semi-sólido de FLETCHER (1928), usando-se quatro tubos.

Foram feitas leituras macro e microscópicas, na primeira, segunda, terceira e quarta semanas após inoculação. As culturas negativas, após a quarta semana, eram descartadas.

### 3.7 - Imunofluorescência Direta (IFD)

#### 3.7.1 - Preparo dos Cortes dos Rins

O estudo da IFD foi feito nos outros 87 rins dos roedores capturados. Através do Micrótomo de Congelação, foram feitos cortes histológicos transversais dos rins, de 4  $\mu$  de espessura, abrangendo fragmentos da camada cortical e medular renal. Foram feitos dois cortes por lâmina, que, secados à temperatura ambiente, foram fixados com acetona P.A. por 30 minutos, no congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), conforme HODGES & EKDAHL (1973).

Após este tempo, a acetona era escorrida e, estando a lâmina seca, os cortes histológicos eram delimitados com esmalte branco, não cintilante.

### 3.7.2 - Preparo da Reação

O conjugado anti-pomona, cujo corante era o isotiocianato de fluoresceína, foi diluído a 1:8 em solução salina tamponada pH 7,2. Cobria-se todo o corte histológico, delimitado por esmalte branco, com o conjugado diluído.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 37°C, por 30 minutos e posteriormente, lavadas, rapidamente, em salina tamponada pH 7,2, colocadas em uma outra solução salina tamponada pH 7,2, por 10 minutos (lavagem por imersão) e enxaguadas, rapidamente, em água destilada. Após estarem totalmente secas, à temperatura ambiente, foram então montadas com lamínula e glicerina tamponada pH 7,2. Foram, também, preparadas lâminas controles positivo e negativo do método, conforme técnica de MOULTON & HOWARTH (1957).

### 3.7.3 - Leitura da Reação

Considerava-se como reação positiva o aparecimento de leptospiras fluorescentes isoladas ou agrupadas, nos campos microscópicos.

Utilizou-se microscópio binocular, condensador de campo escuro, a óleo, objetiva de imersão 40 x, oculares de 10 x, filtro de excitação G2 e de barreira 0/41. Como fonte de iluminação foi usada uma lâmpada ultravioleta HBO - 200 (Osram).

### 3.8 - Análise Estatística

Para verificar se a incidência dos diferentes sorotipos diferia significativamente, dentro de uma espécie animal, aplicou-se aos resultados a prova NÃO PARAMÉTRICA DO "Q de Cochran", segundo SPIEGEL (1975), que se adapta aos casos em que os dados se apresentam em escala nominal, em mais de duas situações.



A Hipótese Nula estabelecida foi a seguinte: "Não há diferenças significativas entre as frequências dos diversos sorotipos, nas várias espécies analisadas".

A Hipótese Alternativa foi: "Há diferenças significativas entre as frequências dos diversos sorotipos, nas várias espécies analisadas".

O nível de significância escolhido foi de 1%.

## QUADRO I

*Classificação\* dos roedores capturados na Fazenda Experimental da EPAMIG em Governador Valadares - MG - 1977.*

NOME CIENTÍFICO	NÚMERO DE ANIMAIS
<i>Nectomys squamipes</i>	28
<i>Akodon arviculoides</i>	23
<i>Zygodontomys laziurus</i>	20
<i>Rattus rattus</i>	7
<i>Oryzomys subflavus</i>	6
<i>Cavia sp</i>	3
TOTAL	87

\*Segundo professor Célio Valle, do Departamento de Zoologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

## QUADRO II

*Sorotipos de Leptospira usados como antígenos, no teste de Microaglutinação Rápida (MAR) fornecidos pelo Centro Panamericano de Zoonoses.*

SOROGRUPO	SOROTIPO	AMOSTRAS
AUTUMNALIS	<i>autumnalis</i>	Aklyomi A
BATAVIAE	<i>bataviae</i>	Van Tienen
AUSTRALIS	<i>bratislava</i>	Jez bratislava
CYNOPTERI	<i>butembo</i>	Butembo
CANÍCOLA	<i>canicola</i>	Hond Utrecht VI
BALLUM	<i>castelloni</i>	Castellon 3
GRIPPOTYPHOSA	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
HEBDOMADIS	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitno
	<i>sejroe</i>	M 84
	<i>wolffi</i>	3705
ICTERHAEMORRHAGIAE	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
POMONA	<i>pomona</i>	pomona
TARASSOVI	<i>tarassovi</i>	perepelicin
PYROGENES	<i>pyrogenes</i>	salinem

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1 - Isolamento de *Leptospira*

Não foi observado crescimento de *Leptospira* em nenhum dos triturados dos 87 rins de roedores, semeados em meio de Fletcher.

##### 4.2 - Imunofluorescência Direta

Nenhuma das 87 amostras de rins de roedores apresentou *Leptospira* fluorescente.

##### 4.3 - Sorologia

###### 4.3.1 - Resultados Estatísticos

Os valores de "Q" encontrados, quando da aplicação da prova aos cinco grupos de animais, constam do Quadro III. Como pode ser visto, neste Quadro, houve aceitação da Hipótese Nula apenas com relação ao Grupo V. Para os ou

tros quatro grupos, não houve aceitação da Hipótese Nula, indicando que houve diferenças significativas entre as frequências dos diversos sorotipos.

#### 4.3.2 - Incidência dos Sorotipos nas diversas espécies animais.

##### 4.3.2.1 - Roedores

Observou-se que o número de reações positivas e a frequência entre os sorotipos não foi significativa (Quadro III e TABELA 1).

##### 4.3.2.2 - Bovinos

Pode-se observar, na TABELA 1, que, dos 657 soros bovinos examinados, 350 (53,3%) apresentaram reações a um ou mais sorotipos. Ocorreram reações para todos os sorotipos, predominando *hardjo* (31,7%). As menores taxas de incidência foram para *L. pomona* (0,8%) e *tarassovi* (0,5%).

Das 18 vacas que abortaram, em 1977, o exame sorológico revelou que 15 (83,3%) reagiram a um ou mais sorotipos de leptospira e o sorotipo predominante foi *hardjo* (77,8%) - TABELA 2.

Examinando-se o soro das 12 vacas que abortaram, em 1978, verificou-se que 11 (91,7%), reagiram a mais de um sorotipo, com a predominância também do sorotipo *hardjo* (91,7%), seguido por *bataviae* (83,3%). Apenas um animal não reagiu a nenhum sorotipo.

Os sorotipos *butembo*, *castelloni* e *grippotyphosa* não foram detectados sorologicamente nos dois grupos de vacas que abortaram. O sorotipo *icterohaemorrhagiae*, também não foi detectado sorologicamente no grupo de vacas que abortaram em 1978 (TABELA 2).

4.3.2.3 - *Eqüinos*

Observou-se, ainda, que dos 20 soros eqüinos testados, 18 (90,0%) reagiram a um ou mais sorotipos, predominando os sorotipos *canicola* (65,0%), *castelloni* (60,0%) e *bratislava* (55,0%) e *pyrogenes* (50,0%). Incidência nula ocorreu para os sorotipos *butembo*, *tarassovi* e *icterohaemorrhagiae*.

Os percentuais de incidência de cada sorotipo ao teste de MAR para leptospirose, dos soros dos roedores, bovinos e equinos estão registrados nas TABELAS 1 e 2 e nos Gráficos 1, 2, 3 e 4.

## QUADRO III

*Valores de "Q" nos 5 grupos animais*

GRUPOS	Q	gl	$\chi^2$	HIPÓTESE NULA
I	963,21	13	27,69	Não aceita
II	69,67	13	27,69	Não aceita
III	83,84	13	27,69	Não aceita
IV	74,68	13	27,69	Não aceita
V	19,87	13	27,69	ACEITA

TABELA 1 - Porcentagem dos animais reagentes ao teste de MAR para *Leptospira* em 657 bovinos, 20 eqüinos e 87 roedores da Fazenda Experimental da EPAMIG, Governador Valadares, MG, 1978.

SOROTIPOS	BOVINOS		EQUINOS		ROEDORES	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>autumnalis</i>	27	4,1	8	40,0	1	1,1
<i>bataviae</i>	119	18,1	7	35,0	-	-
<i>bratislava</i>	46	7,0	11	55,0	-	-
<i>butembo</i>	14	2,1	-	-	-	-
<i>canicola</i>	61	9,3	13	65,0	-	-
<i>castelloni</i>	20	3,0	12	60,0	-	-
<i>grippotyphosa</i>	18	2,7	3	15,0	-	-
<i>hardjo</i>	204	31,1	4	20,0	-	-
<i>icterohaemorrhagiae</i>	29	4,4	-	-	2	2,3
<i>pomona</i>	05	0,8	4	20,0	2	2,3
<i>pyrogenes</i>	30	4,6	10	50,0	-	-
<i>sejroe</i>	15	2,3	5	25,0	2	2,3
<i>tarassovi</i>	03	0,5	-	-	-	-
<i>wolffii</i>	101	15,4	2	10,0	-	-



TABELA 2 - Porcentagem dos animais reagentes ao teste de MAR para *Leptospira* em 18 vacas que abortaram em 1977 e 12 vacas que abortaram em 1978, da Fazenda Experimental da EPAMIG, Governador Valadares, MG.

SOROTIPOS	VACAS QUE ABORTARAM EM 1977		VACAS QUE ABORTARAM EM 1978	
	Nº	%	Nº	%
<i>autumnalis</i>	3	16,7	1	8,3
<i>bataviae</i>	5	27,8	10	83,3
<i>bratislava</i>	1	5,6	2	16,7
<i>butembo</i>	-	-	-	-
<i>canicola</i>	2	11,1	1	8,3
<i>castelloni</i>	-	-	-	-
<i>grippotuphosa</i>	-	-	-	-
<i>hardjo</i>	14	77,8	11	91,7
<i>icterohaemorrhagiae</i>	2	11,1	-	-
<i>pomona</i>	4	22,2	1	8,3
<i>pyrogenes</i>	2	11,1	2	16,7
<i>sejroe</i>	1	5,6	1	8,3
<i>tarassovi</i>	4	22,2	2	16,7
<i>wolffi</i>	3	16,7	5	41,7

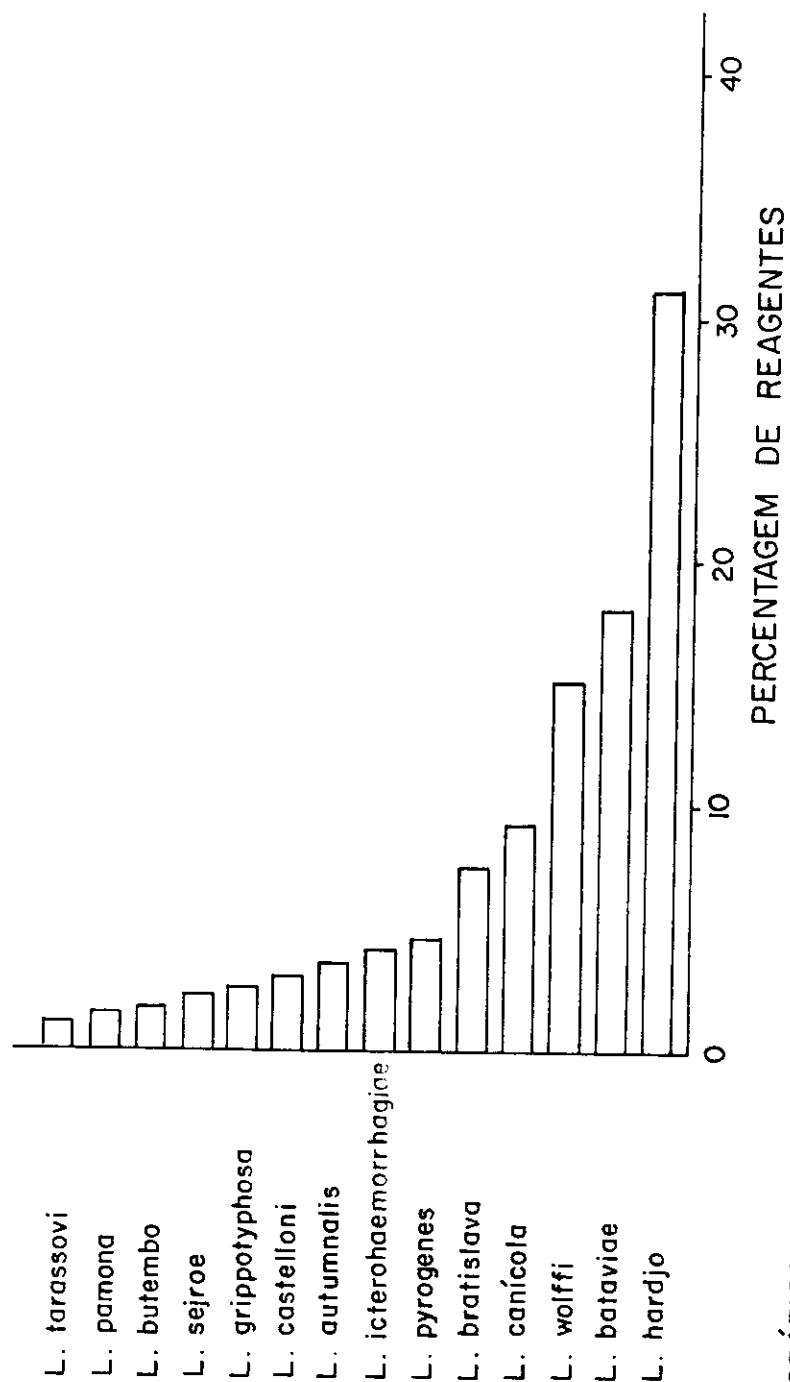


GRÁFICO I - Percentagem dos reagentes a MAR para *Leptospira* em 657 soros sanguíneos de bovinos da Fazenda Experimental da EPAMIG, em Governador Valadares, MG., 1978.

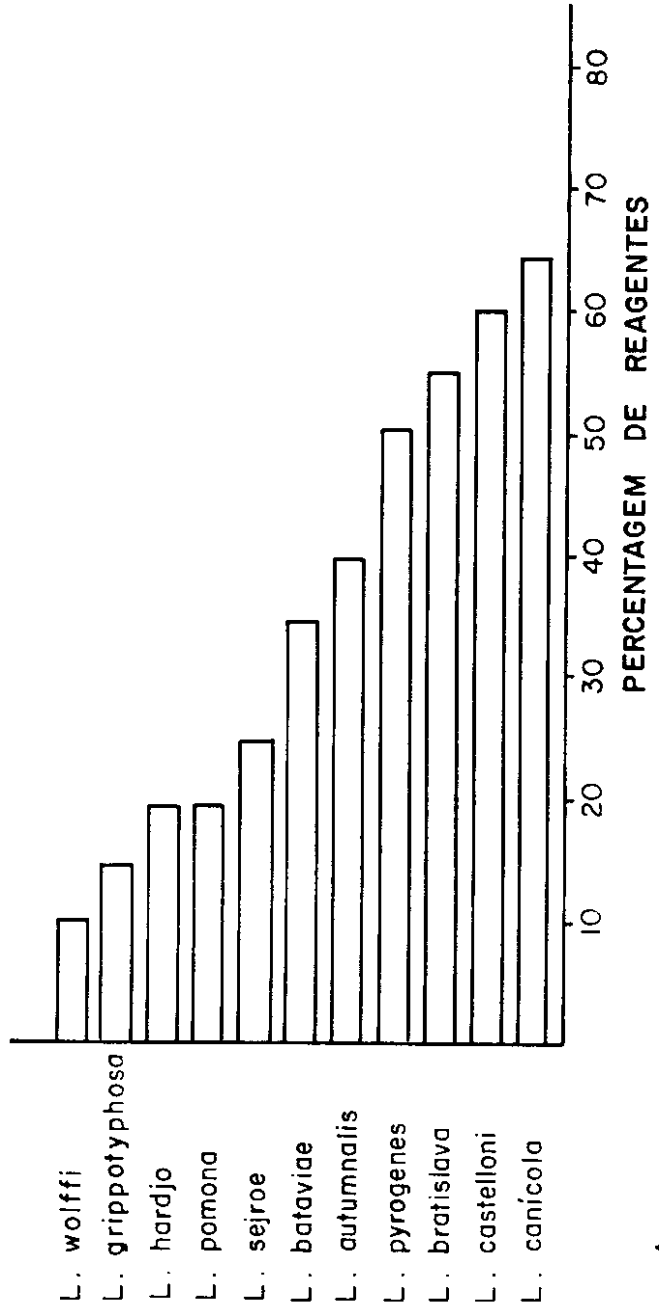
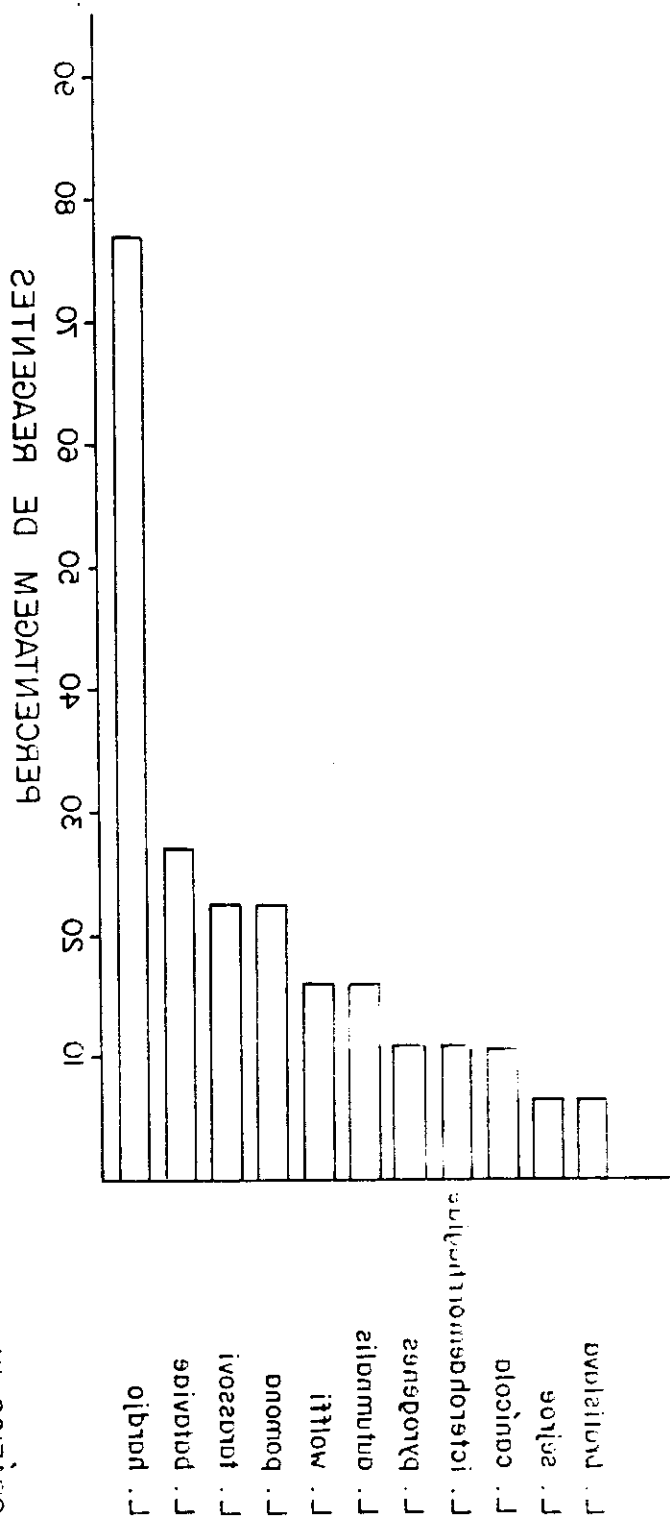


GRÁFICO II - Percentagem dos reagentes a MAR para *Leptospira* em soros sanguíneos na Fazenda Experimental da EPAMIG, em Governador Valadares, MG., 1978.

GRÁFICO III — Reações de sensibilização sob condições de campo, em Governador Valadares, MG.



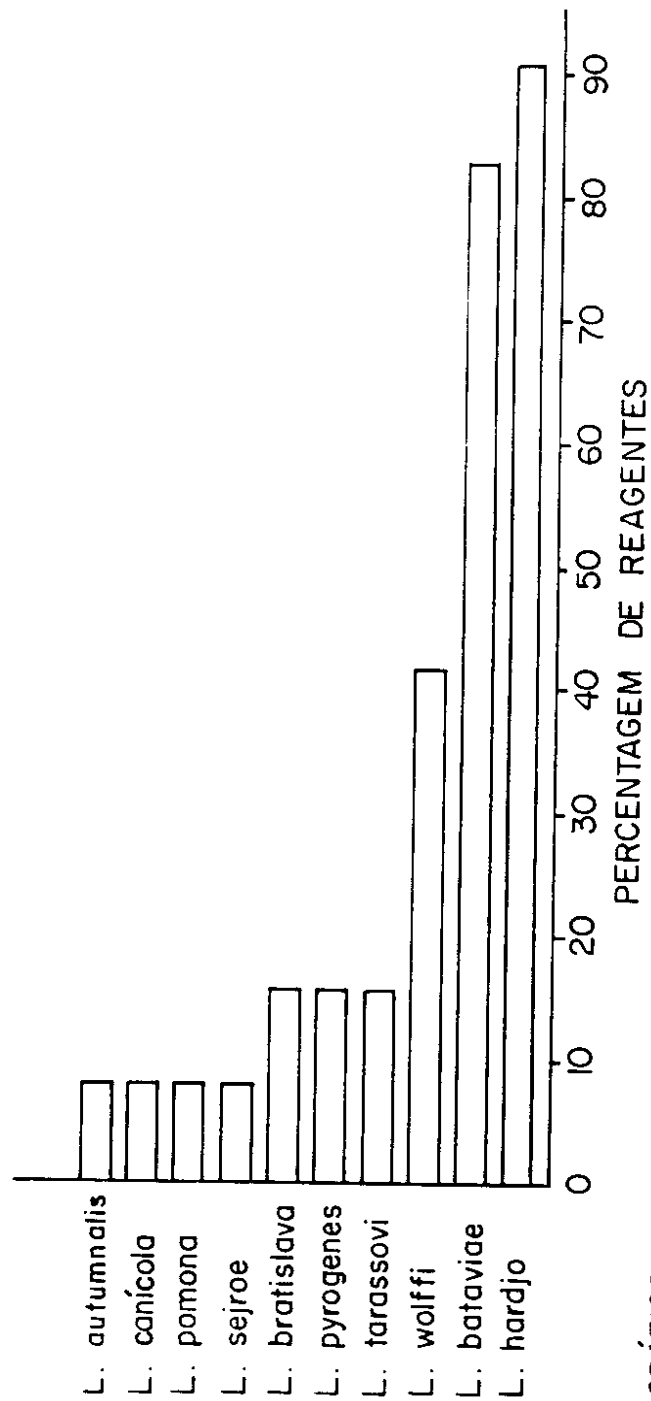


GRÁFICO IV — Percentagem dos reagentes a MAR para *Leptospira* das 12 vacas que abortaram em 1978, na Fazenda Experimental da EPAMIG, em Governador Valadares, MG.

## 5. DISCUSSÃO

A insignificância das reações sorológicas à prova de MAR para leptospira e os resultados negativos no isolamento de *Leptospira* dos roedores indicam que, no presente trabalho, estes animais não atuaram como fonte de infecção para o problema do rebanho em estudo, embora BARBOSA & HIPÓLITO (1952); PESTANA DE CASTRO *et alii* (1961) tenham relatado índices significantes de infecção em roedores no Brasil, TAWFIC *et alii* (1977); NEDUNCHELLIYANS *et alii* (1979); CARTER & CORDES (1980); LICERAS HIDALGO (1981) tenham encontrado o mesmo em outros países e CLARCK *et alii* (1962), CORDEIRO (1970); TWIGG & McDIARMID (1972); SANTA ROSA *et alii* (1975); LÉON VÍZCAÍNO *et alii* (1977); HATHAWAY & BLACKMORE (1981) tenham relatado isolamento em roedores e intertransmissibilidade em bovinos.

Ratificando os dados do presente trabalho, GORDON *et alii* (1961) concluíram que "embora espécies diferentes possam viver lado a lado, o contato real pode ser menor que o necessário para passar leptospiros" e foram corroborados por DOHERTY (1967), quando demonstrou que a infecção não foi

detectada em roedores que viviam junto a bovinos infectados. Ainda confirmando os dados deste estudo, PINHEIRO *et alii* (1974) em vários locais da Rodovia Transamazônica e ARORA & BAXI, na Índia, detectaram baixos índices de reações sorológicas em roedores.

Com relação à Imunofluorescência Direta, ressaltase que WHITE & RISTIC (1959) e COFFIN & MAESTRONE (1962), trabalhando com conjugados *L. pomona*, consideraram esta prova inespecífica para sorotipos heterólogos. No presente estudo, trabalhou-se também com o conjugado *L. pomona* e não se encontraram dados positivos, reforçando mais uma vez, a afirmativa de que os roedores não atuaram como fonte de infecção.

Com relação à sorologia do rebanho bovino, composto de 657 animais, os testes de MAR para leptospirose, revelando 350 (53,3%) reações positivas, com predominância do sorotipo *hardjo* concordam com os dados de SULZER *et alii* (1964) e HUSSAIN *et alii* (1978), que revelaram ampla, distribuição deste sorotipo na América do Norte, MYERS & JELAMBI (1975), que obtiveram o mesmo achado na Argentina, JELAMBI *et alii* (1976) na Venezuela, ELDER & WARD (1978); GORDON (1979) e MILNER *et alii* (1980) na Austrália, TAWFIC (1977) no Egito, TOLARI *et alii* (1979) na Itália e MOREIRA *et alii* (1979) e MADRUGA *et alii* (1980) no Brasil. Embora o sorotipo *pomona* tenha sido relatado como predominante na sorologia de bovinos por BARBOSA (1972); ARUNASALAM (1975); LÉON VÍZCAÍNO & MIRANDA GARCIA (1976); LÉON VÍZCAÍNO *et alii* (1978), MOREIRA (1979), os dados da TABELA 1 acusam o encontro de 0,8% de incidência o que corresponde a um baixíssimo índice.

Nos exames sorológicos das vacas que abortaram em 1977 e 1978, os percentuais dos diferentes sorotipos encontrados, indicados no Gráfico 3 e 4, comprovam a predominância do sorotipo *hardjo*. Isto condiz com os achados de WILLIAMS *et alii* (1975), no Rio Grande do Sul, que encontraram alta prevalência do sorogrupo *hebdomadis* na etiologia

do aborto; com ELLIS (1980); HIGGINS *et alii* (1980) e FERGUNSON & HANNA (1981) que incriminaram, principalmente a *L. hardjo* em rebanhos com histórico de aborto. Contradizendo, outros sorotipos de *Leptospira* tem sido em menor escala, relacionados como causadores de abortos em bovinos, tais como *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. grippotyphosa* e *L. canicola* segundo LACERDA *et alii* (1960); SANTA ROSA *et alii* (1961); LÉON VÍZCAÍNO & MIRANDA GARCIA (1976). ZAMORA & RIEDEMANN (1978), examinando aborto em vacas no Sul do Chile, encontraram ainda o envolvimento de *L. hardjo* e *L. pomona* em aborto bovinos.

Nos soros eqüinos, o encontro dos mais altos índices de reações à *L. canicola* (65%) contradiz os resultados dos trabalhos de BARBOSA (1962), onde foi relatado para o sorotipo *canicola* a mais baixa incidência encontrada. Contudo, a predominância em eqüinos, dos sorotipos *canicola*, *castelloni*, *bratislava* e *pyrogenes* comunga em parte com os achados de SILVA *et alii* (1972); JELAMBI *et alii* (1976) e DAMUDE *et alii* (1979). Contrastando com a incidência nula encontrada para o sorotipo *icterohaemorrhagiae* em eqüinos, no presente trabalho, LÉON VÍZCAÍNO *et alii* (1978) encontraram este sorotipo dentre as mais freqüentes reações nos eqüinos.



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. Os roedores não atuaram como fonte de infecção de leptospirose, no rebanho estudado.

2. A infecção leptospírica se manteve no rebanho, através da transmissão bovino ↔ bovino e bovino ↔ equino.

3. Não houve interrelação entre sorotipos predominantes nas diferentes espécies animais.

SUMMARY

The infection for *Leptospira* was analyzed in 657 bovines, males and females, of various ages, 30 post-abortion cows and 20 horses from the Experimental Farm of EPAMIG in Governador Valadares, in the state of Minas Gerais; the blood serum from the animals was examined for 14 serotypes of *Leptospira*, through rapid microagglutination test.

Out of 657 bovines of varied ages, 350 (53.3%) were infected with one or more serotype-predominantly *hardjo* (31.1%).

Out of 30 post-abortion cows, 26 (86.6%) had one or more serotype, predominantly *hardjo*, with an average incidence of 84.7%.

Out of 20 equine, 18 (90%) were infected with one or more serotype, mainly: *canicola* (65%), *castelloni* (60%) *bratislava* (55%) and *pyrogenes* (50%).

Through rapid microagglutination (MA), culture in Fletcher's semisolid medium, and direct immunofluorescence (DIF) tests, the leptospiral infection was surveyed in rodents, both domestic and wild. This reasearch was perfomed

at the same farm.

The number of positive reactions and the frequency of serotypes encountered through MA didn't provide significant statistics when compared to the serological tests of bovines and equines, and analyzed through Cochran's "Q" test.

From the 87 kidneys cultured in Flether's Medium, it was impossible isolate *Leptospira*; in 87 sections of kidney, stained for IFD with *L. pomona* conjugate, *Leptospira* was not observed.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, A.D. Leptospirosis in Puerto Rico. *Zoonoses Res.*, New York, 2(3): 153-227, 1963.
2. ARORA, B.M. & BAXI, K.K. Sero evidence of leptospiroses in Equidae, Suidae, Rodentia and Lagomorpha. *Indian J. Vet. Pathol.*, India, 3: 52-3, 1978/9.
3. ARUNASALAM, V. Leptospiral antibodies in the sera of cattle. *Malays. Vet. J.*, Kuala Lumpur, 6: 14-7, 1975.
4. BARBOSA, M. Aglutininas e lisinas antileptospira em soros de bovinos, equinos e suínos em Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UMG*, Belo Horizonte, 14: 1-26, 1962.
5. BARBOSA, M. & HIPÓLITO, O. *Leptospira icterohaemorrhagiae* em ratos (*Rattus norvegicus*) em Belo Horizonte. *Arq. Esc. Sup. Vet. UREMG*, Belo Horizonte, 5: 12-5, 1952.

6. CARTER, M.E. & CORDES, D.O. Leptospirosis and other infections of *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*. *N.Z. Vet. J.*, Wellington, 28(3): 45-50, 1980.
7. CLARK, L.G.; KRESSE, J.I.; MARSHAK, R.R. & HOLLISTER, C.J. *Leptospira grippotyphosa* infections in cattle and wildlife in Pennsylvania. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 141(6): 710-2, 1962.
8. COFFIN, D.L. & MAESTRONE, G. Detection of leptospirosis by fluorescent antibody. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 23(92): 159-64, 1962.
9. CORDEIRO, F. Leptospiras isoladas do camundongo *Mus musculares brevirostris* no Estado do Rio de Janeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, Rio de Janeiro, 5: 461-4, 1970.
10. CORREA, M.O.A. & MEARIN, A.B. Leptospiroses no Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, 31: 87-101, 1971.
11. DAMUDE, D.F.; JONES, C.J.; MYERS, D.M. A study of leptospirosis among animals in Barbados W. I. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, 73(2): 161-8, 1979.
12. DOHERTY, P.C. Bovine *Leptospira pomona* infection: environmental contamination and the spread of the disease in a susceptible herd. *Queensland J. Agric. An. Scie.*, 24: 329-41, 1967.
13. ELDER, J.K. & WARD, W.H. The prevalence and distribution of leptospiral titres in cattle and pigs in Queensland. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 54(6): 297-300, 1978.
14. ELLIS, W.A. The diagnosis of abortion due to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* (cattle in Northern

- Ireland) In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIAN, 2., LUCERNE, 1980. Lucerne, 1980; V. 1, p. 149-51.
15. FERGUSON, H.W. & HANNA, J. Bovine Leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. *Vet. Rec.*, London, 110(7): 147-50, 1981.
  16. FLETCHER, W. Recent work on leptospirosis, Tsutsugamuchi disease and tropical typhs in the Federated Malaya State. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, 21: 265-73, 1928.
  17. GALTON, M.M.; MENGES, R.W.; SHOTTS Jr., E.B.; NAHMIAS, A.J.; HEATH, C.W. *Leptospirosis; Epidemiology clinical manifestation in man and animals, and methods in laboratory diagnosis*. (Public Health Series, 951), Washington, D.C., Public Health Organization, 1962.
  18. GORDON, L.M. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in infection of cattle. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 55(1): 1-5, 1979.
  19. GORDON SMITH, C.E.; TURNER, L.H.; HARRISON, J.L. & BROM, J.C. Animal Leptospirosis in Malaya 2. Localities sampled. *Bol. Org. Mund. Saude*, Washington, 24: 23-24, 1961.
  20. HATHAWAY, S.C. & BLACKMORE, D.K. Ecological aspects of the epidemiology of infection with leptospire of the *Ballum* serogroup in the black rat (*Rattus rattus*) and the brown rat (*Rattus norvegicus*) in New Zealand. *J. Hyg.*, Cambridge, 87(3): 427-36, 1981.
  21. HIGGINS, R.J.; HARBOURNE, J.F.; LITTLE, T.W.A.; STEVENS,

- A.E. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype *hardjo*. *Vet. Rec.*, London, 107(13): 307-10, 1980.
22. HODGES, R.T. & EDKAHL, M.O. Use of fluorescent antibody technique for the serological serotypes in culture and bovine urine. *N. Z. Vet. J.*, Wellington, 21: 109-15, 1973.
23. HUSSAIN, B.; GBADAMOSI, S.G.; SIDDIQUE, I.H. Serological studies on leptospirosis in cattle in Est Central Alabama. *Can. J. Comp. Med.*, Ottawa, 42(3): 373-5, 1978.
24. JELAMBI, F., PEÑA, A.; PADILLA, C.; IVANOV, N.; POLANCO, J.E. Leptospirosis of domestic animals (pig, cattle, horse, dog) in Venezuela. *Vet. Trop.*, Caracas, 1(1): 63-71, 1976.
25. LACERDA Jr., P.M.G.; FREITAS, D.C.; LACERDA, J.P.G. Notas sobre Leptospirose bovina. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, 27(13): 87-91, 1960.
26. LÉON VÍZCAÍNO, L. & MIRANDA GARCIA, A. Epidemiological survey of leptospirosis in Cadiz, Spain. *Supl. Cient. Bol. Inf. Cons. Gen. Col. Vet. España*, Madrid, (204/205): 15-32, 1976.
27. LÉON VÍZCAÍNO, L.; MIRANDA GARCIA, A.; GARCIA PÉREZ, M. New outbreaks of leptospirosis in cattle and pigs in Cordoba. *Supl. Cient. Bol. Inf. Cons. Gen. Col. Vet. España*, Madrid, (207/208): 73-84, 1977.
28. LÉON VÍZCAÍNO, L.; MIRANDA GARCIA, A.; PEREA REMUJO, A.; CARRANZA GUZMAN, J. Estudio Epizootiológico, mediante

- encuesta serológica, de la leptospirosis en la provincia de Sevilla. *Arch. Zootec.*, Madrid, 27 (107): 263-83, 1978..
29. LICERAS DE HIDALGO, J. Leptospirosis en Tingo Maria, Departamento de Huanuco, Peru. Estudio en animales silvestes. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, Washington, 91(1): 47-54, 1981.
30. MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; PUTT, N. Frequência de aglutininas anti-leptospira em bovinos de corte da Região Sul de cerrado do Estado de Mato Grosso. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, Belo Horizonte, 32(2): 245-9, 1980.
31. MILNER, A.R.; WILKS, C.R.; CALVERT, K. The prevalence of antibodies to members of *Leptospira interrogans* in cattle. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 56(7): 327-30, 1980.
32. MOREIRA, E.C.; SILVA, J.A.; VIANA, F.C.; SANTOS, W.L.M.; ANSELMO, F.P.; LEITE, R.C. Bovine Leptospirosis. I. Agglutinins in serum of cattle in Minas Gerais state, Brazil. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, Belo Horizonte, 31(3): 375-88, 1979.
33. MOULTON, J.E. & HOWARTH, J.A. The demonstration of *Leptospira canicola* in hamster Kidney by means of fluorescent antibody. *Cornell Vet.*, Ithaca, 47: 524-32, 1957.
34. MYERS, D.M. & JELAMBI, F. Isolation and identificacion of *Leptospira hardjo* from cattle in Argentina *Trop. Geogr. Med.*, Edimburgh, 27: 70-3, 1975.
35. NEDUNCHELLIYAN, S.; VICTOR, D.A.; KHADER, T.G.A. A study on the murine reservoir problem in animal leptospirosis



in Madras City, INDIA, *Indian J. Anim. Health*, Calcutta, 18(2): 63-6, 1979.

36. PESTANA DE CASTRO, A.F.; SANTA ROCA, C.A.; TROISE, C. Preãs (*Caviae aperae azarae*, Lich) - (Rodentia Cavidae) como reservatório de Leptospirose em São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 28: 219-23, 1961.
37. PINHEIRO, F.P.; BENSABTH, G.; ANDRADE, A.H.P.; LINS, Z. P.; FRAIHA, H.; TANG, A.T.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; AZEVEDO, M.C. Vigilancia e investigation de las enfermedades infecciosas a lo cargo de la carretera Transamazonica del Brasil. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.*, Washington, 77(3): 187-98, 1974.
38. RYU, E. Rapide microscopic agglutination test for leptospira without non-specific reaction. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, Paris, 73(1): 49-58, 1970.
39. SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; TROISE, C. Leptospirose Bovina. Inquérito sorológico na Região de Campinas. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 28: 169-73, 1961.
40. SANTA ROSA, C.A.; SULZER, C.R.; GIORGI, W.; SILVA, A.S.; YANAGUITA, R.M.; LOBÃO, A.O. Leptospirosis in Wildlife in Brazil: Isolation of a new serotype in the *Pyrogenes* group. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 36(9): 1363-65, 1975.
41. SCHNURRENBERGER, P.R.; HANSON, L.E.; MARTIN, R.J. Leptospiroses; long-term surveillance on an Illinois farm. *Am. J. Epidemiol.*, Baltimore, 92(4): 223-39, 1970.
42. SPIEGEL, S. *Estatística Não Paramétrica; para as ciências do comportamento*. São Paulo, McGraw Hill do Brasil, 1975.

43. SILVA, A.S.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; GIORGI, W., SANTA ROSA, C.A. Pesquisa de Aglutininas anti-leptospira em soros de equinos. *Rev. Med. Vet.*, Buenos Aires, 8(2): 196-205, 1972.
44. STUART, R.D. The preparation and use of a simple culture medium for leptospirae. *J. Pathol. Bacteriol.*, London, 58(3): 343-9, 1946.
45. SULZER, C.R.; SHOTTS, E.B.; OLSEN, C.D.; GALTON, M.M. & STEWART, M.A. Leptospirosis due to serotype *hardjo* in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 144: 888-90, 1964.
46. SUMMERS, P.M.; CAMPBELL, R.S.F. & DENNETT, D.P. Herd studies on the genital pathology of infertile beef cows. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 50(4): 150-4, 1974.
47. TAWFIC, M.S. Leptospirosis in Egypt. II. Leptospiral agglutinins of serotypes *hardjo* and *pomona* in Egypt. *Vet. Med. Assoc.*, Cairo, 37(2): 121-8, 1977.
48. TAWFIC, M.S.; HAMED, O.M.; EL-KARAMANI, R. Leptospirosis in Egyptian rodents. *Zentralbl. Veterinarmed.*, Reihe B, Hamburg, 24(9): 728-32, 1977.
49. TOLARI, F.; SALIM, H.A.; PIAZZA, D. Agglutinating leptospirosis antibodies in serum of Somali Cattle. *Ann. Fac. Med. Vet.*, Pisa, 31: 101-6, 1979.
50. TWIGG, G.I. & McDIARMID, A. Leptospiral antibodies in dairy cattle: some ecological considerations. *Vet. Rec.*, London, 90(21): 598-602, 1972.
51. WHITE, F.H. & RISTIC, M. Detection of *Leptospira pomona*

in guinea pig and bovine urine with fluorescein - labeled antibody. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 105(2): 118-23, 1959.

52. WILLIAMS, H.A.; OLIVEIRA, S.J.; RIBEIRO, L.A.O. Leptospirose como causa de aborto em um rebanho bovino no Rio Grande do Sul. *Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor*, Porto Alegre, 3: 73-81, 1975.
53. ZAMORA, J. & RIEDEMANN, S. Leptospiral abortion in cows, serious problem in Southern Chile. *Arch. Med. Vet.*, Valdivia, 10(1): 67-8, 1978.