

AGLUTININAS ANTILEPTOSPIRA EM SOROS DE BOVINOS "DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO"¹

FERNANDO CORDEIRO², HÉLIO GUSTAVO GUIDA³, AUVANIR DE ALMEIDA RAMOS⁴ e TEÓFILO REYES MENDOZA⁵

SINOPSE.— 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 leptospiroses 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 cepa *Mm-2*. Os títulos aglutinantes mais elevados encontrados foram com a cepa *Mm-2* (1:102.400) e os sorotipos *wolffi* (1:12.800) e *pomona* (1:3.200). Co-aglutinações também foram observadas com frequência. Em 54 das 64 propriedades visitadas (84,37%) foram encontrados bovinos com reações positivas contra *Leptospira*. As microrregiões homogêneas, assim como as altitudes, afetaram a prevalência de animais reagentes, ocorrendo um percentual mais alto 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 economia acentuada de tempo e material.

Palavras-chave adicionais para índice: *Wolffi*, *tarassovi*, *grippotyphosa*, *pomona*, *bratislava* e a cepa *Mm-2*.

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 *Leptospira* e as evidências sorológicas de infecção em várias partes do mundo (Hoeden 1958).

Volumeosa 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 e Bohlander (1952), Riel e Bienfet (1953), Farina (1957), e Lataste-Dorole (1965).

No Brasil, Freitas *et al.* (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 soro-aglutinação rápida com antígeno polivalente, feita com 150 amostras de soros da mesma granja, indicou 18 reagentes positivos, 16 dos quais aglutinaram o sorotipo *pomona*. Guida e Barros (1958) examinaram, pelo método de aglutinação-lise, 88 soros de bovinos aparentemente normais, sacrificados em matadouro, encontrando somente três positivos: uma para o sorotipo *bataviae* e dois para *pomona*.

¹ Aceito para publicação em 2 de maio de 1974.

Assunto da tese de Mestre em Medicina Veterinária (MMV) do primeiro autor apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1973.

² Médico Veterinário (MMV) do Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), EMBRAPA/RJ, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq 3254/73).

³ Médico Veterinário da Seção de Patologia da Reprodução do IPEACS e bolsista do CNPq (1993/61).

⁴ Médico Veterinário, Chefe da Seção de Patologia da Reprodução do IPEACS e bolsista do CNPq (10476/68).

⁵ Médico Veterinário, estagiário da Seção de Patologia da Reprodução do IPEACS.

Guida *et al.* (1959) pesquisaram, pelo método de aglutinação-lise, anticorpos contra leptospiroses 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. *et al.* (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 *et al.* (1961a) isolaram uma cepa de leptospirose proveniente de feto bovino, identificada como pertencente ao sorotipo *icterohaemorrhagiae*. Santa Rosa *et al.* (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 *et al.* (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 2,36% (3.561 soros), predominando o sorotipo *wolffi*, além de *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, *tarassovi*, *grippotyphosa* e outros.

Não temos maior conhecimento da frequência das leptospiroses em nosso rebanho bovino, dos sorotipos responsáveis, bem como dos reais prejuízos que causam.

Considerando 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.

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 agro-pastoris localizadas em 28 municípios do Estado do Rio de Janeiro (Fig. 1, Quadro 1). A amostragem de soros de cada propriedade correspondeu a cerca de 10% dos seus rebanhos, que oscilavam entre 10 e 400 cabeças. Os animais, em sua grande maioria, eram mestiços de raças européias 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 refrigerado após a coagulação.

Sorologia

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

A técnica de soro-aglutinação microscópica com leptospiros utilizada foi a descrita por Galton *et al.* (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 leptospiros de 4 a 14 dias em meio de Korthof (1932) modificado (Babudieri & Zardi 1959) ou de Stuart (1946), foram os indicados pelo grupo de técnicos da Organização Mundial de Saúde (WHO 1967), com pequenas alterações (Quadro 2). 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 a cepa (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 aglutinação), 2+ (de 50 a 75% de aglutinação), 3+ (de 75 a 100% de aglutinação) e - (o campo microscópico apresentava-se idêntico ao testemunha).

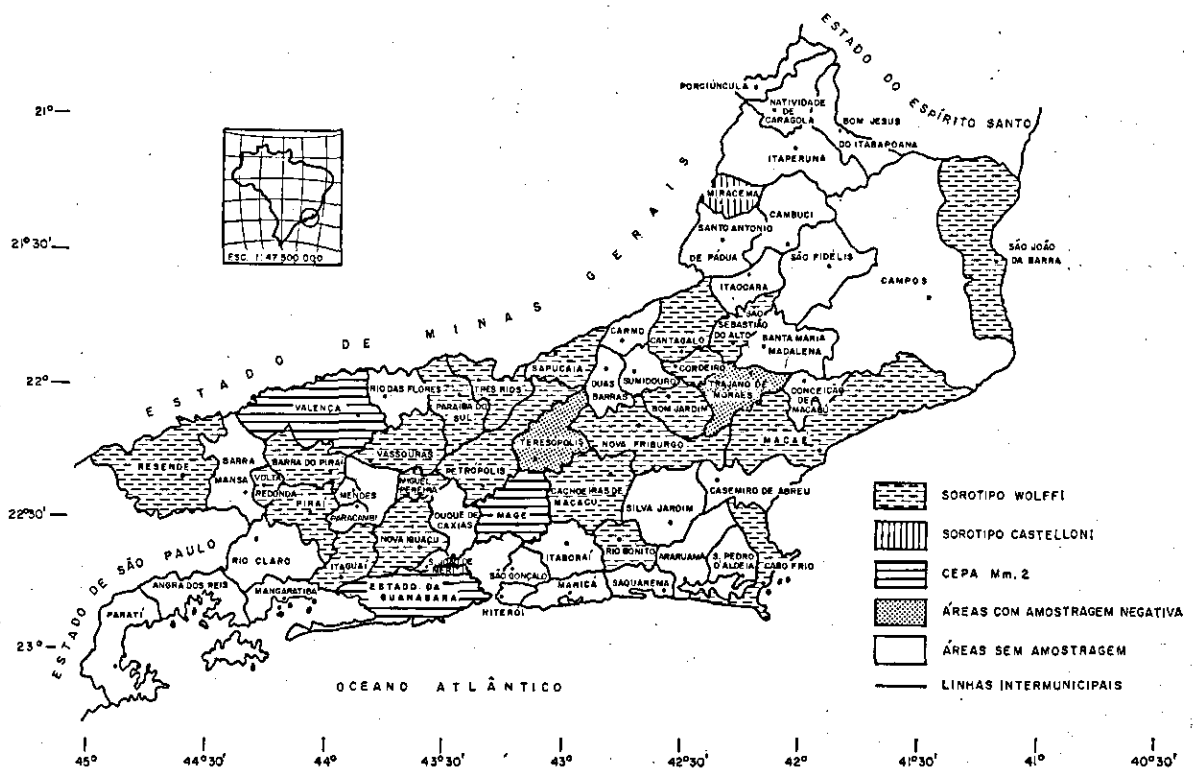


FIG. 1. Procedência dos soros examinados, com indicação das áreas de predominância de alguns sorotipos, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

QUADRO 1. Distribuição dos hemo-soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro usados na prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras

Microrregião homogênea n.º	Municípios			Propriedades visitadas			Soros examinados			
	N.º ord.	Nome	Altitude (m/nível do mar)	N.º ord.	Totais		Por prop.	Por Mun.	Por MRH	
					P/Mun.	P/MRH				
212	1	Miracema	137	1	1	1	17	17	17	
	2	Macaé	5	2	2	2	25	43	43	
	3	Cantagalo	376	4	1	1	29	29	29	
	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		
217		9	São Sebastião do Alto	310	26	1		24	24	
	10	Trajano de Moraes	679	27	1		18	18		
	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		
	218	15	Volta Redonda	417,7	39	3		21	51	
				40			19			
				41			11			
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			
219		18	Teresópolis	902	50	1		7	7	
		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	Cachoeira de Macaçu	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 2. 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*	Perepelicin
	guidae	RP 29
Panama	panama	CZ 214 K
Semarang	patoc	Patoc I
Andamana	andamana	CH II
	pomona? ballum?	Mm-2

* Anteriormente chamado hyos.

Eram consideradas positivas as reações quando 50% ou mais das leptospiiras 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 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 microrregiões homogêneas⁶, os municípios e as altitudes dos mesmos (IBGE 1959).

Foi aplicado o teste do X² em tabelas de contingência para estudo do efeito das microrregiões homogêneas e as diversas altitudes sobre a prevalência das reações positivas na prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiiras.

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 colheram amostras de duas ou mais propriedades (Quadro 1).

QUADRO 3. Prevalência de reações positivas em soros de bovinos pela prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiiras, e predominância de sorotipos por propriedades do Estado do Rio de Janeiro, no período de 1968 a 1971*

Municípios	Propriedades n.º	Soros			Predominância	
		Examinados	Positivos		Sorotipo	%
			N.º	N.º		
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
Parafba 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
São Sebastião do Alto	26	24	8	33,33	"	62,50
Trajano de Moraes	27	18	0	---	---	---
Barra do Piraf	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

* O espaço homogêneo, definido como "forma de organização em torno da produção", foi expresso por combinações de fatos físicos, sociais e econômicos (IBGE 1970).

QUADRO 3. (Continuação)

Municípios	Propriedades dades n.º	Soros			Predominância	
		Examinados N.º	Positivos		Sorotipo	%
			N.º	%		
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
Volta Redonda	38	8	3	37,50	pomona	66,66
	39	21	0	--	---	---
	40	19	2	10,52	wolffi	50,00
	41	11	1	9,09	>	100,00
Nova Friburgo Petrópolis	42	61	10	16,39	>	60,00
	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	--	---	---
	51	8	1	12,50	wolffi	100,00
Miguel Pereira Piraí	52	43	7	16,27	>	42,85
	53	22	2	9,09	tarassovi	100,00
	54	22	5	22,72	wolffi	80,00
Cachoeira de Macacu Casimiro de Abreu Rio Bonito Itaguaí	55	50	8	16,00	>	62,50
	56	25	9	36,00	>	100,00
	57	9	1	11,11	>	100,00
	58	1	1	100,00	>	100,00
	59	18	2	11,11	>	50,00
Magé	60	5	1	20,00	>	100,00
	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: 1.562; total de soros positivos: 312 (19,97%).

QUADRO 4. Prevalência de reações positivas em soros de bovinos pela prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiras, e predominância de sorotipos por municípios do Estado do Rio de Janeiro, no período de 1968 a 1971

Municípios	Soros			Predominância	
	Examinados N.º	Positivos		Sorotipo	%
		N.º	%		
Miracema	17	9	52,94	castelloni	44,44
Macaé	43	17	39,53	wolffi	58,82
Cantagalo	29	6	20,68	>	83,33
Parafba 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
São Sebastião do Alto	24	8	33,33	>	62,50
Traiano de Moraes	18	0	--	---	---
Barra do Piraí	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
Petrópolis	164	22	13,41	>	54,54
Teresópolis	7	0	--	---	---
Miguel Pereira	8	1	12,50	wolffi	100,00
Piraí	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	1.562	312	19,97		

RESULTADOS

Das 64 propriedades visitadas, 54 (84,37%) tinham em seus rebanhos animais positivos à prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiros (Quadro 3).

Somente dois dos 28 municípios do Estado do Rio de Janeiro com amostragem de soros não apresentaram animais reagentes (Quadro 4).

Dos 1.562 soros examinados, 312 (21,85%) apresentaram reações positivas com títulos de 1:100 ou maior (Quadros 5 e 6). O sorotipo *wolffi* (10,62%) foi o de maior evidência, seguido de *tarassovi* (2,62%), cepa *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 para a cepa *Mm-2* (1:102.400) e os sorotipos *wolffi* (1:12.800) e *pomona* (1:3.200). Co-aglutinações foram observadas com frequência (Quadro 7).

QUADRO 5. Antígenos 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	Testados	Soros			
		Positivos ^a		Positivos ^b	
		N.º	%	N.º	%
ballum	533	94	17,63	—	—
castelloni	1.029	218	21,18	5	0,48
australia	256	32	12,50	2	0,78
bratislava	1.306	280	21,43	15	1,14
guidae	968	162	16,73	3	0,30
andamana	740	125	14,89	—	—
Mm-2	1.045	224	21,46	26	2,48

^a Total de soros positivos com todos os antígenos da bateria (Quadro 2).

^b Total de soros positivos com cada antígeno constante deste quadro.

QUADRO 6. Títulos dos hemo-soros de bovinos positivos da 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 ^a
grippotyphosa	14	2	4	—	—	—	—	—	—	20	1,28
pomona	11	4	3	—	1	1	—	—	—	20	1,28
bratislava	10	3	1	1	—	—	—	—	—	15	1,14 ^a
butembo	4	4	—	—	—	—	—	—	—	8	0,51
castelloni	3	—	2	—	—	—	—	—	—	5	0,48 ^a
guidae	2	1	—	—	—	—	—	—	—	3	0,30 ^a
australia	—	2	—	—	—	—	—	—	—	2	0,78 ^a
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	312	21,85 ^b

^a Percentual corrigido, conforme Quadro 5.

^b Percentual total corrigido.

QUADRO 7. Co-aglutinações encontradas na prova de soro-aglutinação microscópica com soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro

Sorotipos	Títulos	Frequência	
wolffi x bratislava	1:100 x 1:100	6	
	1:200 x 1:100	2	
	1:200 x 1:200	1	
	1:400 x 1:100	3	
	1:400 x 1:200	4	
	1:400 x 1:400	1	
	1:800 x 1:100	1	
	1:800 x 1:200	2	
	1:800 x 1:400	4	
	1:1600 x 1:100	1	
	1:12800 x 1:200	2	
	wolffi x mini x bratislava	1:6400 x 1:800 x 1:800	1
		1:1600 x 1:100 x 1:200	1
1:800 x 1:400 x 1:400		1	
1:400 x 1:100 x 1:100		1	
1:200 x 1:200 x 1:200		1	
1:200 x 1:100 x 1:100		1	

QUADRO 7. (Continuação)

Sorotipos	Títulos	Frequência
wolffi x mini	1:100 x 1:100	1
	1:1600 x 1:100	1
	1:1600 x 1:200	1
	1:6400 x 1:1600	1
wolffi x tarassovi	1:100 x 1:100	1
	1:400 x 1:100	2
	1:400 x 1:400	1
	1:1600 x 1:200	1
wolffi x canicola	1:800 x 1:800	1
	1:400 x 1:100	1
wolffi x Mm-2	1:800 x 1:100	1
	1:400 x 1:100	1
wolffi x grippotyphosa	1:400 x 1:100	1
	1:200 x 1:100	1
wolffi x tarassovi x guidae	1:200 x 1:200 x 1:200	1
wolffi x mini x bratislava x tarassovi	1:800 x 1:400 x 1:200 x 1:100	1
wolffi x butembo	1:100 x 1:100	1
butembo x wolffi	1:200 x 1:100	1
butembo x bratislava	1:100 x 1:100	1
butembo x bratislava x tarassovi	1:200 x 1:100 x 1:100	1
butembo x wolffi x bratislava	1:200 x 1:100 x 1:100	1
butembo x autumnalis	1:100 x 1:100	1
tarassovi x guidae	1:200 x 1:200	6
	1:400 x 1:200	1
	1:800 x 1:400	1
tarassovi x bratislava	1:400 x 1:100	1
tarassovi x grippotyphosa	1:100 x 1:100	1
	1:200 x 1:100	2
	1:1600 x 1:100	1
tarassovi x wolffi x guidae	1:400 x 1:200 x 1:200	1
tarassovi x grippotyphosa x wolffi	1:1600 x 1:200 x 1:200	1
tarassovi x wolffi	1:200 x 1:100	1
Mm-2 x pomona	1:400 x 1:200	1
	1:800 x 1:200	1
	1:1600 x 1:100	1
	1:12800 x 1:800	1
	1:102400 x 1:3200	1
Mm-2 x butembo x bratislava	1:400 x 1:100 x 1:100	1
Mm-2 x pomona x bratislava	1:400 x 1:100 x 1:100	1
Mm-2 x pomona x wolffi x grippotyphosa	1:1600 x 1:200 x 1:200 x 1:100	1
Mm-2 x pomona x wolffi x bratislava	1:3200 x 1:3200 x 1:400 x 1:200	1
grippotyphosa x bratislava	1:400 x 1:100	1
grippotyphosa x butembo	1:400 x 1:100	1
grippotyphosa x bratislava x javanica	1:100 x 1:100 x 1:100	1
pomona x wolffi	1:1600 x 1:400	1
	1:100 x 1:100	1
pomona x butembo	1:200 x 1:100	1
bratislava x mini x wolffi	1:400 x 1:400 x 1:100	1
castelloni x canicola	1:400 x 1:400	1
Total		89

O Quadro 8 mostra a prevalência de reações positivas com distribuição por microrregiões homogêneas. O sorotipo predominante foi *wolffi*. Somente uma microrregião homogênea (212) apresentou o sorotipo *castelloni* com predominância.

QUADRO 8. Prevalência de reações positivas em soros de bovinos pela prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiros e predominância de sorotipos por microrregiões homogêneas do Estado do Rio de Janeiro, no período de 1968 a 1971

Microrregião homogênea N.º	Soros		Predominância	
	Examinados	Positivos	Sorotipo	%
	N.º	N.º %		
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
Totais	1.562	312 19,97		

A significância a um nível menor do que 0,1% do valor calculado para o X^2 , no Quadro 9, indica que a prevalência de animais reagentes a leptospiros no Estado do Rio de Janeiro, medida pela prova de soro-aglutinação microscópica, é afetada pelas microrregiões homogêneas. Também no Quadro 10 indica que a prevalência de animais reagentes é afetada pelas microrregiões situadas até 350 metros de altitude. No Quadro 11, a não significância ao nível de 5% do valor calculado para o X^2 indica que essa prevalência não é afetada pelas microrregiões acima de 350 metros.

QUADRO 9. Tabela de contingência das frequências observadas nos resultados da prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiros, para teste do efeito das microrregiões homogêneas do Estado do Rio de Janeiro sobre a prevalência das reações positivas

Microrregião homogênea N.º	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

$X^2 = 76,90$, $P < 0,1\%$.

QUADRO 10. Tabela de contingência das frequências observadas nos resultados da prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiros, para teste do efeito das microrregiões homogêneas do Estado do Rio de Janeiro, situadas até 350 metros de altitude, sobre a prevalência das reações positivas

Microrregião homogênea N.º	Reações de soro-aglutinação	
	Positivas	Negativas
212	9	8
213	17	26
215	23	147
220	18	66
221	36	58
222	8	2

$X^2 = 46,56$, $P < 0,1\%$.

QUADRO 11. Tabela de contingência das frequências observadas nos resultados da prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiros, para teste do efeito das microrregiões homogêneas do Estado do Rio de Janeiro, situadas acima de 350 metros, sobre a prevalência das reações positivas

Microrregião homogênea N.º	Reações de soro-aglutinação	
	Positivas	Negativas
214	6	23
216	40	171
217	108	469
218	32	200
219	15	80

$X^2 = 3,70$, $P > 5\%$.

A significância a um nível menor do que 0,1% do valor calculado para o X^2 , no Quadro 12, 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 13, indica que a prevalência de animais reagentes não foi afetada pelos municípios.

QUADRO 12. Tabela de contingência das frequências observadas (Fo) e esperadas (Fe) nos resultados da prova de soro-aglutinação microscópica com leptospiros, para teste do efeito de altitude no Estado do Rio de Janeiro, sobre a prevalência das reações positivas

Altitudes (m/nível do mar)	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 — 1.000	32	46,3	200	185,7

$X^2 = 50,62$, $P < 0,1\%$.

QUADRO 13. Análise da variância para teste do efeito entre municípios 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%.

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 leptospiros 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 3, que há uma variação de predominância de sorotipos, de região para região, apesar de que o sorotipo *wolffi* aparece com mais freqüência.

A prevalência das reações positivas indicadas no Quadro 4 sugere que os municípios de Cabo Frio, Miracema, Nova Iguaçu e Macaé são os de maior importância com relação a infecções por leptospiros.

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 muito maior número de amostras (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 5), esse resultado eleva-se para 21,85% (Quadro 6). 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 (Corrêa et al. 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, comprovados pelo isolamento do microrganismo (Roth & Galton 1960, Clark et al. 1961, Stoenner 1967, Sullivan & Stallmann 1969, Sullivan & Callan 1970, Corbould 1971, Sullivan 1972, Hoare & Claxton 1972). Santa Rosa (1971a) obteve uma cultura proveniente de rim de bovino que, nos primeiros testes, parecia ser o sorotipo *wolffi*. Posteriormente foi classificada como um novo sorotipo (*guaicurus*) 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 cepa *Mm-2*, isolada de camundongo, constitui na realidade, duas; uma pertencente ao sorogrupo *pomona* e outra ao *ballum* (Babudieri 1971). Encontra-se atualmente em fase de tipificação em laboratório de referên-

cia da Organização Mundial de Saúde. Uma vez incluída entre os antígenos usados no presente trabalho, demonstrou ser mais sensível que o sorotipo *pomona*, pois além de evidenciar maior número de reações positivas (2,48%), em casos de co-aglutinação com este sorotipo, apresentou títulos mais elevados (Quadros 6 e 7).

O sorotipo *gryppotyphosa*, 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 ele habita (Santa Rosa 1970).

O sorotipo *pomona*, também responsabilizado por surto de aborto com retenção de placenta e redução acentuada de produção de leite numa granja de São Paulo (Freitas et al. 1957), parece ser freqüente em nosso meio. No presente levantamento, aparece com um índice de positividade de 1,28%. Outros trabalhos nacionais (Freitas et al. 1960, Santa Rosa et al. 1962) indicam o sorotipo *pomona* como causando danos também à espécie suína e equina.

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 *canicola*, ou afinidades antigênicas.

As co-aglutinações relacionadas no Quadro 7 permitem admitir a ocorrência de infecções por múltiplos sorotipos. Algumas, entretanto, como *wolffi* x *mini*, *tarassovi* x *guidae*, *Mm-2* x *pomona* correm a conta de afinidades antigênicas por pertencerem aos mesmos sorogrupos.

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

A análise estatística permitiu demonstrar o efeito das microrregiões homogêneas e das altitudes na prevalência de animais reagentes a leptospiros. Provavelmente, as microrregiões 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. Verifica-se, ao exame do Quadro 12, 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.

CONCLUSÕES

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%), *gryppotyphosa*

(1,28%), *pomona* (1,28%), *brasilava* (1,14%), e a cepa *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 microrregiões 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 às conclusões acima, seriam recomendáveis:

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.

AGRADECIMENTOS

A 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 Dr. João Brito Jorge, pela revisão do texto em inglês; ao Sr. Homero Martins de Oliveira, Srta. Vânia Lúcia 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, os agradecimentos dos autores.

REFERÊNCIAS

- Alston, J.M. & Broom, J.C. 1958. Leptospirosis in man and animals. E. & S. Livingstone, Edinburgh. 367 p.
- Babudieri, B. 1971. Comunicação pessoal.
- Babudieri, B. & Zardi, O. 1959. Alcuni fattori di crescita delle leptospire. Nuovi Ann. Ig. Microb. 10:121-128.
- Barbosa, M. 1962. Aglutininas e lisinas antileptospira em soros de bovinos, equinos e suínos em Minas Gerais. Arqs Esc. Vet., Minas Gerais, 14:1-26.
- Clark, L.G., Kresse, J.L., Carbrey, E.A., Marshak, R.R. & Hollister, C.J. 1961. Leptospirosis in cattle and wildlife on a Pennsylvania farm. J. Am. vet. med. Ass. 139:889-891.
- Corbould, A. 1971. *Leptospira hardjo* in Tasmania. Aust. vet. J. 47:26. (Vet. Bull. 41, Abstr. 3877)
- Cordeiro, F. 1970. Leptospiras isoladas do camundongo *Mus musculus brevisrostris* no Estado do Rio de Janeiro. Pesq. agropec. bras. 5:461-464.
- Corrêa, M.O.A., Hyakutake, S., Natale, V., Galvão, P.A.A. & Aguiar, I.A. 1965/67. Estudos sobre a *Leptospira wolffi* em São Paulo. Revta Inst. Adolfo Lutz 25/27:11-25.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 1959. Enciclopédia dos municípios brasileiros. Vol. 22, IBGE, Rio de Janeiro. 470 p.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 1970. Divisão do Brasil em microrregiões homogêneas. Fundação IBGE, Rio de Janeiro. 564 p.
- Farina, R. 1957. Epidemiologia delle infezioni da *Leptospira* nei bovini in Italia. Indagini sierologiche su 1820 animali. Vet. ital. 8:567-590.
- Freitas, D.C., Veiga, J.S., Lacerda Jr., P.M.G. & Lacerda, J. P. 1957. Identificação da leptospirese bovina no Brasil. Revta Fac. Med. vet., S. Paulo, 6:81-84.
- Freitas, D.C., Gomes, C.E.S., Lacerda, J.P.C. & Lima, F.P. 1960. Notas sobre leptospirese equina. Arqs Inst. Biol., S. Paulo, 27:93-96.
- Galton, M.M., Menges, R.W. & Shotts Jr., E.B. 1960. Leptospirosis. Methods in laboratory diagnosis. Public Health Service, U.S. Dep. Health, Education and Welfare, Atlanta. 31 p.
- Guida, V.O. & Barros, W.M. 1958. Pesquisa de aglutininas e lisinas antileptospira em soros de bovinos aparentemente normais, sacrificados em matadouro. Biológico, S. Paulo, 24: 26-27.
- Guida, V.O., Santa Rosa, C.A., D'Apice, M., Corrêa, M.O.A. & Natale, V. 1959. Pesquisa de aglutininas antileptospira no soro de bovinos do Estado de São Paulo. Arqs Inst. Biol., S. Paulo, 26:109-117.
- Hoare, R.J. & Claxton, P.D. 1972. Observation on *Leptospira hardjo* infection in New South Wales. Aust. vet. J. 48:228-232. (Vet. Bull. 42, Abstr. 6199)
- Hoeden, J. van der 1958. Epizootiology of leptospirosis. Adv. vet. Sci., p. 277-339.
- Korthof, G. 1932. Experimentelles Schlammbieber beim Menschen. Zbl. Bakt. 125:425. (Citado por Alston & Broom 1958)
- Lacerda Jr. P.M.G., Freitas, D.C. & Lacerda, J.P.C. 1960. Notas sobre leptospirese bovina. Arqs Inst. Biol., S. Paulo, 27: 87-91.
- Lataste-Dorolle, C. 1965. Agglutinines anti-leptospire chez les bovins apparemment normaux. Bull. Off. int. Epizoot. 63:891-905.
- Michin, N.A. & Azinov, S.A. 1935. Spirochaeta jaundice of cattle in North Caucasus (título traduzido). Sovyet. vet. 10: 23-27. (Vet. Bull. 7, p. 419)
- Nikolajev, I.I. 1946. Leptospirosis in the USSR. Med. Parasit., Moscow, 15:65. (Citado por Alston & Broom 1958)
- Riel, J. van & Bienfet, V. 1953. Enquête sur l'existence de la leptospirese bovina em Belgique. Bull. Acad. Méd. Belg. 18: 472-488.
- Roth, E.E. & Galton, M.M. 1960. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Louisiana. Am. J. vet. Res. 21:422-427.
- Ryu, E. 1971. Chronological reference of leptospire and leptospirosis. Res. Inst. Vet. Med., Natl. Taiwan Univ., Taipei. 145 p.
- Santa Rosa, C.A. 1970. Leptospirose em animais silvestres. Isolamento de um novo sorotipo, *Brasiliensis*, no sorogrope *Bataviae*. Tese, Fac. Ciênc. Méd. Biol. Botucatu, S. Paulo. 55 p. (Mimeo.)
- Santa Rosa, C.A. 1971. Comunicação pessoal.
- Santa Rosa, C.A., Castro, A.F.P. & Troise, C. 1961a. Isolamento de *Leptospira iterohaemorrhagiae* de bovino em São Paulo. Arqs Inst. Biol., S. 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., S. Paulo, 28:169-174.
- Santa Rosa, C.A., Castro, A.F.P. & 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., Silva, A.S. & Teruya, J.M. 1969/70. Nove anos de leptospirese no Instituto Biológico de São Paulo. Revta Inst. Adolfo Lutz, S. Paulo, 29/30:19-27.
- Stoener, H.G. 1967. Leptospirosis abortion of beef cattle caused by *Leptospira pomona* and *Leptospira hardjo*. J. Am. vet. med. Ass. 151:1087-1090.
- Stuart, R.D. 1946. The preparation and use of a simple culture medium for leptospirae. J. Path. Bact. 58:343-349.
- Sullivan, N.D. 1972. Further observations on *Leptospira hardjo* infections in pregnant cows. Aust. vet. J. 48:388-390. (Vet. Bull. 42, Abstr. 6797)
- 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.
- 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.
- World Health Organization 1967. Current problems in leptospirosis research. Report of a WHO Expert Group. Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser. 380.

ABSTRACT.- Cordeiro, F.; Guida, H.G.; Ramos, A.de A.; Mendoza, T.R. [*Antileptospira agglutinins in bovine sera of Rio de Janeiro State, Brazil*]. Aglutininas antileptospira em soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1975) 10, 9-19 [Pt, en] EMBRAPA/RJ, Km 47, Rio de Janeiro, RJ, ZC-26, Brazil.

Bovines sera (1,562) from 28 municipalities of the State of Rio de Janeiro were examined by the microscopic agglutination test with 17 live antigens of leptospiras. Positive reactions with titres starting at 1:100 were observed in 21,85% of the sera, consisting mainly of serotypes *wolffi*, *tarassovi*, *grippotyphosa*, *pomona*, *bratislava* and strain *Mm-2*. The highest titres were found with strain *Mm-2* (1:102,400) and the serotypes *wolffi* (1:12,800) and *pomona* (1:3,200). Co-agglutinations were also observed. Cows with positive agglutination reactions were observed in 54 of 64 farms studied (84,37%). Homogenic micro-region and altitude affected the prevalence of reactivity in animals, and an increased rate of positive reactions occurred up to an altitude of 400 m. The municipalities of Cabo Frio, Miracema, Nova Iguaçu and Macaé had highest prevalence of positive reactions. The use of pooled sera in the screening of the positive animals was very useful, as it afforded an economy in time and material.

Additional index words: *Wolffi*, *tarassovi*, *grippotyphosa*, *pomona*, *bratislava*, strain *Mm-2*.