

FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp EM REBANHOS BOVINOS DA BACIA LEITEIRA DO CAPARAÓ, ESTADO DO ESPÍRITO SANTO



Kelvinson Fernandes Viana¹, Marcos Santos Zanini², Elvio Carlos Moreira³

¹ Universidade Federal de Ouro Preto - kelvinsonviana@yahoo.com.br

² Universidade Federal do Espírito Santo

³ Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO: Foram colhidas 330 amostras de soro bovino provenientes de 55 propriedades rurais da Bacia leiteira do Caparaó, Estado do Espírito Santo, testadas pelo método de Soro Aglutinação Microscópica (SAM) para oito sorovares, sendo encontrada uma frequência de 12,42% (41) de animais reagentes para pelo menos um sorovar testado. O sorovar Hardjobovis apresentou-se como o mais frequente entre os soros reagentes com 41 (12,42%) amostras, seguido de Hardjo amostra Bolívia com 32 (9,69%), Hardjo amostra Lagoa com 30 (9,09%), Hardjo Norma com 21 (6,36%), Hardjo OMS com 20 (6,06%) e Wolffi com 8 (2,42%), não havendo nenhuma reação positiva para os sorovares Pomona e Hebdomadis. Entre as 41 amostras reagentes, 100% delas foram reagentes ao sorovar Hardjobovis seguido do sorovar Hardjobovis amostra Bolívia com 32 (78,04%) amostras, Hardjobovis amostra Lagoa com 30 (73,17%), Hardjoprajitno amostra Norma com 21 (51,21%), Hardjoprajitno amostra OMS com 20 (48,78%) e sorovar Wolffi com 8 (19,51%), não havendo soros reagentes frente aos sorovares Pomona e Hebdomadis. Os resultados obtidos demonstraram que o sorovar Hardjobovis provavelmente é o agente causador da maioria dos problemas ligados a infecção por bactérias do gênero *Leptospira* spp na região estudada.

Palavras-chave: anticorpos; bovino leiteiro; Espírito Santo; *Leptospira* spp; sorovares

FREQUENCY OF ANTIBODIES ANTI-*Leptospira* spp IN CATTLE HERDS OF DAIRY IN BASIN CAPARAÓ, STATE OF ESPÍRITO SANTO, BRAZIL

ABSTRACT: We collected 330 serum samples from 55 dairy farms in the Basin of Caparaó, State of Espírito Santo, elaluated by microscopic agglutination (MAT) for eight serovars, found a frequency of 12.42% (41) of reactor animals for at least a serovar tested. Serovar hardjobovis presented himself as the most frequent among reactive sera with 41 (12.42%) samples, followed by Bolivia with 32 Hardjo sample (9.69%), sample Hardjo Lagoa 30 (9.09%) Hardjo Norma with 21 (6.36%), Hardjo WHO 20 (6.06%) and Wolffi with 8 (2.42%), with no positive reaction against serovars Pomona and Hebdomadis. Among the 41 samples reagents, 100% of them were reactive to serovar hardjobovis followed by serovar hardjobovis Bolivia with 32 samples (78.04%), sample Hardjobovis Lagoa 30 (73.17%), Hardjoprajitno Norma sample with 21 (51.21%), WHO Hardjoprajitno sample with 20 (48.78%) and serovar Wolffi with 8 (19.51%), with no front seropositivity to serovars Pomona and Hebdomadis. The results showed that the serovar Hardjobovis probably is the causative agent of most problems related to infection by bacterium of the genus *Leptospira* spp in this region.

Key words: antibodies; dairy cattle; Espírito Santo; *Leptospira* spp; serovars

INTRODUÇÃO

A leptospirose, zoonose bacteriana naturalmente transmissível entre animais vertebrados e o homem, com vasta distribuição geográfica, está presente em todo o mundo. É particularmente prevalente em países de clima tropical a subtropical, principalmente nos períodos de altos níveis pluviométricos (Blood et al., 1983). A leptospirose bovina é uma doença com grande impacto econômico, afetando profundamente os aspectos econômicos, principalmente pela redução na produção animal e pela baixa fertilidade dos plantéis, bem como aqueles fatores relacionados à saúde pública (Langoni et al., 2000).

No Brasil, vários inquéritos sorológicos relacionados à leptospirose dos bovinos já foram concretizados, mostrando que a infecção encontra-se amplamente difundida no país (Ávila et al., 1978, Moreira et al., 1979, Giorgi et al., 1981, Ribeiro et al., 1988, Girio e Mathias, 1989, Brod et al., 1995). Várias infecções pelos sorovares de *Leptospira* são de caráter subclínico, particularmente em animais não gestantes e não lactantes, sendo detectada apenas pela presença de anticorpos ou lesões de nefrite intersticial à necropsia (Bolin e Alt, 1999).

A infecção em bovinos está relacionada principalmente a problemas na esfera reprodutiva (Coghlan e Bain, 1969, Lilenbaum, 1996); causando abortos principalmente no terço final da gestação, natimortos, reabsorção fetal, nascimento de animais debilitados e infertilidade, podendo a fêmea necessitar de 3 a 6 coberturas para conceber. Segundo Sullivan et al. (1970), citado por Rodrigues et al. (1999), pode ocorrer mastite clínica ou subclínica, com alterações nas características macroscópicas do leite, com estrias de sangue, ocasionando elevada redução na produção. No Brasil, a leptospirose

bovina não é considerada doença de notificação compulsória (MAPA), não sendo por isso, submetida ao controle por órgãos e entidades públicas federais ou estaduais que tratam da sanidade animal. Esse fato dificulta conhecer a extensão do contágio ambiental, bem como das infecções por *Leptospira* spp. em nosso país.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp bem como a prevalência dos principais sorovares em soros de 330 vacas em período de lactação na Bacia leiteira do Caparaó, Estado do Espírito Santo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram escolhidas 55 propriedades aleatoriamente para esse estudo durante o período de março de 2007 a março de 2008, através de uma lista de propriedades rurais cadastradas no Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF). A área geográfica onde se situam as propriedades estudadas abrange a região do Caparaó que engloba os municípios de Alegre, Divino de São Lourenço, Dolores do Rio Preto, Guaçuí, Ibatiba, Ibitirama, Irupí, Luna e Muniz Freire, correspondendo à região de maior produção leiteira do Estado, não havendo histórico de vacinações contra leptospirose segundo informações colhidas em cada propriedade.

Para o cálculo da amostragem, foi esperada uma prevalência de 50%, grau de confiança de 95% e o erro não ultrapassando 6% da prevalência, obtendo um $n = 266$ animais. Ficou estabelecida uma percentagem de 10% de amostras coletadas em cada propriedade, gerando um total de 330 amostras de soros sanguíneos de vacas em período de lactação com histórico de

Tabela 1 - Sorovares de *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* usados no teste de soroaglutinação microscópica

Sorogrupo	Sorovar	Amostra de Referência
Serjoe	Hardjo	Hardjoprajitno (OMS)
	Hardjo	Hardjoprajitno (Norma)
	Hardjo/Hardjobovis	Sponcelee
	Hardjo/Hardjobovis	Bolívia*
	Hardjo/Hardjobovis	Lagoa*
	Wolffi	3705
Pomona	Pomona	Pomona
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis

* Amostras recentemente isoladas na UFMG, incluídas no teste sob orientação do Prof. Dr. Elvio Carlos Moreira (dados não publicados).

não recebimento de doses de alguma vacina comercial contra leptospirose.

O sangue foi colhido da veia caudal externa em tubos Vacutainer® de 10 mL com vácuo em seu interior, sendo armazenados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo onde foi precedida a centrifugação a 3500rpm durante 20min, extração do soro e armazenamento a -20°C. Todo o material foi enviado para o Laboratório de Zoonoses da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais onde foi realizado o teste de Soro Aglutinação Microscópica (SAM) sendo empregado um total de oito sorovares, sendo eles, Hardjobovis, Hardjoprajitno amostra Norma, Hardjoprajitno amostra OMS, Hardjobovis amostra Bolívia, Hardjobovis amostra Lagoa, Hebdomadis, Pomona e Wolffi (Tabela 1), seguindo normas técnicas contidas no Manual de Controle da Leptospirose, (1989). Primeiramente, foi realizada a triagem qualitativa dos soros testados, considerando reagentes os soros que aglutinaram 50% ou mais das leptospirosas vivas contidas na solução antigênica.

As amostras reagentes a um ou mais sorovares foram submetidas novamente a SAM para definição do título máximo de anticorpos para um

dado sorovar. A leitura das reações de micro aglutinação foi realizada em microscópio de campo escuro Genix 3® utilizando objetiva de 40X.

A avaliação das diferenças estatísticas entre as frequências observadas para as soroviedades Hardjo (genótipo Hardjoprajitno - amostra Norma), Hardjo (genótipo Hardjoprajitno - amostra OMS), Hardjo (Hardjobovis) Hardjo (Hardjobovis amostra Bolívia), Hardjo (Hardjobovis amostra Lagoa) e Wolffi, foi realizada utilizando-se o teste do qui-quadrado com nível de significância $P < 0,05$ (Sampaio, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as 330 amostras analisadas, 41(12,42%) delas apresentaram reação aglutinante a pelo menos um sorovar. Entre as 41 amostras reagentes, todas (100%) apresentaram aglutinação frente ao sorovar Hardjobovis. Destas, trinta e duas amostras (78,04%) foram reagentes ao sorovar Hardjobovis amostra Bolívia; Trinta amostras (73,17%) reagentes ao sorovar Hardjobovis amostra Lagoa, vinte e uma amostras (51,21%) reagentes ao sorovar Hardjoprajitno amostra Norma, vinte amostras (48,78%) reagentes frente ao sorovar Hardjoprajitno amostra OMS e oito amostras (19,51%) reagiram frente ao sorovar Wolffi, não havendo nenhuma reação aglutinante frente aos

Tabela 2 - Resultados da sorologia de amostras precedentes da região do Caparaó-ES no período de março de 2007 a março de 2008, realizada frente a oito sorovares do gênero *Leptospira* pelo teste de SAM

Sorovar	Número de animais Reagentes	Porcentagem de reagentes entre os positivos	Porcentagem de reagentes no total de amostras (330)	Titulações
Hardjobovis	n=41	100%	12,42%	800
Hardjobovis amostra Bolívia	n=32	78,04%	9,69%	800
Hardjobovis amostra Lagoa	n=30	73,17%	9,09%	800
Hardjoprajitno amostra Norma	n=21	51,21%	6,36%	400
Hardjoprajitno amostra OMS	n=20	48,78%	6,06%	100
Wolffi Amostra 3705	n= 8	19,51%	2,42%	100
Pomona Amostra Pomona	n= 0	0,0%	0,0%	0
Hebdomadis Amostra Hebdomadis	n= 0	0,0%	0,0%	0

sorovares Pomona e Hebdomadis. O resultado da frequência de anticorpos anti *Leptospira* spp em soros sanguíneos de bovinos da região do Caparaó encontram-se na Tabela 2.

Os resultados da frequência de 12,42% de soros reagentes ao sorovar Hardjo e 2,42% para o sorovar Wolffi no Estado do Espírito Santo são similares aos encontrados por Favero et.al. (2001) no mesmo Estado, os quais obtiveram uma maior porcentagem para o sorovar Hardjo (58,8%), e menor para Wolffi (11,7%) entre 270 amostras examinadas. Porém, a prevalência de animais reagentes encontrada pelo mesmo autor (62,2%) e a porcentagem de propriedades consideradas foco por terem animais reagentes (94,4%) diverge da concluída no presente estudo, que obteve 12,48% de animais reagentes em um total de 49,09% de propriedades positivas. Entretanto, deve-se considerar que o trabalho desenvolvido por Favero et al. (2001) foi conduzido em outros municípios deste mesmo Estado que não estiveram presentes neste estudo (Aracruz, Baixo Guandu, Cachoeiro do Itapemirim, Castelo, Ecoporanga, Jerônimo Monteiro, Linhares, Mimoso do Sul, Muqui, Presidente Kenedy e Serra).

Em relação ao resultado do teste de qui-quadrado, ficou demonstrado que não houve diferenças significativas entre as frequências dos sorovares nos rebanhos, resultado este que sugere

uma aleatoriedade na circulação das leptospiros nos animais estudados, não havendo correlação com as propriedades antigênicas de cada sorovariedade. No entanto, em um inquérito sorológico desenvolvido por Araújo et al. (2005), foi observado que as diferenças de porcentagens nos rebanhos estariam associadas às propriedades antigênicas de quatro amostras Hardjo (Norma) (23,7%), Hardjo OMS (19,7%), Hardjo (Hardjobovis) (13,8%) e Wolffi (13,2%), indicando a provável distribuição das sorovarietades de leptospiros no Estado de Minas Gerais.

Os inquéritos sorológicos realizados no rebanho bovino nacional até o ano de 1980 apresentavam índices de animais positivos para leptospiroses de 15 a 18%, com predomínio de reações para a variante sorológica Wolffi (Santa Rosa et al., 1970; Moreira., 1979; Oliveira et al., 1980). Contudo, levantamentos mais recentes revelam uma modificação desta situação, com elevação dos índices de animais reagentes para 20 a 70% e predomínio da sorovariedade Hardjo (Ellis, 1994; Vasconcellos et al., 1997; Fávero et al., 2001; Homem et al., 2001; Herrmann, 2002; Araújo et al., 2005).

No Brasil, o sorovar Hardjo, Wolffi, Pomona, Grippotyphosa e Australis foram predominantes em rebanhos dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Minas

Gerais e Mato Grosso do Sul, com prevalência de 60,43% em um total de 2449 bovinos (Vasconcellos, 1997). Já na microrregião de Goiânia, os resultados indicaram uma prevalência de apenas 5,20% para Hardjo entre 426 animais, ficando clara a predominância do sorovar Wolffi (36,1%) no rebanho estudado (Juliano et al., 2000).

Em inquérito recentemente desenvolvido no Estado da Bahia, a prevalência de animais sororeagentes observada foi de 45,42%, havendo predominância da sorovariedade Hardjo (Hardjoprajitno) 34,49% em um total de 10823 amostras (Oliveira et al., 2009). Curiosamente, em trabalho desenvolvido por Rodrigues et al. (1999), ficou demonstrado que o sorovar *Icterohaemorrhagiae* foi o mais prevalente (28,91%) em um total de 1253 fêmeas bovinas da bacia leiteira da região de Londrina, ficando o sorovar Hardjo com 10,84% e Wolffi 6,02%.

Moreira et al. (1979) examinaram 3.727 bovinos do Estado de Minas Gerais em experimento delineado com amostragem aleatória planejada para determinação de prevalência e observaram 12,10% de animais reagentes para o sorovar Wolffi e 11,11% para o sorovar Hardjo; este foi o primeiro registro de bovinos reatores para o sorovar Hardjo no Brasil. Salienta-se, contudo que nesta ocasião a frequência de reagentes para o sorovar Wolffi foi superior à observada para o sorovar hardjo.

O sorovar Hardjo é considerado o mais patogênico para os bovinos, os quais se comportam como reservatórios para a manutenção da infecção nos rebanhos (Moreira, 1994). A predominância de soros reagentes ao sorovar Hardjo em rebanhos bovinos no país está de acordo com dados verificados em países de outros continentes, situação provavelmente favorecida pelo comércio internacional

de reprodutores ou de material para reprodução (Rende e Ávila, 2003).

A existência de um número predominante de determinados sorovares em diversas regiões, torna difícil o desenvolvimento de uma vacina universalmente eficaz (Zhijun et al., 2007). Outro fato, é que as leptospirosas têm evoluído de maneira a escapar dos mecanismos de defesa do sistema imunológico, principalmente à imunidade inata, visto que tem sido demonstrado que as espiroquetas ligam-se a uma proteína reguladora C4BP, e desta maneira, conseguem escapar do sistema complemento (Barbosa et al., 2009).

A alternativa mais eficaz para controlar as leptospiroses em bovinos é o uso de vacina elaborada com a sorovariedade específica prevalente na propriedade, porém, na maioria das vezes, os proprietários adquirem vacinas comerciais que nem sempre contem as amostras apresentadas pelos animais, isso interfere no sucesso da profilaxia, levando à manutenção de sorovares circulantes nos rebanhos e, conseqüentemente, as leptospirosas continuam causando transtornos de produção e reprodutivos nos bovinos, além de estarem constantemente oferecendo riscos à saúde humana.

É importante salientar que na grande maioria dos inquéritos epidemiológicos desenvolvidos no Brasil, o sorovar Hardjobovis não está incluído, devido principalmente ao fato de muitos laboratórios de diagnóstico não o possuírem, utilizando em seus testes, somente o sorovar Hardjoprajitno amostras Norma ou OMS. Da mesma forma em que o sorovar Hardjobovis foi o mais frequente na região estudada, é possível que em determinadas regiões do país o sorovar mais prevalente não seja o Hardjoprajitno como tem sido demonstrado em outros trabalhos que o sorovar Hardjobovis não estava incluído nas baterias de testes.

No presente estudo, os animais avaliados não apresentavam nenhuma forma clínica da enfermidade e, baseando-se na literatura, era esperado que os sorovares mais prevalentes encontrados fossem do sorogrupo Serjoe. No entanto, os autores julgaram importante o conhecimento das amostras dos sorovares Hadjobovis e Hardjoprajitno que se encontravam circulantes entre os rebanhos da região avaliada. De fato, os resultados foram satisfatórios para este entendimento, bem como, para se obter um parâmetro entre os diversos resultados de inquéritos epidemiológicos em que o sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) amostras OMS e Norma encontra-se em maior prevalência.

Neste contexto, é importante que o sorovar Hadjobovis seja incluído em futuros inquéritos epidemiológicos, no sentido da obtenção das diferenças entre este sorovar e o Hardjoprajitno, bem como suas amostras, visto que o sucesso na profilaxia da infecção por *Leptospira* spp depende da inclusão correta de sorovares presentes em determinada região na vacina que será utilizada no rebanho. Além disso, o conhecimento específico das amostras dos sorovares enriquece não somente a composição do imunobiológico, como também pode levar o sistema imune do animal a uma resposta humoral mais específica frente aos determinantes antigênicos distintos em cada amostra de *Leptospira*.

CONCLUSÃO

O sorovar Hadjobovis é o principal sorovar na Bacia leiteira do Caparaó, causando infecções clínicas e sub-clínicas que podem passar despercebidas na região estudada. Outros sorovares como o Hadjobovis amostra Bolívia, Hadjobovis amostra Lagoa, Hardjoprajitno (Norma), Hardjoprajitno (OMS) e Wolffi agem

sinergicamente tornando a frequência deste tipo de infecção ainda maior.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, V.E.M.; MOREIRA, E.C.; NAVEDA, L.A.B. et al. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.4, p.430-435, 2005.
- ÁVILA, F.A.; COSTA, A.J.; MORAES, F.R. Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em soros de bovinos no município de Jaboticabal, Brasil. **Científica**, v.6, n.3, p.451-453, 1978.
- BARBOSA, A.S.; ABREU, P.A.E.; VASCONCELLOS, S.A. et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v.77, n.3, p.1137-1143, 2009.
- BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A.; RODOSTITS, O.M. **Clínica veterinária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 554 p.
- BOLIN, C.A.; ALT, D.P. Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. **Bovine Practice**, v.33, n.1, p. 50-55, 1999.
- BROD, C.S.; MARTINS, L.F.S.; NUSSBAUM, J.R. et al. Leptospirose bovina na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v.84, n.3, p.15-20, 1995.
- COGHLAN, J.D.; BAIN, A.D. Leptospirosis in human pregnancy followed by death of the foetus. **British Medical Journal**, v.1, n.2, p.228-230, 1969.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Veterinary Clinical North America: **Food Animal Practice**, v.10, n.3, p.463-78, 1994.
- FAVERO, M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A. et al. Leptospirose bovina – variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 Estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p.29-35, 2001.
- GIORGI, W. TERUYA, J.M.; SILVA, A.S. et al. Leptospirose: resultados das soroaglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo durante os anos de 1974/1980. **Biológico**, v.47, n.11, p.299-309, 1981.
- GIRIO, R.J.S.; MATHIAS, L.A. Ocorrência de leptospirose em rebanhos bovinos produtores de leite tipo B na região Norte do Estado de São

- Paulo. **Ciências Veterinárias** v.3, n.1, p.3-5, 1989.
- HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; MORAES, Z.M. et al. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.2, n.34, p.173-180, 2001.
- HERRMANN, G.P. **Leptospira sp em ovinos do Rio Grande do Sul: soroprevalência e avaliação da imunogenicidade da bactéria L. Hardjo**. 2002. Belo Horizonte, 41f. Tese (Doutorado). – Curso de Pós Graduação em Ciência Animal - Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais.
- JULIANO, R.S; CHAVES, N.S.T; SANTOS, C.A. et al. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – GO, **Ciência Rural**, v.30, n.5, p.857-862, 2000.
- LANGONI, H., MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S. et al. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.67, n.1, P. 37-41, 2000.
- LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.18, n.1, p.9-13, 1996.
- MANUAL DE CONTROLE DA LEPTOSPIROSE. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde-Leptospirose. Centro Nacional de Epidemiologia. **Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1989. 98p.
- MOREIRA, E.C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros**. 1994. Belo Horizonte. 110f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós Graduação em Ciência Animal - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- MOREIRA, E.C.; SILVA, J.A.; VIANA, F.C. et al. Leptospirose bovina: Aglutininas anti-*Leptospiras* em soros sanguíneos de bovinos em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.31, n.3, p.375-388, 1979.
- OLIVEIRA, S.J.; PLANTA, C. GOMES, M. et al. Abortamentos em bovinos no Rio grande do Sul, Brasil; isolamento de leptospiroses do sorogrupo Hebdomadis. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**. v.5, n.3, p.51-56, 1980.
- OLIVEIRA, F.C.S.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO, S.R. et al. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.4, p.539-546, 2009.
- RENDE J.C.; ÁVILA, F.A. Leptospirose bovina: perfil epidemiológico e dinâmica de infecção como zoonose. **Ars. Veterinária**, v.19, n.1, p.71-79, 2003.
- RIBEIRO, S. C. A.; GOUVEIA, M. A. V.; SILVA, P. L. Levantamento sorológico em dois surtos de leptospirose bovina em Uberlândia, Triângulo Mineiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.40, n.6, p.415-423, 1988.
- RODRIGUES, C.G.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C. Leptospirose bovina: Sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Paraná, Brasil, **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.309-314, 1999.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 133p.
- SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**. v.1, n.2, p.97-109, 1970.
- VASCONCELLOS, S.A.; BARBARINI J.R.O.; UMEHARA, O. et al. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, período de janeiro à abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.7-15, 1997.
- ZHIJUN, W.L.; ALICJA, W. Leptospirosis vaccines; **Microbial Cell Factories**, v.6, n.1, p.29-39, 2007.