

Rogério Oliveira Rodrigues

**EFICÁCIA DE UM TESTE "IN VITRO" DE BACTERINA ANTI-LEPTOSPIRA
hardjo EM OVINOS.**

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

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Élvio Carlos Moreira

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2004

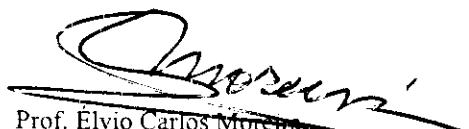
R696e Rodrigues, Rogério Oliveira, 1975-
Eficácia de um teste "in vitro" de bacterina anti-leptospira hardjo
em ovinos / Rogério Oliveira Rodrigues. –2004.
38 p. :il.

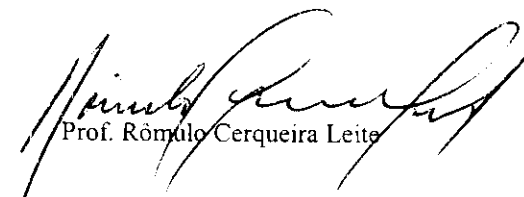
Orientador: Élvio Carlos Moreira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Bibliografia: p.

1. Ovino – Teses. 2. Leptospirose – Vacinas – Teses. 3. Leptospirose
em animais – Teses. 4. Leptospira – Teses. I. Moreira, Élvio Carlos.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
III. Título.


CDD – 636.308 96

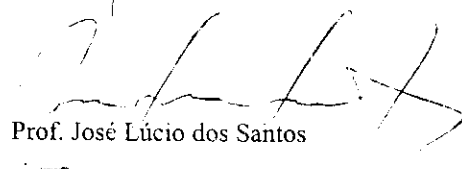
Dissertação defendida e aprovada em 20 de fevereiro de 2004, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Elvio Carlos Moreira
Orientador


Prof. Rômulo Cerqueira Leite


Prof. Jose Ailton da Silva


Prof. Geder Paulo Herrmann


Prof. José Lúcio dos Santos

Meus pais Josias e Natalia Rodrigues pelo exemplo, compreensão e sacrifícios durante anos.

Aos meus irmãos Junior e Renato pelo sofrimento de termos de abandonar nossos pais em busca de nossos sonhos.

Aos meus sobrinhos Larissa, Laurinha, Bruninho, Gabriela e mais o que está por vir que será muito amado e querido, pela falta que senti esses anos longe de vocês.

"Nunca ore suplicando cargas mais leves e sim, ombros mais fortes".
Philips Brooks

Céu, Sol, Sul

*Eu quero andar nas coxilhas
sentindo as flechilhas das ervas do chão
ter os pés mesteados de campo,
fica: mais trigueiro do que sol de verão.
Fazer versos,
cantar as belezas desta natureza sem par
e mostrar para quem quiser ver
o lugar para viver sem chorar.*

*É o meu Rio Grande do Sul,
Céu, Sol, Sul, Terra e Cor
Onde tudo que se planta cresce
e o que mais floresce é o amor.
Eu quero me banhar nas fontes
e olhar horizontes com Deus
e sentir que as cantigas nativas
continuam vivas para os filhos meus.
Ver os campos florindo e
crianças sorrindo e felizes a cantar,
e mostrar para quem quiser ver
o lugar para viver sem chorar*

Jader Moreci Teixeira

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Élvio Carlos Moreira, meu orientador e mestre que com carinho me acolheu em um momento difícil da minha vida e soube guiar meus passos até aqui.

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite meu Co-orientador e amigo que com decisões firmes me ajudou na realização deste trabalho e pela afeição que possui por minha pessoa.

Ao Prof. Geder Paulo Herrmann meu estimado mestre que muitas vezes assumiu a função de Pai, pelo incentivo e compreensão durante todos esses anos, pois é o grande responsável pela minha caminhada desde a graduação até a Pós-graduação.

Aos Professores Andrey Pereira Lage e Zélia Inês Portela Lobato por terem cedido seus laboratórios para a realização deste trabalho.

Aos Professores José Ailton da Silva, Francisco Cecílio Viana, por estarem sempre dispostos a sanarem minhas dúvidas durante o curso.

A Prof(a). Celina Maria Modena pelas orientações informais nos ante-projetos, incentivos na busca do conhecimento e pela amizade.

À Prof(a) Ângela Maria Quintão Lana pela contribuição valiosa na parte de estatística deste trabalho.

Ao Prof. Daniel Roulim Stainki da PUC-RS pela oportunidade da convivência, sempre soube ouvir minhas angústias e sabiamente emitiu sua opinião.

Ao meu grande amigo Antônio Benjamin de Paula "Tônico", pela ajuda na parte laboratorial, pois através de seus conhecimentos práticos me ajudou na elaboração desta dissertação.

As minhas amigas Liz Adhara e Suely Tocantins pelas alegrias e tristezas que compartilhamos ao longo do curso.

A graduanda em Medicina Veterinária da UFSM, Vanessa Mottin, uma grande mulher.

Aos Médicos Veterinários Ricardo Miranda Leite, Cristiano Melo, Paulo Konrad amigos e companheiros nas horas de descontração.

Aos veterinários e amigos Oliver Daza e Ademir Mendonça que com paciência e determinação ajudaram nas "intermináveis" coletas.

Aos Funcionários de DMVP e da FEP-MVZ, em especial Nádia, Nelson, Jorge, Júnia e Ângela que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

As funcionárias do Colegiado de Pós-graduação Eliana e Nilda sempre prestativas nas suas funções orientando os alunos de Pós-graduação.

Ao Prof. Iran Borges pela ajuda para encontrar uma propriedade de criação de ovinos que possuísse as características desejadas e ao Médico Veterinário Rodrigo Orzil Viana por ter cedido a propriedade onde foi realizado o experimento.

As minhas cunhadas Cristiany e Adma por sempre terem me ajudado na vida e ao meu irmão Renato Rodrigues por sempre me ajudar financeiramente nos piores momentos que passei.

SUMÁRIO

	RESUMO	10
	SUMMARY	10
1.	INTRODUÇÃO	11
2.	LITERATURA CONSULTADA	12
3.	MATERIAL E METODOS	15
3.1	LOCAL E CARACTERÍSTICAS DO REBANHO.....	15
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	15
3.3	PREPARAÇÃO DA VACINA	15
3.4	PUREZA E INOCUIDADE	15
3.5	TÉCNICA DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA.....	16
3.6	TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO	16
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.	CONCLUSÕES	36
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Porcentagem de ovelhas positivas para aglutininas anti-Leptospira hardjo amostra Norma no Teste de Soroaglutinação Microscópica vacinadas e não vacinadas. MG 2003.....	19
Tabela 2	Título de aglutininas anti-leptospira no Teste de SAM de acordo com a data da coleta para hardjo amostra Norma em ovinos vacinados com diferentes adjuvantes.	20
Tabela 3	Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de hardjo amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia zero de coleta.....	25
Tabela 4	Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de hardjo amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia 30 de coleta.....	25
Tabela 5	Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de hardjo amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia 60 de coleta.....	26
Tabela 6	Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de hardjo amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia 90 de coleta.....	26
Tabela 7	Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de hardjo amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia 120 de coleta.....	27

LISTA DE FIGURAS

Gráfico 1	Títulos de aglutininas anti-leptospira do Grupo I no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 30 dias após a vacinação.	20
-----------	---	----

Gráfico 2	Títulos de aglutininas anti-leptospira do Grupo II no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 30 dias após a vacinação.	21
Gráfico 3	Títulos de aglutininas anti-leptospira do Grupo III no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 30 dias após a vacinação.	21
Gráfico 4	Títulos de aglutininas anti-leptospira entre os 3 Grupos vacinados no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 30 dias após a vacinação.	22
Gráfico 5	Títulos de aglutininas anti-leptospira do Grupo I no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 60 dias após a vacinação.	22
Gráfico 6	Títulos de aglutininas anti-leptospira do Grupo II no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 60 dias após a vacinação.	23
Gráfico 7	Títulos de aglutininas anti-leptospira do Grupo III no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 60 dias após a vacinação.	23
Gráfico 8	Títulos de aglutininas anti-leptospira entre os 3 Grupos vacinados no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 60 dias após a vacinação.	24
Gráfico 9	Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias em quatro diluições.	28
Gráfico 10	Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias na diluição de 1:2.	28
Gráfico 11	Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias na diluição de 1:4.	29
Gráfico 12	Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias na diluição de 1:8.	29
Gráfico 13	Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias na diluição de 1:16.	30
Gráfico 14	Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias em quatro diluições.	30
Gráfico 15	Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias na diluição 1:2.	31
Gráfico 16	Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias na diluição 1:4.	31
Gráfico 17	Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias na diluição 1:8.	32
Gráfico 18	Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias na diluição 1:16.	32
Gráfico 19	Nível de IgG no período de 120 dias no Grupo III nas quatro diluições.	33
Gráfico 20	Nível de IgG do Grupo III no período de 120 dias na diluição de 1:2.	33
Gráfico 21	Nível de IgG do Grupo III no período de 120 dias na diluição de 1:4.	34
Gráfico 22	Nível de IgG do Grupo III no período de 120 dias na diluição de 1:8.	34
Gráfico 23	Nível de IgG do Grupo III no período de 120 dias na diluição de 1:16.	35

RESUMO

Foi elaborada uma vacina monovalente contendo a sorovariedade hardjo amostra Norma e adsorvida em diferentes adjuvantes: Hidróxido de Alumínio e duas emulsões de água em óleo Emulsigen e a Lanolina. Oitenta ovinos com idade entre 6 meses a 1 ano de idade da raça Santa Inês foram utilizados, divididos em quatro grupos de 20 animais cada. O Grupo I foi vacinado com adjuvante Emulsigen, o Grupo II com a Lanolina e o Grupo III com Hidróxido de Alumínio e, solução salina foi aplicada no Grupo IV. O esquema de vacinação para todos os grupos foi uma dose de 3 ml para cada animal no dia zero e uma revacinação com a mesma dose trinta dias após a primeira. A imunogenicidade da vacina em todos os animais foi avaliada com 0, 30, 60, 90 e 120 dias pelo Teste de Soroaglutinação Microscópica e pelo Teste de Inibição de Crescimento. O Teste de Inibição de Crescimento revelou ser uma alternativa para avaliação de uma bacterina anti-hardjo para ovinos em substituição ao Teste de Proteção em Hamster. Os animais dos três grupos vacinados apresentaram títulos protetores apreciáveis durante os 120 dias de experimento, o adjuvante Hidróxido de Alumínio, Lanolina e Emulsigen revelaram equivalência na indução de anticorpos IgM e IgG quando utilizados em vacinas anti-leptospira hardjo em ovinos.

Palavras-Chave: Leptospira, Vacina, Ovinos

SUMMARY

A monovalent vaccine was developed in three different adjuvants containing the hardjo serovar strain Norma. Hydroxide of Aluminum, and two emulsions of water in oil Emulsigen and Lanolin were used as adjuvants. Eighty Santa Inês sheeps between 6 and 12 months of age were used; divided into four groups of 20 animals for each, the Group I received a vaccine with Emulsigen adjuvant, Group II a vaccine with Lanolin, Group III received the vaccine with Hydroxide of Aluminum and the Group IV was the control one receiving saline solution. The vaccination scheme for all of the groups was 3 ml per animal in day zero with revaccination with the same dose after thirty days. The immunogenicity of the vaccine was evaluated in all the animals within 0, 30, 60, 90 and 120 days by the of Microscopic Agglutination (MAT) test and Inhibition of Growth Test (IGT). The Test of Inhibition of Growth revealed to be an alternative for the evaluation of a anti-hardjo bacterin for sheeps. The animals of the three vaccinated groups presented appreciable protecting titles during the 120 days of experiment, the adjuvants Hydroxide Aluminum, Lanolin and Emulsigen were shown equivalent in the induction of antibodies IgM and IgG when used in vaccines anti-leptospira hardjo in sheeps.

Word-key: Leptospira, Vaccinates, Sheeps

1 - INTRODUÇÃO

A necessidade de intensificar a produção de alimentos em quantidade e qualidade, disponíveis para o homem, tem determinado a procura de alternativas de fontes de proteínas. Atualmente a carne de bovinos, aves e suínos são destacadas como as principais e com maior disponibilidade no Brasil.

A carne de ovino tem se mostrado como uma alternativa muito proeminente, principalmente por ser originária de ruminantes de pequeno porte, capazes de serem mantidos em espaços considerados pequenos, criados em harmonia com bovinos de uma mesma propriedade. São alimentados basicamente com gramíneas e leguminosas, e suplementados com capineiras, que são disponíveis e com abundância na maioria das propriedades rurais de Minas Gerais.

Estima-se que população de ovinos, de Minas Gerais, seja de 125 mil cabeças distribuídas em 13 Mesorregiões (IBGE 1996)¹, criados em regime extensivo, e geralmente para este tipo de criação não é destinado nenhum modelo tecnológico de manejo, sanidade ou melhoramento genético específicos.

Para a implantação de um sistema de produção com uma ovinocultura moderna e eficiente, são necessárias as adoções de medidas preventivas e higiênicas sanitárias, principalmente no que diz respeito no momento da aquisição de matrizes e reprodutores. Assim, são recomendadas as avaliações das características genéticas de raças mais apropriadas para produção de carne, lã e pele, acrescidos de testes imunológicos capazes de detectar animais doentes ou infectados. No caso das leptospiroses, adotar medidas de controle, sendo a vacinação eficaz e de baixo custo.

¹ [http://www.sidra.ibge.gov.br/cgr-bm/prtabr\(20/01/2004\)](http://www.sidra.ibge.gov.br/cgr-bm/prtabr(20/01/2004))

Diversas enfermidades podem determinar problemas reprodutivos e como consequência o êxito da implantação da uma ovinocultura sustentável, podendo ser destacadas neste momento as leptospiroses patogênicas dos ovinos, responsáveis por causar abortos nas diversas fases da gestação e ainda o nascimento de cordeiros fracos com morte nas primeiras semanas de vida.

As leptospiroses nos ovinos geralmente ocorrem na forma de surtos e a doença na sua forma mais grave está associada a sorovariedade *pomona*. Estudos sorológicos recentes e o cultivo de amostras provenientes de fetos ovinos abortados tem revelado também a presença da sorovariedade *hardjo*, responsável por grandes prejuízos na reprodução como o retorno ao cio, o aborto, mastite sanguinolenta nas ovelhas e o nascimento de cordeiros fracos, com a morte nas duas primeiras semanas de vida.

As primeiras evidências de que as leptospiroses poderiam ser uma grande causa de perdas econômicas nos ovinos do Brasil foram feitas em 1963 (Santa Rosa e Pestana de Castro). Estudos sorológicos realizados em países onde a ovinocultura é uma atividade econômica expressiva colocam as leptospiroses entre os principais problemas sanitários. As pesquisas feitas por (Ris, 1975), Thornton (1994) na Nova Zelândia e Gordon (1980) na Austrália, Mccaughan et al. (1980), Hathaway et al. (1982) e Ellis (1994) descrevem que a sorovariedade *hardjo* possui grande importância na ovinocultura desses países. A sorovariedade *hardjo* amostra Norma que havia sido isolada e tipificada na Holanda por Moreira (1994) em bovinos, revelou-se como a mais freqüente na pesquisa realizada por Hermann (2002) sobre a prevalência da infecção por leptospiroses em ovinos no Rio Grande do Sul. Ellis (1981) concluiu que existe associação entre as taxas de prevalência de ovinos reagentes positivos para *hardjo* e perdas reprodutivas, entre elas, abortos e nascimento de crias fracas. Esses autores consideram

necessário o isolamento pois a *hardjo* apresenta baixos títulos mesmo em infecções ativas Tornando-se então uma sorovariedade de grande importância para comporem uma vacina para esta espécie.

A utilização de uma vacina inativada com adjuvante é o método mais comum e viável economicamente em detrimento ao uso de antibioticoterapia (Little et al., 1992). A vacinação reduz o impacto econômico (Sullivan, 1974), impedindo o aparecimento dos sinais clínicos, mas não impede o estabelecimento da infecção principalmente se esta vacina possuir um grande número de sorovarietades não garantindo um número mínimo de células para cada ml da dose, sendo ideal o uso de uma monovalente com a sorovariedade presente na região.

A produção de vacinas formuladas com sorovariedade de *Leptospiras* sp específica, juntamente com a elaboração de um programa sanitário, de manejo e de melhoramento animal são medidas sanitárias importantes na criação de ovinos. A amostra utilizada nesta vacina por ser mantidas em laboratório por muito tempo, possui algumas limitações devido suas características de serem adaptadas aos ruminantes não produzindo sintomatologia clínica em hamster. O teste padrão para a avaliação de vacinas de *Leptospira* é o Teste de Proteção em hamster (USDA, 1976) sendo de difícil realização em períodos curtos de experimentação razão pela qual da utilização de um teste alternativo para avaliação de vacinas de leptospiras.

O objetivo deste trabalho foi à elaboração de uma bacterina anti-*hardjo* com diferentes adjuvantes e a avaliação da imunogenicidade destas vacinas utilizando-se um Teste alternativo de Potência em detrimento ao Teste de Proteção em Hamster.

2 - LITERATURA CONSULTADA

A infecção de ovinos por *Leptospira* sp foi detectada no Brasil pela primeira vez por Santa Rosa e Pestana de Castro, no ano de

1963, no Estado de São Paulo. Mais tarde, novos estudos surgem e concentrando-se na década de 80 no Estado da Bahia, quando Caidas et al., realizou vários inquéritos sorológicos em diferentes rebanhos com problemas reprodutivos.

Ris (1975) e Thornton (1994) na Nova Zelândia, Gordon (1980) na Austrália, Mccaughan et al. (1980), Hathaway et al. (1982) e Ellis (1994) na Irlanda e no Reino Unido, em seus estudos sorológicos, evidenciam que as infecções de ovinos por *Leptospira* sp parecem ser comuns e está associada a presença da sorovariedade *hardjo*, a maior responsável pelo grande número de perdas reprodutivas em bovinos e também causadora de um grande número de abortos nas ovelhas.

Herrmann (2002) analisando 1360 amostras de ovinos criados extensivamente nas mesoregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense determinou uma prevalência de 28,4% da sorovariedade *hardjo* amostra Norma em ovinos que eram criados nos mesmos pastos com bovinos.

No Brasil até o ano de 2002 não eram conhecidos estudos com vacina anti-*Leptospira* sp em ovinos, sendo restrito em bovinos, suínos e caninos. Novamente, Herrmann (2002) produzindo e avaliando a imunogenicidade de uma bacterina adsorvida em adjuvante oleoso e os títulos vacinais de IgM, através da Soroaglutinação Microscópica e para IgG pelo ELISA, demonstrou valores de títulos consideráveis sendo a bacterina capaz de desencadear uma resposta nos animais. Esses títulos deveriam ser confrontados e estabelecidos às relações entre os títulos de anticorpos e a proteção dos animais por ensaios de desafio com a sorovariedade *hardjo* patogênica (Faine, 1982).

Durante a infecção natural por leptospiras os animais desenvolvem uma resposta sorológica positiva significativa dentro de sete a dez dias para a sorovariedade infectante mensurada pelo Teste Soroaglutinação Microscópica. Os animais vacinados com as bacterinas comerciais

licenciadas disponíveis desenvolvem pouco ou nenhum título no Teste de Soroaglutinação Microscópica entretanto a presença de anticorpos protetores nestes soros tem sido demonstrados através do Teste de Inibição de Crescimento, Teste de Proteção em Hamsters e o desafio direto dos animais vacinados (Tripathy et al., 1976).

Tripathy et al. (1975 e 1979) avaliando as imunoglobulinas em bovinos vacinados com bacterinas de *Leptospiras* demonstrou que a Imunoglobulina G (IgG) é a principal classe de anticorpos responsável pela inibição do crescimento e que a mesma classe responde principalmente pela proteção.

Hanson (1977) afirma que após um período curto de aparecimento de aglutininas IgM, os anticorpos neutralizantes, primariamente IgG, são detectáveis. Estes anticorpos neutralizantes podem ser demonstrados pelo teste de proteção em hamster e pelo teste de inibição de crescimento e estes anticorpos podem ser produzidos ambos pela infecção ou pela inoculação com uma bacterina de *Leptospira* sp, e estes podem persistir por até anos após uma infecção e de seis até doze meses após uma vacinação.

Geralmente a primeira classe de anticorpos detectáveis no soro de um animal após estimulação antigênica é a IgM. Isto usualmente é seguido de poucos dias para o aparecimento de anticorpos da classe IgG, como a concentração de IgG aumenta a de IgM diminui, mas ambas as classes são responsáveis pela proteção que foi testada em hamsters entretanto a classe IgG foi 62% mais protetora contra 25% da classe IgM (Negi et al., 1971a).

Huhn et al. (1975) investigando a imunidade conferida por uma bacterina anti-*Leptospira pomona*, verificou que a resposta sorológica no Teste de Soroaglutinação Microscópica, após a vacinação, foi mínima e um reduzido número de animais apresentou anticorpos aglutinantes depois de um mês.

Stoenner (1975), analisando os critérios de títulos a serem considerados como positivos nas provas de aglutinação fez a observação que animais infectados com *L. hardjo*, freqüentemente não desenvolvem níveis de anticorpos suficientes para serem detectados 1:100 no Teste Soroaglutinação Microscópica.

A IgM é a principal classe de imunoglobulínica produzida durante uma resposta imune primária. Também é produzida em uma resposta secundária, mascarado pela predominância da IgG posteriormente (Berek et al., 1993) e (Tyzard, 1998).

As bacterinas estimulam a produção de ambas imunoglobulinas IgM e IgG, a resposta de IgM é de baixa magnitude e de curta duração produzindo títulos no Teste de Aglutinação Microscópica usualmente menores do que 100, no qual não interfere com o teste de diagnóstico. A resposta de IgG, não é detectada pelo Teste de Aglutinação Microscópica, que são responsáveis pelos anticorpos neutralizantes que protegem contra a leptospirose (Hanson, 1977).

É vantajoso testarem as bacterinas na produção de anticorpos aglutinantes, pois estes estão envolvidos na resposta imune humoral à infecção (Ruby et al., 1992).

O papel da resposta imune celular contra a leptospirose é ainda muito debatido, esta resposta desenvolve inicialmente a prevenção da localização renal quando a resposta imune humoral é ineficaz (Balasubramanian e Ramkrishna, 1996).

O efetivo controle da leptospirose depende de um diagnóstico acurado e do desenvolvimento de agentes imunizantes adequados. Entretanto, o desenvolvimento de vacinas múltiplas depende em parte de um meio para mensurar anticorpos protetores em animais vacinados. E a característica padrão da resposta de anticorpos à vacinação pode ser possível à avaliação sorológica da proteção

proporcionada pelas bacterinas de leptospirosas (Negi et al., 1971).

A vacinação é uma importante ação preventiva contra a infecção dos animais por leptospirosas. Para este fim, vacinas inativadas são mais utilizadas (Hanson, 1977), e sua eficácia é aumentada com a adição de adjuvantes, como o hidróxido de alumínio (Hanson, 1977). Em condições de campo, o uso de vacinas contra leptospirose reduz a ocorrência da infecção e os problemas reprodutivos causados pela variante sorológica hardjo (Bolin et al., 1989); em regiões endêmicas, a vacinação contribui substancialmente para a redução do impacto econômico da doença (Sullivan, 1974).

A vacinação não somente provém proteção da doença por *Leptospira* sp mas também reduz as chances de sobrevivência da sorovariedade infectante na população imune (Tripathy et al., 1976).

Tripathy et al. (1976) consideram a vacinação com bacterinas de leptospirosas como o método mais efetivo no controle de rebanhos susceptíveis, desde que fossem específicas contra as sorovariedades prevalentes na área. As bacterinas contra leptospirose devem ser formuladas com o menor número de sorovariedades possíveis, dando-se especial destaque para aquelas grassantes na região (Zemjanis, 1974).

Little et al. (1992) trabalhou com três estratégias no objetivo de controlar a infecção por hardjo em gado de corte na Escócia: promoveram mudanças de manejo, antibioticoterapia e vacinação. Os autores consideraram a vacinação como o único meio de controle e possível erradicação da doença. As características epidemiológicas da infecção mostraram que o programa de vacinação deve ser aplicado em todo o rebanho por um período de cinco anos.

Moreira (1994), avaliou os métodos de erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros, vacinando e acompanhando sorologicamente além da tentativa de isolamento em bovinos alcançou resultados negativos na sorologia após um período de três anos em rebanhos fechados

evidenciando a efetividade da vacinação na erradicação da doença.

Samina et al. (1997) verificaram que o uso de vacina inativada (mono ou multivalente) pode prevenir a agalaxia, mas pode não conferir proteção contra a infecção ou as localizações renais e uterina das leptospirosas, embora o grau de leptospirose possa estar relacionado aos níveis de anticorpos humorais específicos. Evidenciado pelo estudo da Bolin et al. (1989), onde ao avaliar novilhas prenhes em diversos grupos e regimes de vacinação relatou a persistência da *Leptospira* hardjo amostra hardjo-bovis, após o desafio, nos rins mas sem nenhuma evidência clínica dos animais desafiados.

A avaliação da resposta imune com o Teste de Proteção em Hamster não é somente de alto custo, mas também consome muito tempo não sendo adequada para todas as sorovariedades que não são patogênicas para esta espécie. Similamente animais vacinados e desafiados não provém um método adequado para avaliação da resposta de anticorpos como os sinais e lesões muito consideráveis (Tripathy et al., 1972).

O teste de potência preconizado para bacterinas antileptospirose (United States Department of Agriculture, 1976) prevê o ensaio em hamsters com desafio praticado com estirpes dotadas de patogenicidade regular para estes animais, o que, no entanto, não ocorre com todas as estirpes isoladas, principalmente com a sorovariedade hardjo, mesmo quando se adota o expediente da realização em passagens sucessivas na espécie (Faine, 1982 e 1999).

Uma alternativa para que este impasse seja contornado é a realização do ensaio de inibição do crescimento de leptospirosas *in vitro* (Tripathy et al., 1972); (Tripathy et al., 1973), (Tabata, 2002), o qual pode mensurar os níveis de anticorpos neutralizantes presentes no soro sanguíneo de animais vacinados, que não apresentam relação direta com os anticorpos aglutinantes demonstrados pelo Teste clássico de Soroaglutinação Microscópica (Hanson, 1977).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - LOCAL E CARACTERÍSTICAS DO REBANHO

A avaliação da imunogenicidade da bacterina anti-leptospira *hardjo* amostra Norma foi realizada na Fazenda Geo Agropecuária, localizada no município de Esmeraldas, região metropolitana de Belo Horizonte. O município está situado a 60 Km sentido oeste da capital, com uma altitude média de 703 m acima do nível do mar e coordenadas geográficas de 19° 45', 35" de latitude sul e 44° 18', 45" de longitude oeste (FIBGE, 1982).

A propriedade situa-se a 3 Km do centro da cidade de Esmeraldas, possui topografia acidentada, com áreas de várzeas, o clima é tropical úmido com temperatura média de 22°C e precipitação pluviométrica de 1150 a 1540 mm e área em torno de 450 hectares. A propriedade destina somente a criação de ovinos, o rebanho ovino é constituído de aproximadamente de 1000 ovinos deslançados da raça Santa Inês. Os animais jovens com a idade até aos 12 meses de idade são mantidos em instalações fechadas onde recebem atenção especial. Os animais acima desta idade são criados soltos no pasto.

3.2 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram realizadas quatro sorologias durante um ano para obtenção de ovinos negativos e avaliar se existia infecção por *Leptospiras sp.* na propriedade. Todos os testes foram negativos. Para teste de avaliação das vacinas foram organizados quatro grupos, denominados Grupos I, II, III e IV cada formado com 20 ovelhas. Os Grupos I, II e III foram constituídos com ovelhas de 6 meses de idade. O Grupo IV foi organizado com ovelhas de 12 meses de idade para ser o controle. Na composição desses grupos, procedeu-se um sorteio entre 200 ovinos aptos para participar da pesquisa. Foram realizadas cinco coletas de sangue dos quatro Grupos, dia 0, 30, 60, 90 e 120. Foi feita uma revacinação dos grupos I II e III 30 após a aplicação da primeira dose da vacina.

3.3 - PREPARAÇÃO DA VACINA

A bacterina foi produzida em partida única, sorovariedade *hardjo*, genótipo Hardjoprajtino, amostra Norma, foi cultivada em meio de EMJH modificado com fração "V" de albumina bovina (Ellinghausen & McCullough, 1965) por um período de 14 dias a 28°C. Quando a cultura apresentou contagem de células de aproximadamente 2×10^8 bactérias por ml, foi inativada com formalina na concentração final de 0,3%, dividida em três alíquotas de 1000 ml. Cada alíquota, a primeira e a segunda foram emulsionadas em dois adjuvantes oleosos diferentes (água-óleo), Emulsigen² e Lanolina, e uma terceira em um adjuvante não oleoso Hidróxido de Alumínio (Al(OH)₃). As duas diferentes bacterinas oleosas foram adsorvidas em um homogeneizador circular durante 24 horas com 96 rotações por minuto, e terceira bacterina formulada com a Lanolina foi emulsionada com auxílio do equipamento Ultra-Turrax³ em três ciclos de 30 minutos a 13.000 rotações por minuto com banho de gelo. As bacterinas previamente foram padronizadas com 1×10^8 células por ml (3 Escala Mcfarland).

A dose utilizada em cada ovino foi de 3,0 ml, inoculada por via subcutânea na região dorsal do terço proximal do pescoço.

3.4 - PUREZA E INOCUIDADE

As partidas foram previamente avaliadas em relação à pureza e inocuidade, conforme normas preconizadas pelo United States Department of Agriculture (1976) e OIE (2001).

A prova de esterilidade foi realizada em uma alíquota de cada partida, foram semeadas em Agar Sangue a 5%, caldos Tioglicolato de Sódio⁴, Brain Heart Infusion⁵, Tryptic Soy Broth⁶ e agar Sabouraud⁷.

² MVP Laboratories, inc., 5404 Miller Avenue, Ralston, Nebraska 68127

³ Jankle & Kinkel Ika Werk Staufen-Breisgau - TYP - T45

⁴ Becton Dickinson and Company Sparks, Maryland 21152 USA.

⁵ Becton Dickinson and Company Sparks, Maryland 21152 USA.

⁶ Difco Laboratories Detroit Michigan 48238 USA.

Em seis ovinos adultos com mais de 12 meses de idade, saudáveis e negativos na sorologia para a sorovariedade presente na vacina foram aplicadas o dobro da dose recomendada (6 ml) e observou-se as eventuais reações adversas por um período de 14 dias.

3.5 - TÉCNICA DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA

A Técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) consiste em reagir 25 µl de soro suspeito diluído 1:100, com igual volume de uma suspensão de antígeno, incubados em temperatura de 25 a 30°C por um período de tempo de 120 minutos.

O tempo de incubação foi modificado e passou-se a utilizar neste trabalho um tempo de incubação de 60 minutos 27°C ± 1 (Herrmann, 2002).

As amostras dos soros primeiramente foram diluídas em tubos de ensaio 7x120 mm com uma solução de PBS (0,02M Na₂HPO₄; 0,15 M NaCl pH 7,2).

Cada amostra do soro foi diluída inicialmente em 1:5, utilizando 200 µl de soro ovino e 800 µl de PBS. Em seguida realiza-se uma segunda diluição do soro em um segundo tubo de ensaio contendo 900 microlitros de PBS e no qual adicionava-se 100 µl de soro previamente diluído (1:5), desta forma obtinha-se uma diluição do soro de 1:5 e volume final de 1000 µl.

Obtido o volume 1000 µl da diluição do soro (1:50), era transferido para uma cubeta de depósito e no ato seguinte com uma pipeta de oito canais deposita-se 25 µl do soro, em oito poços diferentes uma fila vertical de uma microplaca de poliestireno (NUNC F), logo a seguir adicionava-se 25 µl de oito sorovariedades de antígenos diferentes uma em cada na fileira vertical, desta forma o volume final em cada poço da placa atingia 50 microlitros. As leituras das reações positivas e negativas foram feitas

⁷ Becton Dickinson and Company Sparks, Maryland 21152 USA.

diretamente na microplaca de poliestireno (NUNC "F"), com microscópio Axiolab⁸, equipado com condensador seco de campo escuro, objetiva de longa distância (LD) Epiplan 10x 0,20, oculares E-pi 10x/20 e EP-L 10x/20.

3.6 - TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO

O Teste de Inibição de Crescimento, descrito por (Tripathy, 1972), foi utilizado para determinar os títulos de anticorpos IgG dos animais vacinados para a sorovariedade hardjo amostra Norma.

Procedimentos aplicados no Teste de Inibição do crescimento:

a) Os soros foram coletados assepticamente, com tubos de coleta à vácuo com capacidade de 10 ml, permanecendo em temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente foram colocados por três horas na geladeira para favorecer a separação do soro. Em seguida, foram centrifugados e abertos no fluxo laminar para a transferência do soro para frascos de vidro, de 5 ml, tipo penicilina, previamente esterilizados.

b) O teste de esterilidade foi feito em todos os soros, semeando em meio de Tryptic Soy Broth. Os soros que apresentaram contaminação foram filtrados em filtros de diâmetro de 0,22 µm do tipo Milipore.

c) Os soros foram diluídos PBS estéril na base 2 (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16), em seguida foram inativados em temperatura de 56°C durante 30 minutos. Cada uma das 4 diferentes diluições do soro foram repetidas cinco vezes. Utilizou-se de tubos do tipo baquelite 12 x 120 estéreis primeiro era colocado 2,5 ml de meio EMJH enriquecido com fração "V" de albumina bovina e 0,2 ml dos soros das quatro diluições, e seguida adicionava-se em cada tubo 0,1 ml de uma

⁸ Axiolab. Schott-Zeiss do Brasil Ltda Av. Nações Unidas 21711, São Paulo - SP. CEP 04795-100.

cultura da serovariedade hardjo amostra Norma com 10 dias de crescimento.

d) Os tubos foram incubados por um período de sete a 10 dias a 29°C, foram examinados a turbidez, e o crescimento por aspectos visuais em seguida examinadas amostras dos tubos, colocando-se uma gota em lâmina e examinadas em microscopia de campo escuro. Foi considerada a diluição do soro que houve inibição do crescimento aquela que tinha menos de 10 bactérias por campo microscópico

3.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças de freqüência entre os grupos foram analisadas pelo teste do χ^2 conforme descrito em (Snedecor e Cochran, 1980). Para aceitar a hipótese de existência de diferença entre as vacinas, adjuvantes e o grupo controle, fixou-se o nível de significância estatística em ($p > 95\%$).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

É conhecido que as *Leptospiras* sp. possuem epitopos no envelope externo no qual os anticorpos protetores são direcionados, tanto a opsonização como a aglutinação podem facilitar a fagocitose das leptospiras por macrófagos (Ruby et al., 1992), tornando-se necessária a avaliação da resposta de IgM pelo Teste SAM. As respostas imunológicas detectadas pelo Teste de Soroaglutinação Microscópica no presente estudo não demonstraram serem adequadas para a avaliação do monitoramento da resposta à vacinação devido ao ponto de corte utilizado ser o mesmo para o diagnóstico de infecção, presumindo que a utilização com ponto de corte mais baixo e trabalhando com diluições menores obter-se-ia uma resposta mais aproximada da dinâmica das Imunoglobulinas da Classe M (IgM) semelhante aos encontrados por (Tripathy et al., 1976)

Os resultados negativos tanto para o Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) no grupo controle durante todo o período do experimento bem como os resultados

negativos no dia zero para o Teste de Inibição de Crescimento demonstraram que não houve infecção natural por *Leptospira* no período prévio estudado não havendo títulos de Imunoglobulinas da classe G anteriores a este período. Desse modo, as variações de títulos produzidas tanto pelo SAM bem como pelo Teste de Inibição de Crescimento foram devidas as estimulações antigênicas da vacinação (Tabelas 1 a 22) o que anteriormente havia sido comprovado em estudo sorológico com vacina com a sorovariedade hardjo em ovinos por Herrmann (2002).

O pico de produção de IgM foi alcançado trinta dias após a primeira vacinação (Gráficos de 1 a 4) devido a estimulação vacinal onde alcançou títulos iguais ou superiores a 1:100 contrariando aos encontrados em infecções naturais e por resposta vacinal (Stoenner, 1975) e (Hanson, 1977).

As respostas como estão representadas nos Gráficos de 5 a 8 mostram os títulos residuais com 30 dias após a segunda dose da vacina. Não houve um incremento nestes títulos de IgM, no ponto de corte utilizado no teste, atribuído ao fenômeno de mudança de classe devido à formação prévia de linfócitos B de memória na primeira vacinação (Berek et al., 1993) e (Tyward, 1998).

Os resultados do crescimento negativo de hardjo nas diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia zero estão registrados nas tabelas 3 a 6. Este fato revela que não houve imunoglobulinas da classe G (IgG) traduzindo nenhum contato anterior com a sorovariedade testada. Resultados semelhantes foram encontrados por (Tripathy et al., 1979) quando realizou pesquisa para avaliar vacina em bovinos.

Os resultados apresentados nas tabelas 7 a 10 mostram níveis consideráveis de IgG com 30 dias após a vacinação mas o pico foi atingido (Tabelas 11 a 22) e (Gráficos 9 a 23) após a revacinação no dia 60 de coleta e manteve-se inalterado até o término do experimento com 120 dias, resultados que

concordam com os encontrados por (Tripathy et al., 1973).

A persistência dos títulos de IgG até aos 120 dias do experimento infere-se que esta classe de imunoglobulina persiste por longos períodos e a sua concentração não diminui vertiginosamente por períodos inferiores a seis meses determinando não haver a necessidade de vacinações por períodos inferiores de tempo a este período, estes resultados são reforçados aos obtidos por Negi et al. (1971) onde vacinou bovinos e acompanhou por um período de 12 meses demonstrando a persistência de IgG.

Todas as diferenças de porcentagem de ovinos reagentes entre os grupos no Teste de Inibição de Crescimento a partir do dia 30 de coleta, tiveram nível de significância estatística acima de $p > 95\%$ e indicaram o desenvolvimento de resposta imune na ausência de títulos apreciáveis no Teste de Soroaglutinação Microscópica nos animais vacinados. Sabe-se que IgM é o responsável pelos títulos aglutinantes no início da resposta imune. E IgG em geral, começa predominar de 30 a 60 dias após a vacinação (Tripathy et al., 1975).

A resposta sorológica a dose usada e ao esquema adotado, com vacina monovalente pode ser considerada protetora nesse período. Assim, não haveria necessidade de revacinações em períodos iguais ou inferiores.

Pode ser inferido que todos os adjuvantes utilizados não interferiram com a performance do Teste de Inibição de Crescimento, dados semelhantes foram encontrados por (Tripathy et al., 1976; Ruby et al., 1992).

Os resultados obtidos revelaram a capacidade imunogênica da vacina adsorvida em diferentes adjuvantes. Sendo capaz de desencadear uma resposta imunológica adequada nos ovinos.

O resultado sorológico da vacinação contra *Leptospira* e o tempo de permanência de IgG em circulação durante o período observado, sugere que é seguro o período de revacinações em um espaço de seis meses.

Tabela 1. Porcentagem de aglutininas IgM anti-Leptospira hardjo amostra Norma no Teste de Soroaglutinação Microscópica em ovelhas vacinadas e não vacinadas, Minas Gerais, 2003.

Grupos	Resultados SAM														
	DIA 0			DIA 30			DIA 60			DIA 90			DIA 120		
	Nº testados	Reagentes	%	Nº testados	Reagentes	%	Nº testados	Reagentes	%	Nº testados	Reagentes	%	Nº testados	Reagentes	%
Grupo 1 (Emulsigen)	20	0	0	20	20	100	20	3	15	20	0	0	20	0	0
Grupo 2 (Lanolina)	20	0	0	19*	19	100	19	3	15,79	19	0	0	19	0	0
Grupo 3 (Hidróxido Alumínio)	20	0	0	18*	18	100	18	6	33,33	18	0	0	18	0	0
Grupo 4 (Controle)	20	0	0	20	20	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
Total	80	0	0	77	77	100	77	12	15,56	77	0	0	77	0	0

* Um animal do Grupo 2 morreu sem causa determinada durante o experimento.

** Dois animais do Grupo III morreram sem causa determinada durante o experimento.

Tabela 2. Título de aglutininas IgM anti-leptospira no Teste de SAM de acordo com a data da coleta para hardjo amostra Norma em ovinos vacinados com diferentes adjuvantes.

Dia	Título de Aglutininas											
	Grupo 1 (Emulsigen)				Grupo 2 (Lanolina)				Grupo 3 (Hidróxido Alumínio)			
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800
30	4	11	5	0	8	6	3	2	7	9	1	1
60	2	1	0	0	2	1	0	0	2	3	1	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

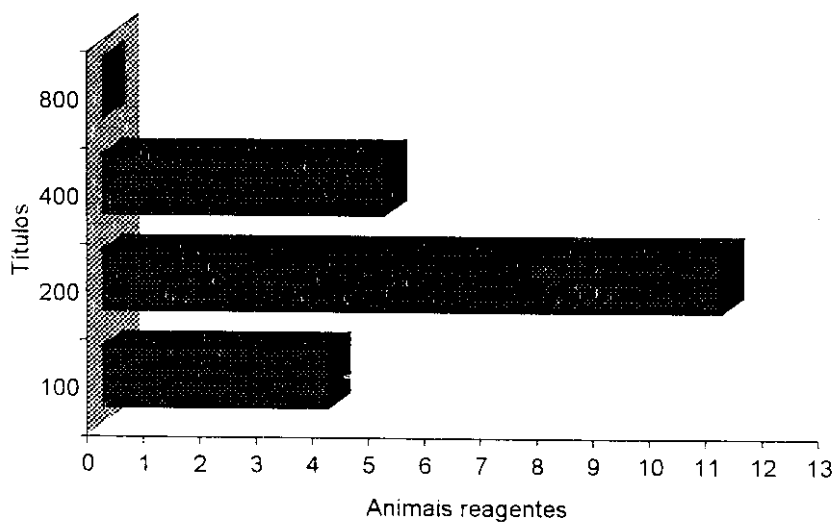


Gráfico 1. Títulos de aglutininas anti-leptospira do Grupo I no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 30 dias após a vacinação.

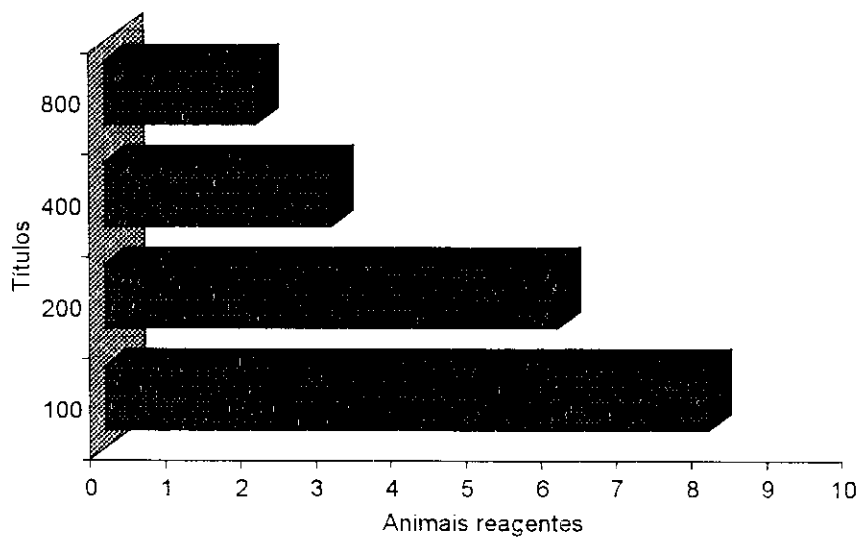


Gráfico 2. Títulos de aglutininas anti-leptospira do grupo II com 30 dias no Teste Soroaglutinação Microscópica após a vacinação.

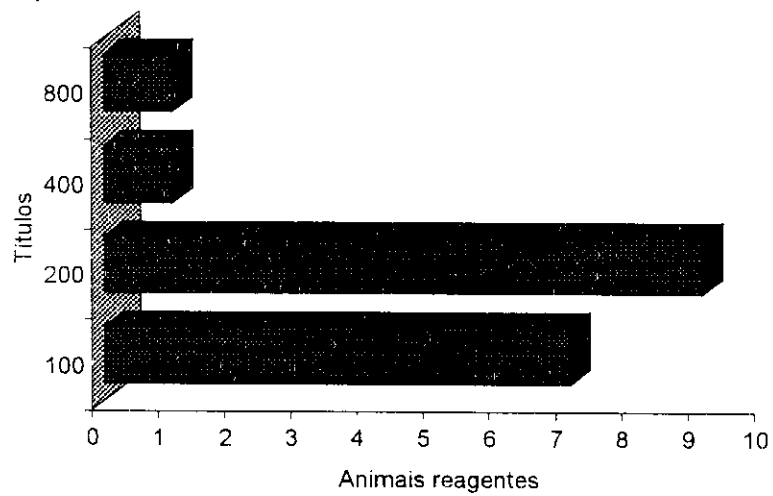


Gráfico 3. Títulos de aglutininas anti-leptospira do grupo III com 30 dias no Teste de Soroaglutinação Microscópica após a vacinação.

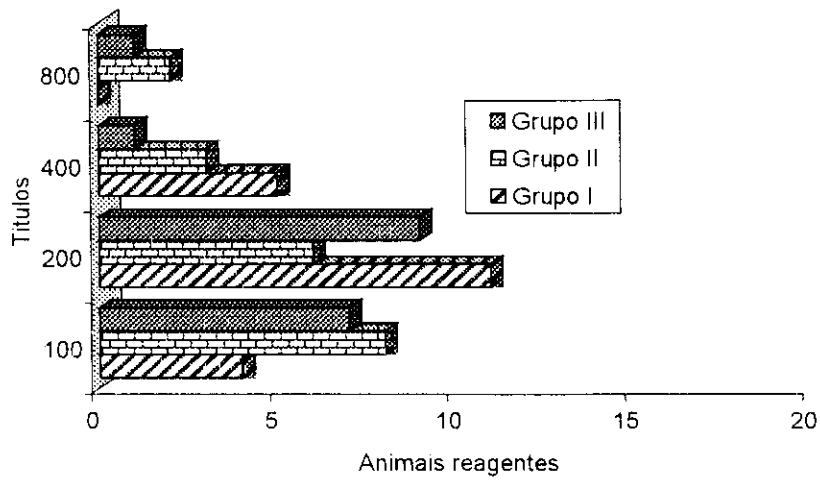


Gráfico 4. Títulos de aglutininas anti-leptospira entre os 3 Grupos vacinados com 30 dias após a vacinação.

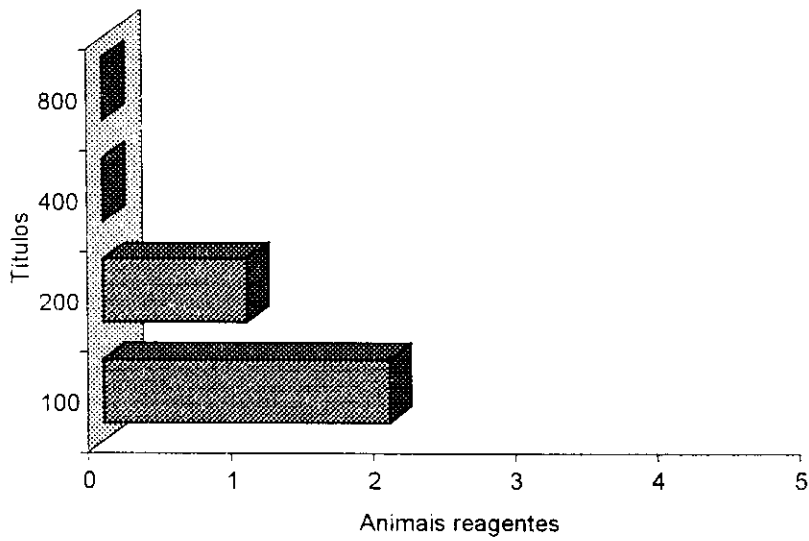


Gráfico 5. Títulos de aglutininas anti-leptospira do grupo I no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 60 dias após a vacinação.

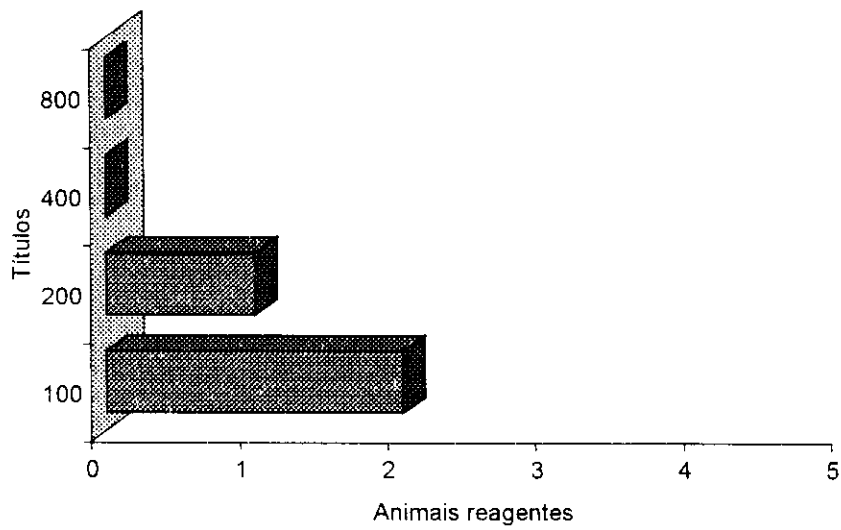


Gráfico 6. Títulos de aglutininas anti-leptospira do grupo II no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 60 dias após a vacinação.

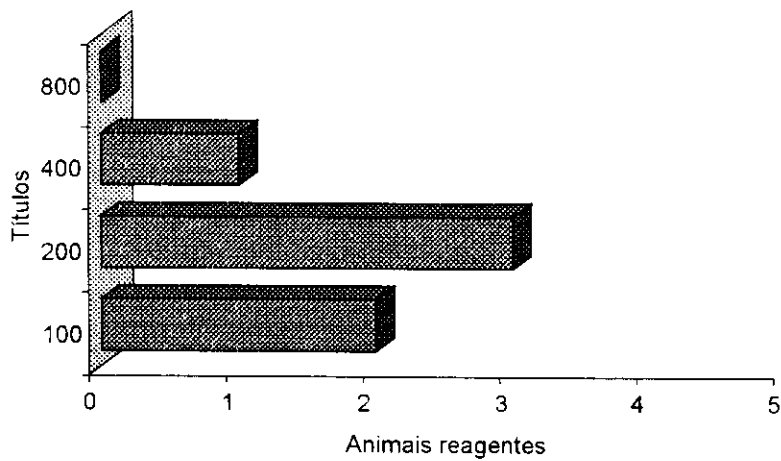


Gráfico 7. Títulos de aglutininas anti-leptospira do grupo III no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 60 dias após a vacinação.

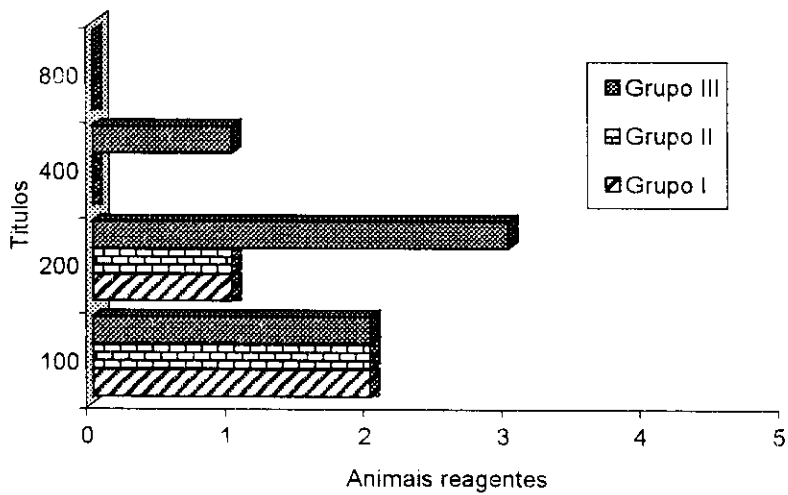


Gráfico 8. Títulos de aglutininas anti-leptospira entre os 3 Grupos vacinados no Teste de Soroaglutinação Microscópica com 60 dias após a vacinação.

Tabela 3 - Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de hardjo amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia zero de coleta.

GRUPOS	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO														
	DILUIÇÕES														
	1:2			1:4			1:8			1:16					
	CRESC. ¹	S/CRESC. ²	%	CRESC. ¹	S/CRESC. ²	%	CRESC. ¹	S/CRESC. ²	%	CRESC. ¹	S/CRESC. ²	%	CRESC. ¹	S/CRESC. ²	%
1	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
2	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
3	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
4 (Controle)	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
Total	80	0	0	80	0	0	80	0	0	80	0	0	80	0	0

¹ - Cresc. = Crescimento ² S/Cresc. = Sem Crescimento

Tabela 4 - Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de hardjo amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia 30 de coleta.

GRUPOS	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO														
	DILUIÇÕES														
	1:2			1:4			1:8			1:16					
	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%
1	14	6	30	16	4	20	17	3	15	19	1	5	19	1	5
2	12	7	36,8	18	1	5,2	18	1	5,2	19	0	0	19	0	0
3	6	12	66,6	10	8	44,4	13	5	27,7	13	5	27,7	13	5	27,7
4 (Controle)	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
Total	52	25	32,5	64	13	16,9	68	9	11,7	71	6	7,8	71	6	7,8

$\chi^2 = 48,25 p = 0,0001$

Tabela 5 - Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de *hardjo* amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia 60 de coleta.

GRUPOS	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO														
	DILUIÇÕES														
	1:2			1:4			1:8			1:16					
	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%
1	1	19	95	1	19	95	2	18	90	5	15	75			
2	0	19	100	0	19	100	0	19	100	0	19	100			
3	1	17	94,4	1	17	94,4	4	14	77,7	4	14	77,7			
4 (Controle)	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0			
Total	22	55	71,4	22	55	71,4	26	51	66,2	29	48	62,3			

$\chi^2 = 47,78$ p = 0,0001

Tabela 6 - Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de *hardjo* amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia 90 de coleta.

GRUPOS	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO														
	DILUIÇÕES														
	1:2			1:4			1:8			1:16					
	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%
1	0	20	100	0	20	100	2	18	90	4	16	80			
2	1	18	94,7	1	18	94,7	2	17	89,4	3	16	84,2			
3	0	18	100	0	18	100	0	18	100	3	15	83,3			
4 (Controle)	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0			
Total	21	56	72,7	22	55	71,4	24	53	68,8	30	47	61			

$\chi^2 = 60,23$ p = 0,0001

Tabela 7 - Grupos de ovelhas submetidos ao Teste de Inibição de Crescimento de *hardjo* amostra Norma nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 no dia 120 de coleta.

GRUPOS	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO											
	DILUIÇÕES											
	1:2			1:4			1:8			1:16		
	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%	CRESC.	S/CRESC.	%
1	0	20	100	0	20	100	2	18	90	3	17	85
2	0	19	100	2	17	89,5	3	16	84,2	4	15	78,9
3	0	18	100	0	18	100	0	18	100	1	17	94,4
4 (Controle)	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0
Total	20	57	74	22	55	71,4	25	52	67,5	28	49	63,6

$\chi^2 = 48,25$ p = 0,0001

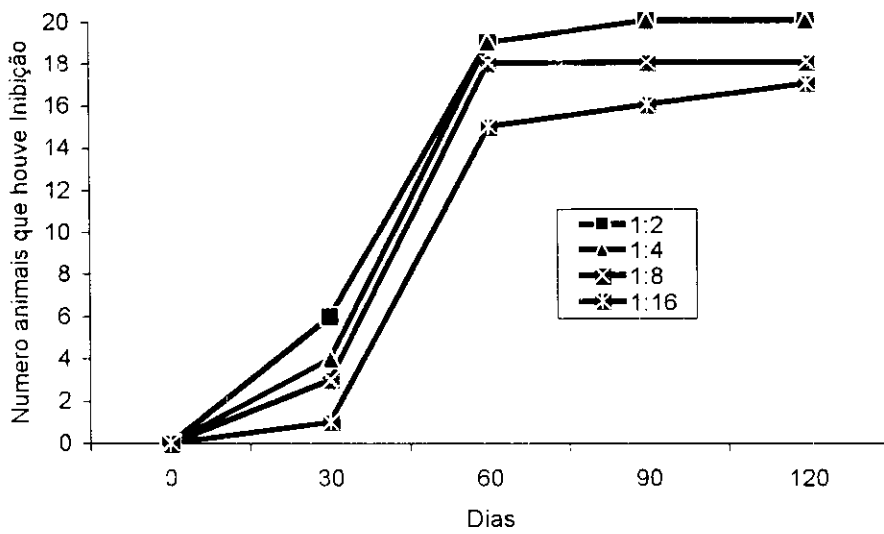


Gráfico 9. Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias em quatro diluições.

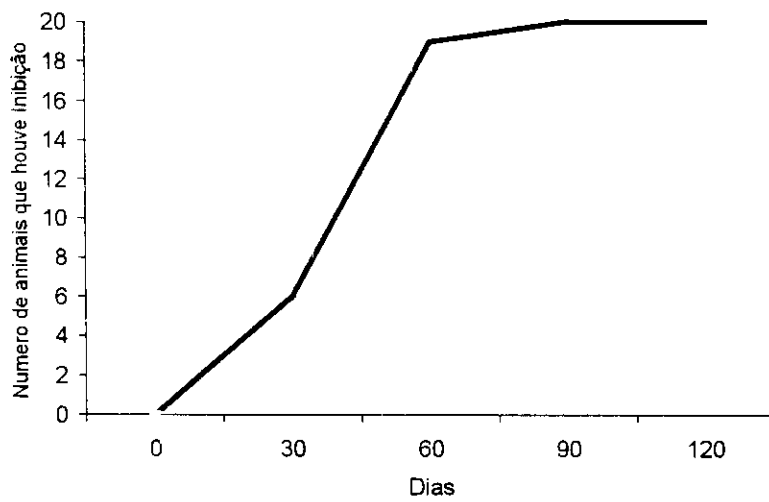


Gráfico 10. Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias na diluição de 1:2.

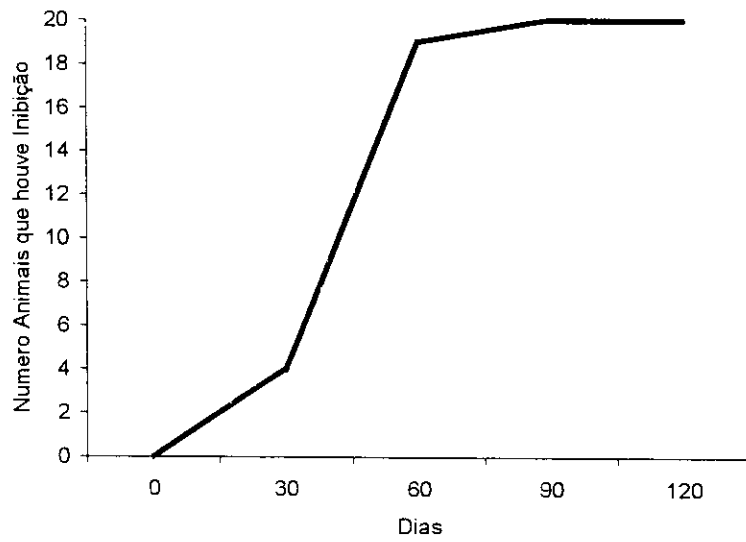


Gráfico 11. Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias na diluição de 1:4.

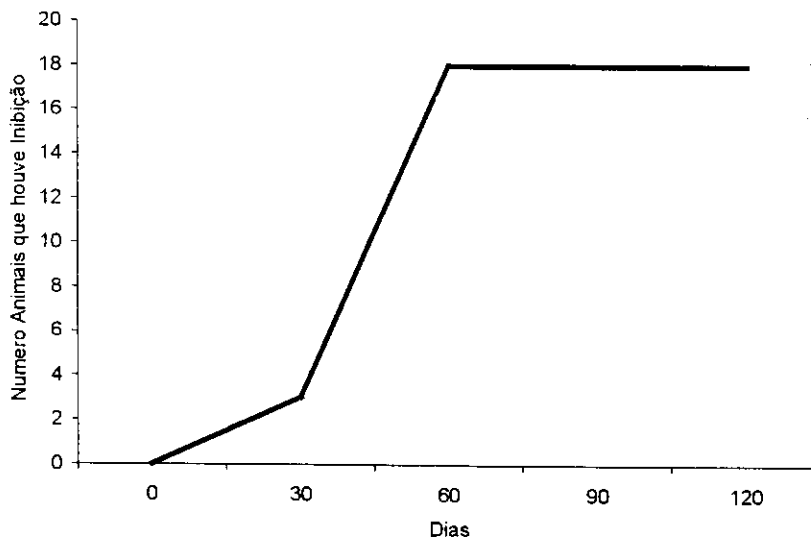


Gráfico 12. Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias na diluição de 1:8.

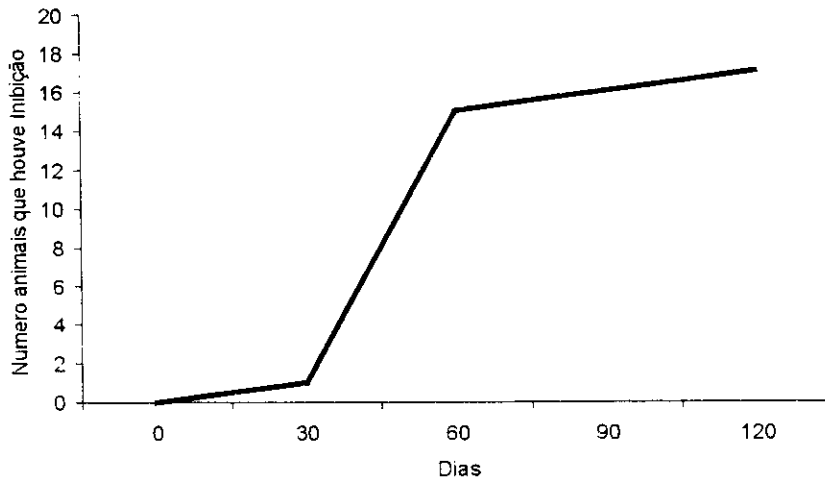


Gráfico 13. Nível de IgG do Grupo I no período de 120 dias na diluição de 1:16.

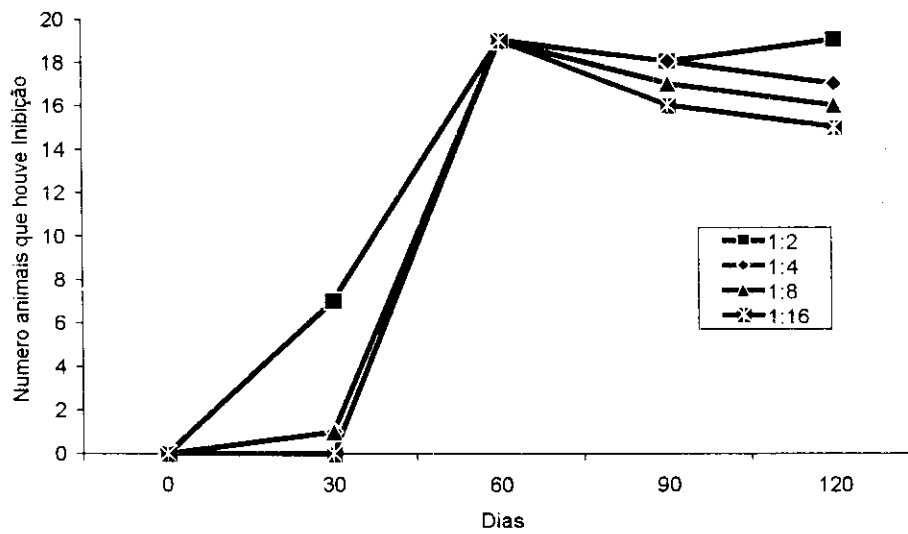


Gráfico 14. Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias em quatro diluições.

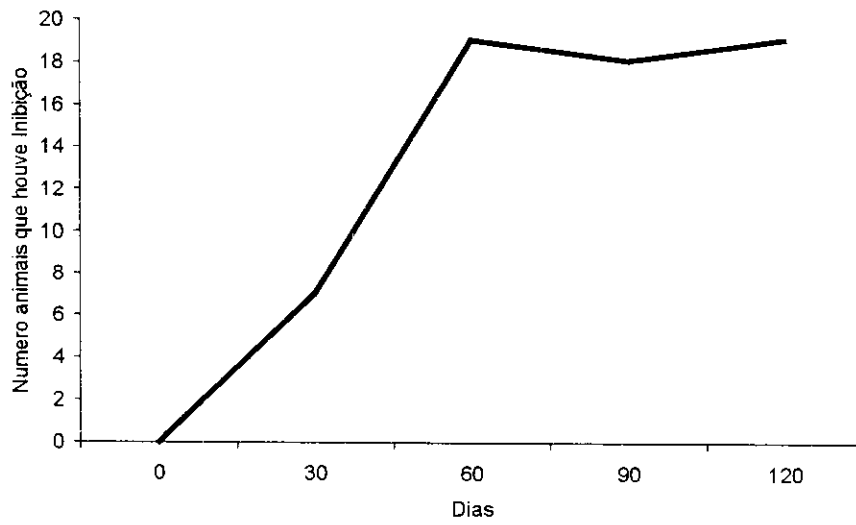


Gráfico 15. Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias na diluição 1:2.

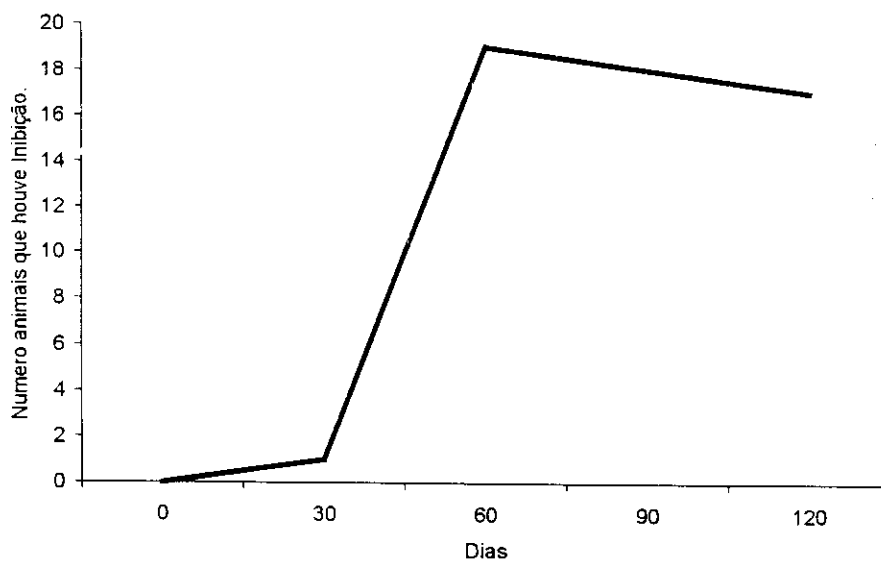


Gráfico 16. Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias na diluição 1:4.

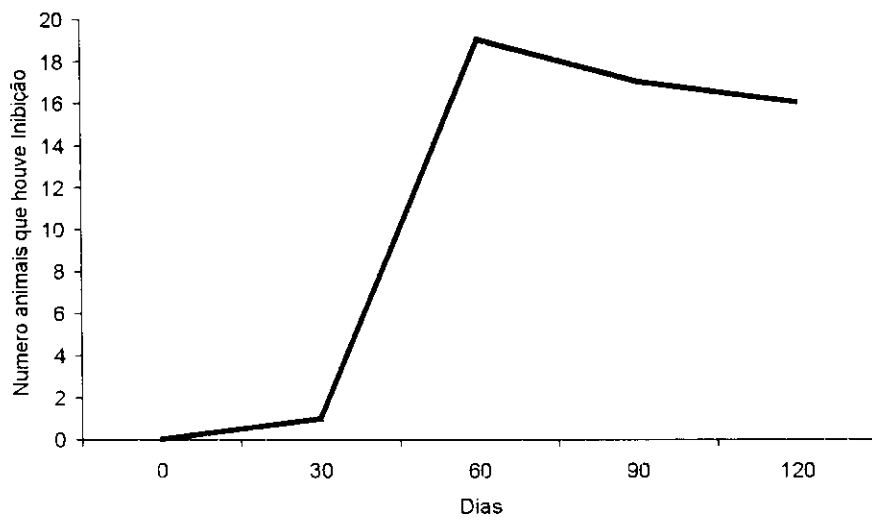


Gráfico 17. Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias na diluição 1:8.

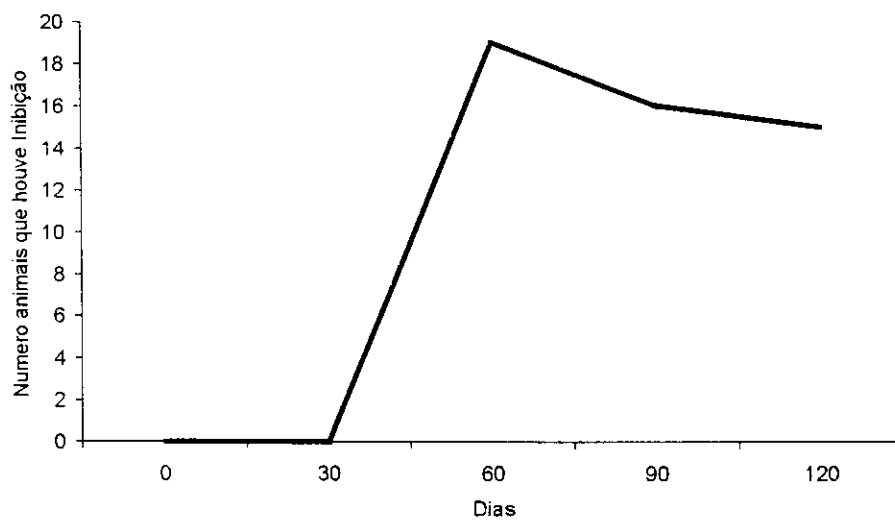


Gráfico 18. Nível de IgG do Grupo II no período de 120 dias na diluição 1:16.

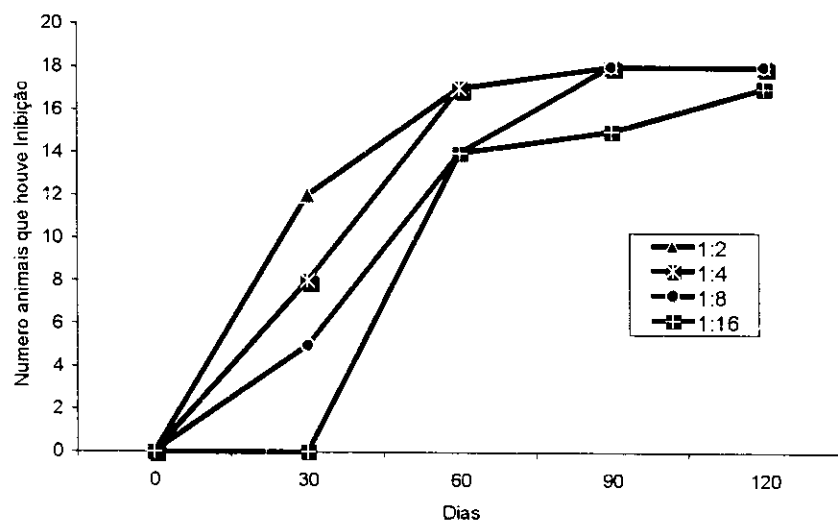


Gráfico 19. Nível de IgG no período de 120 dias no Grupo III nas quatro diluições.

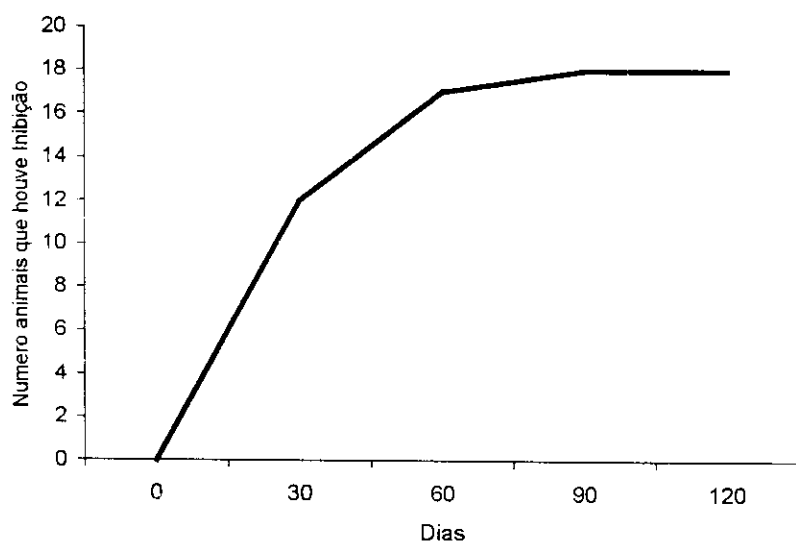


Gráfico 20. Nível de IgG do Grupo III no período de 120 dias na diluição de 1:2.

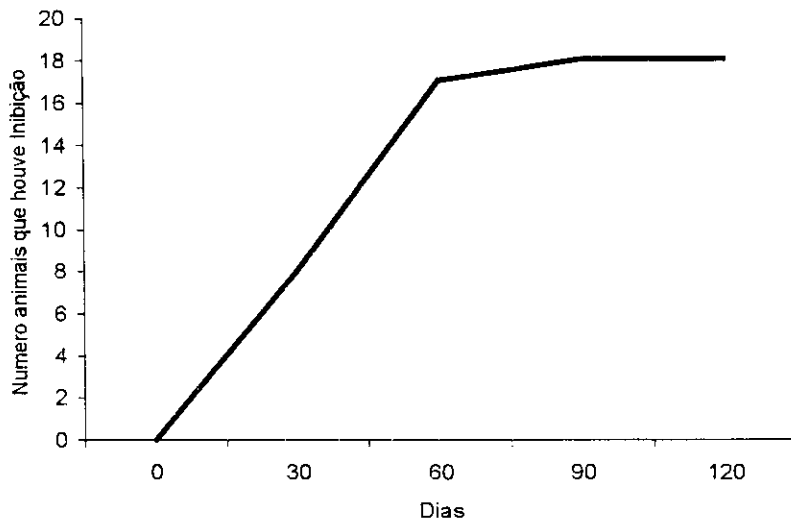


Gráfico 21. Nível de IgG do Grupo III no período de 120 dias na diluição de 1:4.

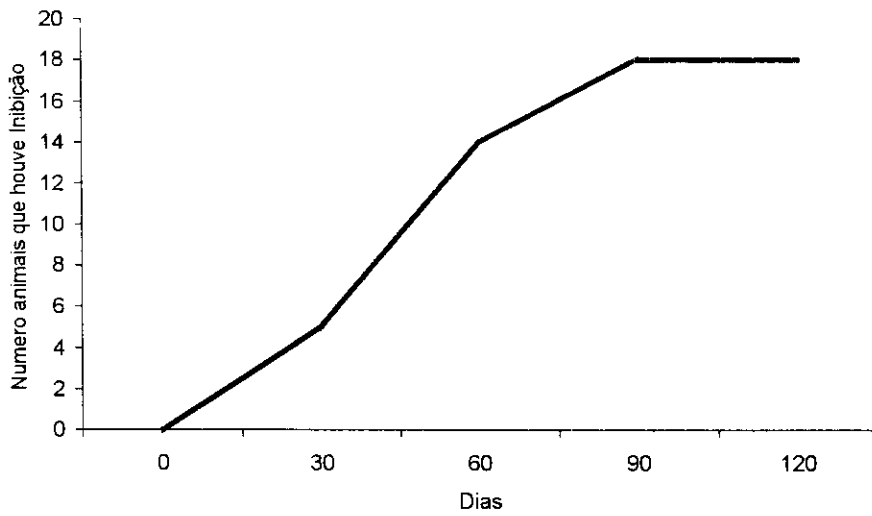


Gráfico 22. Nível de IgG do Grupo III no período de 120 dias na diluição de 1:8.

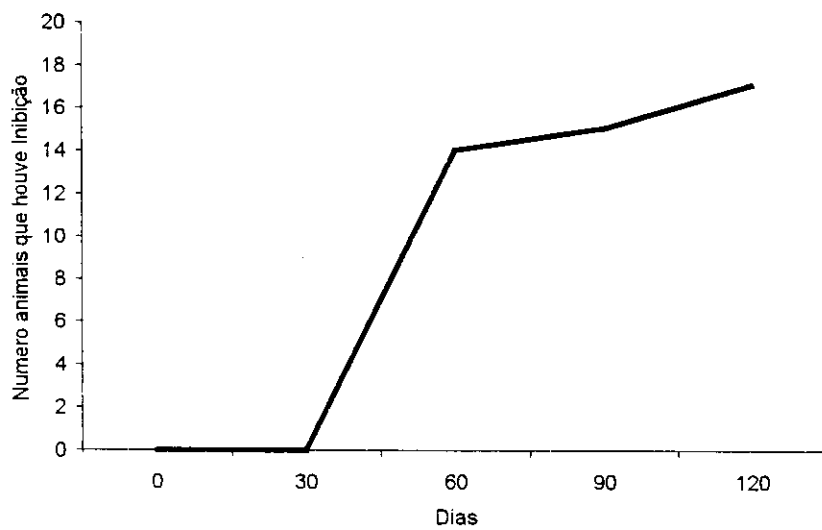


Gráfico 23. Nível de IgG do Grupo III no período de 120 dias na diluição de 1:16.

5 - CONCLUSÕES

O Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) não é adequado para a avaliação de títulos pós vacinais dos anticorpos anti hardjo em ovinos.

Os adjuvantes Hidróxido de Alumínio, Lanolina e o Emulsigen se mostraram equivalentes na indução de anticorpos IgM e IgG quando utilizados em vacinas anti-leptospira hardjo amostra Norma em ovinos.

O Teste de Inibição de Crescimento mostrou-se uma alternativa viável como Teste de Potência *in vitro* para a avaliação da resposta imunológica de vacina anti hardjo

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALASUBRAMANIAN, J.; RAMKRISHNA, J. Ovine leptospirosis: Immune response to experimental infection. *Indian Journal Animal Science*. v. 66, n. 11, p. 1089-1094, 1996.
- BEREK, C.; ZIEGNER, M. The maturation of the immune response. *Immunol. Today*. v. 14, p. 400-404, 1993.
- BOLIN, C.A.; THIERMANN, A.B.; HANDSAKER, A.L.; FOLEY, J.W. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle. *American Journal Veterinary Research*. v. 50, n. 1, p. 161-165, 1989.
- BOLIN, C.A.; ZUERNER, R.L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. *American Journal Veterinary Research*, v. 50, n.12, p. 2004-2008, 1989.
- CALDAS, E.M.; SAMPAIO, M.B.; VIEGAS, E.A.; VIEGAS, S.A.R.A.; DIAS, E.M. Aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos e caprinos na Região Nordeste do Estado da Bahia. *Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia*. v. 8, n.11, p. 88-98, 1983.
- ELLINGHAUSEN, H. C.; McCULLOUGH, W.G. Nutrition of leptospira pomona and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *American Journal Veterinary Research*. v. 26, n. 110, p. 45-51, 1965.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis. In: Martin, W.B.; AITKIN, I.D. *Diseases of Sheep*, 2 ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1991. p. 78-80.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. v. 10, n.3, p. 463-478, 1994.
- FAINE, S. *Guidelines for the Control of Leptospirosis*. Genebra, 1982, 171p. World Health Organization, (Ofset publication, 67).
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis* 2.ed., Austrália, MediSci, 1999, 272p.
- FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Informações Básicas Municipais*. Rio de Janeiro. 1982.
- GORDON, L.M. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar hardjopravitno from sheep. *Australian Veterinary Journal*. v. 56, n. 7, p. 348-349, 1980.
- HANSON, L.E.; TRIPATHY, D.N.; KILLINGER, A.H. Current status of leptospirosis immunization in swine and cattle. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. v. 161, p. 1235-1243, 1972.

- HANSON, L.E. Immunology of bacterial diseases, with special reference to Leptospirosis. *American Veterinary Medical Association*. v. 170. n.9, p.991-994, 1977.
- HATHAWAY, S.C.; LITTLE, W.A.; STEVENS, A.E. Serological survey of leptospiral antibodies in sheep from England and Wales. *Veterinary Record*. v. 110, n.4, p.99-101, 1982.
- HERRMANN, G.P. Leptospira sp. em ovinos do Rio Grande do Sul soroprevalência e avaliação da imunogenicidade da bacterina leptospira hardjo. 2002. 41 p. Belo Horizonte: Tese (Ciência Animal). Escola de Veterinária da UFMG, Minas Gerais, 2002.
- HUHN, R.G; KOKJOHN, M.A; CARDELLA, M.A. Immunity to Leptospirosis: antiserums in dogs and hamsters. *American Journal Veterinary Research*. v.36, p.67-70, 1975.
- LITTLE, T.W.A; HATHAWAY, S.C; BROUGHTON, E.S; SEAWRIGHT, D. Control of Leptospira hardjo infection in beef cattle by whole-herd vaccination. *Veterinary Record*. v.131, p. 90-92, 1992.
- MCCAUGHAN, C.J.; GORDON, L.M.; RAHALEY, R.S. Evidence for infection of sheep in Victoria with leptopirosis of the hebdomadis sorogroup. *Australian Veterinary Journal*. v. 6, p. 201-202, 1980.
- MOREIRA, E.C. Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. 1994. 94 p. Belo Horizonte: Tese (Ciência Animal). Escola de Veterinária da UFMG, Minas Gerais, 1994.
- NEGI, S.K; MYERS, W.L; SEGRE, D. Antibody response of cattle to leptospira pomona: a hemagglutination test to measure IgG and IgM antibodies. *American Journal Veterinary Research*. v. 32, n. 12, p. 1907-1913, 1971.
- NEGI, S.K; MYERS, W.L; SEGRE, D. Antibody response of cattle to leptospira pomona: response as measured by hemagglutination, microscopic agglutination, and hamster protection tests. *American Journal Veterinary Research*. v. 32, n. 12, p. 1915-1920, 1971.
- OFFICE International des Epizooties. Leptospiroses. In: Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. França, *World Organization for Animal Health*. 2001, p- 198-217.
- RIS, D.R. Serological evidence for infection of sheep with *Leptospira interrogans* serotype hardjo. *New Zealand Veterinary Journal*. v. 23. n. 7, p. 154, 1975.
- RUBY, K.W; CARDELLA, M.A; KNUDTSON, W.U. Assay for measuring relative potency of leptospiral bacterinas containing serovar pomona. *Biologicals*. v. 20, p. 259-266, 1992.
- SAMINA, I.; BRENNER, J.; MOALEM, U.; BERENSTEIN, M.; COHEN, A.; PELEB, B.A. Enhanced antibody response in cattle against *Leptospira hardjo* by intradermal vaccination. *Vaccine*, v. 15, n. 12/13, p. 1434-1436, 1997.
- SANTA ROSA, C.A.; PESTANA de CASTRO, A.F. Presença de aglutininas antileptospiras em soro de ovinos e caprinos no Estado de São Paulo, *Arquivos do Instituto de Biologia*. v. 30, p. 93-98, 1963.
- SNEDECOR, G.W; COCHRAN, W.G. Statistical methods, IOWA, Ed. The Iowa State University Press, 1980, 507p.
- STOENNER, H.G. Summary report on the 1975 survey for leptospirosis in the U.S. In. ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 1975. v. 79, p. 145-149.
- SULLIVAN, N.D. Leptospirosis in animals and man. *Australian Veterinary Journal*. v. 50, n. 5, p. 216-223, 1974.

TABATA, R. Proteção cruzada entre bacterinas antileptospirose produzidas com três representantes do sorogrupo serjoe, ensaio experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*). 2002. 70 p. São Paulo: Dissertação (Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses). Escola de Veterinária USP, São Paulo, 2002.

THORNTON, R. Leptospirosis in New Zealand sheep. *Surveillance*. v.21, n. 2, p. 13-14, 1994.

TRIPATHY, D.N.; HANSON, L.E.; KRUMREY, W.A. An *in vitro* growth inhibition test for leptospiral neutralization. In: ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 75., 1971. *Proceedings* ..., 1972. p. 138-143.

TRIPATHY, D.N.; HANSON, L.E.; MANSFIELD, M.E. Growth inhibition test for measurement of immune response of animals vaccinated with leptospiral bacterinas. In: ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 1973. p.113-118.

TRIPATHY, D.N.; SMITH A.R.; HANSON, D.V.M. Immunoglobulins in cattle vaccinated with Leptospiral bacterins. *American Journal Veterinary Research*. v. 36, n. 12, p. 1735 - 1736, 1975.

TRIPATHY, D.N.; HANSON, L.E.; MANSFIELD, D.V.M. Evaluation of the immune response of cattle to leptospiral bacterins. *American Journal Veterinary Research*. v. 37, n. 1, p. 51-55, 1976.

TRIPATHY, D.N.; HANSON, L.E.; MANSFIELD, D.V.M. Evaluation of serologic reactions in cattle following vaccination with multivalent leptospiral commercial bacterins and comparison of the microscopic agglutination (MA) antibody response by various laboratories. In: ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 1979; 83. p.180-188.

TYZARD, I. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*. 5ª ed. Rocca. São Paulo, 1998. 545p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Internal Reference Guide for Potency Assay of *Leptospira interrogans* serotype grippityphosa bacterin USDA Veterinary Services, IA, 1976.

ZEMJANIS, R. Vaccination for reproductive efficiency in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 165, n. 8, p. 689-692, 1974.