

T636.089 69

H 568.2

2002

Geder Paulo Herrmann



*Leptospira* sp EM OVINOS DO RIO GRANDE DO SUL SOROPREVALÊNCIA E AVALIAÇÃO  
DA IMUNOGENICIDADE DA BACTERINA *Leptospira hardjo*.

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte  
UFMG - Escola de Veterinária  
2002

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
20/02/03

99003-05

H5681  
2002

Herrmann, Geder Paulo, 1963-  
*Leptospira* sp em ovinos do Rio Grande do Sul soroprevalência  
e avaliação da imunogenicidade da bacterina *Leptospira hardjo* /  
Geder Paulo Herrmann. – Belo Horizonte : UFMG - Escola de  
Veterinária, 2002.

41p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária

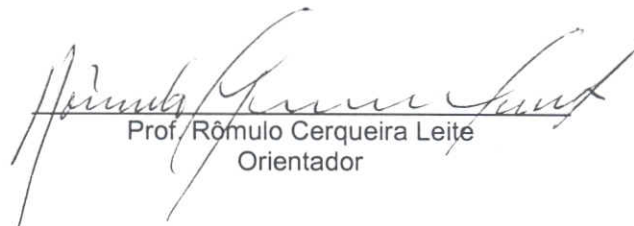
1. Ovino – Doenças – Teses. 2. Leptospirose em animais – Teses. 3.  
Leptospirose - Vacina – Teses. 4. Leptospirose – Diagnóstico – Teses. I. Título.

CDD – 636.089 692

0341-35460

Tese defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2002, pela Comissão Examinadora constituída por.

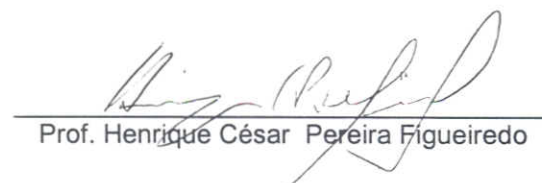


  
Prof. Rômulo Cerqueira Leite  
Orientador

  
Prof. Elvio Carlos Moreira

  
Prof. Andrey Pereira Lage

  
Prof. Sílvio Arruda Vasconcelos

  
Prof. Henrique César Pereira Figueiredo

Meus Pais Vonibaldo e Ely Herrmann pelo exemplo.  
A minha esposa Josiane pela dedicação, sempre amável, que com paciência superou as dificuldades da minha ausência no lar.  
As minhas filhas Gabriela e Júlia, razão deste desafio.

---

Em Memória, Rosenara Weich.  
Deus permita que os sonhos não se acabem e que eles aconteçam, cada um no seu tempo.



## Agradecimentos

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, meu orientador e mestre que com sabedoria soube encorajar-me na busca do conhecimento.

Ao Prof. Élvio Carlos Moreira primeiro um amigo, foi capaz de estimular o entendimento dos grandes acontecimentos da história da sanidade animal.

Aos meus estimados mestres, Dra. Charlote Hubinger Langenegger e o Dr. Jerome Langenegger verdadeiros iniciadores dos meus conhecimentos.

Aos professores Teresinha R. Zanchi, Antônio Jorge Dreon de Albuquerque e aos demais professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM, que no decorrer do tempo me encorajaram na busca do aperfeiçoamento.

À Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin, aglutinadora dos conhecimentos, que com paciência mostrou o caminho para vencer os grandes desafios.

Aos amigos Rogério Oliveira, Daniel Roulim, Paulo Artur, Ricardo Leite, Cristiano Melo e Guilherme, companheiros das grandes discussões e persistentes na busca da verdade.

Aos professores Francisco Lobato, Zélia Lobato, José Ailton da Silva, João Paulo Amaral Haddad e Iran Borges que sempre souberam ouvir minhas angústias e sabiamente emitiram suas opiniões.

Ao Prof. Andrey Lage sempre disposto e companheiro, incentivando-me cada vez mais na busca do conhecimento.

Prof. Romário Cerqueira Leite, amigo e incentivador dos meus estudos.

Aos médicos veterinários Rodrigo Orzil Viana e José Renato de Resende Costa, amigos e companheiros das grandes jornadas.

Aos amigos Célio, Brancão e Eduardo, os incentivares da criação da raça ovina Santa Inês.

Aos colegas do curso Frei, Rejane, Carolina, Iran, Olívia, Juliana de Oliveira e Ronnie Assis.

Ao Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Veterinária, Nilda Lucas e especialmente a Eliana Silva sempre prestativa na fase final da formatação e confecção da Tese.

Aos funcionários do DMVP e da FEP-MVZ, em especial, Antônio, Nádia, Nelson, Luciana, Júnia, Jorge e Joãozinho, que diretamente ou indiretamente colaboraram na execução do trabalho.

Aos funcionários da Secretaria da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul que pacientemente acompanharam nas coletas de campo.

A CAPES/PICDT pela bolsa concedida.

À FEP-MVZ pelo apoio financeiro para realização das coletas de campo.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	9
SUMMARY.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. LITERATURA CONSULTADA.....	12
2.1 DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO OVINA NAS MESORREGIÕES SUDESTE RIO-GRANDENSE.....	12
2.2 SISTEMA DE PRODUÇÃO DA OVINOCULTURA DO RIO GRANDE DO SUL.....	12
2.3 LEPTOSPIRAS EM OVINOS.....	13
3. <b>SOROPREVALENCIA DE AGLUTININAS ANTI-<i>Leptospira sp</i> EM OVINOS NAS MESORREGIÕES SUDESTE E SUDOESTE RIO-GRANDENSE; DO ESTADO RIO GRANDE DO SUL</b> .....	16
RESUMO.....	16
SUMMARY.....	16
3.1 INTRODUÇÃO.....	16
3.2 MATERIAL E MÉTODO.....	17
3.3 RESULTADOS.....	22
3.4 DISCUSSÃO.....	25
3.5 CONCLUSÃO.....	27
3.6 AGRADECIMENTOS.....	27
4. <b>AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA ANTI-<i>Leptospira hardjo</i> EM OVINOS</b> .....	28
RESUMO.....	28
SUMMARY.....	28
4.1 INTRODUÇÃO.....	28
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.2.1 PRODUÇÃO DA VACINA.....	29
4.2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
4.2.3 ELISA IGG ANTI-LEPTOSPIRA CTG.....	30
4.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.3 CONCLUSÃO.....	33
4.2.4 AGRADECIMENTOS.....	33
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	34
6. CONCLUSÕES.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

**LISTA DE TABELAS**

1. INTRODUÇÃO.....	
Tabela 1. Registros da presença aglutininas de anti- <i>Leptospiras sp</i> em ovinos no Brasil, 1963/95.....	14
3. <b>SOROPREVALENCIA DE AGLUTININAS ANTI-<i>Leptospira sp</i> EM OVINOS NAS MESORREGIÕES SUDESTE E SUDOESTE RIO-GRANDENSE; DO ESTADO RIO GRANDE DO SUL</b> .....	
Tabela 1. Municípios selecionados para a coleta de sangue ovino nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, RS. 1999.....	21
Tabela 2. Sorovariedades de <i>Leptospira sp</i> , utilizados como antígeno para microtécnica de aglutinação microscópica.....	22

Tabela 3.	Distribuição da soroprevalência de aglutininas anti- <i>Leptospira sp</i> em 1360 soros ovinos das Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, 1999	23
Tabela 4.	Distribuição dos títulos de aglutininas anti- <i>Leptospira sp</i> nos soros ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense. 1999.....	24
Tabela 5.	Número de soros positivos encontrados em 1630 amostras frente a sorovariedade <i>hardjo</i> CTG e <i>hardjoprajitno</i> .....	24
Tabela 6.	Títulos encontrados na sorovariedade <i>hardjo</i> amostras <i>hardjoprajitno</i> e <i>hardjo</i> CTG.....	25
4.	<b>AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA ANTI-<i>Leptospira hardjo</i> EM OVINOS</b>	
Tabela 1.	Demonstração das medianas dos títulos de aglutininas anti- <i>Leptospira hardjo</i> nos grupos de ovinos A, B e C em três coletas de sangue, utilizados na avaliação da vacina experimental <i>hardjo</i> (Norma) por MAT e ELISA.....	32

---

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Localização geográfica dos Municípios nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense em relação Rio Grande do Sul e ao Brasil	19
-----------	--	----

---

#### LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Curva das medianas dos títulos das reações vacinais anti- <i>Leptospira hardjo</i> nos grupos de ovinos A, B e C em cinco coletas de sangue por um período de 120 dias, nos testes de MAT e ELISA.....	33
------------	--	----

## RESUMO

Foi determinada a soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira sp*, em 1360 amostras de soros de ovinos, das Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, entre os meses de janeiro a março de 1999. A maior soroprevalência da *Leptospira sp*, com maior frequência a sorovariedade *hardjo*, elaborou-se de uma vacina monovalente L *hardjo*, com adjuvante oleoso, aplicada em dois grupos de ovinos formado por 15 ovelhas e um terceiro controle formado por 10 animais. O primeiro grupo recebeu duas doses de vacina com intervalo de 30 dias e o segundo grupo apenas uma dose da vacina. A imunogenicidade foi avaliada utilizando títulos de aglutininas anti-*Leptospira hardjo* vacinais pela técnica de aglutinação microscópica e ELISA, por período de 120 dias. A determinação da prevalência de *Leptospira sp* em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, com elaboração de uma vacina oleosa experimental revelaram-se importantes ferramentas, podendo ser utilizados nos inquéritos epidemiológicos e na implantação de programas de controle das Leptospiroses dos ovinos.

Palavras-Chave: Soroprevalência , *Leptospira*, Diagnóstico , Vacina , Ovinos



### SUMMARY

It was determined the seroprevalence of agglutinins anti-*Leptospira sp*, in 1360 samples of ovine serums, of Mesoregions Southwest and Southeast Rio-Grandense, among the months of January to March of 1999. It was certain the one of the seroprevalence of the *Leptospira sp*, more frequently the serovar hardjo, was elaborated of a vaccine monovalent *L hardjo*, with oily adjuvants, applied in two ovine groups formed by 15 sheep and a third control formed by 10 animals. The first group received two vaccine doses with interval of 30 days and the second group one dose of the vaccine. The immunogenicity was evaluated using titres of agglutinins anti-*Leptospira hardjo* vaccine for the technique of microscopic agglutination and ELISA, for period of 120 days. The determination of the prevalence of *Leptospira sp* in ovines in Mesoregiões Southwest and Southeast Rio-Grandense, with elaboration of an experimental oily vaccine important tools were revealed, could be used in the epidemic inquiries and in the implantation of programs of control of Leptospirosis of the ovines.

Word-Key: Seroprevalence, *Leptospira*, Diagnostic, Vaccine, Ovines.

## 1. INTRODUÇÃO

As Leptospiroses são Zoonoses de distribuição mundial causada por uma bactéria do gênero *Leptospira*. As *Leptospira sp* são classificadas em membros da espécie *Leptospira interrogans*. O gênero recentemente foi reorganizado por estudos de afinidade antigênica e análises moleculares, os agentes etiológicos das leptospiroses estão divididos em duas espécies, patogênicas e não patogênicas e, foram classificadas em oito espécies, distribuídas em mais 200 sorovariedades distintas e arranjadas em 23 Sorogrupos, Faine, (1994) e Bolin, (1996).

A *Leptospira sp* tem sido identificada, infectando várias espécies de animais e o homem, mas algumas sorovariedades apresentam hospedeiro primordial em espécies definidas. Assim, a sorovariedade *icterohaemorrhagiae* tem como hospedeiro principal o *Rattus norvegicus*, e acidentalmente infecta o homem os animais silvestres e domésticos. A sorovariedade *pomona* tem o suíno e o equino como hospedeiros primários, mas também infecta os bovinos causando a morte de bezerros e quadros agudos com abortos nas vacas. A sorovariedade *bratislava* tem como hospedeiro primário os equinos, mas é importante causa de infertilidade em suínos e bovinos. A sorovariedade *hardjo*, cujo primeiro isolamento foi no homem, tem o bovino como hospedeiro principal, ocasiona sérios prejuízos econômicos à pecuária leiteira e de corte, que entre outros danos, causa infertilidade, mastites, abortos, ocorrência de natimortos e nascimento de bezerros fracos.

No Brasil, a infecção por *Leptospira sp* foi diagnosticada pela primeira vez em 1957, em bovinos e a partir daí são demonstrados os prejuízos causados nas criações de animais domésticos. Embora existam pesquisas em *Leptospira sp* em várias espécies, há predomínio desses estudos em bovinos, onde a bactéria aparece com ampla distribuição e elevada frequência na maioria dos Estados brasileiros. Tem sido descrita a sua participação em infecções nos animais domésticos de exploração

econômica e de estimação, entre eles os ovinos, sua disseminação é um fato real e crescente, sendo relevante em regiões onde são adotados sistemas de criações consorciados entre diferentes espécies, destacando-se, atualmente, o sistema de criação extensivo de bovinos/ovinos adotado no Rio Grande do Sul.

O Estado do Rio Grande do Sul com a maior população de ovinos do Brasil e com registros históricos de problemas reprodutivos nas ovelhas, com infertilidade e abortos, mortalidade precoce de cordeiros nas primeiras semanas de vida, não despertou os pesquisadores e o sistema de pesquisa local sobre esse relevante tema. Assim essa é a primeira vez que se propõe a determinar a soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira sp* e identificar as sorovariedades mais prevalentes nos ovinos.

O isolamento de *Leptospira sp* é considerado pela comunidade científica como de difícil execução. Esse fato valoriza o teste de soroaglutinação como método de diagnóstico, por ser de alta eficiência e capaz de identificar infecções recentes. Essa técnica detecta predominantemente imunoglobulinas da classe M (IgM), anticorpo característico de infecção.

A técnica de microaglutinação microscópica (MAT) foi descrita por Galton e colaboradores e modificada mais tarde, por Cole colaboradores, apresenta uma série de vantagens no diagnóstico das *Leptospira sp*. No entanto, poucos laboratórios de diagnóstico da doença no homem e nos animais implantaram essa técnica. Existem limitações e entre elas, pode-se citar a necessidade de técnicos especializados, o risco de contaminação durante a execução pelo uso de antígenos vivos em lâmina de vidro sem a devida proteção, a demora no processamento pelo longo tempo de incubação, e necessidade do uso de bateria de antígenos com grande número de sorovariedades, o custo de manutenção e repiques semanais das culturas, entre outros.



As leptospiroses tem representado grandes perdas na bovinocultura pela infecção por várias sorovariedades e o custo do tratamento com antibióticos, alternativa onerosa para os pecuaristas. O uso de vacinas de boa qualidade, contendo sorovariedades homólogas, tem mostrado sua eficiência no controle de surtos e na resolução da infecção em rebanhos endemicamente contaminados.

A vacina é recomendada como forma segura para a controle da doença. Seu uso contínuo e adequadamente ministrado, produz boa imunidade nos animais, previne os sintomas como o aborto e a morte embrionária com absorção, bem como o aparecimento de outros sinais clínicos característicos da doença, possibilitando seu controle no plantel. O custo de cada dose de vacina é significativamente menor do que a dose do antibiótico utilizado no tratamento

O grau de proteção desenvolvido pelo uso da vacina também pode ser avaliado em animais de laboratório ou por métodos sorológicos. A aglutinação microscópica quando utilizada, detecta predominantemente a (IgM), imunoglobulina pouco persistente no sangue circulante, detectada por aproximadamente de 30 dias após a vacinação. O ensaio imunoenzimático (ELISA), é um teste sorológico capaz de quantificar anticorpos protetores, essencialmente imunoglobulinas G (IgG) presentes no soro sendo as mais duradouros, podem ser detectadas no soro, em períodos maiores, que variam de seis meses até um ano.

Com fundamento nessas considerações, foram estabelecidos os seguintes objetivos para a presente pesquisa: 1. Determinar a soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira sp* em soros de ovinos das Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, 1999. 2. Avaliar a imunogenicidade de uma bacterina *L. hardjo* adsorvida em adjuvante oleoso para ovinos.

## 2- LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO OVINA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

O Rio Grande do Sul (RS), destaca-se na produção animal com o maior rebanho de ovinos do Brasil, predominantemente, formado por raças essencialmente produtoras de lã e algumas raças com aptidão mista. Durante muitos anos o rebanho gaúcho foi constituído por 12 milhões de cabeças. Esse efetivo vem decrescendo gradativamente a partir de da década de 80, e nos últimos dez anos foi afetado profundamente pela desvalorização da lã natural no mercado internacional, substituída por lã sintética. Na metade da década de 90 o rebanho gaúcho estava estimado em aproximadamente 5.080.000 animais, distribuídos em sete Mesorregiões Geográficas: Noroeste, Nordeste, Centro Ocidental, Centro Oriental, Sudoeste, e Sudeste Rio-Grandense. Com destaque na criação de ovinos as Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense.

As Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, localizadas abaixo do paralelo - 28°, a primeira mais ao Sul do Rio Grande do Sul e a segunda no Oeste do Rio Grande do Sul, junto à fronteira do Uruguai e da Argentina, são formadas por 35 municípios (Figura 1), com uma população estimada de 3.720.347 cabeças o equivalente a 75% da população de ovinos do RS., segundo o Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993)

### 2.2 SISTEMA DE PRODUÇÃO DA OVINO-CULTURA DO RIO GRANDE DO SUL.

Nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense os ovinos são criados em sistema extensivo, consorciado com o gado bovino, nos mesmos pastos e aguadas numa proporção um ovino para cada 1.6 bovinos. As fazendas em sua grande maioria são formadas por grandes extensões de terra, conhecidas como "Estâncias", com áreas médias, superiores 500 hectares e, em situações extremas,

algumas fazendas de criação ovina podem chegar ao tamanho de 7200 hectares. Este tipo de criação de bovinos com ovinos permite uma exploração seletiva das pastagens nativas locais, formadas basicamente por gramíneas e leguminosas, implantadas em solos de baixa profundidade. O manejo dos animais ocorre essencialmente de duas a três vezes por ano, no mês de dezembro a janeiro para a tosquia e controle parasitário e de janeiro a março, na época estação da monta natural ou da inseminação artificial. (Santos, 1985).

### 2.3- LEPTOSPIRA sp EM OVINOS

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 São Paulo. Mais tarde, novos estudos surgem e concentrando-se da década 80 e início dos anos 90, no Estado da Bahia, quando Caldas et al., e Viegas et. al., realizaram vários inquéritos sorológicos em diferentes rebanhos com problemas reprodutivos (Tabela 1).

Santa Rosa (1970), afirmou que o diagnóstico preciso da *Leptospira sp* é feito com a demonstração direta ou indireta do agente etiológico. Os principais métodos direto são o isolamento, a microscopia de campo, a imunofluorescência direta e a histopatologia. O segundo grupo de diagnóstico etiológico indireto, são aqueles que revelam a presença de anticorpos no sangue circulante.

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 a infecção 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.

Gordon (1980) e Hathaway et al., (1981), concluíram que apesar dos ovinos apresentarem uma certa resistência, infectam-se por *Leptospira sp* diretamente nas águas e pastagens, principalmente pela sorovariedade *hardjo* e, uma vez estabelecida a infecção, os animais atuam como hospedeiros limitados, mas na maioria das oportunidades são conhecidos como portadores e eliminadores da bactéria na urina por mais de dois meses

Gordon, (1980), Hathaway et al., (1982) Cousins & Robertson (1986) e Ellis, (1994) observaram que a sorovariedade *hardjo* parece ser universal é encontrada na maioria dos inquéritos epidemiológicos constituindo-se desta forma um fator negativo, importante aspecto de sanidade do rebanho.

Simpson & Done (1989), e Ellis (1994), verificaram a importância do sistema de criação de ovinos na transmissão da bactéria. Assim, uma prática comum adotada nas fazendas, quando ocorre a morte de ovelhas no trabalho de parto, ou na deficiência de colostro e leite, os cordeiros geralmente são suplementados com colostro ou leite cru de vaca que podem estar contaminados, os cordeiros nesse caso apresentam um quadro clínico caracterizado por anemia aguda, febre, depressão, dificuldade respiratória seguido de morte.

Cousins et al., (1989) salientaram que os ovinos podem se tornar hospedeiros da sorovariedade *hardjo*, quando acidentalmente a bactéria dos bovinos passam pelo contato direto nas pastagens e nas aguadas contaminados. Também tem sido demonstrado que pode ocorrer a transmissão direta entre os ovinos dentro do plantel.



Tabela 1. Registros da presença de aglutininas anti-*Leptospira sp* em ovinos no Brasil, 1963/95

Autores	Estados	Ano	Número de soros	Frequência (%)	Técnica	Sorovarietades mais frequentes
Santa Rosa e Pestana de Castro	São Paulo	1963	400	34,00	MAT	<i>canicola, pomona, icterohaemorrhagiae e sejroe</i>
Santa Rosa e Pestana de Castro	São Paulo	1969/70	481	29,7	MAT	<i>pomona, icterohaemorrhagiae sejroe e bataviae</i>
Viegas et al.,	Bahia	1980	35	22,80	MAT	<i>autumnalis, castellanis grippotyphosa e tarassovi</i>
Caldas et al.,	Bahia	1983.	1130	15,40	MAT	<i>autumnalis, butembo castellanis e pomona</i>
Caldas et al.,	Bahia	1986	800	34,70	MAT	<i>Autumnalis castellanis e butembo</i>
Caldas et al.,	Bahia	1989	930	11,72	MAT	<i>butembo, wolffi, tarassovi e castellanis.</i>
Caldas et al.,	Bahia	1991	124	46,00	MAT	<i>australis castellanis, grippotyphosa e andamana</i>
Caldas et al.	Bahia	1993	111	77,40	MAT	<i>Icterohaemorrhagiae autumnalis, australis tarassovi, castellanis pomona, pyrogenes grippotyphosa e wolffi</i>
Viegas et al.,	Bahia	1994	219	89,50	MAT	<i>javanica, castellanis canicola, celledoni autumnalis, bataviae grippotyphosa, wolffi pyrogenes, australis pomona e tarassovi</i>
Caldas et al.,	Bahia	1994	61	90,00	MAT/ELISA	<i>castellanis, autumnalis e tarassovi</i>
Caldas et al.,	Bahia	1995/96	105	48,57	MAT	<i>L. interrogans*</i>
Caldas et al.,	Bahia	1997/98	122	78,70	MAT	<i>canicola e pomona</i>
Langoni et al.,	São Paulo	1995	356	44,50	MAT	<i>Icterohaemorrhagiae castellanis, hardjo, bratislava, andamana, wolffi, copenhageni, grippotyphosa, pomona e tarassovi</i>

\* Espécie: *Leptospira interrogans*

Ellis, (1994), constatou que as *Leptospira sp* causam nos ovinos uma enfermidade de caráter sistêmico, que interfere na reprodução, na lactação das ovelhas e na sobrevivência de cordeiros. A maioria das perdas reprodutivas estão diretamente relacionadas às sorovariedades *hardjo* e *pomona* e um pequeno número de casos são causados pelas sorovariedades *ballum* e *grippotyphosa*. Verificou que a epidemiologia das leptospiroses em ovinos são muito complexas e potencialmente a bactéria pode infectar um grande número de animais do rebanho, no entanto um pequeno número de sorovariedades torna-se endêmico. Esta endemicidade está diretamente relacionada com hospedeiros específicos de cada sorovariedade presente no ambiente.

Ellis, (1994) e Vermunt et al., (1994), enfatizaram que a *Leptospira sp* penetram ativamente pelas mucosas e na pele íntegra. A bacteremia pode durar poucas horas ou chegar até dez dias, a doença é caracterizada por febre, abortamento, retorno ao cio e a eliminação de *Leptospiras* vivas no colostro e leite, muitas sorovariedades podem causar lesões no órgãos internos desencadeando um quadro de anemia hemolítica aguda em especial nos cordeiros.

Ellis, (1994) e Ellis et al., (1981) verificaram que a ocorrência de *Leptospira sp* nos ovinos parecem ser comum na maioria dos países do mundo, sendo, destacados naqueles rebanhos que utilizam sistemas de manejo extensivo em que a criação das ovelhas ocorre juntamente com bovinos, onde, os ovinos adquirem preferencialmente a infecção pelo contato direto com urina ou pela água contaminadas nos bebedouros coletivos.

Clark, (1994) comprovou a capacidade da *Leptospira sp*, produzir danos à saúde humana, principalmente aquelas pessoas que estão envolvidas diretamente no auxílio do parto das ovelhas ou na assistência aos cordeiros nas primeiras horas de vida.

Ellis, (1994) verificou que as perdas reprodutivas são mais observadas no início da gestação com aborto e retorno ao cio ou ainda nas proximidades do parto, quando são observados nascimentos de cordeiros prematuros ou a morte na primeira semana de vida. Na maioria dos casos os abortos são causados pela sorovariedade *hardjo* e em pequeno número pelas sorovariedades *pomona*, *ballum* e *bratislava*, entre outros.

Segundo (Ellis, 1994), na Irlanda do Norte, o emprego de vacinas em ovinos são limitadas e na prática tem sido recomendado o uso da mesma vacina utilizada para bovinos com dose reduzida na quarta parte.

Moreira, (1994) desenvolveu vacina homologada contra *Leptospira sp*, culturas inativadas com formol tendo como adjuvante o Hidróxido de Alumínio. Historicamente o hidróxido de alumínio tem sido utilizado com adjuvante primário em vacinas animal e gradativamente vem sendo substituídos por adjuvantes oleosos, veículos que proporcionam uniformidade na distribuição dos antígenos, máxima estabilidade, com mínimo efeito tóxico e de desconforto no local da aplicação, além de serem capazes de maximizar uma resposta imunológica.

No Brasil não são conhecidos estudos com vacina anti-*Leptospira sp* em ovinos, sendo restrito em bovinos, suínos e caninos. O controle com a vacinação, tem sido obtido com uso sistemático de bacterinas específicas contra as sorovariedades mais prevalentes, o que na prática tem se revelado como uma medida eficiente no controle de focos.

Ribeiro (1998), pesquisou as causas de mortes de ovinos no Estado do Rio Grande do Sul, relatou os achados em 12 anos, apontando os prejuízos econômicos, no entanto as *Leptospira sp* não foram descritas entre as causas de morte de ovelhas e cordeiros.



### 3. SOROPREVALENCIA DE AGLUTININAS ANTI-*Leptospira* sp EM OVINOS NAS MESORREGIÕES SUDESTE E SUDOESTE RIO-GRANDENSE; DO ESTADO RIO GRANDE DO SUL

#### RESUMO

Foi determinado por estudo de soroprevalência a presença de aglutininas anti-*Leptospira* sp em 1360 amostras soros de ovinos, clinicamente sadios com mais de um ano de idade, criados extensivamente em 136 fazendas de 18 municípios, 10 na Mesorregião Sudeste e 8 na Mesorregião Sudoeste Rio-Grandense do Estado do Rio Grande do Sul, entre os meses de janeiro a março de 1999. Os soros foram testados pela técnica de aglutinação microscópica. Das 1360 amostras de soro testados, 466 (34,26%) animais foram positivos e os títulos de aglutininas anti-*Leptospira* sp variavam de 100 a 3200. As soroprevalências das reações, foram: *hardjo* (CTG), 210 (28,4%), *sentot*, 152, (16,8%); *hardjo* (OMS), 133 (14,5%); *fortbragg* 73 (6,3%), *wolffi*, 39 (4,7%); *pyrogenes*, 25 (1,8%); *australis*, 21 (1,6%); *pomona*, 20 (1,6%); *sejroe*, 19 (2,2%); *castellonis*, 18(1,8%); *hebdomadis*, 17 (1,3%); *icterohaemorrhagiae*, 16 (0,5%); *grippotyphosa*, 9 (0,7%); *canicola*, 8 (0,6%); *tarassovi*, 7 (0,6%), *bratislava* 4 (0,29%), *autumnalis* 3 (0,2%); e *mini szwajizak* 0. Os resultados mostraram que as *Leptospira* sp estão disseminadas na maioria das fazendas que criam ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense.

Palavras-Chaves: *Leptospira* sp, Ovino, Rio Grande do Sul, Prevalência

#### SUMMARY

He took place study of seroprevalence of the leptospira sp in 1360 samples of ovine serums, from different breeds and healthy clinically with more than one year of age, created they areraised intensive systems in 136 farms of 18 countys, ten in Mesorregion Southeast and eight in Mesorregion Southwest Rio-Grandense of Rio Grande do Sul, among the months of January to March of 1999. The serums were tested by the thecnique microscopic agglutination. Agglutinins anti-*Leptospira* sp, was detected with titles that varied from 100 to 3200. Of

the 1360 tested animals samples 466 (34,26%) were positive. The pevalence of found reactions are described in decreasing order of the serovars: *hardjo* (CTG), 210 (28,4%), *sentot*, 152, (16,8%); *hardjo* (OMS), 133 (14,5%); *fortbragg* 73 (6,3%), *wolffi*, 39 (4,7%); *pyrogenes*, 25 (1,8%); *australis*, 21 (1,6%); *pomona*, 20 (1,6%); *sejroe*, 19 (2,2%); *castellonis*, 18(1,8%); *hebdomadis*, 17 (1,3%); *icterohaemorrhagiae*, 16 (0,5%); *grippotyphosa*, 9 (0,7%); *canicola*, 8 (0,6%); *tarassovi*, 7 (0,6%), *bratislava* 4 (0,29%), *autumnalis* 3 (0,2%); e *mini szwajizak* 0. The results *Leptospira* sp was disseminated in breeds ovine in Mesorregions Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense.

KEY WORDS: *Leptospira* sp, Ovine, Rio Grande do Sul, Epidemiology.

#### 3.1. INTRODUÇÃO

A população ovina do Estado do Rio Grande do Sul (RS) é constituída por aproximadamente 5,1 milhões de cabeças, criadas extensivamente em sete Mesorregiões: Noroeste, Nordeste, Centro Ocidental, Centro Oriental, Grande Porto-Alegre, Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1998)<sup>1</sup>, cerca de 3,28 milhões de cabeças, ou seja, (75%) do rebanho ovino, está distribuído nas Mesorregiões Sudoeste e Sudeste Rio-Grandense.

O rebanho ovino do Rio Grande do Sul é formado basicamente por raças produtoras de lã e alguns planteis de raças mistas. Os animais são criados juntamente com os bovinos em sistema extensivo, em pastos nativos constituídos basicamente de gramíneas e leguminosas, numa proporção aproximada, de uma cabeça de ovino para cada 1,6 cabeças de bovino. As Mesorregiões Sudeste e Sudoeste

<sup>1</sup> < www.sidra.ibge.gov.br/cgr-bm/prtabr > 25/10/1998

caracterizam-se por excelência pela pecuária de corte extensiva, em grandes propriedades conhecidas como "Estâncias", os animais são criados livremente permanecendo nos pastos mantendo relações de convívio com os bovinos durante o ano todo, Censo Agropecuário 1996, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, ( IBGE 1998).

O gênero *Leptospira* sp, família *Leptospiraceae*, recentemente foi classificado por estudos de afinidades antigênicas e análises moleculares, e os agentes etiológicos das leptospiroses foram divididos em duas espécies patogênicas e não patogênicas. As *Leptospiras* patogênicas estão divididas em oito espécies, distribuídas em mais 200 sorovariedades e arrançadas em 23 Sorogrupos (Yasuda et al., 1987; Faine, 1999 e Bolin, 1996).

As *Leptospiras* patogênicas são zoonoses de importância para o homem e os animais, e já foram descritas em uma grande variedade de animais domésticos e selvagens, que adquirem naturalmente a infecção, no entanto um pequeno número de animais manifestam a doença. Os ovinos são os animais domésticos considerados menos susceptíveis, porém sofrem a ação das *Leptospiras* patogênicas, e em muitos casos são assintomáticos, a doença geralmente ocorre na forma de surtos causando perdas nas ovelhas em gestação e nos cordeiros, as duas categorias de animais considerados de maior risco. Pode se manifestar de forma aguda, sub-aguda e crônica, caracterizando-se por quadros clínicos de septicemia, hemorragia, nefrite, seguido por icterícia, hemoglobinúria, mastite sanguinolenta, retorno ao cio, abortamento nas ovelhas e anemia hemolítica nos cordeiros com morte na primeira semana de vida. Ellis, (1994) Vermunt et al., (1994) e Ciceroni et al., (2000).

Das diversas sorovariedades que tem sido descritas em ovinos, a sorovariedade *hardjo* é a mais relatada em todo o mundo, portanto a maior causadora de problemas reprodutivos em ovelhas e de morte

cordeiros. Além dessa sorovariedade, também tem sido descritas outras sorovariedades, porém com menor frequência, podendo ser destacadas a presença das sorovariedades *L. pomona*, *ballum*, *bratislava* e *grippotyphosa*. (Hartley 1952; Sullivan, (1974); Davinson & Hirsch, (1980); Ellis, (1983) e Ellis, (1986)

No Brasil, inquéritos sorológicos feitos por Langoni et al., (1995) em ovinos e Vasconcelos, (1997) em bovinos, demonstraram a distribuição de *Leptospira* sp em vários Estados brasileiros. No Rio Grande do Sul, onde a criação dessas duas espécies são comuns, nos mesmos pastos e aguadas, a infecção por *Leptospira* sp provavelmente está estabelecida nos rebanhos.

Apesar do Estado do Rio Grande do Sul possuir a maior população ovina do Brasil, e da existência de reclamações antigas dos produtores sobre problemas reprodutivos nas ovelhas e de morte de cordeiros nas primeiras semanas de vida, não se encontrou na literatura técnica e científica registros de trabalhos sobre a importância do provável papel das leptospiroses nesses quadros.

Com base nesses pressupostos, o presente estudo teve como objetivo determinar a soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* sp em ovinos nas Mesorregiões Sudoeste e Sudeste Rio-Grandense no período de janeiro a março de 1999.

### 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de amostras foram realizadas entre os meses de janeiro a março de 1999 em rebanhos de ovinos criados em 136 fazendas localizadas nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense na região Sul do Brasil, no ponto extremo Sul da Federação, com latitude Norte - 28°06'22" e Sul -33°60'42" da linha do Equador, longitude Leste -49°60'22" e a Oeste-57°60'34" do Meridiano de Greenwich<sup>2</sup> (Figura 1.)

<sup>2</sup> <http:// www.datasus.gov.br> 11/02/2002



Para determinar a soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira sp* nos ovinos nas Mesorregiões Sudoeste e Sudeste Rio-Grandense (Figura 1.), utilizou-se a seguinte fórmula para calcular o número de ovinos a serem estudados, segundo o Centro Panamericano de Zoonoses (Cepanzo, 1979).

$$n = \frac{p \cdot (100-p) \cdot \alpha^2}{(p \cdot d/100)^2}$$

onde,

p= Prevalência Esperada =12%

$\alpha$ = Grau de Confiança 95% = 1,96

d= Erro Amostral= 15%

A amostra calculada de 1252 animais, foi aumentada em 30 %, ou seja, aumentou-se 378 animais, totalizando 1630 ovinos.

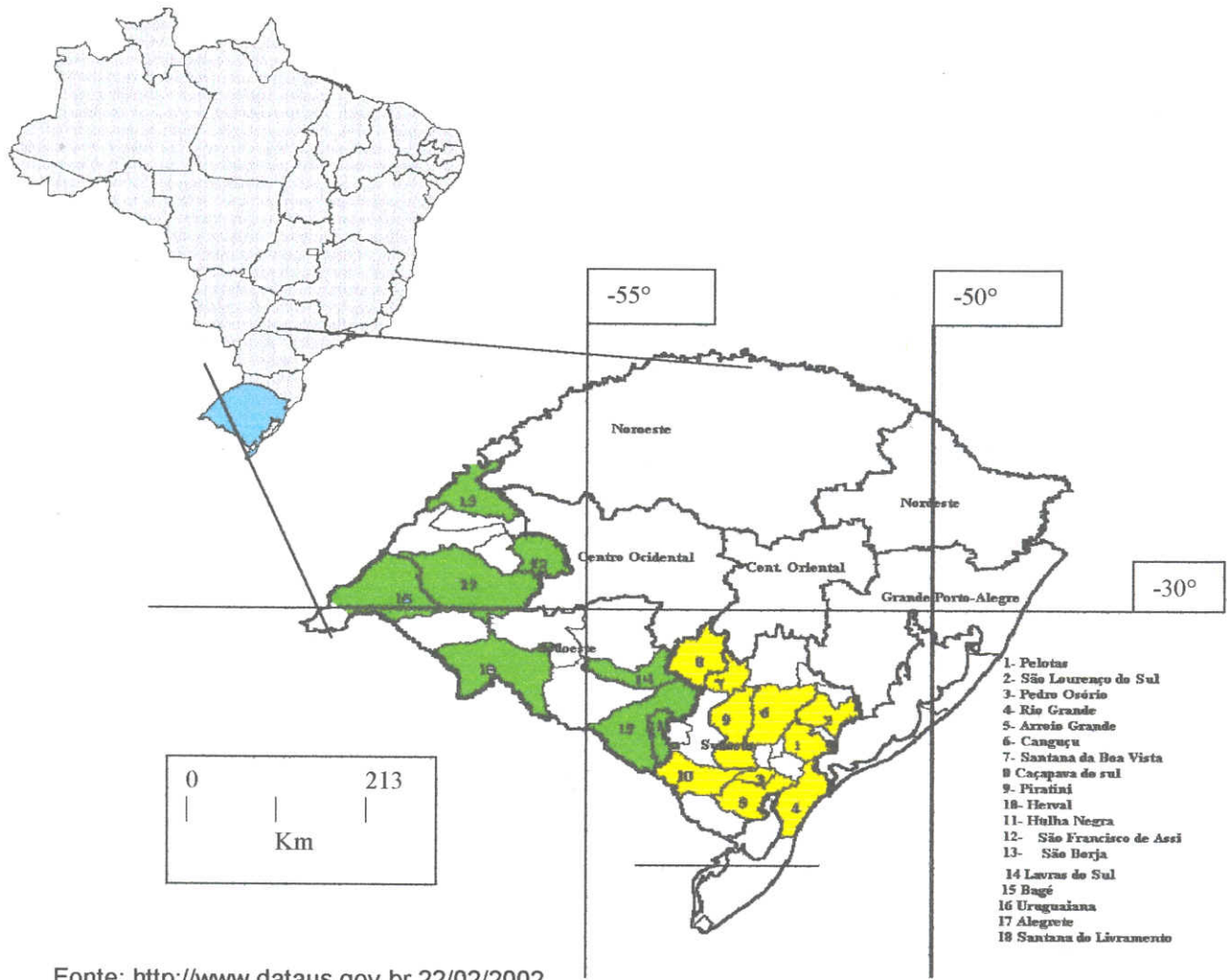
Selecionou-se aleatoriamente 50 % dos municípios das duas Mesorregiões do estudo, resultando 10 municípios na Mesorregião Sudeste (Pelotas, São Lourenço do Sul, Pedro Osório, Rio Grande, Arroio Grande, Canguçu, Santana da Boa Vista, Piratini e Herval) e 8 na Mesorregião Sudoeste (Hulha Negra, São Francisco de Assis, São Borja, Lavras do Sul, Bagé, Uruguaiana, Alegrete e Santana do Livramento (Tabela 1 e Figura 1).

A população de ovinos dos município selecionados foi obtida dos arquivos do censo agropecuário do ano de 1996, (IBGE 1998) e, para obter o número de fazendas a ser coletada nos municípios selecionados, foi feita a divisão do total de ovinos criados nos 18 municípios (2.380.230), por 163 propriedades, resultando desta forma em intervalo amostral 14.284 mil animais.

A população ovina dos municípios selecionados foi ordenada de forma crescente (Tabela 1) e o intervalo amostral de 14.284 animais, foi aplicado também naqueles municípios com população ovina com intervalo amostral inferior, onde foi também sorteado uma fazenda. As fazendas amostradas foram sorteadas em cada município, a partir dos registros nos arquivos das Inspetorias Veterinária da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul, (Tabela 1)

Todos os ovinos sorteados ao acaso possuíam mais de um ano de idade, e no momento da coleta estavam clinicamente sadios e sem registros de histórico de doenças interferindo na reprodução. As amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular, e os soros congelados a -20°C e transportados em gelo, até o Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, onde foram conservadas sob refrigeração até a realização dos testes.

Foi utilizada como antígenos uma bateria formada por 18 amostras representando 17 sorovariedades de *Leptospira sp*, (Tabela 2), cultivadas meio de EMJH, por sete dias de incubação a 27°C, contendo aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  bactérias por ml, livres de contaminantes e de auto-aglutinação. A escolha da bateria de antígenos foi feita a partir dos registros dos estudos sorológicos realizados em ovinos e acrescido das sorovariedades mais prevalentes encontradas nos estudos sorológicos em bovinos por diferentes autores no Brasil.



Fonte: <http://www.dataus.gov.br> 22/02/2002  
 Figura 1. Localização geográfica dos Municípios nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense em relação ao Brasil

Tabela 1. Municípios selecionados para coletas de soros de ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, RS. 1999

Município	População de ovinos	Amostras previstas		Amostras coletadas		Mesorregião
		Propriedades	Animais	Propriedades	Animais	
1 Pelotas	3.677	1	10	1	10	Sudeste
2 São Lourenço do Sul	13.947	1	10	1	10	Sudeste
3 Hulha Negra	16.563	1	10	1	10	Sudoeste
4 Pedro Osório	25.204	2	20	2	20	Sudeste
5 Rio Grande	30.348	2	20	2	20	Sudeste
6 São Francisco de Assis	41.553	4	40	4	40	Sudoeste
7 Arroio Grande	53.402	4	40	4	40	Sudeste
8 Canguçu	53.628	4	40	4	40	Sudeste
9 Santana da Boa Vista	62.259	4	40	4	40	Sudeste
10 São Borja	78.149	5	50	5	50	Sudoeste
11 Lavras do Sul	81.657	6	60	5	50	Sudoeste
12 Caçapava do Sul	85.884	6	60	5	50	Sudeste
13 Piratini	143.984	10	100	5	50	Sudeste
14 Bagé	178.761	12	120	12	120	Sudoeste
15 Herval	185.450	13	130	13	130	Sudeste
16 Uruguaiana	386.717	25	250	24	240	Sudoeste
17 Alegrete	423.446	30	300	30	300	Sudoeste
18 Santana do Livramento	463.491	32	320	14	140	Sudoeste
Total	2.328.230	163	1630	136	1360	

Fonte: Censo agropecuário 1996 (IBGE, 1998)



Tabela 2. Sorovariedades de *Leptospira* sp, utilizados como antígeno para técnica de microaglutinação microscópica.

Sorogrupos	Sorovariedades	Espécies	Amostras
AUSTRALIS	australis	<i>L. interrogans</i>	BALLICO
	bratislava	<i>L. interrogans</i>	JEZ BRATISLAVA
AUTUMNALIS	autumnalis	<i>L. interrogans</i>	AKIYAMY H
	fortbragg	<i>L. noguchii</i>	FORT BRAGG
BALLUM	castellonis	<i>L. borgpetersenni</i>	CASTELLON 3
CANICOLA	canicola	<i>L. interrogans</i>	HOND UTRECHT IV
DJASIMAN	sentot	<i>L. interrogans</i>	SENTOT
GRIPPOTYPHOSA	grippotyphosa	<i>L. interrogans</i>	MOSKVA V
HEBDOMADIS	hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	HEBDOMADIS
ICTEROHAEMORRAGIAE	icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	RGA
MINI	mini	<i>L. santarosai</i>	SZWAJZAK
POMONA	pomona	<i>L. interrogans</i>	POMONA
PYROGENES	pyrogenes	<i>L. interrogans</i>	SALINEM
SEJROE	sejroe	<i>L. borgpetersenni</i>	M 84
	hardjo	<i>L. interrogans</i>	HARDJOPRAJITNO HARDJO (CTG)
	wolffi	<i>L. interrogans</i>	3705
TARRASOVI	<i>tarrasovi</i>	<i>L. borgpetersenni</i>	PEREPELECIN

Os testes sorológicos foram realizados pela técnica de microaglutinação microscópica (MAT) segundo Cole et. al., (1973), modificada no tempo de incubação para 60 minutos.

As leituras das reações foram feitas diretamente na microplaca (NUNC F, Dinamarca) com microscópio, equipado com condensador seco de campo escuro, objetiva de longa distância Epiplan LD 10X/0.20, oculares E-pi 10X/20 e EP-L 10X/20, Axiolab®.<sup>1</sup>

Os soros foram testados a partir da diluição de 100, sendo considerados positivos os soros que apresentaram 50% ou mais de aglutinação e os soros positivos foram diluídos na base 2 até determinação do título final.

Em virtude da população ovina de cada fazenda sorteada ser muito diferenciada, a soroprevalência foi calculada ponderando-

se os valores, segundo Bennett et al., (1991).

### 3.3. RESULTADOS

Dos 18 municípios sorteados nas Mesorregiões sudeste e sudoeste Rio Grandense, em um (Pelotas), não ocorreram animais reagentes pela técnica da MAT e das 136 propriedades estudadas, em 113 (83,09%) houve pelo menos um animal positivo para uma das 17 sorovariedades de *Leptospira* sp utilizada na bateria de antígeno (Tabela 3).

Das 1360 amostras de soro testadas, 466(34,26%) (IC 95% 29,74 a 38,78%) apresentavam reação positiva, com títulos de anticorpos superiores a 100, para várias sorovariedades conforme dados. Era registrada aquela que apresentava maior título (Tabela 3).

Nesse trabalho foram utilizadas duas amostras da sorovariedades hardjo, sorogrupo serjoe (hardjoprajitno, padrão e hardjo CTC, isolada na Escola de

<sup>1</sup> Axiolab Schott-Zeiss do Brasil Ltda Av. Nações Unidas 21711, São Paulo - SP. CEP 04795-100



Veterinária da UFMG). Essas amostras foram as mais prevalentes na bateria utilizadas representando 30,10% do total de reações (IC 95%, 16,96%-44,23%). Das 233 reações positivas para a sorovariedade hardjo, 110 foram para hardjo CTG e 23 para hardjoprajtino e 100 com reações para as duas soroviedades concomitantemente (Tabela 5).

Em ordem decrescente, a segunda mais prevalente foi a sorovariedade sentot com 152 reações (16,8% IC – 95%, 7,15 – 26,45%) seguida pela sorovariedade fortbragg com 73 reações (6,3% IC 95% 3,72 – 8,88%).

Tabela 3. Distribuição da soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira sp* em 1360 soros ovinos das Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, 1999

Soroviedades	Ovinos	Prevalência <sup>a</sup>	95(%)IC <sup>b</sup>
<i>hardjo</i>	233	30,66	16,96- 44,23
Amostra CTG	210	28,40	14,54-42-26
Amostra <i>hardjoprajtino</i>	23	1,69	0,00- 3,45
<i>sentot</i>	152	16,8	7,15-26,44
<i>fortbragg</i>	73	6,3	3,71-8,88
<i>wolffi</i>	39	4,7	2,21-7,18
<i>pyrogenes</i>	25	1,8	0,00-3,74
<i>australis</i>	21	1,5	0,40-2,60
<i>pomona</i>	20	1,6	0,00-3,55
<i>sejroe</i>	19	2,2	0,00-4,64
<i>castellonis</i>	18	1,8	0,32-3,27
<i>hebdomadis</i>	17	1,25	0,00-2,64
<i>icterohaemorrhagiae</i>	16	1,10	0,00-1,03
<i>grippotyphosa</i>	9	0,60	0,00-1,45
<i>canicola</i>	8	0,6	0,00-1,28
<i>tarassovi</i>	7	0,6	0,00-1,32
<i>bratislava</i>	4	0,2	0,00-0,48
<i>autumnalis</i>	3	0,1	0,00-0,30
<i>mini</i>	0	0,0	0,0-0,0

a- Prevalência ponderada calculada segundo Bennet et al., (1991) (48,7% IC 95% 35,4%-62,00%)

b- Intervalo de Confiança 95%

Tabela 4. Distribuição absoluta dos títulos das reações de aglutininas anti-*Leptospira* sp nos soros ovinos positivos das Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, 1999.

Sorovariedades	Títulos						Total
	100	200	400	800	1600	3200	
1 <i>hardjo</i> CTG	79	53	32	29	11	6	210
2 <i>sentot</i>	101	39	11	1	0	0	152
3 <i>hardjoprajitno</i>	73	30	15	9	4	2	133
4 <i>fortbragg</i>	46	19	8	0	0	0	73
5 <i>pyrogenes</i>	20	3	2	0	0	0	25
6 <i>castellonis</i>	17	1	0	0	0	0	18
7 <i>pomona</i>	14	5	0	1	0	0	20
8 <i>australis</i>	18	2	1	0	0	0	21
9 <i>icterohaemorrhagiae</i>	15	0	1	0	0	0	16
10 <i>wolffi</i>	25	8	3	3	0	0	39
11 <i>sejroe</i>	17	1	1	0	0	0	19
12 <i>hebdomadis</i>	13	4	0	0	0	0	17
13 <i>grippotyphosa</i>	8	1	0	0	0	0	9
14 <i>canicola</i>	8	0	0	0	0	0	8
15 <i>tarassovi</i>	7	0	0	0	0	0	7
16 <i>bratislava</i>	3	1	0	0	0	0	4
17 <i>autumnalis</i>	2	1	0	0	0	0	3
18 <i>mini szwajizak</i>	0	0	0	0	0	0	0
Total	466	168	74	43	15	8	774

Tabela 5. Número de soros positivos encontrados em 1630 amostras frente a sorovariedade *hardjo*, amostras *hardjo* CTG e *hardjoprajitno*

Sorovariedade	Amostra referência	Positivos	Negativos
<i>hardjo</i>	-	233	1127
	CTG	110	1250
	<i>Hardjoprajitno</i>	23	1337
	CTG/ <i>hardjoprajitno</i>	100	1260

Tabela 6. Títulos encontrados na sorovarietade *hardjo* amostras *hardjoprajitno* e *hardjo* CTG.

	Amostras			<i>Hardjoprajitno</i>					
	Títulos	100	200	400	800	1600	3200	Negativos	Total
<i>Hardjo</i> CTG	100	6	6	0	0	0	0	58	70
	200	38	1	1	0	0	0	20	60
	400	5	12	0	3	0	0	13	33
	800	7	7	9	0	0	0	7	30
	1600	1	1	2	4	0	1	1	10
	3200	0	0	0	2	3	1	1	7
	Negativos	16	5	2	0	0	0	1127	1150
	Total	73	32	14	9	3	2	1227	1360

### 3.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho, embora semelhante àqueles encontrados por Santa Rosa et al., 1963, 1969/70 e Langoni et al., 1995 no Estado de São Paulo, Viegas, 1980, Caldas et al., 1983 e 1986 na Bahia e menores do que aqueles relatados por Caldas et al., 1989; Viegas 1994; Caldas 1994; Caldas et al., 1995/96<sup>a</sup> e Caldas et al., 1997/98, não podem ser comparados pois enquanto a maioria dos autores trabalhou com amostras de animais com problemas, sem representação estatística, nesse, foi aplicado métodos de amostragem probabilística, além do local e o período de pesquisa serem diferentes. Ainda há que se ponderar que a bateria dos antígenos utilizados, tanto nesse trabalho como nos citados acima não era a mesma.

A prevalência ponderada de 48,7% (IC 95%, 35,4-62,0%) encontrada nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense e em 17 dos 18 municípios probabilisticamente sorteados, evidenciam sua larga dispersão na região e corroboram com o trabalho de Santa Rosa e Pestana de Castro (1963), que já naquela época alertaram aos criadores e técnicos gaúchos sobre a possibilidade da leptospirose ser um dos grandes responsáveis por enormes prejuízos econômicos da ovinocultura do Sul, principalmente ligado aos episódios reprodutivos e mortalidade de recém-nascidos, o que não foi objetivo desse trabalho. Por outro lado, a não detecção de anticorpos em animais do município de Pelotas, não indica que esse seja livre da doença, pois as condições locais, de

baixadas alagadas são propícias a manutenção da doença. No entanto, a coleta de somente, 10 animais de um único rebanho, devido ao delineamento experimental utilizado, pode ter sido um equívoco metodológico.

Das 774 reações encontradas no soro dos animais infectados utilizado nesse trabalho, houve uma variação nos títulos aglutinantes de 100 até 3200. Desses, 634 (81,91%) eram menores ou iguais a 200 e, 140 (18,19%) iguais ou superiores a 400. Isso mostra uma situação epidemiológica grave, pois demonstra que a infecção está ativa o que confirma os achados de Ellis (1994) que encontrou animais recentemente infectados com título variando entre 100 e 200. Nesse trabalho o maior título encontrado foi 3200, sugerindo infecção muito mais grave.

A sorovarietade *hardjo* é largamente distribuída entre animais domésticos no Brasil e com certa frequência pode-se encontrar animais com título de anticorpos antileptospira superiores a 100, sem no entanto, que estes apresentem sinais clínicos clássicos de leptospirose, entretanto, uma anamnese mais acurada pode revelar uma série de conseqüências danosas, tais como transtornos reprodutivos, natimortos e crias fracas com altas taxas de mortalidade nos primeiros dias de nascidos, o que já foi comprovado por Ellis (1982). Isso pode levar muitas vezes a diagnósticos incorretos e conseqüentemente medidas de controle inadequadas.



Embora o trabalho tenha seguido o procedimento tradicional de partir de uma diluição de 100 e considerar os animais positivos com título de 100 ou maior, Blackmore et al. (1982) afirmam que animais com título  $\leq 50$  podem ser considerados infectados e apresentar transtornos reprodutivos, desta forma, estes resultados podem estar subestimados.

É sabido que estudos em bovinos, a sorovariedade mais prevalente no Brasil é a hardjo (Moreira, 1994) e (Vasconcelos, 1997). Nessa pesquisa em ovinos, também a mesma foi a mais prevalente e coincidentemente com as maiores freqüências na Mesoregião Sudoeste, onde estão localizados as maiores estâncias e as maiores concentrações de ovinos e bovinos (Arroio Grande, Canguçu, Alegrete,, Santana da Boa Vista, Caçapava do Sul, Piratini, Herval, Bagé, Uruguaiana, Alegrete e Santana do Livramento).

Embora a sorovariedade hardjo seja a mais prevalente nesse trabalho, foram utilizadas na bateria, duas variantes, uma considerada padrão, (hardjoprjaitino) e uma amostra isolada (Norma) por Moreira (1994) em bovinos de Minas Gerais. Os resultados obtidos evidenciaram a necessidade de estudos sobre as baterias de antígenos utilizados em diagnóstico de rotina. Dos 233 animais positivos para a sorovariedade hardjo, 110 (8,09%) reagiram só para a variante "norma", 23 (1,69%) só para a ocorrente "hardjoprjaitino" e 100 (7,35%) para as duas variantes concomitantemente. Esse fato sinaliza a necessidade de pesquisa e isolamento de novos sorovares ocorrentes nos rebanhos, pois os antígenos mantidos indefinidamente em meios de cultura com repiques freqüentes, pode selecionar variantes que diferem daquelas encontradas na natureza, como parece ser o que ocorreu nesse trabalho.

Outro fato importante é a controvérsia entre pesquisadores sobre achados de pesquisa, assim, Moreira (1994) afirma que é raro ocorrer duas ou mais sorovarietades infectando o mesmo rebanho, enquanto Roth & Galton (1960) sugere a possibilidade da hardjo e sejroe ocorrerem

simultaneamente, o que parece ter sido esse caso.

Sendo a sorovariedade hardjo a mais prevalente nos rebanhos bovinos brasileiros, é a primeira vez que sua presença é relatada em ovinos no Rio Grande do Sul o que era esperado pelo tipo misto de criação ovino/bovinos em regime extensivo. De fundamental importância, constatou-se o fato de que a cepa Norma, isolada em Minas Gerais por Moreira (1994) tem maior prevalência no Rio Grande do Sul, superando a amostra padrão hardjoprjaitino. Isso indica que as vacinas usuais do mercado, feitas com amostras padrões, podem não estar protegendo dentro da margem de segurança ou ainda estar permitindo resultados não confiáveis, quando se usa só amostra padrão na Bateria de antígenos.

Nesse trabalho, foi a primeira vez no Brasil que é relatada a presença da sorovariedade Sentot em animais domésticos, com o agravante de ser o segundo sorovar em prevalência com (16,8%) (IC 95% 7,15 – 26-45%) nos animais estudados. O único relato desse sorovar no Brasil foi em um paciente humano no Estado de São Paulo (Alterio & Cunha, 1966). Isso provavelmente porque essa sorovariedade não está incluída nas baterias de antígenos usualmente utilizados não pela sua ausência no ambiente. Esse achado corrobora os comentários de Faine (1982) indicando a necessidade de isolamento e tipificação de novos sorovares, sempre que são detectados a primeira vez em uma região.

A sorovariedade pomona foi encontrada nesse estudo, somente na mesoregião sudeste com baixa prevalência de 6% (IC 95% 0,35 – 3,55), no entanto o estado de alerta não deve ser esquecido, pois essa leptospira poderá ser talvez a que causa maiores perdas econômicas (Cousins et al. 1989, Bahman et al. 1980, Ellis et al., 1983 e Ellis, 1994).

O ambiente e o manejo produtivo de bovinos e ovino no Rio Grande do Sul, favorecem a manutenção e disseminação da doença. Embora os bovinos sejam os

hospedeiros principais da leptospira hardjo, o estreito convívio dos ovinos com bovinos, principalmente nas grandes estâncias, propicia essa transmissão entre espécies e, a partir de ovinos infectados pode ocorrer disseminação entre os da sua espécie. Outro modo freqüente de transmissão poderá ser a alimentação de cordeiros com leite de vaca, prática usual que ocorre em casos especiais de parição múltipla, morte da mãe ou animais fracos que não acompanham o rebanho. Esses e outros fatores são amplamente discutidos por outros autores como Simpson & Done, 1989; Ellis, 1994; Cousins & Robertsons, 1986; Cousins et al. 1989; Draghi de Bernilg (Biotti de Carceres, 1998).

O Rio Grande do Sul tem o maior rebanho ovino do Brasil com grande tradição pecuária, até o presente momento não havia notificação da leptospirose como uma causa importante no aparecimento de transtorno reprodutivos e mortalidade de animais jovens. Um dos poucos trabalhos sobre o assunto, foi feito por Oliveira e Barros, 1982 que estudaram casos de morte de cordeiros, analisados por histopatologia sem direcionar o diagnóstico na busca de agentes infecciosos. Os resultados desse trabalho sugerem necessidade de estabelecer e implantar um programa sanitário na pecuária de ovinos visando determinar os agentes infecciosos mais prevalentes e propor medidas de controle.

### 3.5 CONCLUSÃO

O rebanho ovino das Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, está exposto a várias sorovariedades de *Leptospira sp*, sendo a mais prevalente a sorovariedade *hardjo* seguido das sorovariedades *sentot* e *fortbragg*.

Há necessidade da elaboração de programas de controle da doença por meio da produção e o uso de vacinas homologas específicas para a região, e a adoção de uma série medidas profiláticas entre elas incluem a vacinação sistemático de todos os ovinos do plantel.

Realizar novas pesquisas da *Leptospira sp* no Estado do RS, estendendo os estudos também no homem e outras espécies de animais, destinando esforços para o isolamento a identificação de amostras.

### 3.6. AGRADECIMENTOS

À FEP/MVZ Coordenação Preventiva pelo apoio financeiro. à CAPES/PICDT (GPH), ao CNPq pelas bolsas concedidas, à BRAZEISS Representações LTDA pelo empréstimo do microscópio, à Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Rio Grande Do Sul e a Antônio Benjamim de Paula pelo auxílio técnico laboratorial.



#### 4. AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA ANTI-*Leptospira hardjo* EM OVINOS

##### RESUMO

Foi produzida uma bacterina oleosa com a sorovariedade harjo, para uso em ovinos. A capacidade imunogênica da bacterina e o período de proteção foram testados em ovinos e acompanhados de teste de ELISA por 120 dias. Utilizou-se três grupos de 15 ovelhas, cada. O primeiro grupo recebeu uma única dose, o segundo duas doses intervaladas de 30 dias e o terceiro era o controle. Os resultados indicam que houve produção de anticorpos e que as duas vacinações foram mais eficientes. O pico de proteção aconteceu aos 30 dias e se mantiveram com a revacinação até 60 dias, com queda significativa após este período. O grupo vacinado uma única vez apresentou queda de anticorpos aos 30 dias.

Palavras-Chave: Vacina, Ovinos, Elisa, Adjuvante

##### SUMMARY

An oil bacterin was produced with the Hardjo serovar, for use in sheed. The imunogenic capacity of the bacteria and the protection period was tested in sheep followed by ELISA test for 120 days. It was used three groups of fifteen sheep each. The first group received an unique dose, the second two doses with an interval of 30 days and the third was the control group. The results indicate that there was an antibody production and that the two vaccines were efficient. The highest level of protection happened at 30 days and were maintained until 60 days with revaccination, with an significative decrease after this period. The group that was vaccinated only once presented an antibody decrease with 30 days.

Word-key: vaccine, Ovines, Elisa, Adjuvant

##### 4.1 INTRODUÇÃO

As Leptospiroses são zoonoses de distribuição mundial que afeta os animais domésticos, selvagens e o homem. Essas doenças são causadas por espiroquetas do gênero *Leptospira*. As *Leptospiras sp* estão divididas em oito espécies patogênicas e mais de 200 sorovariedades (Yasuda, 1987, Bolin, 1996 e Faine, 1999). Teoricamente, qualquer uma das diferentes sorovariedades pode infectar o homem e os animais, porém na prática um pequeno número de sorovariedades torna-se endêmica em uma determinada espécie e área (Ellis et al., 1994).

As leptospiroses nos ovinos geralmente ocorrem na forma de surtos e a doença na sua forma mais grave está associada as 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 semana de vida (Ellis, 1991; Ellis et al., 1983).

No Brasil, já foi demonstrada a presença de *Leptospira sp* em ovinos criados em vários Estados, especialmente em rebanhos com históricos de problemas reprodutivos (Santa Rosa e Pestana de Castro 1963, Langoni et al., 1995).

Tem sido verificada cada mais a importância das *Leptospira sp* em ovinos por estudos soropidemiológicos. Recentemente, nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste Rio-Grandense, foi registrada uma soroprevalência de (48,7%). A sorovariedade *hardjo* foi encontrada com frequência de 30,6% (Herrmann, 2002, Capítulo 2) sugerindo o envolvimento da mesma nos problemas reprodutivos. Outros trabalhos já demonstraram a capacidade dos ovinos de se tornarem reservatórios da

sorovariedade *hardjo* (Gerritsen et al., 1994, Gordom, 1990)

No Brasil, o controle das leptospiroses em ovinos com uso de bacterinas comerciais são conhecidos, assim como na maioria dos países com grandes criações de ovinos. Geralmente são utilizadas bacterinas disponíveis no mercado para a utilização em bovinos sem haver, contudo, uma avaliação da imunogenicidade das mesmas para ovinos

O Objetivo do presente estudo foi produzir uma bacterina oleosa monovalente com a sorovariedade *hardjo* e acompanhar a dinâmica de produção de anticorpos induzida pela vacinação de ovinos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 PRODUÇÃO DA BACTERINA

A bacterina foi produzida em partida única. A amostra (Norma) de *Leptospira hardjo* (gentilmente cedida pelo professor Elvino Carlos Moreira, da Escola de Veterinária da UFMG, foi cultivada em meio de EMJH modificado com fração "V" de albumina bovina (Ellinghausen & McCullough, 1965) por 14 dias a 28°C. Quando a cultura apresentou contagem de aproximadamente  $2 \times 10^8$  bactérias por ml, foi inativada com formol na concentração final a 0.3% e emulsionada em um adjuvante oleoso Emulsigem<sup>®1</sup>, por 24 horas em homogeneizador circular com 96 rotações por minuto. A vacina foi padronizada  $1 \times 10^8$  por ml. A pureza do cultivo foi avaliada por microscopia de campo escuro, os testes de esterilidade feitos em meios apropriados e a inocuidade avaliada em coelhos jovens por 14 dias, conforme normas preconizadas por United States Department of Agriculture (USDA, 1976) e Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2001).

<sup>1</sup> MVP. Laboratories, Inc, Ralstron, Nebraska. 68127-3825

### 4.2.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais utilizados no experimento foram 40 ovelhas, não gestantes, da raça Santa Inês, com mais de um ano de idade, criadas em de um rebanho livre de *Leptospira sp.*, previamente monitorados por soroaglutinação microscópica (MAT) por período de um ano. Foram mantidas em piquetes coletivos alimentadas com capineiras e leguminosas nativas da região. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

**Grupo A:** formado por 15 ovelhas que receberam duas doses de 3 ml da bacterina, sendo a primeira dose foi aplicada no dia zero e a segunda dose foi aplicada trinta dias após.

**Grupo B:** formado por 15 ovelhas que receberam apenas no dia zero uma dose de três ml da bacterina.

**Grupo C (controle negativo):** formado por 10 ovelhas e recebeu no dia zero uma única dose de três ml de solução salina.

Em todos os grupos o inóculo foi administrada por via subcutânea no terço médio do pescoço.

Foram realizadas cinco coletas de sangue dos três grupos, obedecendo a intervalos de tempo iguais. A primeira coleta foi procedida no dia zero, imediatamente antes da aplicação da bacterina e as quatro restantes foram feitas nos dias 30, 60, 90 e 120 dias após a primeira vacinação.

Foi utilizado como soro controle negativo, os soros obtidos do dia zero das 40 ovelhas, momento que ainda os animais não tinham sido vacinados e não tinham anticorpos anti-leptospira.

O soro controle positivo foi produzido conforme protocolo Faine, (1982), em 4 ovelhas com idade aproximada de oito meses, de um rebanho livre de *Leptospira sp.* As 4 ovelhas receberam cinco doses do antígeno contendo aproximadamente de  $1-2 \times 10^8$  bactérias por ml da amostra *hardjo*



(Norma), inativado com formalina 0,3%. As cinco doses do antígeno foram aplicadas com intervalo de sete dias. Com as seguintes doses 1, 2, 4, 6 e 6 ml. A primeira dose do antígeno foi aplicada por via endovenosa, as demais 4 doses por via subcutânea região do pescoço.

Semanalmente foram coletadas amostras de sangue para o acompanhamento do aumento do títulos dos quatro animais pelo MAT conforme Cole et al (1973), e o título máximo de 10.240, foi obtido na quinta coleta, realizada no 28º dia, sete dias após a quarta aplicação.

#### **4.2.3 ELISA IgG ANTI-LEPTOSPIRA HARDJO**

O antígeno foi preparado em uma partida única, conforme os procedimentos recomendados por Terpstra *et al.*, (1980) e Hartskeerl *et al.*, (2001), como segue: uma cultura de amostra *hardjo* (Norma), mantida no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, foi cultivadas em meio de EMJH e incubada por 7-14 dias à 28°C, quando a cultivo apresentava um bom crescimento e pureza com concentração celular aproximada de  $1-2 \times 10^8$ , e uma turbidez equivalente ao tubo 3 da escala de MacFarland, foi inativado com formol numa concentração final 0.5%, por uma hora em seguida foi centrifugada em temperatura de 4°C por 30 minutos a 8.000 X g. A cultura então foi aquecida a 100°C em banho-maria por 30 minutos, deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente,. O sobrenadante foi separado do sedimento e novamente centrifugado em temperatura de 4°C para a retirada de resíduos celulares por 30 minutos a 8.000 X g. O antígeno obtido foi estocado em geladeira até o momento do uso.

O antígeno foi fixado nas microplacas (Maxisorp Nunc, Denmark), utilizando 100 µl de antígeno por poço. A adsorção foi procedida a temperatura ambiente e as placas sensibilizadas foram estocadas a 4°C. No momento do uso as microplacas foram tratadas com três lavagens com PBS pH 7.2 Tween 20 (0,05%), e incubadas com

PBS Tween 20 (0,05%), acrescido de 5% de leite em pó desnatado por 30 minutos à 37°C, para o bloqueio dos sítios inespecíficos.

As placas foram lavadas vigorosamente por três vezes com PBS Tween 20 (0,05%) acrescido de leite em pó 1%. Uma série de diluições dos soros dos 40 ovinos dos grupos A, B e C, de um total de cinco coletas, cada soro foi processado individualmente, e de cada amostra das respectivas coletas, foram diluídos seriadamente (base 2), iniciando em 1:10 até 1:10.240, em volume de 100 µl de PBS Tween 20 (0,05%). As placas foram incubadas por uma hora em câmara úmida 37°C, Lavadas novamente por 3 vezes com PBS Tween 20 (0,05%) acrescido de leite em pó 1%. 100 µl de conjugado diluído 1:10.000 anti (IgG) ovina, marcada com peroxidase (Bethyl, USA), foi adicionado nos respectivos poços. Após a incubar por uma hora a temperatura ambiente novamente foram lavadas por três vezes com PBS Tween 20 (0,05%) acrescido de leite em pó 1%. 100 µl de substrato cromogênico (15mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidina (TMB, sigma, USA), acrescentado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1%, e incubadas por 10 minutos em câmara escura. A reação foi bloqueada utilizando-se 30 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A leitura foi feita em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. Controles positivos negativos foram incluídos em todas as placas, para cada teste realizado.

O ponto de corte do teste foi calculado pela media geométrica conforme os procedimentos recomendados Harstkeerl *et al.*, (2001) e consistiu em titular os soros das 40 ovelhas sabidamente negativas da coleta do dia zero. A maior leitura obtida dos soros dos animais, foi dividido por dois. Portanto os soros dos animais vacinados que apresentavam na leitura em 450 nm igual ou superior a 0,342 de DO foram considerados positivos. Os títulos de anticorpos de cada amostra foram determinados como a recíproca da maior diluição que apresentou densidade ótica maior que o ponto de corte, que foi estabelecido em 80 para o teste.



#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As respostas imunológicas detectadas por MAT não mostraram-se adequadas para o monitoramento da resposta à vacinação e o teste de ELISA, segundo a metodologia utilizada, mostrou-se adequado para a mensuração da dinâmica de produção de anticorpos IgG anti-*Leptospira*.

O resultados negativos para MAT no grupo controle (C) durante todo o período do experimento demonstram que não ocorreu infecção natural por *Leptospira* no período. Desse modo, as variações de títulos de anticorpos detectados por MAT e por ELISA nos grupos A e B durante o experimento foram devidas à estimulação antigênica da vacinação (Tabela 1), o que havia sido comprovado anteriormente em estudos sorológicos com vacinas com a sorovariedade *hardjo* em bovinos por Goddard *et al.*, (1991)

Animais do grupo A apresentaram um pico de produção de IgG anti-*Leptospira* aos 30 dias após a primeira vacinação. Mesmo com a segunda vacinação esse pico manteve-se inalterado e apresentou um declínio após mais um período de 30 dias (Gráfico.1). Esses resultados demonstram que a vacina produzida, administrada em duas doses intervaladas de 30 dias, foi capaz de induzir a produção de IgG anti-*Leptospira* sem, contudo, ser capaz de manter o título de anticorpos por períodos superiores à trinta

dias . Desse modo, devem ser conduzidos novos experimentos avaliando esquemas de vacinação que utilizem um número maior de doses de vacina e um período de monitoramento sorológico de seis meses a um ano.

O pico de produção de IgM detectado por MAT no grupo A, trinta dias após a segunda vacinação, deve-se provavelmente a estimulação vacinal. Sabe-se que os lipopolisacarídeos de *Leptospira* se comportam como antígenos T independentes podendo induzir a produção de quantidades detectáveis de IgM (FAINE, 1999)

O pico de IgG observado no grupo B (mediana 160) após a primeira vacinação foi menor que o grupo A (mediana 320). Esses resultados vistos na (Tabela 1.), podem ser devidos à variação individual dos animais na resposta imune (Tyzard, 1998).

Os resultados obtidos demonstraram a capacidade imunogênica da vacina adsorvida em adjuvante oleoso, e que teve potencialidade de desencadear uma resposta nos animais, os títulos de anticorpo encontrados no teste de ELISA, segundo (Faine, 1982), deveriam ser confrontados e estabelecidas as relações entre os títulos de anticorpos e a proteção dos animais por ensaios de desafio com sorovariedade *L. hardjo* patogênica.

Tabela 1. Demonstração das medianas dos títulos de aglutininas anti-*Leptospira hardjo* nos grupos de ovinos A, B e C em três coletas de sangue, na avaliação da bacterina experimental por MAT e ELISA.

		MAT	ELISA	MAT	ELISA	MAT	ELISA	MAT	ELISA	MAT	ELISA
Grupo A											
1	537	0	10	160	640	160	320	40	80	0	160
2	545	0	10	80	320	160	320	40	80	0	80
3	547	0	10	80	160	80	320	20	80	0	80
4	571	0	10	80	160	80	160	10	40	0	40
5	636	0	20	80	640	160	160	20	160	0	80
6	642	0	10	40	160	160	160	20	160	0	160
7	697	0	10	40	320	160	80	20	80	0	80
8	753	0	10	40	320	320	320	10	160	0	160
9	759	0	10	40	160	80	320	40	40	10	160
10	765	0	10	160	320	80	640	20	80	10	80
11	794	0	20	160	320	160	80	20	160	0	80
12	832	0	10	80	80	80	320	20	80	0	160
13	1035	0	10	80	160	80	320	20	80	0	160
14	1081	0	10	80	160	80	160	20	160	0	320
15	1082	0	10	40	160	160	40	40	80	0	80
Mediana		0	10	80	320	160	320	20	80	0	160
Grupo B											
1	428	0	10	160	160	20	80	20	160	0	80
2	562	0	10	40	160	40	80	10	80	0	80
3	563	0	10	40	320	20	160	10	40	20	40
4	575	0	10	40	640	20	80	10	40	0	160
5	585	0	10	40	160	20	40	10	80	0	80
6	597	0	10	80	160	20	40	10	160	0	80
7	637	0	10	80	320	10	80	10	10	0	40
8	641	0	10	80	160	10	160	10	40	0	40
9	647	0	20	80	320	10	160	10	80	10	40
10	679	0	20	40	160	80	80	10	160	0	10
11	698	0	10	80	160	10	40	10	160	0	20
12	766	0	20	80	320	80	40	10	160	0	10
13	782	0	10	80	160	10	40	10	40	0	10
14	867	0	10	40	160	10	10	10	160	0	10
15	1084	0	10	40	320	10	80	10	80	0	20
Mediana		0	10	80	160	20	80	10	80	0	40
Controle											
1	423	0	20	0	80	0	40	0	40	0	40
2	459	0	10	0	40	0	20	0	40	0	20
3	508	0	10	0	20	0	80	0	80	0	20
4	531	0	10	0	40	0	80	0	80	0	20
5	614	0	20	0	40	0	40	0	20	0	20
6	638	0	20	0	20	0	80	0	80	0	20
7	649	0	10	0	10	0	80	0	20	0	20
8	703	0	20	0	40	0	40	0	10	0	20
9	706	0	10	0	40	0	80	0	80	0	10
10	754	0	20	0	40	0	80	0	40	0	20
Mediana		0	15	0	40	0	80	0	40	0	20

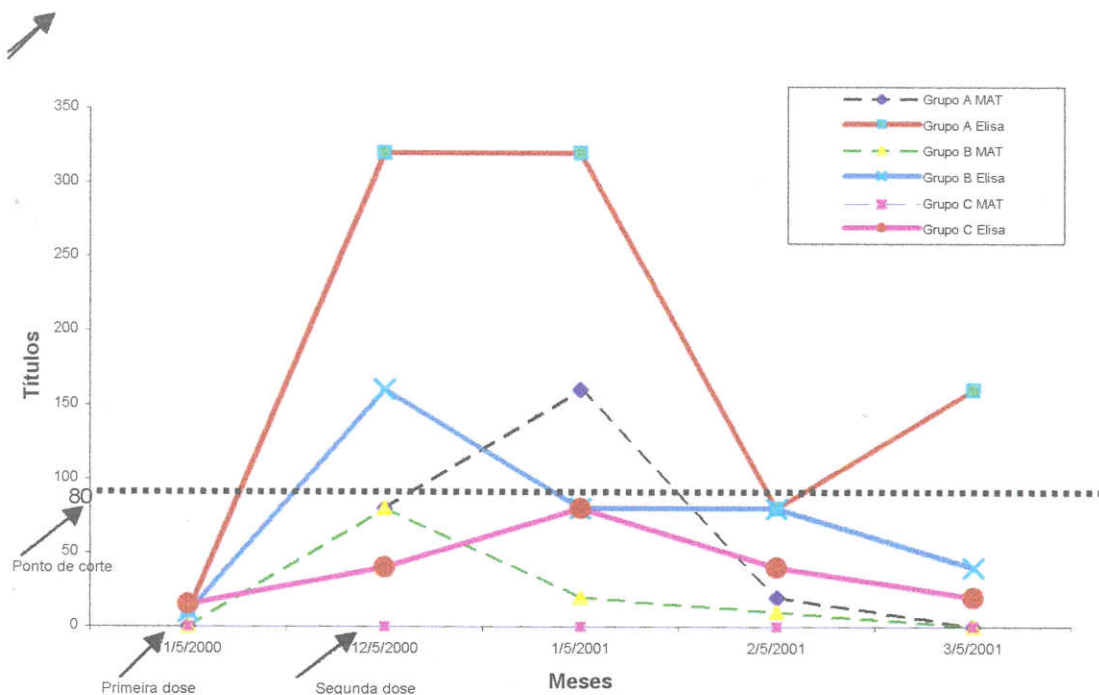


Gráfico 1. Curva das medianas dos títulos das reações vacinais anti-*Leptospira hardjo* nos grupos de ovinos A, B e C em cinco coletas de sangue por um período de 120 dias, nos testes de MAT e ELISA

#### 4.4 CONCLUSÃO

A vacina monovalente *hardjo*, adsorvida em adjuvante oleoso, foi imunogênica e os anticorpos foram detectados no 60 dias na técnica de aglutinação microscópica e por 120 dias no teste de Elisa.

O teste de Elisa com antígeno homólogo *L hardjo* detectou anticorpos vacinais por 120 dias e mostrou-se mais adequado, mostrando dinâmica da progressão vacinal, podendo ser indicado para monitorar programas de contra leptospiroses dos ovinos.

Novos experimentos devem conduzidos e avaliados diferentes esquemas de vacinação que utilizem um número maior de doses de vacina acompanhados com

desafio de campo e um período de monitoramento sorológico de seis meses a um ano.

#### 4.5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária -FEP- MVZ, Coordenação Preventiva. À Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin Embrapa - CPAP, Do Médico Veterinário Rodrigo Orzil Viana, A CAPES-PICDT pela bolsas concedidas, APL, ECM, RCL, Bolsistas do CNPq. e a Antônio Benjamim pelo apoio Técnico Laboratorial.



## 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Rio Grande do Sul está localizado no extremo sul do país, caracteriza-se pela exploração pecuária, predominando a pecuária bovina de corte e a ovinocultura de lã e mista para carne, criada para o consumo no local e nas próprias fazendas.

O Estado tradicionalmente, possuiu o maior contingente de ovinos, chegando nos tempos de maior produção a 12.000.000 de cabeças. Com o avanço da indústria têxtil e a evolução da indústria de fios sintéticos custos mais baixos, a pecuária de ovinos de lã, entrou em decadência, ficando relegados à segundo plano na economia pecuária, chegando na atualidade a um rebanho estimado em aproximadamente 5.000.000 de cabeças, menos de 50% do potencial já explorado.

Essa diminuição efetiva do rebanho ovino, está ligada principalmente a queda do preço da lã, da não especialização das raças dos animais para corte e possivelmente também por falta de um programa sanitário para identificar as causas das perdas por morte de animais e problemas reprodutivos.

Embora a ovinocultura esteja presente em todo o estado, cerca de 75% da população ovina está concentrada nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste, locais em que predominam as grandes fazendas, onde são prioritariamente criados bovinos de corte e concomitantemente os ovinos. Esse tipo de manejo, propicia em grande eficiência o estabelecimento de doenças transmissíveis ao alcance às espécies.

No levantamento bibliográfico feito para essa pesquisa, muito pouco foi encontrado sobre as doenças infecciosas que afetam os ovinos nesta região, sendo encontrado um trabalho de referência sobre as causas que levam à morte e aos transtornos produtivos na espécie ovina, descrito por Oliveira & Barros, (1982), os autores não incluíram entre as causas a *Leptospira sp* como possível agente causal, mas somente foram associados fatores não infecciosos, isso talvez não tenha sido o objetivo deles, já

que o diagnóstico e o levantamento foi exclusivamente por anatomia patológica.

Diante da ausência de dados e cientes de que a *Leptospira sp* é um agente infeccioso largamente distribuído nos rebanhos bovinos brasileiros e mundiais e que alguns pesquisadores como Santa Rosa e Pestana de Castro, (1963), já alertavam para a leptospirose em ovinos. Posteriormente Santa Rosa & Pestana de Castro, (1969/70) e Langoni et al., (1995), detectaram sorologicamente a presença da infecção em ovelhas no Estado de São Paulo e Caldas et al., (1980), e Viegas et al.,(1983), no Estado da Bahia, sempre, em ovinos com problemas reprodutivos, conclui-se que no Rio Grande do Sul e em outros Estados brasileiros a situação não deveria ser diferente. Isso se observa mais fortemente pelo fato de que em bovinos gaúchos já apresentaram essa infecção, relatada por Abuchaim & Dutra (1985).

Foi então proposto e executado um levantamento sorológico do rebanho ovino gaúcho. Para tanto foram escolhidos 10 municípios da Mesorregião Sudoeste e 8 da Mesorregião Sudeste, Mesorregiões estas que congregam a maioria dos animais do rebanho do Estado, cerca de 75%. Fez-se a amostragem por conglomerados em que de cada fazenda sorteada sangrava-se 9 ovelhas e um carneiro com mais de um ano, aparentemente sadio.

O método ideal para o diagnóstico da leptospirose é a evidência do agente, Santa Rosa (1970), mas o isolamento é difícil e a evidência por cortes histológicos para coloração pela prata ou por Imunofluorescência só são eficientes em casos clínicos, optou-se por um teste indireto em que evidencia a presença de anticorpos no soro.

Foi escolhida a técnica de aglutinação microscópica, que é um teste de referência e de eficiência comprovada,. (OIE, 2001). Embora essa técnica seja muito eficiente, ela tem alguns inconvenientes, a necessidade de utilizar antígenos vivos, o que é oneroso, a padronização dos sorotipos devem constar na bateria, o risco

de contaminação do operador e o tempo longo de incubação da reação entre outros. No entanto, ainda assim optou-se por ela. O tempo padrão de incubação da reação é de 120 minutos, embora outros autores tenham testado outros tempos, sem contudo determinar a padronização. Nesse caso foi executado a técnica em 60 minutos de incubação, com base em experiências prévias da equipe que executou a técnica nos tempos de 120, 60 e 30 minutos de incubação e não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os dois primeiros.

Dos 1360 soros coletados de 136 fazendas, localizadas em 18 municípios foi detectado pelo menos um animal positivo em 17 municípios, apenas em um único município não foi encontrado animais positivos, mesmos assim não significa que a microrregião esteja livre da doença.

É importante ressaltar que as *Leptospira sp* mais prevalentes foi a sorovariedade *hardjo* com duas amostras (Norma e *hardjoprajitno*), seguido pela sorovariedade *sentot*, pela primeira vez diagnosticada em ovinos no Brasil.

A presença da sorovariedade *pomona* na Mesorregião Sudoeste com baixa prevalência dessa sorovariedade, ao mesmo tempo serve de alerta indicando a necessidade de novas pesquisas, visto ser uma das sorovariedades que mais provoca aborto nos animais.

A maior prevalência da sorovariedade *hardjo*, já era esperada, pelo fato de ser também a mais prevalente nos bovinos brasileiros.

Os resultados encontrados sinalizam que há necessidade de intensificar os diagnósticos da leptospirose nos rebanhos Sul Rio-Grandense e que há necessidade ainda de tomar providências imediatas para controlar o problema, que pode ser um dos fatores que interferem na produtividade da pecuária ovina, aliado ao baixo preço da lã e o pequeno mercado da carne, levando ao desestímulo do pecuarista e seus agregados.

Detectado esses problemas, decidiu-se elaborar uma bacterina específica para ovinos, visto que no Brasil são comercializadas preferencialmente bacterinas para bovinos. Essas bacterinas encontradas no mercado contem uma gama de sorotipos, nem sempre aqueles ocorrentes no rebanho. Além disso, usou-se pela primeira vez um adjuvante oleoso, pois até então as bacterinas disponíveis no mercado nacional e no exterior eram adjuvadas com hidróxido de alumínio. Esse é um adjuvante muito eficiente, porém de duração média, e o adjuvante oleoso utilizado, tem duração prolongada e melhor eficiência.

Elaborou-se experimentalmente uma bacterina monovalente com a sorovariedade *hardjo* em adjuvante oleoso (Emulsigen), que foi inoculado em ovinos de rebanhos livres da doença e saudáveis.

Esses animais foram acompanhados mensalmente para a produção de anticorpos. Para tanto, foi construído um teste de ELISA que foi capaz de detectar anticorpos da classe IgG até 120 dias após a inoculação, naqueles animais que receberam uma dose reforço aos 30 dias. Nos animais vacinados somente com uma dose conseguiu-se detectar anticorpos apenas até 30 dias após a vacinação.

Esse experimento foi importante para determinar o período de revacinação em ovinos, o que não tinha sido feito até o momento. Por outro lado, a construção desse ELISA, abriu a possibilidade de testar a eficiência das vacinas comerciais disponíveis no Brasil. O teste MAT que é utilizado nas rotinas dos laboratórios detecta predominantemente IgM, que é uma imunoglobulina característica de infecções recentes, ao contrário de que se observa após a vacinação, essencialmente IgG.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados nessa pesquisa, pode-se afirmar que:

As *Leptospiras sp* estão amplamente distribuídas nos rebanhos ovinos do Rio Grande do Sul, onde as sorovariedades



mais prevalentes são a *hardjo* e a *sentot*. Embora a presença da sorovariedade *pomona* seja baixa, naquela região, ainda se constitui uma preocupação pelo grau de patogenicidade da estirpe.

Conclui-se também que embora a *Leptospiras sp* seja um problema na pecuária ovina, seu controle pelo uso bacterinas elaboradas com amostras prevalentes homologas é possível.

É importante salientar que a elaboração de um teste de ELISA eficiente, permitirá monitorar as bacterinas existentes contra *Leptospiras sp* no mercado brasileiro, até agora sem nenhum controle de qualidade.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCHAIM, D.M.; DUTRA, N.L.F. Prevalência da Leptospirose em bovinos da bacia leiteira de Porto Alegre-RS. **Arquivos Faculdade de Veterinária UFRGS**. v. 13, p.55-60, 1985.

ALTÉRIO, D.L.; CUNHA, J.C. Human leptospirosis caused by *Leptospira sentot*. **Revista Clinica da Faculdade de Medicina São Paulo**, v. 21. n.4, p.199-201, 1966.

BAHAMAN, A.R.; MARSHALL, R.B.; BLACKMORE, D.K.; HATHAWAY, S.W. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar *Hardjoprajitno* from sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.8, n. 28,p.171, 1980.

BENNETT, S; WOODS, T.; LIYANAGE, W.M.; SMITH,D.L. A simplified method for cluster-sample surveys of health in developing countries. **Rapp. Trimest. Statistical Sanit. Mond**. v. 44, n. 3, p. 98-106, 1991.

BLACKMORE, D.K.; BAHAMAN, A.R.; MARSHALL, R.B. The epidemiological interpretation of serological response to leptospiral serovars in sheep. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 30, n. 4, p. 38-42, 1982.

BOLIN, C.A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. **Sem. Vet. Med. Surg. Small Anim**. v.1, n.3, p. 166, 171, 1996.

MANUAL DE LEPTOSPIROSE. 2 ed. Brasília. Fundação Nacional da Saúde Ministério da Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Zoonoses e Animais Peçonhentos, 1995. 98p.

BROUGHTON, E.S.; MARSHALL, R.B.; LITTLE, T.W.A.; HATHAWAY, S.C.; MACKINTOCH, C.G.; HELLSTRON. J.S. *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* vaccines in cattle: Immunogenicity of vaccines prepared from cultures grown in a protein-free medium. **Preventive Veterinary Medicine**. v.2, n.1-4, p. 423-433, 1984.

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.

CALDAS, E. M.; SAMPAIO, M.B.; COSTA, J.A. Investigação comparativa de estirpes apatogênicas para o diagnóstico sorológico de leptospirose, em animais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v.10, n.1, p.14-47, 1986.

CALDAS, M. E.; SANTANA, A. F.; CAETANO, A. L. S.; COSTA, J.A. Estudo da ovinocaprinocultura na Região Nordeste do Estado da Bahia. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v.12, n.1. p. 1-96, 1989.

CALDAS, E. M.; VIEGAS, E. A.; MASSA, L.F.M. Comportamento de estirpes apatogênicas no diagnóstico sorológico de leptospirose, em animais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v. 10, n.1, p. 3-24, 1991.

CALDAS, E. M.; VIEGAS, E. A.; VIEGAS, S. A. R. A.; REIS, R. S.; SANTOS, M. S. Aglutininas anti-leptospiras em hemo-soro de animais domésticos no Estado da Bahia,

1990-1993. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v. 16, n.1, p. 45-49, 1993.

CALDAS, E. M.; SIMÕES, J.; MEYER, R.; NASCIMENTO, I.; VIEGAS, S. A. R.A.; REIS. Nota sobre atualização de diferentes antígenos de *Leptospira* para a detecção de anticorpos nos de animais domésticos. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v. 17, n. 1, 1-7, 1994.

CALDAS, E. M.; VIEGAS, E. A.; REIS, R. S.; MASSA, L.F.M, VIEGAS, S. A. R.A. Estudo comparativo entre estirpes de *L. interrogans* e *L. biflexa* no diagnóstico de triagem de leptospirose em animais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v. 18, n. 1, 127-147, 1995/96a.

CALDAS, E. M.; VIEGAS, E. A.; REIS, R. S.; VIEGAS, S. A. R.A. Aglutininas anti-*Leptospira* em hemossoro de animais domésticos no Estado da Bahia, 1994/1996-II. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v.18, n. 1, p. 268-280-1995/96b.

CALDAS, E. M.; SILVA, E.D.; REIS, R. S.; VIEGAS, S. A. R.; VASCONCELLOS, S.A. Estudo comparativo entre o teste da macroaglutinação e a soroglutinação microscópica, utilizando antígenos de *L. interrogans* e *L. biflexa* no diagnóstico rápido da leptospirose em animais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**. v. 19, n. 1, 155-177, 1997/98.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONÓSES, Ramos Mejia. **Procedimientos para estudios de prevalência por muestreo**. Buenos Aires: CEPANZO, 39 p, 1979, (Nota Técnica 18).

CICERONI, L.; LOMBARDO, D.; PINTO, A.; CIARROCCHI, S.; SIMEONI, J. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and Goats in Alto Adige-South Tyrol. **Journal Veterinary Medicine**, v., 47, n. 5, p. 217-223, 2000.

CHAMPAGNE, M.J.; HIGGINS, R.; FAIR BROTHER, J.M.; DUBREUIL, D. Detecção e caracterização de leptospiral antigens using abiotin/avidin double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay immunoblot. **Canadian Journal Veterinary Research**. v.55, n. 3, p. 239-245, 1991.

CLARK, A.M. *Leptospira hardjo* infection in sheep. **Veterinary Record**. v.134. n.11, p. 283, 1994.

COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PURSELL, A.R. Improved Microtecnica for the leptospiral microscopic agglutination test. **Applied Microbiology**. v.25, n.6, p. 976-980, 1973.

COUSINS, D.V.; ROBERTSON, G. M, HUSTAS, L. The Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detection the IgM antibody response to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *pomona* and *tarassovi* in cattle. **Veterinary Microbiology**. v. 10, n. 5, p. 439-450, 1985.

COUSINS, D.V.; ELLIS, T.M.; PARKINSON, J.; McGLASHAN, C. H. Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar *hardjoprajitno*. **Veterinary Record**. v. 124, n. 4, p. 123-124, 1989.

COUSINS, D.V.; ROBERTSON, G. M. Use of enzyme immunoassay in a serological survey of leptospirosis in sheep. **Australian Veterinary Journal**. v. 63, n.2, p. 36-39, 1986.

DAVIDSON, J.N.; HIRSH, D.C. Leptospirosis in lambs. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 176, n. 2, p.124-125, 1980.

DRAGHI DE BENÍTEZ, M. G, BIOTTI DE CARCERES, G. M. Aislamiento de *Leptospira interrogans* en un cordero da la provincia de Corrientes (Republica da Argentina). **Revista Medicina Veterinária**. v. 79, n. 3, p.224-225, 1998.

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infetions and semen. Part I.



*Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Trichomonas foetus*. **Veterinary Bulletin** v. 62, n. 8 p751-758, 1992.

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.; MICHNA, S.W. Bovine Leptospirosis: Experimental infection of pregnant heifers with a strain belonging to the Hebdomadis Serogroup. **Research Veterinary Science**. v. 22, n.2. p. 229-236, 1977.

ELLIS, W.A.; O'BRIEN, J.J.; CASSELLS, J. Role of in the cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype *hardjo* infection in Northern Ireland. **Veterinary Record**. v. 108, n. 26, p. 555-557, 1981.

ELLIS, W.A.; BRYSON, D.G.; NEILL, S.D.; McPARLAND, P.J.; MALONE, F.E. Possible involvement of leptospire in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. **Veterinary Record**. v.26, n.12, p. 291-293, 1983.

ELLIS, W.A.; MONTGOMERY, J.; CASSELLS, J.A. Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of *Leptospira interrogans* serovars *hardjoprajitno*. **Research Veterinary Science**. v. 39, n. p. 292-295, 1985.

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.

ELLIS, W.A.; BRYSON, D.G.; NEILL, S.D.; McPARLAND, P.J.; MALONE, F.E. Possible involvement of leptospire in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep.

**Veterinary Record**. v.26, n.12, p. 291-293, 1983.

FAINE, S. **Guidelines for the Control of Leptospirosis**. Geneva, 1982, 171p. World Health Organization, (Offset publication, 67).

FAINE, S. *Leptospira* and Leptospirosis. 4 ed. Boca Raton: CRC Press,. Flórida, USA. 1994, 272p

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, Leptospira and Leptospirosis 2.ed., Austrália, MediSci, 1999, 272p.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE , Disponível <<http://www.datasus.gov.br>>acesso 22.02.2002

GALTON M. M. SULZER, R.C.; SANTA ROSA, C.A.; FIELDS, M.F. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Applied Microbiology**. v. 13. n. 1, 81-85, 1965.

GERRITSEN, M.J.; KOOPMANS, M.J.; PETERSE, D.; OLYHOEK, T. Sheep as maintenance host or *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* subtype *hardjobovis* **American Journal Veterinary Research**. v. 55, n.9, p.1232-1237, 1994.

GODDARD, R.D., LUFF, P.R., THORNTON, D.H The serological response of calves to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* vaccines and infection as measured by the microscopic agglutination test and anti-IgM and anti-IgG enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Microbiology**. V. 26, p. 191-201, 1991

GORDON, L. M. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar *hardjoprajitno* from sheep. **Australian Veterinary Journal**. v. 56, n. 7, p. 348-349, 1980.

HARTLEY, W.J. Ovine Leptospirosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 28, n. 7, p. 169-170, 1952.

HARTSKERRL, R.A.; SMITS, H.L.; KORVER, H.; GORIS, M.G.A.; TERPSTRA, W.J. International course on laboratory



methods for the diagnosis of leptospirosis. Holanda, Royal Tropical Institute, 2001, 100p.

HATHAWAY, S.C. Leptospirosis in New Zealand: an ecological view. **New Zealand Veterinary Journal**, v.29, n. 7, p. 109-112,1981.

HATHAWAY, S.C.; MARSHALL, R.B. Experimental infection of sheep with *Leptospira interrogans*: serovars *hardjo* and *balcanica*. **New Zealand Veterinary Journal**.v.27, n. 9. p. 197-199, 1979.

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.

HENKEN, A.M.; GRAAFT, E.A.M.; CASAL, J. Measurement of diseases frequency IN: NOORDHUIZEN, J.P.TM.; FRENKENA, K, HOODJ, C.M. Application of quantitative methods in Veterinary Epidemiology. **The Netherlands: Wageningen Press**, 1997, Cap. IV, p. 63-98.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA Anuário Estatístico do Brasil. Geologia e Recursos Minerais, v.53, .p.1-45, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Censo Agropecuário, 1996. Disponível em: <[www.sidra.ibge.gov.br/cgr-bm/prtabr](http://www.sidra.ibge.gov.br/cgr-bm/prtabr), Acesso 25/10/1998>.

KINGSCOTE, , B.F.; PROULX, J. The successful management of *Leptospira hardjo* infection in a beef herd in Northern Ontario. **Canadian Veterinary Journal** . v.11, n. 27, 435-439, 1986

LANGONI, H.; MARINHO, M; BALDINI, S.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; SILVA, E.D Pesquisa de aglutininas anti-leptospiras em soros ovinos do Estado de São Paulo, Brasil, utilizando provas de macroaglutinação em placa e soroaglutinação microscópica. **Revista**

**Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 17, n 6, 264-268, 1995.

MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; PUTT, N. Freqüência de aglutininas anti-*Leptospira* em bovinos do Sul do Cerrado do Estado do Mato Grosso. **Arquivos Escola de Veterinária da UFMG**, v. 32, n.2, p.245-258, 1980.

MACKINTOSCH, C.G.; MARSHALL.; R.B.; BROUGHTON E.S. The use of *hardjo-pomona* vaccine to prevent leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* . **New Zealand Veterinary Journal**. v. 4, n.1, p. 171-172, 1980.

MARTIN, S.W.; SHOUKRI,M.;THORBURN, M.A. Evaluating the health status of herds based test applied to individuals. **Veterinary Medicine Preventive**. v. 14, n.1-2, p. 33-43, 1992.

MARSHALL, R. Leptospirosis in sheep and the possible implications of this infection to human health. Disponível <<http://infobrok.co.nz/morsheep.htm>> acesso em 08/04/1999.

McCAUGHAN, C. J.; GORDON, L. M.; RAHALEY.R. S. Evidence for infection of sheep in Victoria with leptospirosis of the hebdomadis sorogroup, **Australian Veterinary Journal**. v. 6, p. 201-202, 1980.

MOREIRA, E.C.; SILVA, J.A.; VIANA, F.C.; MOREIRA, W.L. Leptospirose bovina: I- Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospiras* em soros de bovinos de Minas Gerais. In: ENCONTRO DE PESQUISAS, 7, 1978, Belo Horizonte. Anais. Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 1978, 81p.

MOREIRA, E.C.; SILVA, J.A.; VIANA, F.C.; et.al.. aglutininas anti-*Leptospiras* em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**. v. 31. n.3.p.375-388, 1979.

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.N.; MYERS.; D.V.M.; SEGRE, D. Antibody response of cattle to *Leptospira pomona*: Response as measured by hemagglutination, microscopic agglutination, and hamster protection test. *American Journal Veterinary Research*. v. 32, n.12, p.1915-1920, 1971.

OFFICE International des Epizooties. Leptospirosis. In: Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. França, World Organization for Animal Health. 2001, p-198-217.

OLIVEIRA, S.J.; PIANTA, C.; GOMES, M.; SANTIAGO, C. Abortos bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. Isolamento de leptopiras do sorogrupo Hebdomadis. **Boletim do Instituto de Pesquisas "Desidério Finamour"**. v.7, p. 51-56, 1980.

OLIVEIRA, A.C.; BARROS, S.S. Mortalidade perinatal em ovinos no município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul. **Pesquisas Veterinária Brasileira**. v. 2, n.1, p-1-7, 1982.

REIS, R.; RYU, E.; MOTTA, J.G.; CORREA, O.; WIEST, J.M. Pesquisa de aglutininas anti-leptopiras em cães através do teste de micro-aglutinação rápida. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 25. n. 15. p. 15-21, 1973.

RIBEIRO, A. Doenças de ovinos no sul do Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**; ano 4, n.13, p. 15-18, 1998.

RIBOTTA, M.J.; HIGGINS R.; GOTTSCHALK, M.; LALLIER, R. Devolvement of in indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. **Canadian Journal Veterinary Research**. v. 64, p. 32-37, 2000.

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.

RIS, D.R.; HAMEL, K.L. *Leptospira interrogans* serovar *pomona* vaccines with different adjuvants in cattle. **New Zealand Veterinary Journal** v. 27. n. 8, p.169-171-1979.

RON, T. Leptospirosis in New Zealand. **Surveillance** v.21, n.2, p.13-14, 1994.

ROTH, E.E.; GALTON, M.M. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Louisiana. **American Journal Veterinary Research**. v. 21, n. 5, p. 411-427, 1960.

RYU, E. Rapid microscopic agglutination test for leptospira without nonspecific reaction. **Bulletin Office International Epizooties**, v 73, n.1, p. 49-58,1970.

SAMAPAI, I.B.M, **Estatística aplicada e experimental animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221p.

SANTA ROSA, C. A & PESTANA de CASTRO, A. F. Presença de aglutininas antileptopiras em soro de ovinos e caprinos no Estado de São Paulo, **Arquivos Instituto de Biologia**. v. 30, p.93-98, 1963.

SANTA ROSA, C. A.; PESTANA de CASTRO A. F.; da SILVA, A. S.; TERUYA, J. M. Nove anos de leptospirose no instituto biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 29/30, p. 19-27, 1969/1970.

SANTA ROSA, C. A.; PESTADA de CASTRO.; TROISE, C. Leptospirose bovina: inquérito sorológico na região de Campinas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.28, p. 169-173, 1961.

SANTOS, V.T. Ovinocultura princípios básicos para sua introdução e exploração, São Paulo. Livraria Nobel SA. 1985, 167p.

SCHOLLUM, L. e MARSHALL, R.B. Age and the ability of calves to respond to a leptopiral vaccine **New Zealand Veterinary Journal** .v. 33, n. p. 146-147,1985.



SIMPSON, V.R.; DONE, S. *Leptospira hardjo* and lambs received cows colostrum. **Veterinary Record**. v. 124, n. 17, p. 469, 1989.

SMITH, C.R.; KETTERER, P.J.; MCGOWAN, M.R.; CORNEY, B.G. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjoprajitno* infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**. v. 71, n. 9, p. 290-294, 1994.

STRINGFELLOW, D.A.; BROWN, R.R.; HANSON, L.E.; SCHNURRENBERGER, P.R. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.12, n. p. 165-1983.

SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man **Australian Veterinary Journal**. v. 50 n. 5, p.216, 1974.

TERPSTRA, W.J.; LIGTHAERT, G.A.; SCHOONE, G.J. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) **Znb. Bakt Hyg., Orig. A**, 247, 400-405, 1980.

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

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

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 *grippotyphosa*

bacterins USDA Veterinary Services, IA, 1976.

VASCONCELLOS S.A. Leptospirose bovina. In: 12, 1997, Caxambú; Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Anais do 2, Simpósio Pfizer sobre doenças infecciosas e vacinas para bovinos. Caxambú, 1997, p.34-38.

VERMUNT, J.J.; WEST, D.M.; COOKE, M.M.; ALLEY, M.R.; COLLINS, E.J. Observation on three outbreaks of Leptospirosis *interrogans* serovar pomona infection in lambs **New Zealand Veterinary Journal**, v. 42, n.4, p.133-136, 1994.

VIEGAS, E.A.; VIEGAS, S.A.R.A.; CALDAS E.M. Aglutininas antileptospira em hemossoro de caprinos e ovinos, no Estado da Bahia. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v.5, n.1, p.20-34, 1980

VIEGAS, E.A.; YANAGUITA, R.M.; VIEGAS, S.A.R.A.; SILVA, L.A.; VASCONCELLOS, S.A. Emprego de estirpes de *Leptospira biflexa* na prova de soroglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose caprina e ovina. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science** v.31, n. 1. P. 25-30, 1994.

YASUDA, P.A.; STEIGERWALT, A.G.; SULZER, K.R.; KAUFMAN, A.F.; ROGERS, F.; BRENNER, D.J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups, and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal Systematic Bacteriology**. v. 37, p. 407-415, 1987.