Rogerio Oliveira Rodrigues

IMUNOGENICIDADE DE BACTERINAS ANTI-LEPTOSPIRAS PARA BOVINOS PRODUZIDAS NO BRASIL, 2006/7

Tese apresentada 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. Élvio Carlos Moreira

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2008

R696i Rodrigues, Rogério Oliveira, 1975-
Imunogenicidade de bacterinas anti-leptospiras para bovinos produzidas no Brasil, 2006/7 / Rogério Oliveira Rodrigues. – 2008.
145 p. : il.

Orientador: Élvio Carlos Moreira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Leptospirose em animais – Teses. 3. Leptospirose – Vacina – Teses. 4. Imunoglobulinas – Teses. I. Moreira, Élvio Carlos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692

Aos meus pais, pelo que sou hoje e por me
ensinarem o valor real das coisas.
A minha amada Angélica.
Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Natália Oliveira Rodrigues e Josias Francisco Rodrigues pelo exemplo de amor, dedicação e perseverança por todos esses anos me incentivando nos momentos mais difíceis desta caminhada.

À mulher que mudou minha vida, meu grande amor e companheira, Angélica Bertagnolli, pela paciência, compreensão e participação direta neste trabalho.

Aos meus irmãos e familiares, pelo apoio de sempre.

Aos meus sobrinhos Natália, Laura, Gabriela, Larissa e Bruno do qual não vi crescerem, pela ausência, me perdoem.

Prof. Élvio Carlos Moreira, pela orientação e ensinamentos que usarei pelo resto da minha vida.

Ao Prof. Carlos Chavez pela imensa ajuda nos testes laboratoriais e participação ativa.

Aos Prof(s) Andrey Pereira Lage, Marcos Bryan Heinemann e João Paulo Amaral Haddad pela intensa colaboração e valiosas sugestões.

Ao Prof. Geder Paulo Herrmann pela amizade de sempre.

Aos Funcionários Nádia, Antonio (Toninho) e Ricardo pela amizade e ajuda em todos os momentos deste trabalho.

Aos amigos que retornaram aos seus destinos de origem, Dunezeu e Suely pela valiosa convivência.

À minha amiga Telma (Telmex) por estar sempre disposta em me ajudar e me socorrer em momentos que beiravam o desespero.

Aos meus colegas e grandes amigos Oliver Daza e Carlos Eugênio pela amizade de todos esses anos e companheirismo na pós-graduação tornando esta caminhada um pouco menos árdua.

Ao Prof Rômulo Cerqueira Leite pela amizade que possui por mim e participação.

À EMBRAPA Juiz de Fora MG na pessoa do Dr. Antonio Cerqueira Leite por disponibilizar os animais para a realização do experimento.

A todos os meus amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

"Deve-se escrever da mesma maneira como as lavadeiras lá de Alagoas fazem seu ofício. Elas começam com uma primeira lavada, molham a roupa suja na beira da lagoa ou do riacho, torcem o pano, molham-no novamente, voltam a torcer. Colocam o anil, ensaboam e torcem uma, duas vezes. Depois enxáguam, dão mais uma molhada, agora jogando a água com a mão. Batem o pano na laje ou na pedra limpa, e dão mais uma torcida e mais outra, torcem até não pingar do pano uma só gota. Somente depois de feito tudo isso é que elas dependuram a roupa lavada na corda ou no varal, para secar. Pois quem se mete a escrever devia fazer a mesma coisa. A palavra não foi feita para enfeitar, brilhar como ouro falso; a palavra foi feita para dizer."

Graciliano Ramos

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS	14
	RESUMO	15
	ABSTRACT	15
1	**INTRODUÇÃO**	16
2	**LITERATURA CONSULTADA**	17
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	26
3.1	LOCAL DO ESTUDO E CARACTERÍSTICAS DO REBANHO	26
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
3.3	VACINAS COMERCIAIS E EXPERIMENTAL	28
3.4	PERÍODO DE COLETA DE SANGUE ESQUEMA DE VACINAÇÃO APLICADO	30
3.5	PROVAS SOROLÓGICAS	30
3.5.1	ANTÍGENOS	30
3.5.2	TÉCNICA AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA	30
3.5.3	ELISA INDIRETO	31
3.5.4	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO	31
3.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
4	**RESULTADOS**	32
5	**DISCUSSÃO**	95
6	**CONCLUSÕES**	98
7	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	99
	ANEXOS	
Anexo 1	Resultados dos títulos obtidos no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjoprajiitino em todos os tratamentos de acordo com o tempo de colheita da amostra. Belo Horizonte, 2006/07.	107
Anexo 2	Resultados dos Títulos em Logaritmo no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjoprajiitino	110
Anexo 3	Resultados dos títulos obtidos no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma em todos os tratamentos de acordo com o tempo de colheita da amostra. Belo Horizonte, 2006/07.	113
Anexo 4	Resultados dos Títulos em Logaritmo no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjoprajitino amostra Norma.	116
Anexo 5	Resultados dos títulos obtidos no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjobovis em todos os tratamentos de acordo com o tempo de colheita da amostra. Belo Horizonte, 2006/07.	118
Anexo 6	Resultados dos Títulos em Logaritmo no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjobovis.	121
Anexo 7	Resultados do Teste Elisa das DO(s) Normalizadas utilizando a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma.	125
Anexo 8	Resultados do Teste Elisa das DO(s) Normalizadas utilizando a sorovariedade Hardjoprajiitino.	129
Anexo 9	Resultados do Teste Elisa das DO(s) Normalizadas utilizando a sorovariedade Hardjo bovis.	133

Anexo 10 Resultados do Teste de Inibição de Crescimento com valores de DO(s) de soros individuais para todas as vacinas. 137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Bateria de sorovariedades de Leptospira sp. utilizadas no monitoramento dos bovinos para inclusão na composição dos grupos experimentais, Belo Horizonte, Brasil, 2004..... 27
Tabela 2 Data de fabricação e de vencimento das vacinas anti-leptospiroses para bovinos disponíveis para aquisição no Brasil em 2005/06. 28
Tabela 3 Vacinas anti-leptospiroses para bovinos disponíveis para aquisição no Brasil em 2006. 29
Tabela 4 Intervalo de coleta de sangue e protocolo de vacinação anti-leptospiroses dos bovinos. 30
Tabela 5 Correlação entre os valores de DO(s) individuais com o Teste de Inibição de Crescimento no soro de bovinos vacinados. 33
Tabela 6 Médias Aritméticas das OD(s) obtidas no ELISA contra as sorovariedades de Leptospiras Hardjo, Hardjobovis e Norma, de acordo com o tempo após a vacinação. Belo Horizonte, MG, 2007..... 34
Tabela 7 Médias Geométricas dos Logaritmos dos títulos obtidos no Microaglutinação contra as sorovariedades de Leptospiras Hardjo, Hardjobovis e Norma, de acordo com o tempo após a vacinação. Belo Horizonte, MG, 2007. 34
Tabela 8 Médias Aritméticas das OD(s) obtidas contra cada sorovariedade no decorrer do estudo após a vacinação. Belo Horizonte, MG.2007. 34
Tabela 9 Médias dos logaritmos dos títulos obtidos no Teste de Microaglutinação contra cada sorovariedade no decorrer do estudo após a vacinação. Belo Horizonte, MG.2007. 35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Porcentagem de inibição de crescimento de Hardjo, amostra Norma em soros de bovinos vacinados após 60 dias da primeira dose. 41
Gráfico 2 Porcentagem de inibição de crescimento de Hardjo, amostra Norma em soros de bovinos vacinados após 30 dias da revacinação..... 41
Gráfico 3 Níveis de IgG determinados pelo o ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos de todos os grupos. 42
Gráfico 4 Níveis de IgG determinados pelo o ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo A. 42
Gráfico 5 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo B. 43
Gráfico 6 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo C. 43
Gráfico 7 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo D. 44
Gráfico 8 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo E. 44
Gráfico 9 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo G. 45
Gráfico 10 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo H. 45
Gráfico 11 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo I. 46
Gráfico 12 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo J. 46
Gráfico 13 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo K. 47

Gráfico 14 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo ELISA Amostra Norma. 47
Gráfico 15 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo ELISA Amostra Norma. 48
Gráfico 16 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo ELISA Amostra Norma. 48
Gráfico 17 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo ELISA Amostra Norma. 49
Gráfico 18 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 150 pelo ELISA Amostra Norma. 49
Gráfico 19 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 180 pelo ELISA Amostra Norma. 50
Gráfico 20 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo ELISA Amostra Norma. 50
Gráfico 21 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 300 pelo ELISA Amostra Norma. 51
Gráfico 22 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos de todos os grupos. 51
Gráfico 23 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo A. 52
Gráfico 24 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo B. 52
Gráfico 25 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo C. 53
Gráfico 26 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo D. 53
Gráfico 27 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo E. 54
Gráfico 28 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo G. 54
Gráfico 29 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo H. 55
Gráfico 30 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo I. 55
Gráfico 31 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo J. 56
Gráfico 32 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjo após a vacinação em bovinos do grupo K. 56
Gráfico 33 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo ELISA Amostra Hardjo. 57
Gráfico 34 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo ELISA Amostra Hardjo. 57
Gráfico 35 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo ELISA Amostra Hardjo. 58
Gráfico 36 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo ELISA Amostra Hardjo. 58
Gráfico 37 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 150 pelo ELISA Amostra Hardjo. 59
Gráfico 38 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 180 pelo ELISA Amostra Hardjo. 59
Gráfico 39 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo ELISA Amostra Hardjo. 60

Gráfico 40 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 300 pelo ELISA Amostra Hardjo. 60
Gráfico 41 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos de todos os grupos. 61
Gráfico 42 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo A. 61
Gráfico 43 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo B. 62
Gráfico 44 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo C. 62
Gráfico 45 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo D. 63
Gráfico 46 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo E. 63
Gráfico 47 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo G. 64
Gráfico 48 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo H. 64
Gráfico 49 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo I. 65
Gráfico 50 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo J. 65
Gráfico 51 Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a Amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo K. 66
Gráfico 52 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo ELISA Amostra Hardjo bovis. 66
Gráfico 53 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo ELISA Amostra Hardjo bovis. 67
Gráfico 54 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo ELISA Amostra Hardjo bovis. 67
Gráfico 55 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo ELISA Amostra Hardjo bovis. 68
Gráfico 56 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 150 pelo ELISA Amostra Hardjo bovis. 68
Gráfico 57 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 180 pelo ELISA Amostra Hardjo bovis. 69
Gráfico 58 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo ELISA Amostra Hardjo bovis. 69
Gráfico 59 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 300 pelo ELISA Amostra Hardjo bovis. 70
Gráfico 60 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos de todos os grupos. 70
Gráfico 61 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo A. 71
Gráfico 62 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo B. 71
Gráfico 63 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo C. 72
Gráfico 64 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo D. 72

Gráfico 65 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo E. 73
Gráfico 66 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo G. 73
Gráfico 67 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo H. 74
Gráfico 68 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo I. 74
Gráfico 69 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo J. 75
Gráfico 70 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo K. 75
Gráfico 71 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Norma. 76
Gráfico 72 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Norma. 76
Gráfico 73 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Norma. 77
Gráfico 74 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Norma. 77
Gráfico 75 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Norma. 78
Gráfico 76 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos de todos os grupos. 78
Gráfico 77 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo A. 79
Gráfico 78 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo B. 79
Gráfico 79 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo C. 80
Gráfico 80 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo D. 80
Gráfico 81 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo E. 81
Gráfico 82 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo G. 81
Gráfico 83 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo H. 82
Gráfico 84 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo I. 82

Gráfico 85 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo J. 83
Gráfico 86 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo K. 83
Gráfico 87 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo. 84
Gráfico 88 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo. 84
Gráfico 89 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo. 85
Gráfico 90 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo. 85
Gráfico 91 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo. 86
Gráfico 92 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos de todos os grupos. 86
Gráfico 93 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo A. 87
Gráfico 94 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo B. 87
Gráfico 95 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo C. 88
Gráfico 96 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo D. 88
Gráfico 97 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo E. 89
Gráfico 98 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo G. 89
Gráfico 99 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo H. 90
Gráfico 100 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo I. 90
Gráfico 101 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo J. 91
Gráfico 102 Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo K. 91
Gráfico 103 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo bovis. 92
Gráfico 104 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo bovis. 92
Gráfico 105 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo bovis. 93

Gráfico 106 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo bovis. 93
Gráfico 107 Comparação de Médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo Teste de Microaglutinação com a amostra Hardjo bovis. 94

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	- porcentagem
°C	- graus Celsius
mL	- mililitro
μL	- microlitro
g	- grama
EMJH	- Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
UFMG	-Universidade Federal de Minas Gerais
PCR	-Reação da Cadeia da Polimerase
L.	- Leptospira
MAT	- Teste de Aglutinação Microscópica
ELISA	- Ensaio Imunoenzimático
EUA	- Estados Unidos da América
pH	- Potencial hidrogeniônico
coating buffer	- Tampão carbonato/bicarbonato 0,05M com pH 9,6
PBS	-Solução salina (0,15M) tamponada com fosfato (0,01M) pH 7,4
PBST de Tween 20	-Solução salvacina(0,15M) tamponada com fosfato (0,01M) pH 7,4 com 0,05%
IgG	- Imunoglobulina da classe G
IgM	-Imunoglobulina da classe M
OPD	- o-Phenylenediamine [1,2 – Benzenediamine]
H_2SO_4 1M	-Acido Sulfúrico a 1 molar

RESUMO

No presente trabalho os níveis de anticorpos de dez bacterinas incluindo nove comerciais polivalentes e uma experimental monovalente, produzida com a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma, foram avaliados empregando-se o Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) e um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Os níveis de proteção conferidos pelas bacterinas obtidos no teste de inibição do crescimento (TIC) e no ELISA foram correlacionados. Para realização do TIC com a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma foram escolhidos momentos importantes em termos de concentração de IgG (Dias 60, 240, 270, 330 e 420). Paralelamente foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático indireto utilizando-se conjugado anti-IgG total para mensurar os níveis de imunoglobulinas da classe G conferido pelas bacterinas utilizando três amostras diferentes (Hardjoprajiitino, Hardjoprajiitino amostra Norma e Hardjobovis). Utilizou-se o TAM exclusivamente para mensurar os níveis de imunoglobulinas da classe M utilizando as três amostras acima referidas.Os resultados demonstraram que todas as bacterinas produziram algum tipo de resposta, mas somente nos dias 60 e 270 obtiveram níveis de anticorpos protetores não atingindo a totalidade dos animais utilizados. Os grupos vacinados não apresentaram mesma homogeneidade de resposta de anticorpos sugerindo a necessidade de aumentar a concentração da sorovariedade Hardjo para melhorar a resposta imunológica. Os protocolos para vacinas polivalentes deverão ser revisados para que a Hardjo apresente resposta sorológica adequada para revacinações semestrais.

Palavras-chave: leptospirose, bacterina, bovinos, imunoglobulinas

ABSTRACT

In the present study the levels of antibodies than ten bacterins comprising nine commercial and a experimental monovalent, produced with serovar Hardjoprajiitino sample Norma, were evaluated using up the microagglutination test (MAT) and an enzyme immunoassay (ELISA) indirect. Levels of protection conferred by bacterins obtained in the test inhibition of growth (TGI) and ELISA were correlated. For the TGI with serovar Hardjoprajiitino sample Norma were chosen important times in terms of IgG concentration (Days 60, 240, 270, 330 and 420). At a test was developed immunoassay indirect, using anti-IgG conjugated total to measure the levels of the immunoglobulin G class given by bacterins using three different samples (Hardjoprajiitino, Hardjoprajiitino sample Norma and Hardjobovis). It was used MAT exclusively to measure the levels of immunoglobulins in Class M using the three samples above said. We results showed that all bacterins produce some kind of answer, but only on days 60 and 270 achieved levels of protective antibodies not reaching all the animals used. The groups had not vaccinated same uniformity of response of antibodies suggesting the need to increase the concentration of serovar Hardjo to improve the immune response. The protocols for multivalent vaccines should be reviewed so that the Hardjo present serological response appropriate for revaccination six months.

Key-words: leptospirosis, bacterin, bovine, imunoglobulins

1 – INTRODUÇÃO

As leptospiroses são zoonoses de distribuição mundial responsáveis por sérias perdas econômicas na pecuária bovina, devido a abortos e infertilidade, além de causar doença aguda febril em humanos e animais de companhia (Faine et al., 1999; Bharti et al., 2003).

A sorovariedade Hardjo têm sido encontrada sorologicamente com maior freqüência e causando maior impacto na eficiência reprodutiva de rebanhos bovinos (Vasconcelos et al., 1997; Langoni et al., 1999).

A amostra de referência Norma foi isolada no Estado de Minas Gerais, Brasil e foi tipificada por anticorpos monoclonais e PCR como *L. interrogans* sorovariedade Hardjo, genótipo Hardjoprajiitino (Moreira, 1994).

Diferenças nos resultados encontrados em inquéritos soroepidemiológicos entre as duas amostras da sorovariedade Hardjo utilizadas no laboratório de zoonoses da UFMG, têm sido demonstradas, com a amostra Norma detectando a maioria dos animais positivos. Diferenças entre as amostras Norma e Hardjoprajitino, amostra de referência da sorovariedade Hardjo, já haviam sido observadas com maior ou menor intensidade em outras populações de bovinos e ovinos em outros estados do Brasil (Moreira, 1994; Leite, 2003; Hermann, 2004; Araújo et al., 2005). Estas diferenças são provavelmente, devido ao baixo número de passagens e origem da amostra Norma, visto que, a mesma foi isolada em 1991 e portanto, apresenta um menor número de passagens *in-vitro* do que a amostra Hardjoprajiitino que foi isolada em 1938 (Wolf, 1969).

Como a amostra Norma foi isolada no Brasil, ela provavelmente apresenta maior similaridade antigênica com *L. interrogans* sorovariedade Hardjo infectando bovinos no Brasil do que a Hardjoprajiitino que foi isolada de um homem em Sumatra (Wolf, 1969).

Diferenças ultra-estruturais e antigênicas na identidade das moléculas de superfície de amostras virulentas e cultivos isogênicos de culturas atenuadas de *L. interrogans* da sorovariedade grippotyphosa tëm sido demonstrada (Haake et al., 1991).

A leptospirose é usualmente controlada por programas de vacinação. A vacinação contra leptospirose pode proteger da doença e também prevenir a infecção crônica de *Leptospira* sp.. A vacinação deve proteger contra a doença clínica e adicionalmente prevenir animais do estabelecimento do estado de portador renal e eliminação de *Leptospiras sp.* pela urina, tanto em condições experimentais quanto em infecções naturais (Freudenstein e Hein, 1991).

Estudos têm demonstrado a falta de uma proteção completa com a sorovariedade Hardjo e entre sorovariedades do sorogrupo *borgpetersenii* (Bolin et al., 1989). Devido às vacinas usualmente consistirem de células inteiras quimicamente inativadas, pouco se conhece sobre os componentes imunogênicos responsáveis em provocar a resposta imune protetora (Nunes-Edwards et al., 1985).

A identificação das leptospiras que infectam um rebanho torna possível o desenvolvimento de uma vacina específica (Faine et al., 1999). Contudo, existe a dificuldade de se identificar com precisão a(s) sorovariedades(s) causador(as) usando técnicas sorológicas. O alto grau de reações cruzadas entre as sorovariedades pode levar a interpretações equivocadas. Essa dúvida leva os laboratórios a produzirem vacinas polivalentes, com o objetivo de atender uma demanda bem diversificada. Essas vacinas polivalentes, por sua vez, podem gerar reações cruzadas nos animais induzindo resposta imunológica que não apresentam títulos uniformes para as diferentes sorovariedades.(Siddique e Shah, 1990; Bolin et al.,1991; Arduino et al., 2004),

O fato da resposta imunológica ser baixa e específica para cada sorovariedade, faz do

uso das bacterinas comerciais uma medida profilática muitas vezes ineficiente (Hanson, 1997; Faine et al., 1999), e aumenta a probabilidade dos animais vacinados se tornarem portadores destes microorganismos (Srivastava, 2006).

Todas as bacterinas anti-leptospiroses polivalentes, comercializadas no Brasil são provenientes de culturas de células inteiras inativadas quimicamente e adsorvidas em adjuvante (Langoni et al, 1999b). Microorganismos de outras doenças como a Rinotraqueíte Infecciosa Bovvacina(IBR), Diarréia Viral Bovina (BVD), Vírus Sincicial Bovino (BRVS), Parainfluenza tipo III (PI3) ou mesmo toxóide de *Clostridium tetani* também estão associados.

O modelo de desafio em hamster é usado para teste de potência de vacinas de *L.* Hardjo para bovinos, entretanto, o procedimento é descrito como menos severo tendo sido relatado que os animais freqüentemente sobrevivem à infecção. Algumas das maiores desvantagens destes modelos são o grande número de animais que são usados para o teste de potência e também pela manutenção da virulência da amostra desafio. Além disso, humanos são susceptíveis à infecção com a bactéria leptospira, o teste envolve alto risco de infecção a trabalhadores de laboratório (Weisser e Hechler, 1997; Marbehant, 1999).

Existe consenso entre os pesquisadores de que o teste de potência para a sorovariedade Hardjo é trabalhoso de ser realizado. Por isso, métodos alternativos de potência para vacinas de Leptospiroses, avaliadas tanto por métodos sorológicos quanto por métodos de quantificação de antígenos têm sido propostos (Ebert et al., 1999; Schalling, 1999; Varney, 1999; Hartskeel, 1999; Hickey, 1999; Ruby, 1999). Todas as vacinas anti leptospiroses para bovinos, disponíveis no mercado brasileiro, contêm a sorovariedade Hardjo que é pouco patogênica para hamster e cobaios. Esse aspecto é muito importante, pois essa sorovariedade é a mais prevalente na pecuária bovina brasileira, não sendo possível ser avaliada rotineiramente por esse teste (Tripathy et al., 1973), uma vez que os ensaios leptospiricidas correlacionam-se intimamente com os resultados do teste de proteção em hamster (Bey & Johnson, 1978).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar durante um período de 420 dias os níveis de aglutininas anti-leptospira Hardjo em bovinos imunizados com nove vacinas polivalentes disponíveis no mercado brasileiro e compará-las com uma vacina monovalente de L. Hardjo amostra Norma por meio do Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) e por um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto utilizando amostra homóloga bem como heteróloga (Hardjoprajiitino e Hardjobovis). Adicionalmente, realizou-se um ensaio leptospiricida (Inibição do Crescimento) para determinação do nível de proteção.

2 – LITERATURA CONSULTADA

Por mais de 50 anos, um grande numero de vacinas de Leptospira têm sido desenvolvidas e avaliadas em animais de laboratório, bovinos, suínos, cães, ovinos e eqüinos. Muitas destas são bacterinas contendo organismos inativados por vários métodos químicos e/ou por aquecimento (Srivastava, 2006).

Broom (1949), já havia demonstrado alguma proteção de hamsters contra a sorovariedade Canicola utilizando culturas inativadas com fenol em altíssimas dosagens.

Brunner e Meyer (1950), relataram o sucesso na imunização de hamsters e cães com bacterinas liofilizadas com Canicola e Icterohaemorrhagiae. As sorovariedades utilizadas apresentaram especificidade, não havendo proteção cruzada contra outras sorovariedades. Por esta razão, vacinas multivalentes são preparadas incorporando várias sorovariedades, mas resultados satisfatórios só foram alcançados em hamsters e porcos-da-india utilizando-se até três sorovariedades (Venugopal e Ratnam, 1991).

Gillespie e Kenzy (1950 e 1958) avaliaram as repostas imunes em bezerros vacinados com uma bacterina inativada pela aureomicina, formol, e uma bacterina comercial. Todas as bacterinas induziram resposta em bezerros de 6 a 8 meses de idade e observou-se que bezerros vacinados com menos de 2 meses de idade fracassaram no desenvolvimento de imunidade substancial, quando avaliada pelo desafio experimental, 6 a 8 meses depois.

York e Baker (1953), prepararam uma bacterina da sorovariedade Pomona a partir de microorganismos cultivados em ovos embrionados. Estudos de vacinação e desafio em cobaias e bovinos demonstraram proteção 2 a 6 semanas após a imunização. Entretanto, os níveis de anticorpos encontrados foram baixos.

Olitzki et al. (1953), utilizaram um cultura da sorovariedade Pomona inativada pela formalina e avaliou esta bacterina em suínos, sendo observado um moderado grau de proteção, no entanto uma reposta febril desenvolveu-se em alguns animais.

Brown et al. (1955), produziram uma bacterina em meio de Stuart modificado de cultura de Leptospira com inativação térmica, congelamento e descongelamento. E também desenvolveram uma bacterina inativada com formalina contendo um adjuvante (hidróxido de alumínio). Bezerros vacinados com esta preparação desenvolveram títulos aglutinantes significantes, entretanto a bacterina utilizada sem adjuvante demonstrou baixos títulos. Adicionalmente os bezerros vacinados resistiram com sucesso ao desafio com a inoculação de sangue de porcos-da-índia infectados com Leptospira.

Hoag e Bell (1955), desenvolveram uma bacterina com a sorovariedade pomona utilizando inativação com ácido acético e aquecimento, esta bacterina foi utilizada em bezerros que se tornaram resistentes a leptospiremia, leptospirúria e lesões no rim.

Johnson e Wilson (1960), fracionaram soro de coelho em três frações: globulinas, albumina e um ultrafiltrato. As globulinas associadas com albumina demonstraram ser promotoras de crescimento. Subseqüentemente, o soro de coelho foi parcialmente substituído pela albumina bovina. Os ácidos graxos essenciais foram substituídos pelo Polisorbato 80 ou Tween 80. Leptospiras cultivadas no meio de albumina bovina e Tween 80 (Ellinghausen e Mccullough, 1965 e Johnson e Harris, 1967), suplementadas com cálcio, magnésio, zinco, vitamvacinaB_{12}, B_1 e Cloreto de amônia, apresentaram crescimento mais consistente com alta densidade celular permanecendo antigênicas e imunogênicas como aquelas em meios utilizando soro de coelhos (Morsi e Shibley, 1973).

Posteriormente, foi demonstrado que leptospiras cultivadas em meio de albumina bovina permaneciam virulentas até certo limite de tempo nos subcultivos (Bey e Johnson, 1986).

Bey e Jonhson (1986), postulam que nos EUA e vários outros países, muitos pesquisadores e fabricantes de produtos biológicos utilizam o meio de albumina descrito por Johnson e Harris (1967), Ellinghausen & Mccullough, (1965), ou o meio de albumina modificado descrito por Bey e Johnson (1978). Estes meios possuem a capacidade de cultivar leptospiras com um baixo inoculo (1 – 1.000 organismos/ml) atingindo altas densidades celulares com até (1 – 2 x 10^9 organismos/ml).

Meios livres de soros (Shenberg,1967; Stalheim, 1966; Staneck, et al., 1973; Van Eseltine e Staples, 1961; Van Eseltine et al., 1967; Vogel e Hunter, 1961), frequentemente requeriam adaptação da leptospira ao ambiente ou somente umas poucas sorovariedades podem ser cultivadas nestes meios. No entanto, leptospiras crescidas dentro destes meios retém sua imunogenicidade (Kida et al., 1977), mas não ganharam grande aceitação pelos fabricantes de produtos biológicos (Bey e Jonhson, 1986).

Bey e Johnson (1978), desenvolveram um meio livre de soro usando carvão vegetal detoxificado por tween para o cultivo de leptospiras patogênicas. Uma ampla variedade de sorovariedades de vários sorogrupos pode ser cultivada com baixo inóculo (10^1 – 10^3 leptospiras/ml) atingindo altas densidades celulares (10^9 células/ml). A imunogenicidade de leptospiras cultivadas em meios livres de proteínas foram similares àquelas preparadas em meios contendo albumina bovina (Bey e Johnson, 1982), sendo que estas foram capazes de serem cultivadas mantendo a patogenicidade para hamsters. Este meio pode facilmente ser convertido a um meio de baixa proteína pela adição 0,1% albumina sérica bovina para o cultivo de sorovariedades mais fastidiosas. O fosfato de alumínio potássico normalmente é utilizado como adjuvante devido à ampla faixa de segurança de toxicidade (Marshall et al., 1980).

A Organização Mundial de Saúde (1976), já discutia que a maior parte das bacterinas utilizadas para a prevenção de leptospirose contém hidróxido de alumínio como adjuvante. Este depósito é inócuo, ainda que possam aparecer abscessos. As concentrações de anticorpos contra os antígenos destas bacterinas são superiores, mas não são comparáveis aos correspondentes de vacinas oleosas. Além disso, a resposta utilizando este tipo de adjuvante é de curta duração.

Adjuvantes de emulsão de água em óleo em bacterinas são empregados com menos freqüência do que os biológicos com adjuvante de depósito, entretanto, seu uso pode ser importante já que se permite empregar doses menores de antígeno para obter títulos mais altos de anticorpos e mantê-los durante anos (Vanselow, 1987).

O desenvolvimento de vacinas de leptospirose é um processo árduo que consome tempo. Ao contrário de outras bactérias, espiroquetas requerem condições de crescimento fastidiosas. A promoção de crescimento em tanques pode não ser adequada satisfatoriamente e o uso de biofermentadores pode ou não aumentar o crescimento de várias sorovariedades (Srivastava, 2006).

Preparações contendo células inteiras são utilizadas comumente como bacterinas na prevenção da leptospirose. Como esse tipo de proteção é considerada sendo sorogrupo-específico, várias sorovariedades foram adicionadas às vacinas usuais, e a sorovariedade mais patogênica é selecionada em cada sorogrupo. Diferentes extratos de leptospira foram avaliados para a sua capacidade protetora contra a leptospirose aguda letal em gerbils *(Meriones unguiculatus)*. Extratos totais induzem proteção completa contra desafios homólogos e proteção parcial contra desafios heterólogos. Frações lipopolissacárides protegem contra desafios homólogos, mas não contra heterólogos. E extratos protéicos induzem proteção significante contra ambos os tipos de desafio (Sonrier et al., 2001).

Palit et al. (1996), relataram que uma vacina trivalente para leptospirose bovina contra Pomona, Copenhageni e Hardjo foi imunogênica e capaz de induzir altos títulos. No entanto, a eficácia da vacina permaneceu desconhecida como nenhum estudo de desafio foi conduzido. Dhaliwal et al (1996), de outra forma relataram que a eficácia de uma vacina pode ser melhor mensurada pela observação da performance de fertilidade e produção de leite. Entretanto Flint e Liardet (1980), utilizando uma vacina trivalente em experimentos de desafio em hamsters, demonstraram que o componente Hardjo, quando usado sozinho ou em uma vacina trivalente foi capaz de proteger hamsters e prevenir contra leptospirúria satisfazendo os requerimentos da Farmacopéia Européia. Estudo semelhante foi conduzido por Mackintosh et al. (1980), onde uma bacterina bivalente foi capaz de produzir proteção significativa no grupo das novilhas expostas ao desafio natural para a sorovariedade Hardjo.

Bacterinas de leptospiras, quando aplicadas nas diversas espécies domésticas, frequentemente falham em induzir níveis significantes de anticorpos aglutinantes,

especialmente em suínos a despeito do uso de adjuvantes (Bey e Johnson, 1983).

Essas falhas levaram os cientistas a obterem respostas, voltando-se para avaliação do tipo de imunoglobulinas produzidas na resposta a estimulação antigênica, devido aos animais estarem frequentemente refratários à infecção na ausência de um título aglutinante (Heath e Box, 1965).

Bolin et al. (1989), demonstraram que novilhas que receberam dois tipos de vacinas pentavalentes contendo a sorovariedade Hardjobovis e Hardjoprajiitino, falharam em proteger contra a infecção advinda do desafio demonstrada pela apresentação de microorganismos na urina apesar dos títulos do teste de microaglutinação serem altos. O estudo sugeriu que a eficácia de uma vacina pode não ser baseada somente na sorologia.

Bolin et al. (1991), demonstraram que a sorovariedade Hardjo é um antígeno de baixa imunogenicidade, com isso produz uma baixa resposta de anticorpos após as vacinações, produzindo proteção por um curto período de imunidade.

Naiman et al. (2001), citaram que a habilidade destas vacinas para proteger contra a sorovariedade Hardjo poderá refletir em diferenças genéticas nos isolados da sorovariedade Hardjo usados nas vacinas ou nas condições de cultura usadas para a preparação da bactéria para a vacina. Tais diferenças podem afetar a qualidade e o tipo de resposta induzida.

Entretanto, Hodges et al. (1985), descreveram o uso de uma vacina bivalente comercial (Pomona, Hardjo) na Nova Zelândia, onde protegeu da infecção e preveniu a leptospirúria muito bem.

Trifunovic et al. (1989), relataram em um rebanho bovino com problemas de hemoglobinúria, e observaram que o uso de vacina experimental produzida com o antígeno da sorovariedade Pomona, isolada de um animal infectado do rebanho, conferiu uma maior proteção em comparação com o uso de uma vacina comercial.

Herrmann (2002), determinou a soroprevalência de aglutininas anti-Leptospira sp, em 1360 amostras de soros ovinos no estado do Rio Grande do Sul achando a Hardjo como a mais prevalente, a partir deste achado elaborou uma vacina monovalente com L. Hardjo, com adjuvante oleoso, aplicada em dois grupos de 15 ovelhas e um terceiro serviu de controle com dez 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 um período de 120 dias. A determinação da prevalência de Leptospira sp em ovinos no Rio Grande do Sul com elaboração de uma vacina oleosa experimental revelaram-se importantes ferramentas, podendo ser utilizadas nos inquéritos epidemiológicos e na implantação de programas de controle das Leptospiroses dos ovinos.

François et al., (1995), demonstraram que uma simples vacinação de suínos com uma vacina inativada de leptospira não induz títulos na microaglutinação em 96% dos animais após 15 dias. Após 28 dias os títulos foram 1/100 quando um reforço foi dado no 15 dia pós-vacinação.

Yan et al., (2003), avaliaram os efeitos sorológicos e epidemiológicos de uma vacina de envelope externo para leptospira em uma população na China de uma área endêmica para a doença. Os resultados da análise de coorte apresentaram uma taxa protetora da vacina de envelope externo para o mesmo grupo sorológico de leptospira da vacina com 75,17% de efetividade.

Tripathy et al. (1975), selecionaram soros de animais vacinados sem nenhum título de anticorpo no teste de microaglutinação que possuíam atividade de inibição de crescimento, demonstrando que a atividade de inibição de crescimento é principalmente

em função de anticorpo da classe G (IgG). O anticorpo da classe M (IgM) foi principalmente associado com a resposta no teste de microaglutinação, concluindo que a resposta aglutinante é indicativo de exposição à infecção de leptospiras ou antígenos, e pode somente ser uma medida de proteção quando associada com níveis correspondentes de anticorpos (IgG) específico.

A existência de anticorpos protetores em bovinos aproximadamente um ano após a vacinação foi demonstrada por testes de proteção em hamsters (Huhn et al., 1971; Huhn et al., 1975; Negi et al., 1971), e por testes de inibição de crescimento (Tripathy et al., 1972; Tripathy et al., 1974), na ausência de uma resposta aglutinante significativa.

Johnson e Muschel (1966) e Johnson e Harris (1967), descreveram o efeito anti-leptospira de anticorpos específicos e complemento. Bey e Johnson (1978a), utilizaram uma modificação do ensaio leptospiricida que demonstrou ser mais sensível do que o teste de microaglutinação. Amostras de cães e bovinos vacinados tinham títulos nos ensaios leptospiricidas após os títulos na microaglutinação terem desaparecido. Os títulos nos ensaios leptospiricidas correlacionavam-se intimamente com os resultados do teste de proteção em hamster (Bey e Johnson, 1978b). Adicionalmente, Torres et al., (1981), observaram que os ensaios leptospiricidas foram altamente sorovariedade específico quanto ao teste de microaglutinação.

Tripathy et al. (1972), detalharam um teste de inibição de crescimento realizado com a adição de leptospiras viáveis ao meio de crescimento contendo soro de animais vacinados que possuem anticorpos. Este teste é hábil em detectar anticorpos quando o teste de microaglutinação for negativo. Uma desvantagem deste teste é que consome muito tempo, devido à leptospiras necessitarem crescer antes da reação ser determinada.

Vacinas multivalentes são usadas para cobrir infecções causadas por um grande número de sorovariedades, entretanto, a eficácia destas vacinas contra doenças causadas por todas sorovariedades incorporadas na vacina é duvidosa (Dobson e Davos, 1975). Existem poucos trabalhos demonstrando que animais vacinados podem desenvolver títulos de anticorpos contra todas as sorovariedades incorporadas na vacina (Danczig e Polner, 1997).

Bramel e Scheidy (1956), avaliaram o efeito da revacinação em eqüinos e em bezerros com uma bacterina com Pomona. Resultados em eqüinos indicaram um aumento de volume no local da injeção que persistiu de três a quatro dias. Concluíram que uma revacinação não possuía nenhum efeito adverso em eqüinos.

Dobson e Davos (1975), avaliando títulos vacinais em suínos verificaram ausência de títulos de aglutininas seis semanas após a primeira inação. A partir da segunda dose o título de aglutininas limitou-se a 300, verificando que a persistência destes títulos variava com a sorovariedade, não ultrapassando oito semanas.

Kiesel e Dacres (1959), observaram que bovinos vacinados com uma bacterina Pomona se tornaram protegidos dos sinais clínicos de leptospirose, mas a leptospirúria nem sempre foi prevenida. Adicionalmente, eles notaram que bezerros abaixo de dois meses e meio de idade falharam em desenvolver proteção adequada para mais do que três meses como os outros, ressaltando que a proteção relatada nos animais vacinados se deu na ausência de níveis de anticorpos substanciais.

Philips (1958), vacinou bezerros com uma dose com 5 ml de uma cultura bruta inativada quimicamente , dois grupos foram utilizados, um com 4,7 x 10^8 e o outro com 6,3 x 10^8 leptospiras/ml. Todos os animais exceto dois tinham títulos de até 1:50 após a vacinação. Todos os animais vacinados foram protegidos da doença clínica ao desafio experimental. Este estudo postulou que se uma bacterina contém hidróxido de

alumínio, menor massa antigênica poderia ser utilizada.

Philips (1958), neste mesmo estudo avaliou três bacterinas em suínos. Suas observações foram similares a relatos anteriores (Burnstein et al., 1957), descrevendo que suínos vacinados não desenvolvem títulos como bovinos vacinados, independente da massa antigênica ou a presença de adjuvantes. Entretanto todos os suínos foram refratários ao desafio.

Ruiz et al. (1991), investigaram a eficiência de três substâncias (hidróxido de alumínio, vitaminas lipossolúveis A/D/E e levamisol) contidas em uma bacterina experimental para a prevenção de leptospirose em vacas de uma exploração leiteira, para gerar anticorpos específicos contra a infecção. Formaram-se quatro grupos de cinco animais cada para cada tratamento correspondente. A bacterina utilizada foi pentavalente com cada uma das substâncias. Coletaram-se soros no dias 0 e 90 após a vacinação para comprovar o título de anticorpos produzidos por cada uma das bacterinas utilizando o teste de microaglutinação. A bacterina que gerou maior título de anticorpos específico foi a que continha vitaminas lipossolúveis (A/D/E) ($P<0,01$), seguido da bacterina com hidróxido de alumínio ($P<0,05$), entre as bacterinas que continha levamisol e o controle não houve diferença estatística para assegurar que eram diferentes.

Rao e Keshavamurthy (1985), avaliaram bezerros bubalinos vacinados com uma bacterina pentavalente por meio do teste de microaglutinação e pelo teste de inibição de crescimento. Os autores observaram que a soroconversão contra todos as sorovariedades ocorreu em torno do 15 dia após a vacinação, relataram ainda que uma melhor resposta foi alcançada em bezerros que receberam duas doses da vacina, com quatro semanas de intervalo entre as vacinações em relação aos que receberam uma dose.

Sanford e Morris (1990), vacinaram leitões com seis meses de idade utilizando três vacinas comerciais pentavalentes e avaliaram a resposta para as várias sorovariedades. Todas as três vacinas elucidaram uma resposta vacinal significante de anticorpos para as sorovariedades Canicola, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae. A resposta de anticorpos para os outros antígenos de leptospira variou entre os animais vacinados. Nenhum dos grupos vacinados desenvolveu títulos significantes para Leptospira Hardjo. Duas das três vacinas alcançaram resposta vacinal significante para Leptospira Pomona, mas em cada caso a média de título do grupo vacinado foi menor que 100.

Otani et al. (1980), fracionaram soros anti-leptospira de cavalos hiperimunizados por gel de filtração em Sephadex G-200 ou por eletroforese em bloco rígido. As frações foram examinadas quantitativamente para as atividades leptospiricidas, aglutinantes e de fixação de complemento. A atividade leptospiricida foi mais alta na fração de globulina7S (IgG) do que na fração de globulina 19S(IgM), onde atividade aglutinante foi evidenciada na porção de ambas as frações sendo mais alta na fração 19S. Atividade de fixação do complemento foi encontrada plenamente dentro de ambas as frações. As atividades de fixação de complemento e leptospiricida foram mais altas na fração γ-globulina do que na T-globulina, onde a atividade aglutinante foi comparável dentro das duas frações de globulinas. Estes resultados levaram a concluir que a atividade aglutinante nem sempre pode proceder correlacionando-se com a atividade leptospiricida.

Adler et al. (1982), usaram um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detectar IgG específica e anticorpos de IgG no soro de bovinos infectados e imunizados com Leptospira Hardjo. Os resultados demonstraram que a IgM apareceu no soro primeiro mas foi rapidamente seguida pela IgG que permaneceu persistente por um tempo maior do que IgM. Os níveis de anticorpos detectáveis pelo ELISA e pelo teste de microaglutinação não se

correlacionaram, sugerindo que as duas técnicas mensuram sistemas antígeno-anticorpo diferentes.

Thiermann e Garrett (1982), empregaram o teste de microaglutinação e um ensaio imunoenzimático (ELISA), no qual se utilizou à fase fenol de um antígeno extraído do aquecimento da água-fenol comparando os anticorpos de bovinos vacinados para Leptospira Hardjo e Pomona. Entre as amostras de soros dos animais vacinados, o ELISA (usando antiglobulina IgG) foi positiva em 64% com o antígeno Hardjo e 78% com Pomona. Entretanto, o teste de microaglutinação foi positivo somente 18% com Hardjo e 23% com Pomona, não havendo nenhuma reação no teste de ELISA no soro entre os animais utilizados como controle negativo. Concluíram que o ELISA, usando conjugado antiglobulina, foi sobretudo a técnica mais sensível para detecção de anticorpos de leptospiras em bovinos.

Hartman et al. (1984), usaram um ELISA específico anti-IgM e anti-IgG para mensurar a reposta de anticorpos estimulada em cães vacinados com uma bacterina de leptospira contendo as sorovariedades Icterohaemorrhagiae e Canicola quimicamente inativadas. Todos os cães produziram IgM e IgG anti-leptospira. A produção de IgM foi o primeiro tipo de resposta após cada vacinação (vacinação primária, reforço e revacinação anual). Uma resposta de IgG anti-leptospira substancial pode ser demonstrada somente após o primeiro reforço e após a revacinação anual. A revacinação anual resultou em uma elevada e persistente resposta de IgG do que o reforço. O autor sugeriu uma revisão nos protocolos de vacinação.

Goddard et al. (1991), utilizaram o teste de microaglutinação e ELISA(s) anti-IgM e anti-IgG para examinar em um período de dezesseis semanas, 35 bezerros vacinados com Leptospira Hardjo. Concluíram que a resposta sorológica a vacinação detectada tanto pelo teste microaglutinação quanto pelo teste de ELISA foi limitada demonstrando em apenas quatro animais aumentos de duas a quatro vezes nos títulos de IgG.

Ruby et al. (1992), desenvolveram um ELISA para quantificação de antígenos em bacterina de leptospira Pomona tipo kennewicki. Um anticorpo monoclonal (MAb), 2D7, direcionado contra a superfície antigênica da célula inteira de Leptospira Pomona tipo kennewicki, foi usado no ensaio. A captura do antígeno nas bacterinas por um antisoro policlonal foi seguida pela adição do fluido ascítico de 2D7, um conjugado anti-mouse e substrato. Os biológicos avaliados com este sistema incluíam preparações que continham antígeno tipo kennewicki (homólogo) e aqueles que não continham tipo kennewicki (heterólogo). Bacterinas heterólogas deram valores de densidade óptica (DO) comparáveis aos poços brancos. As bacterinas homológas produziram valores de DO(s) iguais ou maiores daqueles da bacterina de referência do Laboratório do Serviço Veterinário Nacional (NVSL). A potência relativa de uma série de 84 bacterinas licenciadas comercialmente foram avaliadas usando um programa de computador que estimava a potência relativa. O sistema de ELISA foi capaz de detectar antígenos em bacterinas contendo Leptospira Pomona tipo kennewicki e demonstrar o potencial para testar *in-vitro* as bacterinas de leptospiras.

Posteriormente, Ruby (1996), utilizando o mesmo sistema de ELISA mencionado acima, convidou todos os fabricantes de produtos biológicos que produziam bacterinas de leptospira nos Estados Unidos da América para participarem de um estudo experimental para avaliação de seus produtos. Todos os participantes possuíam comentários favoráveis em relação à performance, sensibilidade e especificidade do ELISA. Os estudos de correlação foram conduzidos utilizando-se 10 diluições seriadas de uma bacterina monovalente de Leptospira Pomona com adjuvante hidróxido de alumínio vacinando hamsters de acordo com o Code of Federal Regulations (CFR). Estas mesmas diluições também foram avaliadas no protocolo de ELISA. Resultados indicaram que o ELISA

correlacionava-se com o ensaio de potência em hamster.

Ribotta et al. (2000), desenvolveram um ELISA indireto para a detecção de anticorpos de leptospiras em cães. O ELISA desenvolvido tinha uma sensibilidade de 100% relativa ao teste de microaglutinação quando os soros caninos com títulos no microaglutinação maiores ou iguais a 100 para diferentes sorovariedades foram testadas, além disso, possuía uma especificidade de 95,6% comparando-se com o teste de microaglutinação. Dentre 158 soros testados como negativos no teste de microaglutinação, sete reagiram no ELISA. Os autores discutiram que o fato ocorreu provavelmente porque estes soros continham anticorpos de leptospiras não aglutinantes, os quais são detectáveis pelo o ELISA e não pela microaglutinação, que detecta somente anticorpos aglutinantes. Estas observações demonstram que o ELISA pode detectar ambas classes de anticorpos: aglutinantes ou anticorpos da classe M e neutralizantes ou anticorpos da classe G, tornando o teste mais sensível do que a microaglutinação. Fato que também havia sido comprovado por CHO et al. (1989).

Ávila et al., (1985), estudaram a resposta imunitária humoral em 14 suínos com 6 a 8 meses de idade, da raça Wessex, distribuídos em grupos de 4 a 5 animais vacinados contra leptospirose. A vacina utilizada foi preparada com as sorovariedades Pomona e Canicola e aplicada em duas doses de 5 ml, com intervalo de 15 dias, nos animais do grupo I. Os animais do grupo II receberam, também por via subcutânea, apenas uma dose de 5 ml. O grupo III, com quatro animais, não foram vacinados, sendo mantido como controle. Os resultados demonstraram que a imunidade induzida por duas doses foi mais sólida que a induzida por uma única, na proteção contra a leptospirose renal.

Siddique e Shah (1990), produziram uma vacina de leptospira com a suspensão de envelope externo das sorovariedades Pomona, Canicola, Hardjo, Icterohemorrhagiae, Grippotyphosa e Szwajizak e avaliaram em hamsters. Aplicaram duas doses da vacina. A presença de anticorpos protetores e os níveis de aglutininas contra as sorovariedades presentes na vacina foram determinadas pelo teste de microaglutinação. A análise comparativa da efetividade imunológica das duas doses demonstrou que a quantidade de 10 μg envelope externo na dose atingiu consideravelmente títulos maiores de anticorpos e promoveu mais proteção do que a dose de 1 μg. No entanto, a partir dos títulos obtidos contra as sorovariedades, títulos contra Hardjo e Canicola foram comparativamente menores. Isto foi atribuído pela pequena quantidade de antígenos solúveis na preparação final da vacina ou como um resultado da supressão da resposta antigênica por antígenos de outras sorovariedades.

Moreira (1994), avaliou métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros utilizou de dois métodos de vacinação com bacterinas produzidas a partir de cepas homólogas isoladas na propriedade. O primeiro rebanho recebeu uma dose inicial e revacinações semestrais, e o segundo recebeu duas aplicações iniciais intervaladas de 45 dias, com revacinações semestrais e uma dose de estreptomicvacinana dose 25 mg/Kg peso vivo. Em ambos os tratamentos ocorreu um declínio progressivo nos animais reagentes no teste de microaglutinação a partir do 8° mês de implantação da vacinação.

Favero et al. (1997), vacinaram bovinos com uma bacterina (5 ml) contendo as sorovariedades Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo e Wolffi nas concentrações de 9,2 x 10^7; 9,8 x 10^5; 1,8 x 10^7 e 13,2 x 10^7 de bactérias por mililitro, respectivamente, em três grupos de animais. Coletas foram realizadas um dia antes da vacinação e nos dias 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 após a vacinação. Além disso, utilizou o teste de proteção em hamster para avaliar a proteção. O autor demonstrou altos títulos para a sorovariedade Hardjo até aos 90 dias após a vacinação, mas devido à constatação de títulos de anticorpos pré-vacinais para esta sorovariedade, os

resultados podem não ter refletido o real poder imunogênico desta sorovariedade na vacina utilizada. Para o teste de proteção hamster foi utilizada a sorovariedade pomona, o que resultou em excelentes resultados com 100% contra a doença e 90% de proteção contra a infecção renal.

Costa et al. (1998), avaliaram a imunidade cruzada entre Hardjo e Wolffi, em quatro grupos de hamsters adultos e sadios. A proteção conferida pelas vacinas foi avaliada mediante pesquisa direta de leptospiras (métodos de cultura de macerado de órgãos em meios de Fletcher e EMJH modificado e histopatologia com coloração pela prata) e pesquisa indireta de leptospiras (avaliação de sinais clínicos e estudo histopatológico de fígado, rins e pulmão, pela coloração hematoxilina-eosina dos cortes histológicos). O título sorológico dos hamsters foi avaliado pelo teste de microaglutinação rápida em placas. Os resultados revelaram que a vacinação dos hamsters tanto com Hardjo quanto com wolffi conferiram imunidade ante ao desafio com Hardjo.

Langoni et al. (2002), utilizaram treze cães machos e dez fêmeas para a avaliação da dinâmica de anticorpos pós-vacinais contra leptospira pelo teste de microaglutinação. Foi utilizado uma vacinana concentração de 10^5 bactérias/ml com as sorovariedades Icterohaemorrhagiae, Canicola, Copenhageni e Grippotyphosa. Os animais foram acompanhados por sorologias desde o dia 0, onde se realizou a vacinação com duas doses, 8, 15, 29, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162 e 176 dias após a última dose. O estudo concluiu que sete dias após a vacinação de machos e fêmeas apresentaram resposta sorológica idêntica, sendo maior para a sorovariedade Icterohaemorrhagiae e que estes oscilaram de forma suntuosa em ambos os grupos.

Tabata et al. (2002), produziram três bacterinas com diferentes sorovariedades do sorogrupo Sejroe, Hardjo (bacterina A), Wolffi (bacterina B) e Guaricura (bacterina C). As bacterinas foram avaliadas em hamsters machos pela comparação de anticorpos aglutinantes e anticorpos neutralizantes usando o teste de microaglutinação e o teste de inibição de crescimento. Os resultados do teste de aglutinação microscópica apresentaram aglutininas cruzadas entre as sorovariedades Hardjo e Wolffi, e Wolffi e Guaricura. Os resultados do teste de inibição de crescimento revelaram a presença de anticorpos neutralizantes entre as sorovariedades Wolffi e Guaricura contra Hardjo, Wolffi e Guaricura. E ainda foi encontrado que a amostra de Hardjo testada não produziu níveis detectáveis de anticorpos neutralizantes, indicando pobre imunogenicidade.

Klaasen et al. (2003), induziram a duração da imunidade com vacinas bivalentes de leptospiras atuais do mercado e avaliaram contra a infecção experimental. Para o propósito do estudo, cães jovens foram vacinados duas vezes seguidos pelo desafio com ambos, Leptospira Canicola e Icterohaemorrhagiae , com 5, 27 e 56 semanas após a segunda vacinação. Para avaliar a duração da imunidade, títulos de anticorpos aglutinantes foram mensurados antes e após o desafio. Os efeitos do desafio e uma variedade de parâmetros foram determinados incluindo re-isolamento do desafio no sangue, urina e rins. Ambas as amostras de desafio induziram uma infecção generalizada nos cães controles, amostra Canicola demonstrou ser mais virulenta. Quando os diferentes parâmetros foram avaliados observou-se que duas vacinações induziram uma alta taxa de proteção de infecção generalizada com Canicola e Icterohaemorrhagiae com 5, 27 e 56 semanas após a segunda vacinação. Adicionalmente, após 56 semanas, permaneceu um alto nível de imunidade contra infecção renal com Canicola e como conseqüência, apresentação urinária da sorovariedade Canicola. O estudo concluiu que esta vacina, usando este protocolo de vacinação, a duração da imunidade de um ano pode ser obtida contra a infecção com ambas as sorovariedades.

Arduino et al. (2004), utilizando o teste de microaglutinação pesquisou a indução de anticorpos contra leptospira em bovinos vacinados com uma bacterina polivalente

comercial frente a dois protocolos de vacinação. Um grupo recebeu uma dose e outro grupo recebeu duas doses intervalada de trinta dias. Os animais foram monitorados nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 após a primeira aplicação da vacina. Os animais que receberam uma dose não diferiram significativamente do grupo controle negativo, a vacinação com reforço apresentou melhor desempenho ocorrendo soroconversão para as sorovariedades Hardjo, Wolffi, Icterohaemorrhagiae e Pomona.

Delbem, (2004), trabalhou com uma vacina contra leptospirose elaborada a partir de LPS proveniente da membrana externa comparando as repostas induzidas por essa vacina quando adsorvida em hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A (MPLA) como adjuvantes. A autora utilizou hamsters inoculados com duas doses da vacina com 15 dias de intervalo, e posteriormente foram desafiados com estirpe homóloga 15 dias após a aplicação da segunda dose da vacina. A vacina MPLA foi superior induzindo melhores títulos de anticorpos neutralizantes do que a vacina que utilizou o hidróxido de alumínio como adjuvante, pois protegeu um maior número de animais contra o desafio.

Arduino (2005), avaliou títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais em bovinos. Utilizou 100 animais divididos em cinco grupos que receberam quatro vacinas comerciais e um grupo controle. Os animais foram investigados dos dias 0 ao 180 pós-vacinação frente a todas as sorovariedades utilizadas nas vacinas e relatou não haver homogeneidade nos títulos para cada sorovariedade sendo as sorovariedades Hardjo e Wolffi que produziram maior média de títulos médios durante o experimento. Entretanto, o autor relata que houve diferenças entre os tratamentos e em determinadas situações a Hardjo apresentou um pior desempenho comparando-se os tratamentos.

Nardi Junior et al. (2006), avaliaram o perfil sorológico de 17 bezerras búfalas vacinadas durante um período de 360 dias empregando-se o teste de microaglutinação. Os resultados apresentaram que todos os constituintes da vacina produziram reação sorológica, mas para a sorovariedade Hardjo houve apenas soroconversão nos dias 60 e 240, com o título atingindo seu ápice, após a vacinação e que este título declinou rapidamente.

Nardi Junior et al. (2007), investigando a interferência de anticorpos no diagnostico sorológico de leptospirose, trabalharam com búfalos usando dois tipos de vacinas, uma de célula inteira e outra de envelope externo durante 540 dias. Ambas as vacinas induziram resposta sorológica no teste de microaglutinação aos 15 dias após a vacinação para todos as sorovariedades e revelaram títulos máximos ao redor dos 45 e 60 dia após a vacinação. Os perfis sorológicos dos títulos de aglutininas foram semelhantes para as duas vacinas, entretanto, a vacina de envelope externo produziu títulos mais precoces e mais elevados do que a bacterina de célula inteira.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – LOCAL DO ESTUDO E CARACTERISTICAS DO REBANHO

A avaliação destas bacterinas foi realizada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Campo Experimental de Coronel Pacheco localizada no município de Coronel Pacheco – MG na região da Zona da Mata de Minas Gerais.

O município está situado a 280 Km de Belo Horizonte, com uma altitude média de 410 m acima do nível do Mar e coordenadas geográficas de 21° 33’ 45” S de latitude e 43° 18’ 45” W de longitude (IBGE, 2000).

A Fazenda Água Limpa possui 1050 hectares e um rebanho de 900 animais das raças Girolando, Holandês, Gir e Guzerá. Divididos em sistemas de produção independentes (intensivo, semi-intensivo e extensivo) sem intercâmbio e/ou trânsito de animais entre os sistemas de produção.

A unidade de produção de gado puro constituída por 120 animais efetivamente estabulados da raça Holandês PO e POI e mantida em sistema de freestall.

A propriedade faz parte de um sistema de produção de genética diferenciada e por ser uma unidade de produção modelo possui um rigoroso controle sanitário para as diversas enfermidades.

3.2 – GRUPOS EXPERIMENTAIS

Noventa e nove bovinos da raça Holandesa (Bos taurus), com idade de 24 a 48 meses de idade, foram divididos em 11 grupos com nove animais cada. Estes animais foram monitorados durante doze meses (testes mensais) pelo Teste Aglutinação Microscópica com dez sorovariedades mais prevalentes para bovinos no Brasil (Quadro 1), para investigar alguma atividade de circulação de leptospira no rebanho. Os resultados de todos estes testes foram negativos por todo o período. Em todos os testes realizados era feito um controle positivo para cada sorovariedade com um soro sabidamente positivo, feito a partir da inoculação em coelhos com as três sorovariedades (Hardjo amostra Norma, Hardjoprajitino e Hardjobovis).

Durante o período do experimento dois animais morreram de dois grupos diferentes e foram necropsiados chegando ao diagnóstico de babesiose pois por se tratarem de animais estabulados o ano todo em ambiente fechado e a incidência de carrapatos ser muito baixa possuem quase nenhuma imunidade à babesiose.

Tabela 1. Bateria de sorovariedades de Leptospira sp. utilizadas no monitoramento dos bovinos para inclusão na composição dos grupos experimentais, Belo Horizonte, Brasil, 2005.

Sorogrupos	Espécies	Sorovariedades*	Amostras
AUSTRALIS	*L. interrogans*	Bratislava	Jez bratislava
HEBDOMADIS	*L. interrogans*	Hebdomadis	Hebdomadis
ICTEROHAEMORRHAGIAE	*L. interrogans*	Icterohaemorrhagia e	RGA
GRIPPOTYPHOSA	*L. kirshneri*	Grippotyphosa	Moskva V
MINI	*L. santarosai*	Mini	Mini
POMONA	*L. interrogans*	Pomona	Pomona
SEJROE	*L. interrogans*	Hardjo	Hardjoprajitino
	L. interrogans	Hardjo	Norma
SEJROE	*L. borgpetersenii*	Hardjobovis	Sponselee
TARASSOVI	*L. borgpetersenii*	Tarassovi	Perepelicin

*Sugerido por Araújo et al. (2005)

3.3 – VACINAS COMERCIAIS E EXPERIMENTAL

As vacinas foram adquiridas nos representantes credenciados pelo fabricante para a comercialização do produto para o estado de Minas Gerais, e o esquema de vacinação foram realizados de acordo com as especificações descritas na bula de cada fabricante (duas aplicações intervaladas de 30 dias e uma revacinação seis meses após a ultima dose), seguindo rigorosamente as especificações preconizadas na bula de cada vacina. Todas as bacterinas foram mantidas em temperatura de 6°C no interior da geladeira que foi aferida com termostado digital Full Gauge Controls®[1] Modelo TIC-17RGTi/RGTiL. durante todo o tempo do experimento e utilizou-se para a aplicações das doses as mesmas partidas para todas as vacinas durante todo o experimento. Por razões éticas os nomes comerciais foram codificados conforme (Quadro 2 e 3).

Foi incluída uma vacina experimental monovalente elaborada no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG com a sorovariedade *Hardjoprajitino* amostra Norma com adjuvante de emulsão óleo em água, EMULSIGEN®[2].

A amostra Norma foi cultivada em EMJH (Ellinghausen e McCullough, 1965) durante 14 dias a 28°C enriquecido com fração V albumina bovina.

O crescimento foi monitorado semanalmente e feito à contagem em câmara de Petroff-Hausser[3]. Ao final da segunda semana apresentou uma densidade 1 x 10^9 células/ml inativada com formoldeído (0,3%) e foi monitorada com anti-soro homólogo no teste de aglutinação microscópica. A presença de leptospiras vivas foi checado com sub-cultivos em meio EMJH. Posteriormente, foi adsorvida em um adjuvante de emulsão óleo em água (EMULSIGEN®) na concentração de 8% e acrescentado vermelho fenol 0,01% como indicador de pH(7,2). A partida final foi previamente avaliada em relação à pureza e inocuidade, conforme recomendações preconizadas pelo United States Departament of Agriculture (1976) e OIE (2001).

A prova de esterilidade foi realizada em uma alíquota da partida que foi semeada em Agar Sangue a 5%, Tioglicolato de Sódio[4], Brain Heart Infusion[3], Tryptic Soy Broth[5] e Agar Sabouraud[3].

O produto final (bacterina) foi testado para inocuidade, uma dose de cinco ml em cinco bezerros de seis meses de idade para testar a segurança contra reações adversas. Foram avaliados os parâmetros para dor, formação de edema e rubor bem como alterações na temperatura corporal (febre).

Tabela 2. Data de fabricação e de vencimento das vacinas anti-leptospiroses para bovinos disponíveis para aquisição no brasil em 2005/06.

Vacina	Data de fabricação	Data de vencimento
A	Maio/05	Maio/06
B	Junho/05	Dezembro/06
C	Fevereiro/05	Fevereiro/06
D	Fevereiro/05	Agosto/06
E	Abril/05	Abril/06
G	Junho/05	Junho/06
H	Fevereiro/05	Agosto/06
I	Janeiro/05	Janeiro/07
J	Fevereiro/05	Fevereiro/07
K	Junho/05	Junho/07

[1] Full Gauge Controls Rua Júlio de Castilhos, 250 - Canoas/RS - Brasil - CEP: 92120-030
[2] MVP Laboratories, Inc. Omaha, USA.
[3] Hausser Scientific Partnership, Horsham, Pa.
[4] Becton Dickison and Company Sparks, Maryland 21152 USA.
[5] Difco Laboratories Detroit Michigan 48238 USA.

Tabela 3: Vacinas anti-leptospiroses para bovinos disponíveis para aquisição no brasil em 2005/06.

TRATAMENTO	SOROVARIEDADES										VOLUME DA DOSE (ml)	VIA DE APLICAÇÃO	DOSE DE REFORÇO (INDICAÇÃO)	ADJUVANTE
	Canicola	*Grippotyphosa*	*Hardjo*	*Hardjo amostra Norma*	*Icterohaemorrhagiae*	*Pomona*	*Wolffi*	*Bratislava*	*Tarassovi*	*Copenhageni*				
A			X		X	X	X	X			3,0	IM/SC	3-5 semanas	Hidroxido de alumínio
B			X		X	X	X	X			5,0	SC	4 semanas	Oleoso (Óleo mineral
C	X	X	X		X	X	X				5,0	SC	4-6 semanas	Hidroxido de alumínio
D	X	X	X		X	X	X				5,0	SC	3-5 semanas	Hidroxido de alumínio
E	X	X	X		X	X	X				3,0	IM/SC	4-6 semanas	Hidroxido de alumínio
***CONTROLE**											5,0	SC		
****G**				X							5,0	SC	4-6 semanas	Oleoso (Emulsigen®)
H	X	X	X		X	X	X		X		5,0	SC	3-5semanas	Hidroxido de alumínio
I	X	X	X		X	X		X	X		5,0	SC	4 semanas	Hidroxido de alumínio
J	X	X	X		X	X					2,0	IM	2-4semanas	Oleoso
K	X	X	X		X	X		X		X	3,0	SC	4 semanas	Hidroxido de alumínio

- * = Controle negativo (solução fisiológica)
- **= vacinaexperimental
- SC- subcutâneo; IM - intramuscular
- ® = MVP Laboratories, Inc. Omaha, USA.

3.4 – PERÍODO DE COLETA DE SANGUE ESQUEMA DE VACINAÇÃO UTILIZADO

As coletas foram realizadas mensalmente para avaliar a resposta imunológica durante o período de 420 dias (Quadro 4).

No dia zero uma dose da vacina foi aplicada em todos os bovinos, conforme prescrição de cada fabricante, com exceção do grupo controle que recebeu uma dose de solução salina. Trinta dias após a primeira dose administrou-se uma dose de reforço em todos os grupos. Duzentos e dez dias após a dose de reforço realizou-se a revacinação com uma dose recomendada pelo fabricante em todos os grupos experimentais excetuando-se o grupo controle que recebeu solução salina. Foi utilizado agulhas descartáveis (uma agulha para cada animal) da marca Becton Dickinson ®[6] de tamanho (40 x 12 mm) e bisel trifacetado. Observou-se as eventuais reações locais e tardias advindas das aplicações, cujo nenhum animal apresentou alguma reação.

Tabela 4: Intervalo de coleta de sangue e protocolo de vacinação anti-leptospiroses dos bovinos.

DIAS	COLETA	VACINAÇÃO
0	SIM	SIM
30	SIM	SIM
60	SIM	NÃO
90	SIM	NÃO
120	SIM	NÃO
150	SIM	NÃO
180	SIM	NÃO
210	SIM	NÃO
240	SIM	SIM
270	SIM	NÃO
300	SIM	NÃO
330	SIM	NÃO
360	SIM	NÃO
390	SIM	NÃO
420	SIM	NÃO

[6] Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ USA 07417

3.5 – PROVAS SOROLÓGICAS

3.5.1 – ANTÍGENOS

As sorovariedades Hardjo (Hardjoprajitino, Hardjobovis e Hardjoprajitino amostra Norma) foram replicadas semanalmente em meio de cultura EMJH (Ellinghausen e Mccullough, 1965), e mantidas em estufa bacteriológica a 28°C. Todos os antígenos foram utilizados com sete dias de incubação. A concentração foi correspondente a escala número um de MacFarland (100 a 200 leptospiras por campo microscópico), livre de contaminação e de autoaglutinação.

3.5.2 – TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (TAM)

As amostras de soros sanguíneos foram diluídas em solução tamponada de Sörensen, diluídas inicialmente a 1/5. Desta diluição, foram colocadas alíquotas de 30 μl em placas de ELISA com igual quantidade de solução salina tamponada na primeira fileira da placa. Nos demais poços restantes da placa foram adicionados 30 μl solução salina tamponada, a partir daí realizou-se diluições seqüenciais na proporção geométrica de razão 2 até a maior diluição positiva. Foram adicionados 30 μl das seguintes sorovariedades Hardjo (Hardjoprajitino, Hardjobovis e Hardjoprajitino amostra Norma).

Posteriormente a diluição foi levemente agitada e incubada em estufa bacteriológica a 28°C por uma hora, procedendo-se a seguir a leitura.

As placas foram levadas ao microscópio binocular (Carl Zeiss[7]), equipado com condensador de campo escuro a seco, com aumento de 100x.

Avaliou-se o grau de aglutinação, segundo recomendado pelo Centro Panamericano de Zoonosis (1985), sendo 1+ cerca de 25% das leptospiras aglutinadas presentes no

[7] Carl Zeiss, Inc. Germany.

campo microscópico, 2+ quando cerca de 50%, 3+ quando 75% e 4+ acima de 75%.

Foram consideradas reagentes as amostras de soros sanguíneos que aglutinaram pelo menos 50% das leptospiras até a maior diluição reagente com metade das leptospiras aglutinadas.

3.5.3 – ELISA INDIRETO

Utilizou-se microplacas de PVC flexível marca Becton, Dickinson and Company, USA, de fundo chato como suporte para adsorção do antígeno.

O ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA) foi realizado utilizando-se de antígenos individuais de Hardjoprajiitino, Hardjoprajiitino amostra Norma e Hardjobovis crescidos durante 14 dias em meio modificado de Ellinghausen e McCullough, (1965). Estes foram sonicados com uma amplitude de 80 durante 2 minutos com pulsos de 10 segundos.

A concentração protéica foi dosada através do método de Lowry (1951). O antígeno foi diluído em solução tampão de ligação ("coating buffer") pH 9,6 em uma concentração de 0,5 μg/ml. As placas foram sensibilizadas com 100 μl por poço desta diluição por 12 horas ("overnight") a 4°C, lavadas com PBS Tween 20 0,05% três vezes e posteriormente foram bloqueadas durante 1 hora com solução (caseína 2% em PBS), lavadas novamente por três vezes. Os soros foram então diluídos em tampão de incubação (PBS Tween 0,05% com 0,025% caseína) e ensaiados em duplicata na diluição 100 incubados durante 2 horas. Em todas as placas soros controles positivos e negativos, também diluídos na mesma diluição e previamente escolhidos pelo TAM, foram selecionados em quadruplicata.

Novamente lavadas, as placas, com a solução de lavagem o conjugado ovino anti-IgG total bovino diluído 5000 em PBS Tween 0,05% e incubado durante uma hora. O conjugado foi produzido segundo metodologia (Avrameas e Ternynck, 1971) e então titulado para estabelecer a diluição de trabalho.

As placas foram novamente lavadas e acrescentadas o substrato (o-Phenylenediamine [1,2 – Benzenediamine] – OPD) em tampão citrato pH 5,0 mais peróxido de hidrogênio (H_2O_2), durante 20 minutos, a reação foi parada com a solução H_2SO_4 1M. A leitura foi feita em leitor de ELISA BIO-RAD[8] (168-1002 Modelo 680) utilizando filtro com comprimento de onda de 492 nm de absorvância e os resultados expressos de acordo com o quociente Amostra/Positivo (A/P), obedecendo a seguinte fórmula:

$$A/P = \frac{\overline{XA} - \overline{XN}}{\overline{XP} - \overline{XN}}$$

Onde,

$\overline{X}_A$ = Média da absorvância a 492 nm da duplicata da amostra.

$\overline{X}_P$ = Média da absorvância a 492 nm da duplicata do soro padrão positivo.

$\overline{X}_N$ = Média da absorvância a 492 nm da duplicata do soro padrão negativo.

Para todas as amostras utilizadas no ELISA foi estabelecido um ponto de corte, calculado a partir das duas maiores leituras do controle negativo de cada ELISA indireto determinando a média acrescida de dois desvios padrões, a partir deste ponto com uma absorvância de 492 nm os soros são considerados positivos conforme recomendado por Hartskeerl et al., (2001).

3.5.4 – TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

Um Teste de Inibição de Crescimento, ensaio *in vitro* leptospiricida, foi realizado para estabelecer o grau de proteção conferido pelas vacinas, o protocolo feito de acordo com (Triphaty et al., 1973).

Foram escolhidos intervalos para avaliar os níveis de IgG nos dias 0, 60, 240, 270, 330 e 420. Executou-se em sete bovinos de cada grupo (exceto o grupo controle) o bioensaio com cinco repetições de cada bovino

[8] Bio-Rad Laboratories, Inc. (Califórnia - EUA)

utilizando-se L. Hardjoprajitino amostra Norma como antígeno a cada duzentos tubos foi feito um controle positivo e negativo.

Em cada tubo foi adicionado 2,5 ml de meio EMJH com 100 μl de antígeno com uma concentração de 1 x 10^9 células/ml previamente quantificado em câmara de Petroff-Hausser e com 14 dias de crescimento em meio de cultura, juntamente colocou-se 100 μl de soro estéril individual previamente inativado em banho maria para o sistema complemento durante 30 minutos a 56°C, dos animais de cada grupo. Os soros foram filtrados com filtros de 0,45μ de porosidade do tipo Millipore[9] em fluxo laminar.

Foi feita a bateria de cinco tubos com um soro hiperimune de coelho previamente titulado por Dot-blot alcançando um título de 1/12800 para o controle positivo e cinco tubos com um soro de coelho negativo para Leptospira Hardjoprajiitino amostra Norma.

Os resultados positivos para inibição crescimento foram expressos pela leitura em lâmina de cada tubo após 14 dias de incubação feita à contagem em um campo para a visualização de uma quantidade menor de 10 células de leptospiras vivas, acima disso o resultado foi anotado como negativo.

3.6 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os títulos de anticorpos obtidos pelo teste de aglutinação microscópica e pelo Ensaio Imnunoenzimático (ELISA indireto) foram categoricamente pareados de acordo com o variável tempo (dias decorridos após a primeira aplicação da vacina), tratamento (A, B, C, D, E, Controle {F}, G, H, I, J, K) e sorovariedade individualmente analisada (Hardjoprajiitino, Hardjoprajiitino amostra Norma e Hardjobovis).

Os títulos do Teste de Aglutinação Microscópica foram logaritmizados na base 10 e calculados as médias geométricas destes respectivos títulos, também foram calculados as médias aritméticas para os valores obtidos de DO(s) do ELISA. Ambos as médias (aritméticas e geométricas) foram submetidas ao teste Kruskal-Wallis, não-paramétrico, e comparados por outro teste não-paramétrico de comparação múltipla, Dunn, testadas as hipóteses com 5% de confiabilidade (Sampaio, 1998).

Um teste não paramétrico, correlação de Spearman, foi utilizada para averiguar a associação entre os dados individuais das DO(s) para a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma com os dados categóricos para o teste de inibição de crescimento.

A tabulação e o tratamento dos dados foram efetuados com o auxilío de um pacote estatístico denominado Graphpad prism 5.0 Instat for Windowns[10].

4 – RESULTADOS

4.1 – TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

No teste de Inibição de crescimento nos dias 0, 240, 330 e 420 em todas as vacinas utilizadas não houve nenhum título de aglutininas apreciáveis que produzisse resultados de inibição de crescimento (Anexos 1, 3 e 5).

Aproximadamente 80 % do total de vacinas usadas no experimento produziram títulos significativos estatisticamente no dia 60, que perfaz, 30 dias após a dose de reforço. A vacina G e I produziram acima de 60 % de inibição, as vacinas C e J 50%, vacinas A, E e K 20%, vacinas D e H apenas 10% e a vacina B não produziu título –significativo neutralizante para a Leptospira Hardjoprajiitino amostra Norma (Graf. 1).

Após 30 dias da revacinação (dia 270), 80% de todas as vacinas produziram títulos neutralizantes detectáveis pelo teste de inibição de crescimento (Graf. 2). A vacina G produziu 80% de inibição de crescimento, a vacina J 60%, vacinas C e D 50%, vacinas E, H e I apenas 20%, a vacina A somente 10% e as vacinas B e K não produziram

[9] Millipore Corporation, USA.

[10] GraphPad Software 11452 El Camino Real, #215 San Diego, CA 92130 USA

título algum detectável pelo teste de inibição de crescimento.

A análise adequada de comparação entre os resultados de cada grupo do Teste de Inibição é o Teste de Probit, regressão logística ordinal, o que leva a relação entre as concentrações de cada sorovariedade presentes nas vacinas com os dados de inibição.

Segundo a Coordenação de Produtos Biológicos MAPA/Brasília, não existe legislação que obrigue as indústrias a informarem as concentrações celulares das sorovariedades de leptospira presentes nas vacinas. Desta forma, é proibida a publicação desta informação sobre estes dados por serem considerados segredo industrial.

Correlacionando os valores das densidades ópticas do ELISA destes animais individualmente com os dados categóricos do Teste de Inibição de Crescimento por meio da da correlação de Spearman obteve-se um r = 0,5699, com um intervalo de confiança de 0,4995 a 0,6329 que foi significante para todos os grupos (Tab. 5).

Tabela 5: Correlação entre os valores de DO(s) do ELISA amostra Norma de soros individuais com o Teste de Inibição de Crescimento em bovinos vacinados.

Vacinas	**Coeficiente r Spearman**	**Intervalo confiança (95%)**	**Correlação significante (α = 0,05)**
Todos os grupos	0,5699	0,4995 a 0,6329	P< 0.0001
A	0,4462	0,1555 a 0,6658	P< 0,0031
B	0,2642	-0,05257 a 0,5326	P< 0,0909
C	0,6803	0,4672 a 0,8187	P<.0001
D	0,5611	0,3016 a 0,7432	P<0,0001
E	0,5086	0,2332 a 0,7084	P<0,0006
G	0,7573	0,5827 a 0,8650	P<0.0001
H	0,4462	0,1555 a 0,6658	P<0,0031
I	0,6460	0,4179 a 0,7974	P<0.0001
J	0,7110	0,5124 a 0,8374	P<0.0001
K	0,3690	0,0640 a 0,6110	P<0,0162

Ao avaliar os valores das OD(s) individuais em cada dia testado nos grupos de animais vacinados e confrontando-se com os dados categóricos do Teste de Inibição de Crescimento dos grupos (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K).

Os grupos A e H produziram r=0,4462 iguais, demonstrando uma correlação significativa.

O único grupo que não apresentou uma correlação significativa foi o grupo da B, o qual apresentou um r= 0,2642 com o teste de Inibição de Crescimento.

Os grupos G, J, C e I apresentaram as melhores correlações com r=0,7573, r=0,7110, r=0,6803 e r= 0,6460, respectivamente.

Dentre as correlações significativas o grupo K foi a de menor valor apresentando-se, com um r= 0,3690.

Os grupos da D e da E produziram r=0,5611 e r=0,5086 que foram semelhantes e significativas.

4.2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS EM RELAÇÃO AO TEMPO

Na tabela 6 as médias aritméticas das DO(s) segundo os tempos de coleta são apresentadas, demonstrando que somente nos dias 30, 60, 90, 120, 150, 180, 270 e 300 as vacinas anti leptospira Hardjo

induziram a produção de títulos de anticorpos, cujos resultados foram estatisticamente significantes.

Tabela 6. Médias Aritméticas das OD(s) obtidas no ELISA contra as sorovariedades de Leptospiras Hardjo, Hardjobovis e Norma, de acordo com o tempo após a vacinação. Belo Horizonte, MG, 2007.

Tempo (dias)	Média de títulos
0	0,029 a
30	0,488 b
60	0,591 b
90	0,474 b
120	0,414 b
150	0,276 c
180	0,197 d
210	0,106 e
240	0,086 e
270	0,375 b
300	0,244 cd
330	0,176 d
360	0,107 e
390	0,064 ae
420	0,020 a

* valores com letras diferentes dentro da mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$)

Na tabela 7 as médias geométricas dos títulos segundo os tempos de coleta são apresentadas, demonstrando que somente nos dias 30, 60, 90, 120 e 270 as vacinas anti leptospira Hardjo induziram a produção de títulos de anticorpos, cujos resultados foram estatisticamente significante.

A análise estatística dos resultados obtidos demonstrou que houve interação entre tempo, a sorovariedade e a vacina aplicada ($p<0,05$) quando comparados as médias aritméticas das DO(s) e as médias dos logaritmos dos títulos pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os resultados foram comparados por outro teste não paramétrico, o teste múltiplo de Dunn. Portanto, houve influência dos fatores acima citados na indução da produção de anticorpos após a aplicação das vacinas nos animais.

Tabela 7: Médias Geométricas dos Logaritmos dos títulos obtidos no Teste de Microaglutinação contra as sorovariedades de Leptospiras Hardjo, Hardjobovis e Norma, de acordo com o tempo após a vacinação. Belo Horizonte, MG, 2007.

Tempo (dias)	Média de títulos
0	0,000 a
30	1,298 b
60	1,983 c
90	1,546 b
120	1,411 d
150	1,296 e
180	1,104 ae
210	0,000 a
240	0,000 a
270	1,334 d
300	1,276 e
330	1,040 a
360	0,000 a
390	0,000 a
420	0,000 a

* valores com letras diferentes dentro da mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$)

4.3 – Análise estatística das médias em relação a sorovariedade

Comparando-se às médias aritméticas gerais das DO(s) contra cada sorovariedade testada no ELISA indireto (Tab. 8) verificou-se que a sorovariedade que obteve maior média foi a Hardjobovis, mas não diferiu da amostra Norma. A sorovariedade Hardjo foi a amostra que demonstrou menor desempenho em relação a amostra Hardjobovis.

Tabela 8: Médias Aritméticas das OD(s) obtidas contra cada sorovariedade no decorrer do estudo após a vacinação. Belo Horizonte, MG.2007.

Sorovariedade	Média de títulos
Hardjo	0,2360 a
Norma	0,2477 ab
Hardjobovis	0,3099 b

*valores com letras diferentes dentro da mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$)

Quando as médias gerais dos logaritmos de títulos de cada sorovariedade testada pelo teste de microaglutinação foram comparadas (Tab. 9), verificou-se que a

sorovariedade Hardjo foi a que demonstrou melhor desempenho em relação a amostra Norma, mas não diferiu estatisticamente da amostra Hardjobovis.

Tabela 9: Médias dos logaritmos dos títulos obtidos no Teste de Microaglutinação contra cada sorovariedade no decorrer do estudo após a vacinação. Belo Horizonte, MG. 2007.

Sorovariedade	Média de títulos
Norma	0,2805 a
Hardjobovis	0,4181 b
Hardjo	0,4951 b

*valores com letras diferentes dentro da mesma coluna diferem entre si ($p<0,05$)

4.4 – Análise estatística das médias aritméticas do ELISA indireto

As médias aritméticas normalizadas de todos os antígenos utilizados no ensaio imunoenzimático indireto são descritas nos anexos 7, 8 e 9.

Utilizando-se o antígeno Hardjoprajiitino amostra Norma no ensaio imunoenzimático todas as vacinas induziram resposta detectável pelo teste.

O grupo A produziu um pico de resposta no dia 60 após o reforço com declínio até o dia 240 após a vacinação, onde houve uma revacinação e novamente um novo pico no dia 270 (Graf. 3) .

O grupo B somente produziu um pico de reposta detectável no dia 270 após a revacinação (Graf. 4). Contrariamente o grupo C produziu um pico de resposta no dia 30, e estes persistiram até ao dia 120 onde declinaram até no dia 210 após a vacinação. Após trinta dias da revacinação foi evidenciado uma nova elevação da resposta no dia 270 e um posterior gradual declínio até o dia 390 após a revacinação (Graf. 5).

Diferentemente, o grupo D apresentou a maior resposta somente no dia 120, perfazendo 90 dias após a ultima dose e semelhantemente uma nova resposta no dia 270 com pouca persistência (Graf. 6).

Comparativamente semelhante ao grupo C, a resposta do grupo E (Graf. 7) produziu uma reposta no dia 30 após a primeira dose que persistiu até no dia 120, a partir do qual vieram a declinar até o dia 210 e novamente se elevaram no dia 270, devido a revacinação.

O grupo G (Graf. 8) foi o grupo que apresentou os maiores valores de médias entre todos os grupos testados, produzindo uma evidente elevação na resposta que atingiu seu pico no dia 120 e declinou até o dia 240 após a vacinação e novamente se elevou no dia 270, devido à revacinação e ocorreu um novo declínio até o dia 420.

O grupo H também produziu títulos detectáveis seguindo o mesmo padrão dos outros grupos com persistência até no dia 120 e declínio até no dia 240 e novamente um pico no dia 270 decorrente da revacinação (Graf. 9).

Com menor intensidade do que o grupo G, o grupo I (Graf. 10) produziu títulos apreciáveis que persistiram até o dia 120 e vieram declinando até o dia 240 e novamente produziu uma nova reposta no dia 270 após a revacinação seguindo o mesmo padrão de resposta de todos os grupos.

O grupo J diferentemente de todos os outros grupos produziu uma persistência até o dia 150 após a vacinação(Graf. 11).

Comparativamente diferente, o grupo K não produziu uma reposta apreciável no dia 270, após 30 dias da revacinação (Graf. 12).

Comparando estas médias entre as vacinas dentro dos referidos tempos de coleta o gráfico 13 demonstra que no dia 30 os grupos A, B, D, E, H e K não diferiram significativamente do controle negativo. Para os grupos C, G, I e J os valores das médias não diferem entre si utilizando-se a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma.

Para o dia 60 mantiveram-se os mesmos grupos (A, B, D, E, H e K) do dia 30 não havendo diferença estatística do valor encontrado para o grupo controle negativo e

permanecendo os grupos C, G, I, e J não diferindo entre si mas superiores aos demais (Graf. 14).

O gráfico 15 demonstra a comparação dos valores médios para o dia 90 entre os grupos de animais vacinados. Os grupos A, B, D e K não diferiram do grupo controle negativo e os demais grupos (C, E, G, H, I e J) não diferem entre si.

No dia 120 (Graf. 16) houve um aumento dos grupos que não diferiram do controle negativo com o decorrer do tempo após a vacinação. Os grupos A,B, D, E, H, I e K não apresentaram diferença estistica significativa quando comparadas com o grupo controle. Os grupos C, G e J não diferem entre si estatisticamente e demonstram manutenção de títulos 60 dias após a revacinação.

O mesmo perfil de valores médios permaneceu no dia 150 em relação ao dia 120 nos grupos de animais vacinados (Graf. 17).

O gráfico 18 demonstra os valores médios com 180 dias decorridos do experimento, onde somente o grupo G diferiu estatisticamente do grupo controle negativo na manutenção dos títulos.

Para o dia 270 (trinta dias após a revacinação) somente os grupos A, B, H, I, e K não diferem do grupo controle negativo. Os demais grupos C, D, E, G e J não diferem entre si, mas apresenta diferença significativa aos demais grupos (Graf. 19).

O gráfico 20 demonstra as comparações dos valores médios no dia 300 (sessenta dias após a revacinação). Os grupos A, B, E, H, J e K não diferem do controle negativo. Os demais grupos C, D, G e I demonstram valores médios que não diferem entre si mas estatisticamente superiores.

Utilizando a sorovariedade Hardjoprajiitino a reposta apresentada pelo grupo A apresentou menor persistência, e os picos foram atingidos nos dias 30 e 270, respectivamente (Graf. 21).

Somente uma reposta apreciável foi atingida no dia 270 para o grupo B onde foi de baixa amplitude (Graf. 22).

Diferentemente do grupo anterior, no grupo C a reposta foi persistente até no dia 120 após a vacinação e aumentou no dia 270, trinta dias após a revacinação (Graf. 23).

Comparativamente semelhante ao grupo C, o grupo D diferiu apenas na persistência desta resposta que permaneceu até o dia 300 depois da revacinação (Graf. 24).

O Grupo E produziu uma reposta semelhante ao grupo anterior diferindo somente na magnitude da reposta no dia 270 após a revacinação (Graf. 25).

Novamente o grupo G foi o que produziu uma reposta de maior valor e magnitude utilizando o antígeno Hardjoprajiitino quando comparada com os demais grupos do mesmo antígeno utilizado. Um fato interessante foi a persistência da resposta até o dia 240 após a vacinação e novamente veio a persistir até o dia 420 com alguma resposta (Graf. 26).

Os Gráficos (27 ao 29) relativos aos grupos H, I e J foram semelhantes em termos de dinâmica diferindo apenas na magnitude de resposta.

O grupo K não produziu reposta significativa no dia 270 após a revacinação conforme apresentado no gráfico 30.

O Gráfico 31 demonstra as comparações de médias entre os grupos de animais vacinados no dia 30 utilizando o antígeno Hardjoprajitino presente na formulação de todas as bacterinas comerciais. As vacinas B, D, H e K não apresentaram diferença significativa quando comparadas com o controle negativo. Diferentemente, os grupos A, C, E, G, I e J não diferiram entre si, mas foram estatisticamente superiores aos demais.

No dia 60 (Graf. 32) os os grupos A, B, D e K apresentaram valores de médias das DO(s) não discordantes do controle negativo. Os grupos C, E, G, H, I e J não diferem entre si mas possuem médias

significativas em relação ao controle negativo.

No dia 90 (Graf. 33), somente os grupos A, B e K não diferiram do controle negativo. Os grupos C, D, E, H, I, J, e K apresentaram valores de médias não discordantes entre si, mas estatisticamente discordantes em relação ao grupo controle negativo.

O Gráfico 34 demonstra as comparações das médias aos 120 dias de experimento, onde houve um aumento de grupos que não diferiram do grupo controle negativo (A, B, I, J e K). Os demais grupos: C, D, E, G e H não diferiram entre si mas obtiveram diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo.

Com 150 dias de experimento (Graf. 35) novamente houve um aumento dos grupos que não diferiram do grupo controle negativo, (grupos A, B, E, H, I, J e K), permanecendo os grupos C, D e G com diferenças significativas em relação ao controle negativo.

Perfazendo 180 dias decorridos do experimento (Graf. 36). Os grupos A, B, E, H, I, J e K apresentaram médias que não diferiram significativamente do grupo controle negativo. Os demais grupos (C, D e G) possuem valores que não discordam entre si, mas são estatisticamente significativos em relação ao grupo controle negativo.

Trinta dias após a revacinação, no dia 270 (Graf. 37) houve uma diminuição dos grupos que não diferiram do grupo controle negativo, permanecendo os grupos (A, B, E, H e K) com valores de médias que não diferiram do controle negativo. Os demais grupos restantes (C, D, G, I e J) possuem médias que não são discordantes entre si, mas são estatisticamente significantes.

O Gráfico 38 demonstra somente três grupos (C, D e G) que mantiveram valores de médias de títulos suficientes para diferirem significativamente do grupo controle negativo. Os demais grupos (A, B, E, H, I, J, e K) não diferiram do grupo controle negativo.

Utilizando-se o antígeno Hardjobovis no ensaio imunoenzimático, o grupo A produziu um pico no dia 30 após a primeira dose onde não ocorreu uma persistência em decorrência do reforço (Graf. 39).

Semelhantemente ao comportamento do grupo B utilizando-se os outros antígenos anteriores, com Hardjobovis este grupo não produziu resposta significativa após a vacinação e a revacinação (Graf. 40).

Os grupos C e D produziram comportamento semelhante em termos de dinâmica da reposta vacinal (Gráficos 41 e 42). O grupo E também apresentou resposta semelhante, porém de menor intensidade (Graf. 43).

Utilizando-se o antígeno Hardjobovis o grupo G produziu a maior resposta em termos de amplitude e comparativamente semelhante aos outros antígenos em termos de persistência de resposta (Graf. 44).

Os Gráficos 45 a 47 demonstram o comportamento dos grupos H, I e J que foram semelhantes em termos de reposta vacinal diferindo apenas que o grupo H, o qual não produziu reposta substancial no dia 30.

O grupo K produziu alguma reposta somente com 30 e 60 dias após a vacinação e reforço, mas de baixa magnitude e de curta duração e não desenvolvendo resposta no dia 270 após a revacinação (Graf. 48).

Em termos de comparações de médias para a sorovariedade Hardjobovis, no dia 30 após a primeira dose da vacina, os grupos B, D, H e K não diferenciam entre si e não diferiram do controle negativo, entretanto os grupos A, C, E, G, I e J apresentaram diferença significativa quando comparadas com o controle negativo (Graf. 49).

Trinta dias após o reforço no dia 60 houve uma mudança no perfil de médias com aumento de grupos que não diferiram do controle negativo, (grupos A, B, D, E, e K), contudo, os grupos C, G, H, I e J obtiveram diferença significativa do controle negativo (Graf. 50).

O Gráfico 51 demonstra os resultados do dia 90, onde houve novamente um alteração no perfil das médias em relação ao dia 60. Os grupos A, B, E e K não diferiram do controle negativo e houve uma diminuição dos grupos que não diferem do controle negativo. O grupos C, D, G, H, I e J alcançaram valores médios com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo.

Novamente houve uma alteração no perfil no dia 120 decorridos do experimento (Graf. 52) com acréscimo de mais um grupo aos grupos que não diferenciaram do controle negativo (Grupos A, B, E, H e K), entretanto os grupos C, D, G, I e J permaneceram estatisticamente superiores em relação ao controle negativo.

Somente os grupos C e G (Graf. 53) obtiveram diferença significativa em relação ao grupo controle negativo, determinando uma alteração substancial no perfil de comparação de médias no dia 150 onde os grupos A, B, D, E, H, I, J, e K não obtiveram diferença significativa em relação ao controle negativo.

O Gráfico 54 demonstra a comparação de médias para o dia 180, onde novamente houve alteração no perfil anterior. Somente o grupo G diferenciou-se do grupo controle negativo com todos os outros grupos não obtendo diferença significativa estatisticamente do controle negativo.

Devido a revacinação no dia 270 (trinta dias após a revacinação) o perfil das médias alterou-se novamente. Todos os grupos com exceção dos grupos A, B, H e K foram estatisticamente superiores ao controle negativo (Graf. 55).

No dia 300 (Gráfico 56) houve uma pequena alteração em relação ao dia 270 com a inclusão de mais um grupo que não diferenciou-se do controle negativo (Grupos A, B, E, H e K) permanecendo o restante dos grupos com diferenças significativas estatisticamente do controle negativo.

4.5 – Análise estatística das médias do Teste de Microaglutinação

Utilizando-se do teste de microaglutinação com a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma o grupo A produziu um pico de resposta no dia 30 após a primeira dose que declinou até o dia 90. Um novo pico foi observado no dia 270, trinta dias após a revacinação, mas de pequena amplitude e de curta duração (Graf. 57).

O Grupo B produziu resposta semelhante ao grupo anterior no teste de microaglutinação com a diferença de que o título declinou no dia 60 (Graf. 58).

Diferentemente dos dois grupos anteriores o grupo C produziu uma reposta de maior intensidade e mais duradoura onde o título veio a persistir até o dia 90 e ainda no dia 120 havia algum título residual, posteriormente no dia 300 havia titulo residual (Graf. 59).

Semelhantemente ao grupo anterior, o grupo D produziu uma resposta até o dia 90 e um novo pico no dia 270 que não persistiu declinando já no dia 300 (Gráfico 60), fato também observado no grupo E (Graf. 61).

O grupo G produziu reposta de maior intensidade e de longa duração se comparado aos outros grupos com reposta até o dia 180 após a vacinação, e títulos residuais até o dia 330 após a revacinação (Graf. 62).

Ao contrário deste grupo anterior, o grupo H apresentou uma reposta pouco duradoura atingindo títulos residuais até o dia 90 e uma pequena elevação no dia 270 que rapidamente desaparece (Graf. 63).

A semelhança do grupo anterior, os grupos I e K produziram uma reposta até o dia 90 após a vacinação, mas não apresentaram títulos após a revacinação (Graf. 64 e 66).

O titulo persistiu até o dia 120 após a vacinação e uma nova reposta foi evidenciada no dia 270 após a revacinação para o grupo J (Graf. 65).

Comparando-se as médias de reposta no dia 30 verificou-se que os grupos B, D, E, H, I, J e K não diferiram do grupo controle negativo, e os grupos A, C e G obtiveram

diferença significante estatisticamente em relação ao controle negativo. Os grupos da C e G foram as melhores vacinas que obtiveram as melhores médias não diferindo entre si (Graf. 67).

Houve uma mudança no perfil de médias no dia 60, onde somente os grupos A, B, D, E e K não produziram uma resposta significativa comparando-se ao controle negativo, entretanto os grupos restantes (C, G, H, I e J) foram estatisticamente superiores (Graf. 68).

Somente os grupos C, J e G apresentaram médias significantes estatisticamente ao final de 90 dias do experimento, diferindo do controle negativo. Os grupos restantes A, B, D, E, H, I e K não diferiram estatisticamente do grupo controle negativo com uma observação importante de que os grupos A e B não apresentaram resposta alguma (Graf. 69).

Ao final de 120 dias de experimento (Gráfico 70) somente o grupo G possuía títulos que foram diferentes estatisticamente do grupo controle negativo, entretanto, todos os outros grupos (A, B, C, D, E, H, I, J e K) somente possuíam títulos residuais que não diferiram do grupo controle negativo.

Após 30 dias da revacinação (dia 270) somente os grupos C e G apresentaram títulos significantes que diferiram do controle negativo. Os demais grupos A, B, D, E, H, I, J e K não produziram títulos significantes que diferencia-se do grupo controle negativo. Tais grupos não foram capazes de produzir títulos mesmo após a estimulação com a dose de revacinação (Graf. 71).

Utilizando-se o antígeno Hardjoprajiitino no teste de microaglutinação, os grupos A e B produziram títulos persistentes até o dia 150 após a vacinação e uma nova elevação nestes títulos no dia 270 após a revacinação foi observada, porém, no grupo B os títulos foram de menor intensidade (Graf. 72 e 73).

Diferentemente dos dois grupos anteriores os grupos C e D produziram títulos em maior magnitude chegando até o dia 150 após a vacinação e com títulos residuais até o dia 300 após a revacinação (Graf. 74 e 75).

Apesar do grupo E apresentar títulos residuais até o dia 150 após a vacinação, este grupo não obteve títulos significativos após a revacinação (Graf. 76).

O grupo G (Graf. 77) foi novamente o grupo que apresentou a maior persistência e magnitude de reposta com os títulos permanecendo até o dia 180 após a vacinação e até o dia 330 após a revacinação.

O titulo permaneceu somente até o dia 120 após a vacinação para o grupo H, com uma pequena elevação no dia 270 após a revacinação que rapidamente declinou (Graf. 78), fato também observado para o grupo I (Gráf. 79).

Para o grupo J foi observado titulo residual até o dia 150 após a vacinação com uma nova elevação no dia 270, devido a revacinação no dia 240 e com persistência até o dia 300 (Gráfico 80). Fato não observado para o grupo K que apresentou titulo residual até o dia 120, mas não houve uma nova elevação neste título devido a revacinação (Graf. 81).

Utilizando-se das comparações de médias (Graf. 82) os grupos que melhor se comportaram foram A, B, C, D, E, G, I e J. Os outros dois grupos (H e K) não diferiram do controle negativo. Esta comparação de médias foi a que melhor demonstrou resultados, provavelmente por ser tratar do antígeno Hardjoprajitino (antígeno homólogo as sementes de leptospiras utilizadas na preparação das vacinas comerciais).

O gráfico 83 demonstra o dia 60 (trinta dias após o reforço). Os grupos A, B e K já não possuíam títulos de aglutininas significantes que fossem diferentes do controle negativo, entretanto os grupos C,D,E,G,H,I e J tiveram médias de títulos significantes estatisticamente.

Houve uma mudança no perfil de médias no dia 90 comparando-se ao ponto no tempo anterior, onde houve um aumento de grupos que não diferenciam do grupo controle

negativo (Grupos: A,B,E,I e K). Os demais grupos C,D,E,H e J ainda permaneciam com títulos suficientes para diferenciarem do grupo controle negativo (Graf. 84).

Quatro meses após a primeira dose somente os grupos C, D, G e I possuiam títulos significantes estatisticamente do grupo controle negativo, entretanto os grupos A, B, E, H, I e K não mantiveram títulos que fossem diferentes do grupo controle negativo (Graf. 85).

Mesmo após a revacinação no dia 240 do experimento somente o grupo G demonstrou títulos suficientes para diferenciar do grupo controle negativo, entretanto os outros grupos (A, B ,C, D, E, H, I, J e K), não obtiveram médias que fossem diferentes do controle negativo (Graf. 86).

Usando o antígeno Hardjobovis no teste de microaglutinação, o grupo A produziu somente título até o dia 150 sendo este residual e não houve a presença de título para a imunoglobulina da classe M após a revacinação (Graf. 87).

Ao contrário do grupo anterior o grupo da B produziu dois pequenos picos de títulos nos dias 30 e 270 respectivamente, mas de curta duração e baixa intensidade (Graf. 88).

Os grupos C, D e E comportaram-se de forma semelhante tendo títulos residuais até o dia 150, porém a intensidade deste titulo neste dia foi visualmente superior no grupo C. Houve uma persistência até o dia 300 do grupo D neste titulo, fato não observado no grupo C e E (Graf. 89, 90 e 91).

Para o grupo G o título foi observado até o dia 180 após a vacinação de forma residual e uma nova elevação neste título foi observada no dia 270 que permaneceu até o dia 330 de forma também residual. Este grupo apresentou a maior média de títulos para esta sorovariedade se comparado a este mesmo grupo com a utilização das outras sorovariedades (Graf. 92).

Comportamento semelhante ocorreu entre os grupos H, I e J onde houve a persistência até o dia 150 com títulos residuais para todos estes grupos, porém o grupo J apresentou uma nova elevação no dia 270 provinda da revacinação, fato que não ocorreu nos grupos H e I de forma significativa (Graf. 93, 94 e 95).

O gráfico 96 apresenta o comportamento do grupo K frente ao antígeno Hardjobovis onde o título persistiu somente até o dia 120 após a vacinação e não houve resposta à revacinação.

Os resultados das comparações de médias revelaram que somente os grupos B, H e K não diferem do grupo controle negativo no dia 30 (Graf. 97), entretanto, os grupos A, C, D, E, G, I e J foram os grupos que obtiveram as melhores médias de reposta diferindo estatisticamente do controle negativo.

Mesmo após a dose de reforço no dia 60 (Graf. 98) os grupos A, B, E e K não produziram médias de títulos suficientes para se diferenciarem do controle negativo, entretanto os grupos C,D,G,H,I e J produziram médias que foram superiores e significantes estatisticamente.

Decorridos 90 dias do experimento (Graf. 99) os grupos A, B, E, I e K já não possuíam títulos para diferenciar-se do controle negativo, contudo os grupos C, D, G, H e J permaneceram com às médias de títulos com signicância estatística e diferentes do controle negativo.

Houve um aumento de grupos (A, B, E, I, J e K) que não diferenciaram do controle negativo com o decorrer do tempo no dia 120 (Graf. 100), no entanto os grupos C,D,G e H ainda possuíam títulos diferenciando-se do controle negativo e estatisticamente superiores.

Mesmo após a revacinação no dia 270 (trinta dias após a revacinação) somente o grupo G obteve títulos diferenciando-se do controle negativo, todos os outros grupos A, B, C, D, E, H, I, J e K não alcançaram médias de títulos suficientes estatisticamente para diferenciar-se do grupo controle negativo (Graf. 101).

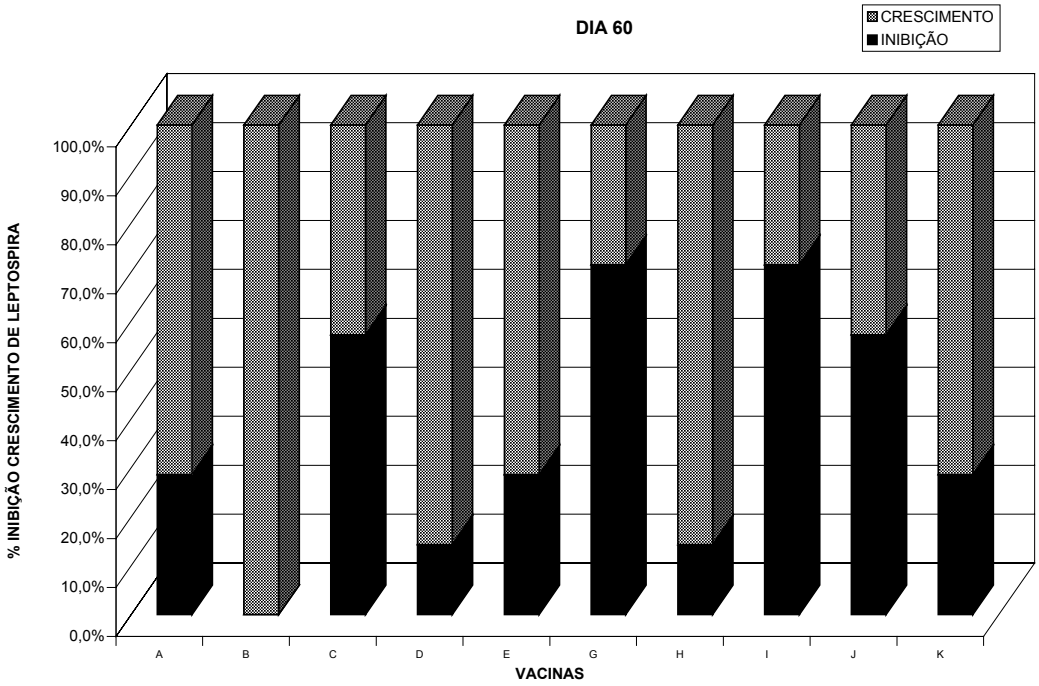


Gráfico 1: Porcentagem de inibição de crescimento de Hardjo, amostra Norma em soros de bovinos vacinados após 60 dias da primeira dose.

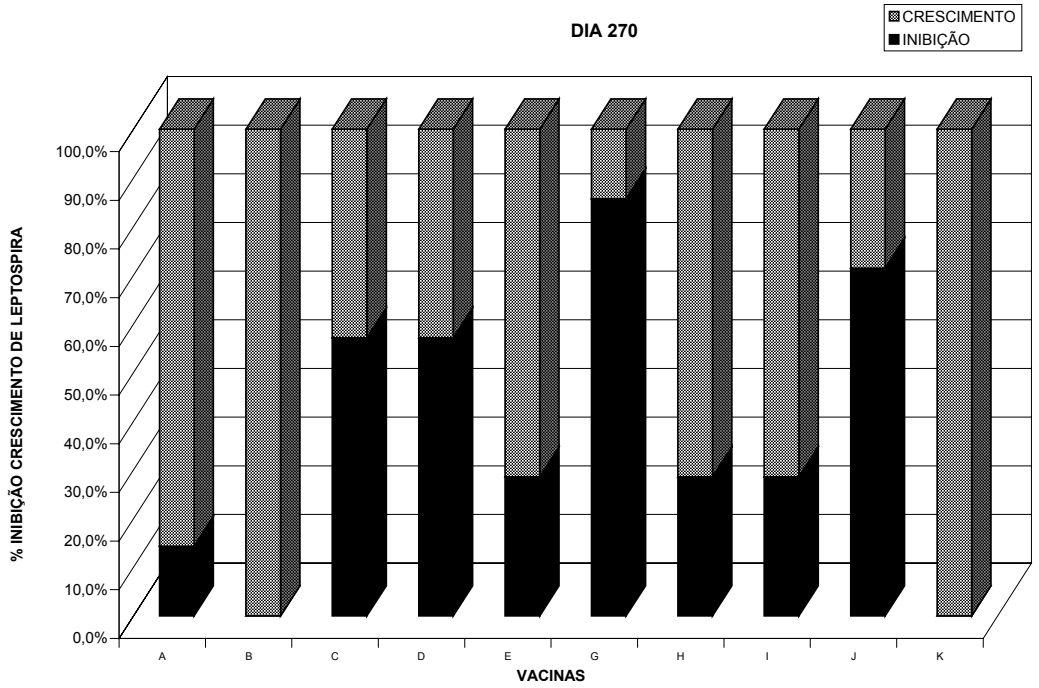


Gráfico 2: Porcentagem de inibição de crescimento de Hardjo, amostra Norma em soros de bovinos vacinados após 30 dias da revacinação.

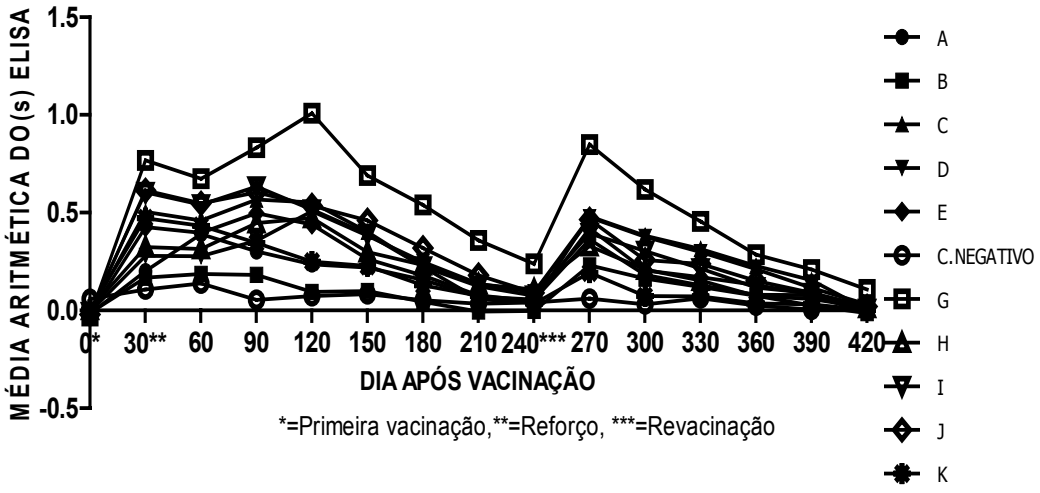


Gráfico 3 : Níveis de IgG determinados pelo o ELISA com Hardjoprajitino amostra Norma após os protocolos de vacinação em bovinos de todos os grupos.

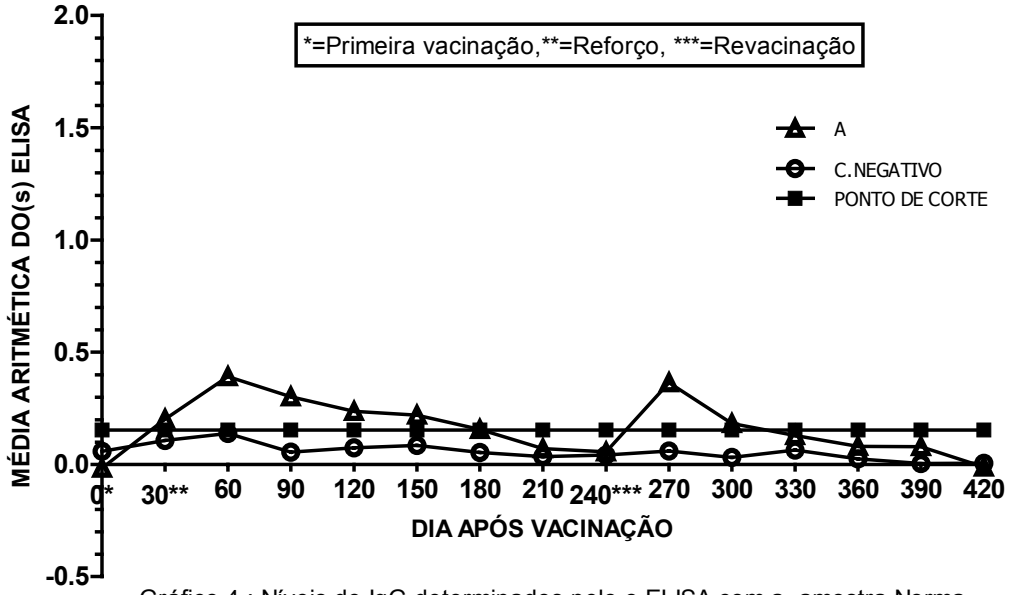


Gráfico 4 : Níveis de IgG determinados pelo o ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo A.

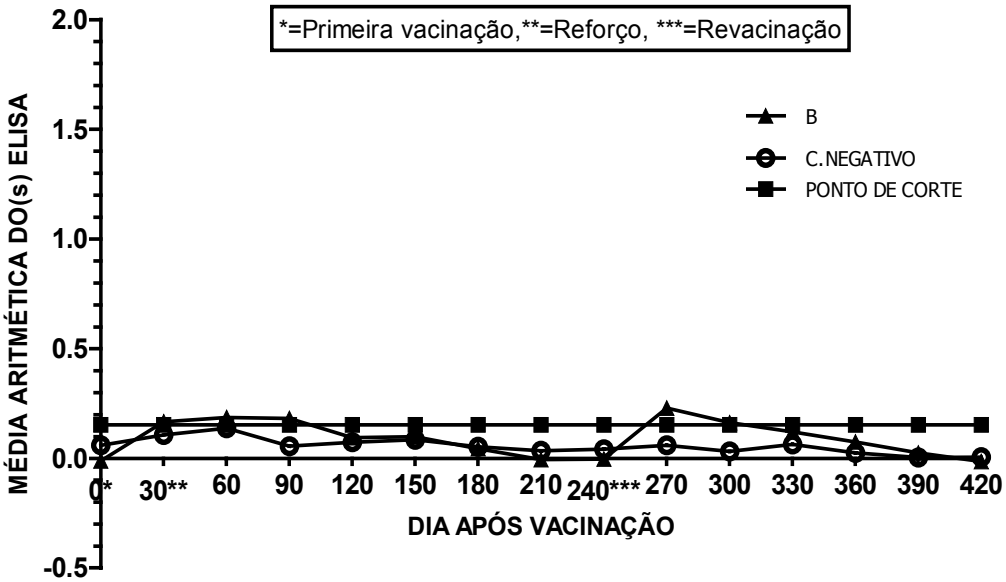


Gráfico 5 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo B.

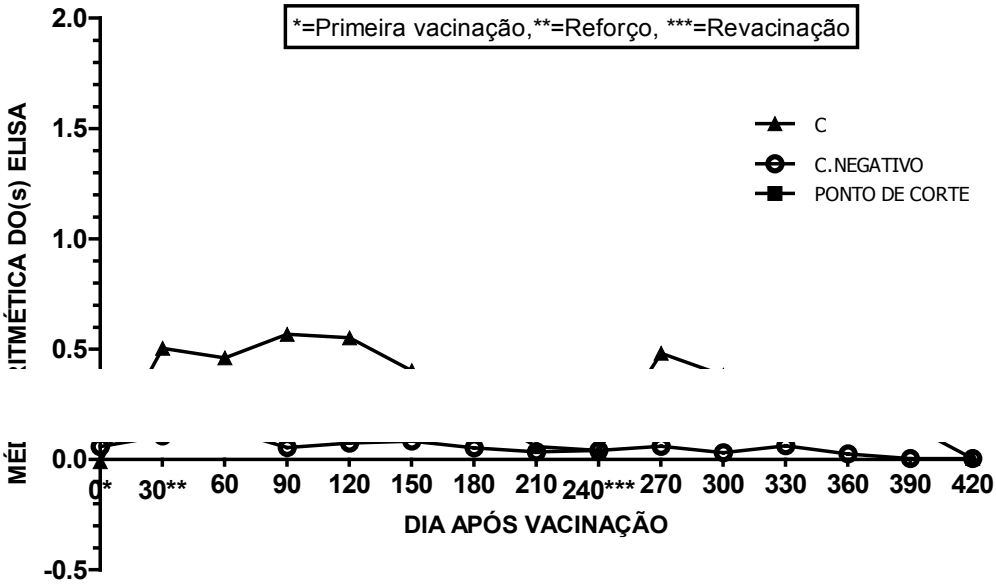


Gráfico 6 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo C.

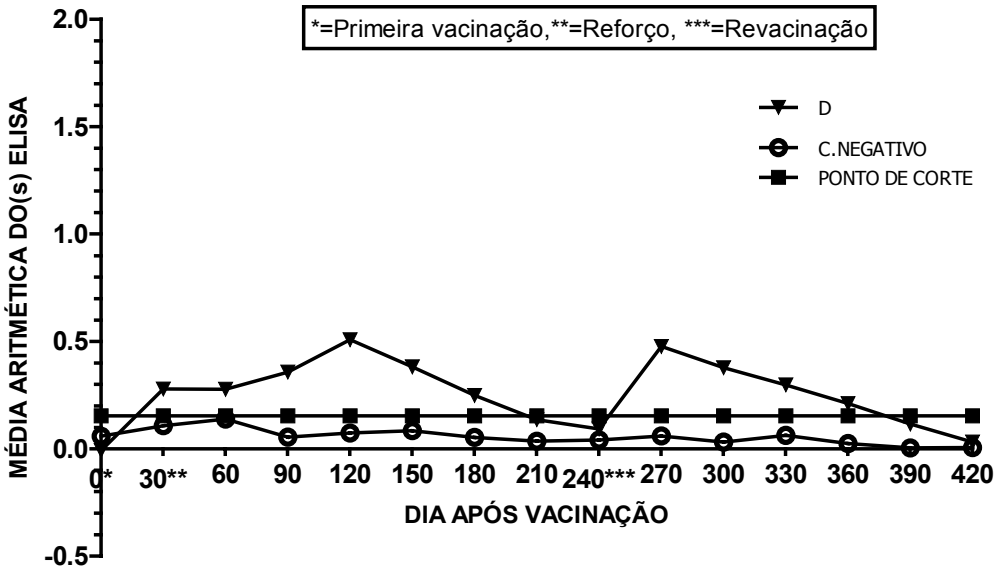


Gráfico 7 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo D.

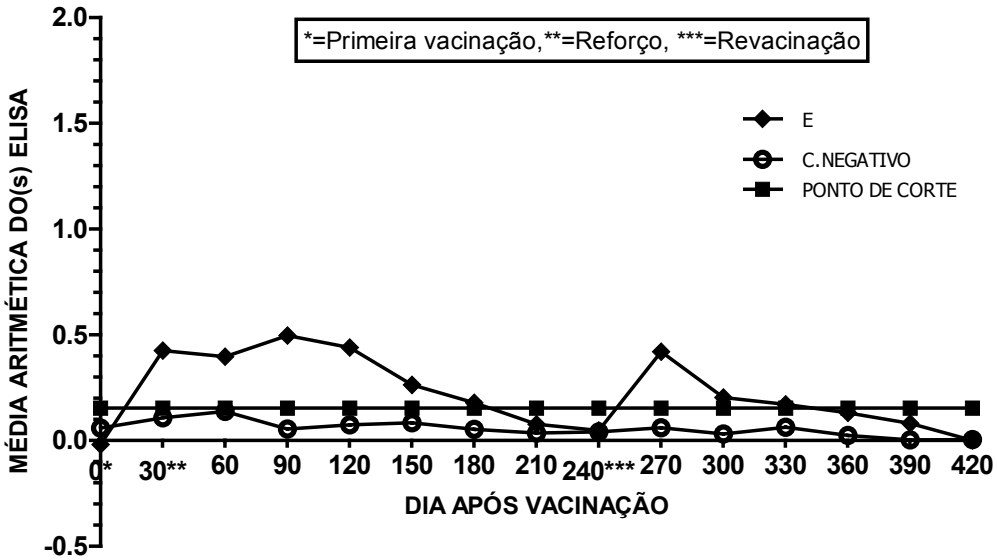


Gráfico 8 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo E.

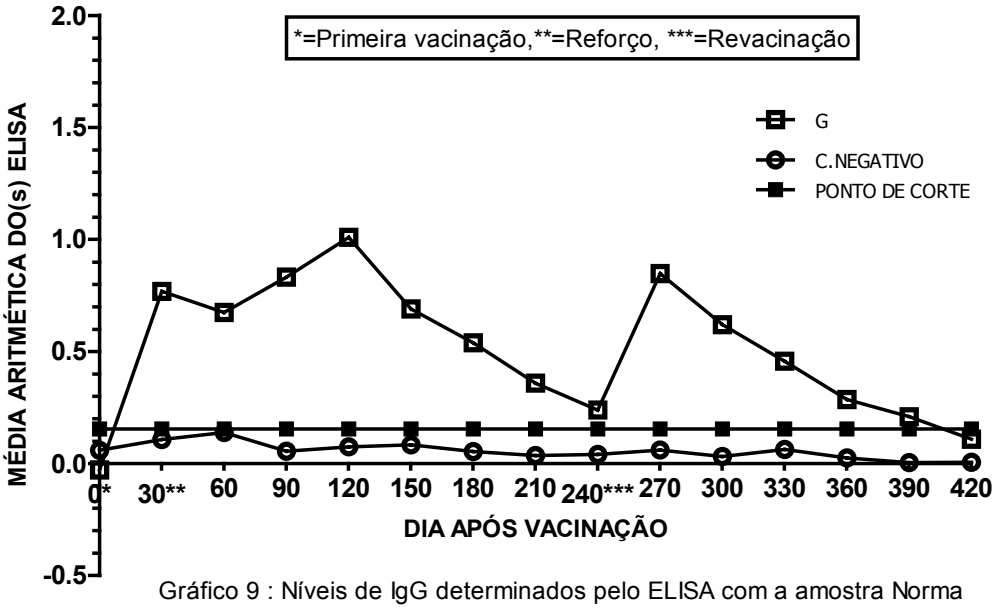


Gráfico 9 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo G.

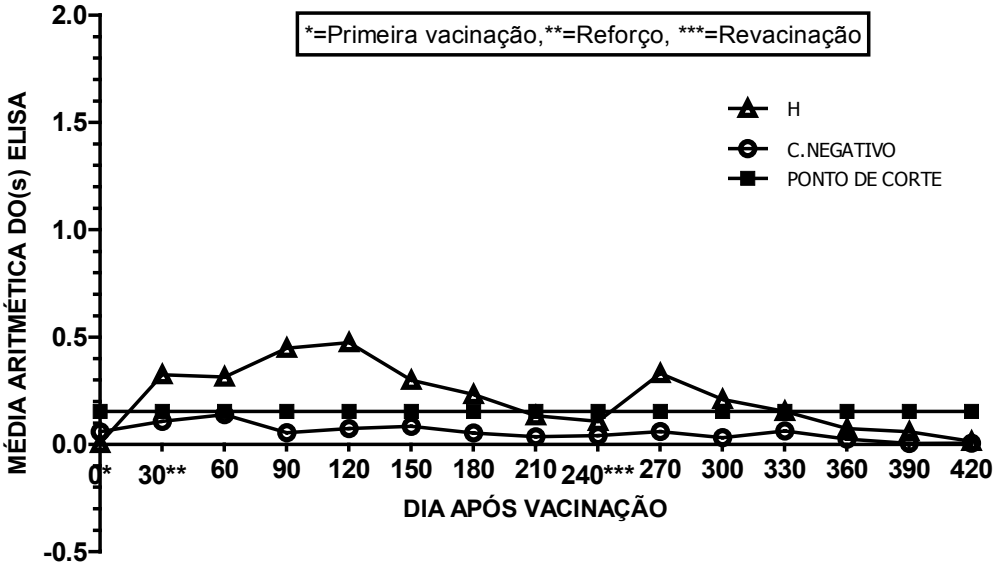


Gráfico 10 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo H.

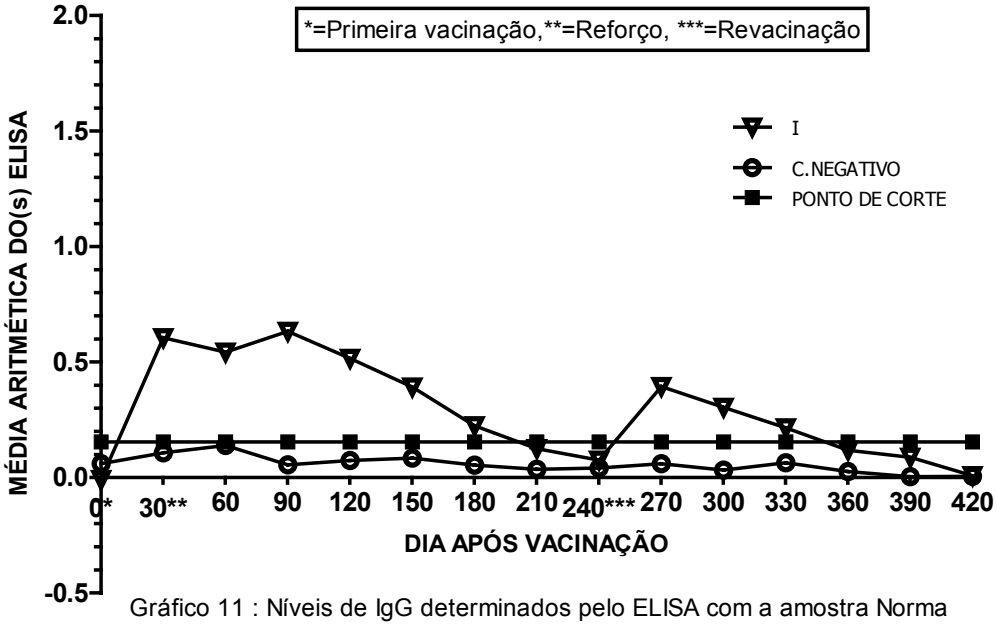


Gráfico 11 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo I.

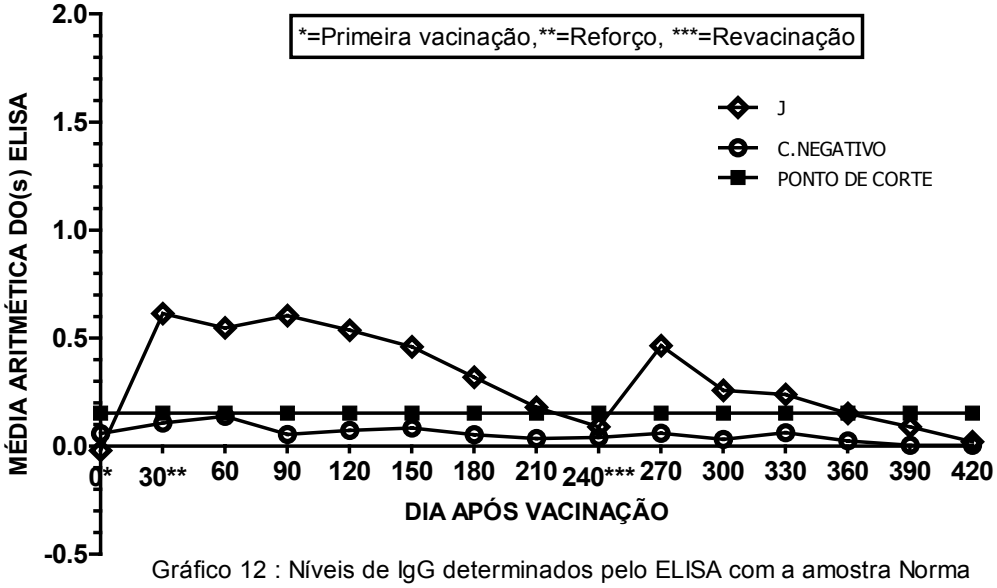


Gráfico 12 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo J.

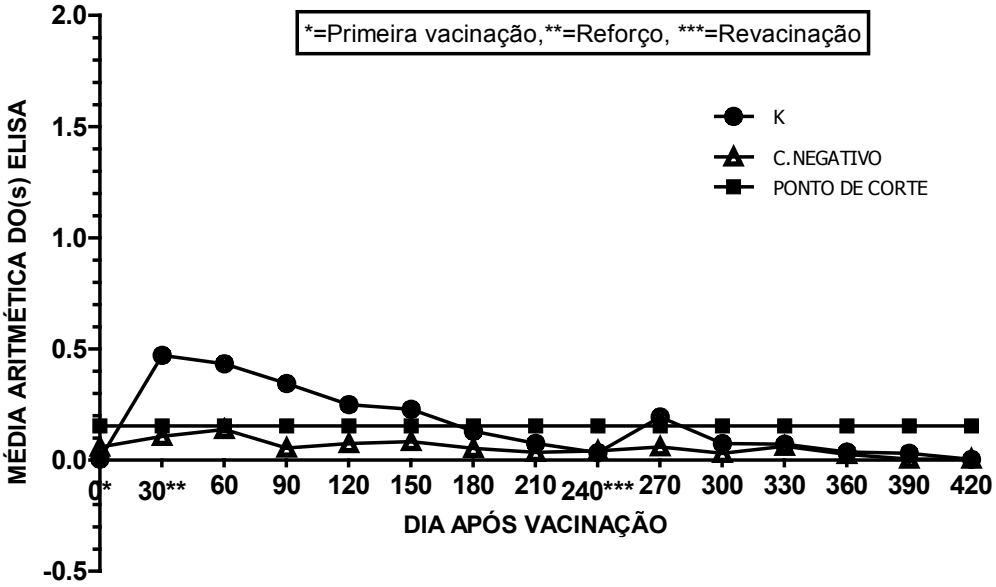


Gráfico 13 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Norma após a vacinação em bovinos do grupo K.

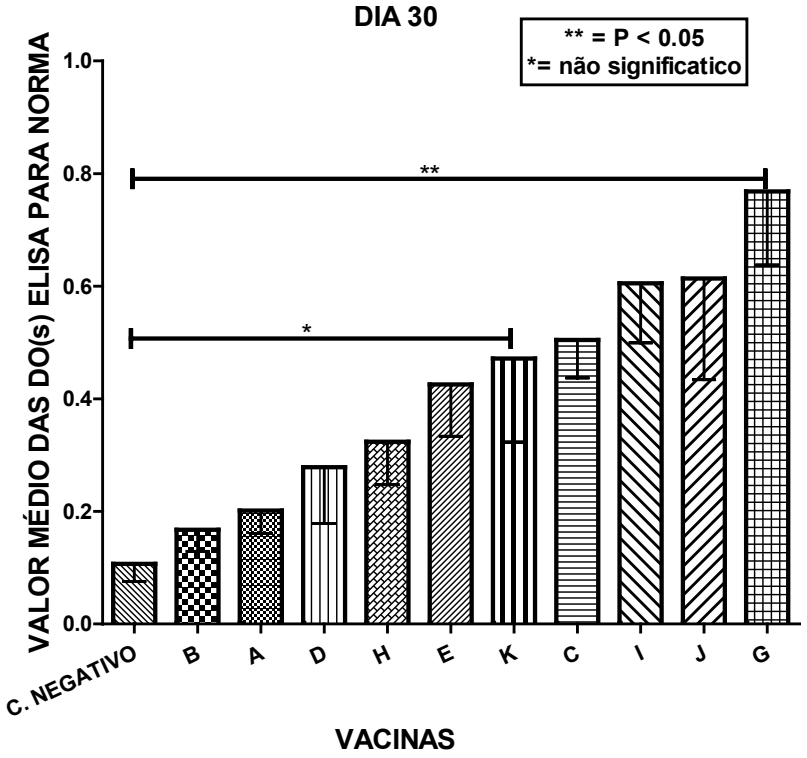


Gráfico 14 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo ELISA amostra Norma.

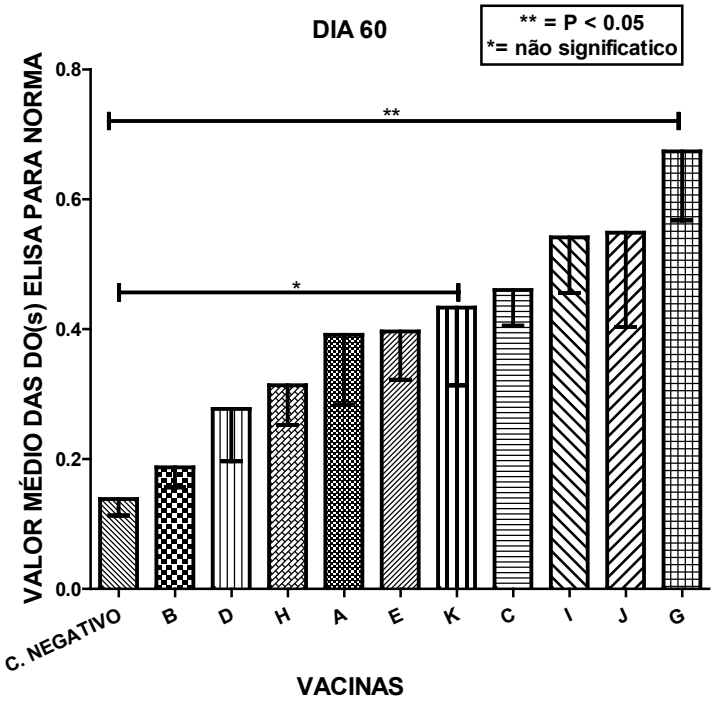


Gráfico 15 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo ELISA amostra Norma.

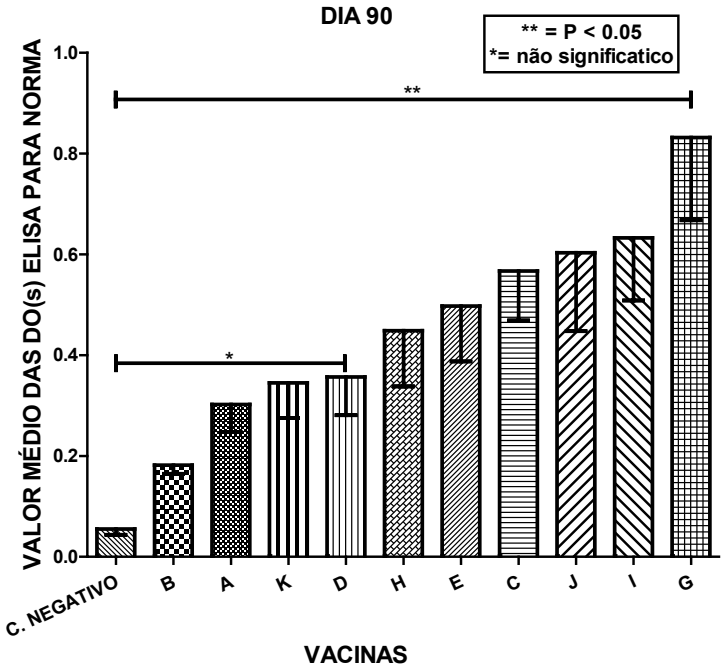


Gráfico 16 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo ELISA amostra Norma.

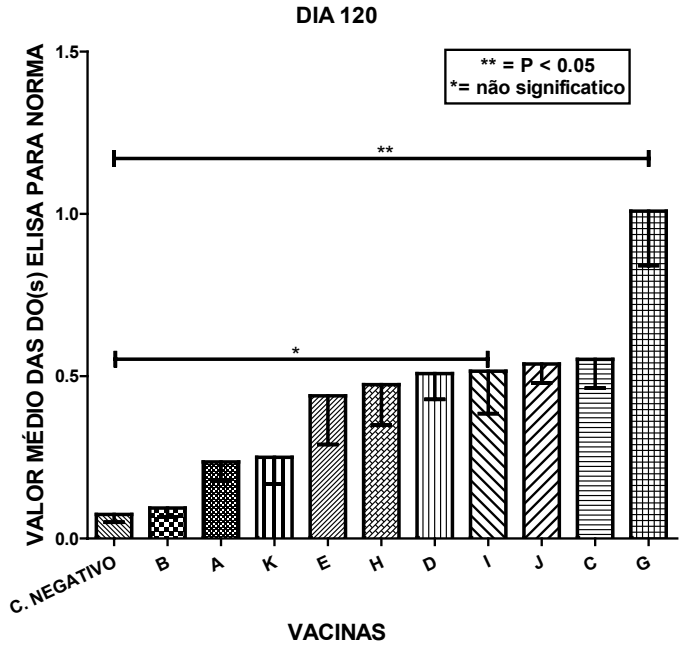


Gráfico 17 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo ELISA amostra Norma.

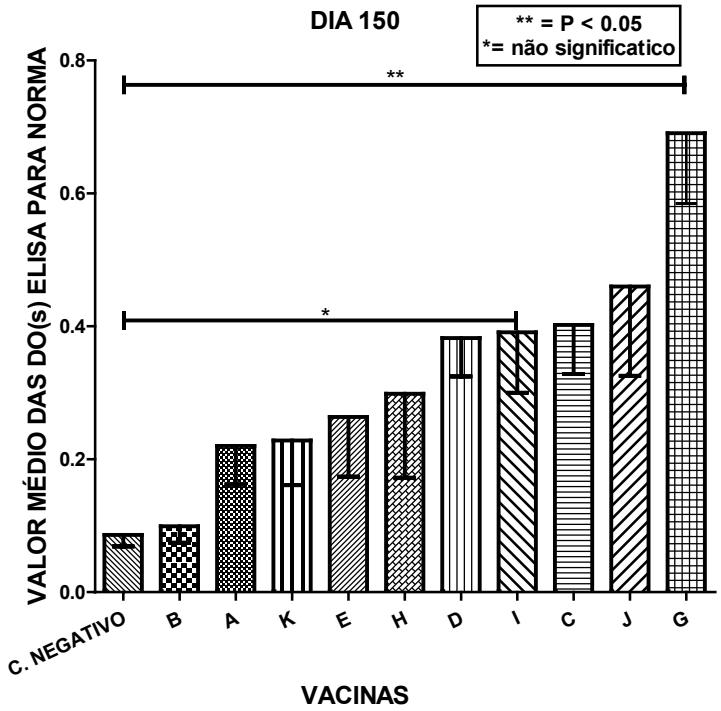


Gráfico 18 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 150 pelo ELISA amostra Norma.

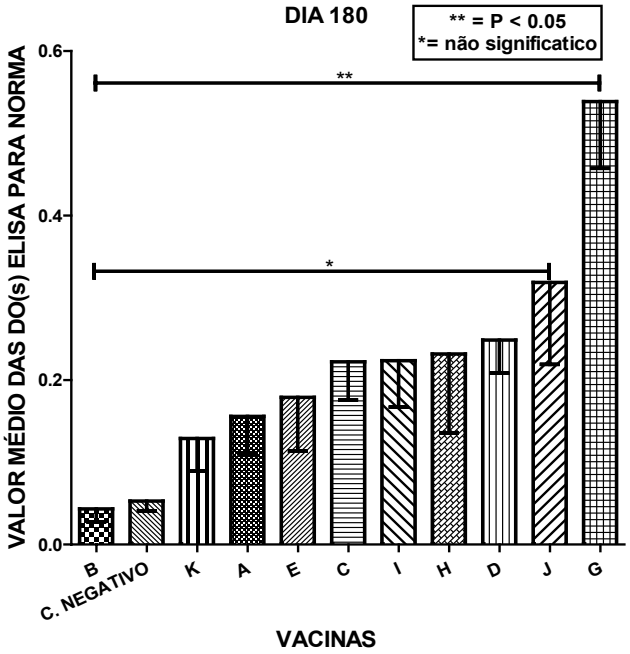


Gráfico 19 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 180 pelo ELISA amostra Norma.

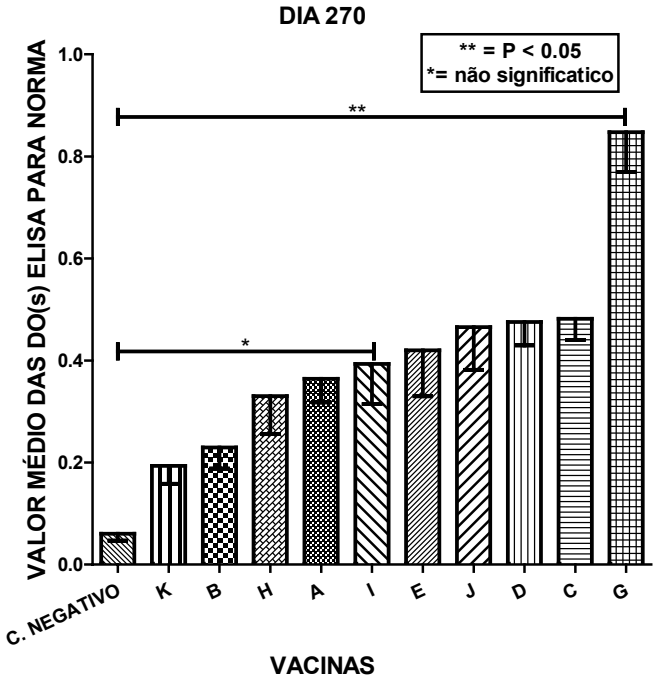


Gráfico 20 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo ELISA amostra Norma.

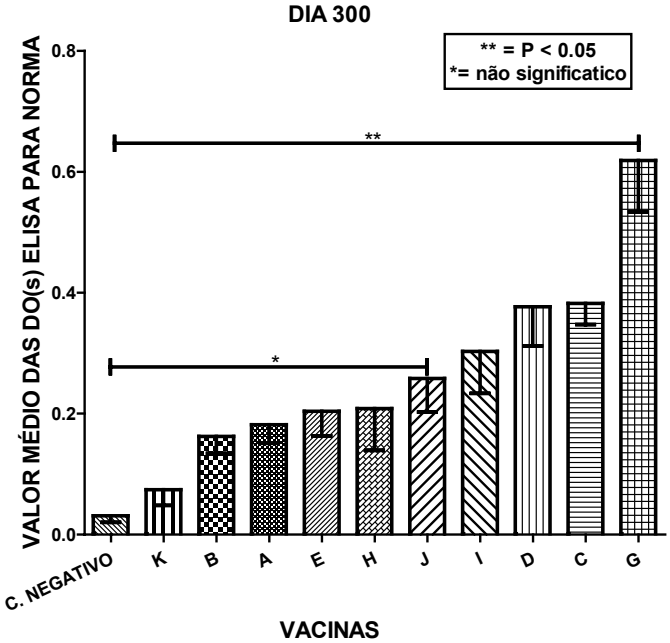


Gráfico 21 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 300 pelo ELISA amostra Norma.

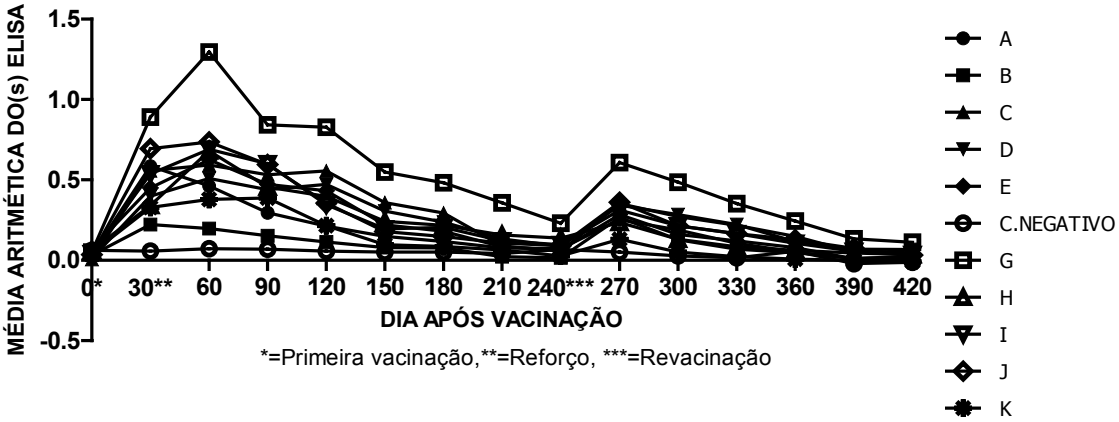


Gráfico 22 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos de todos os grupos.

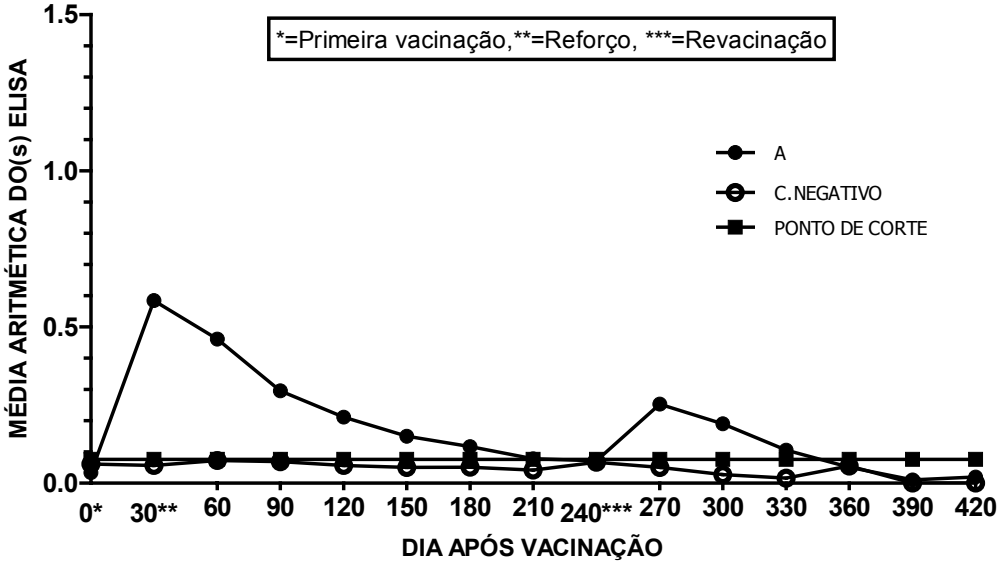


Gráfico 23 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo A.

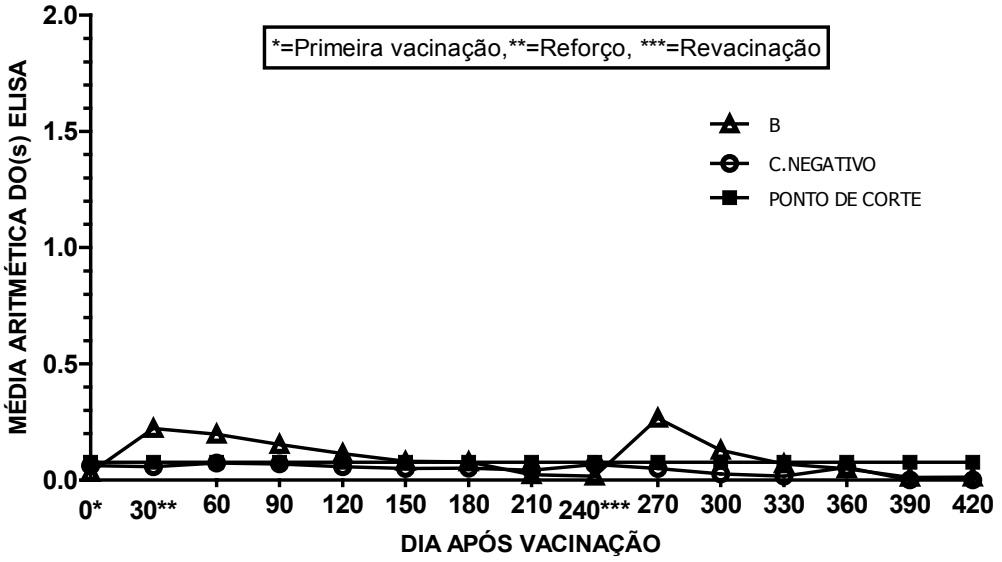


Gráfico 24 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo B.

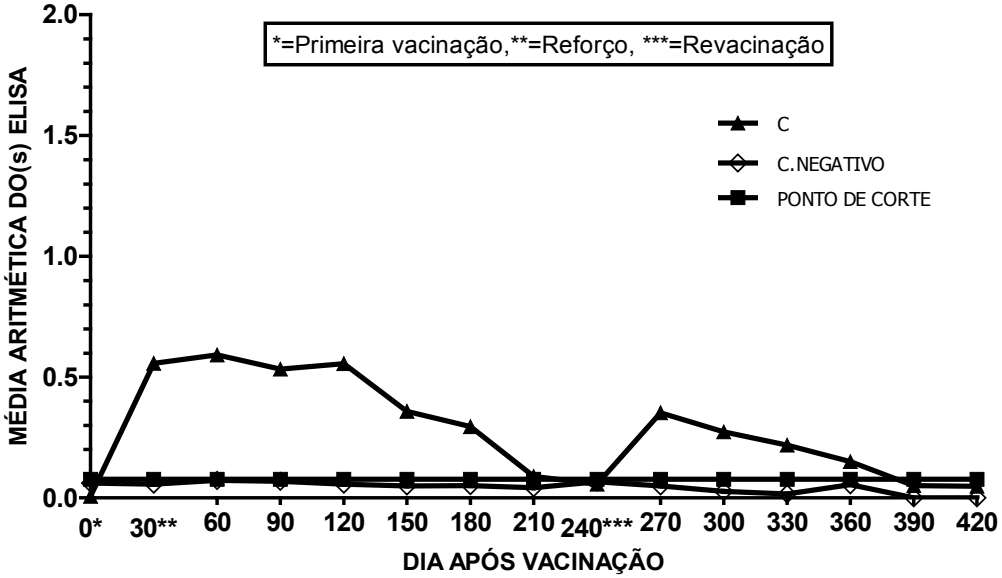


Gráfico 25 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo C.

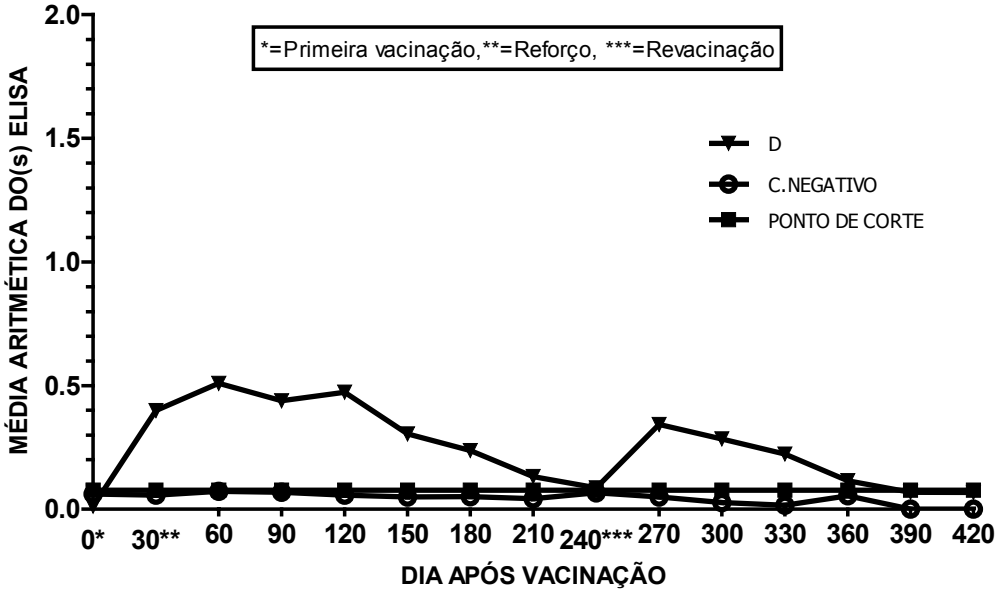


Gráfico 26 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo D.

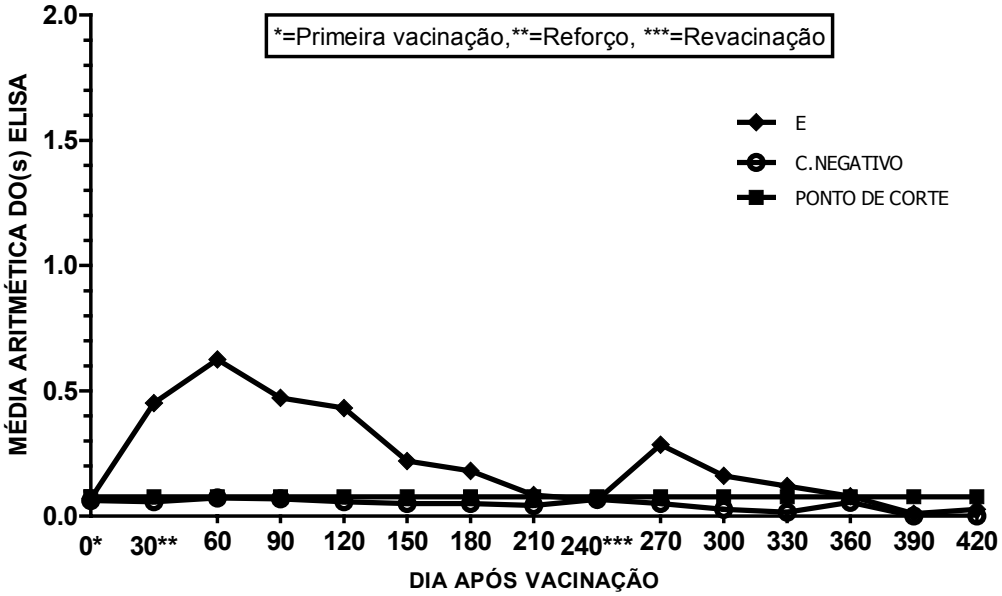


Gráfico 27 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo E.

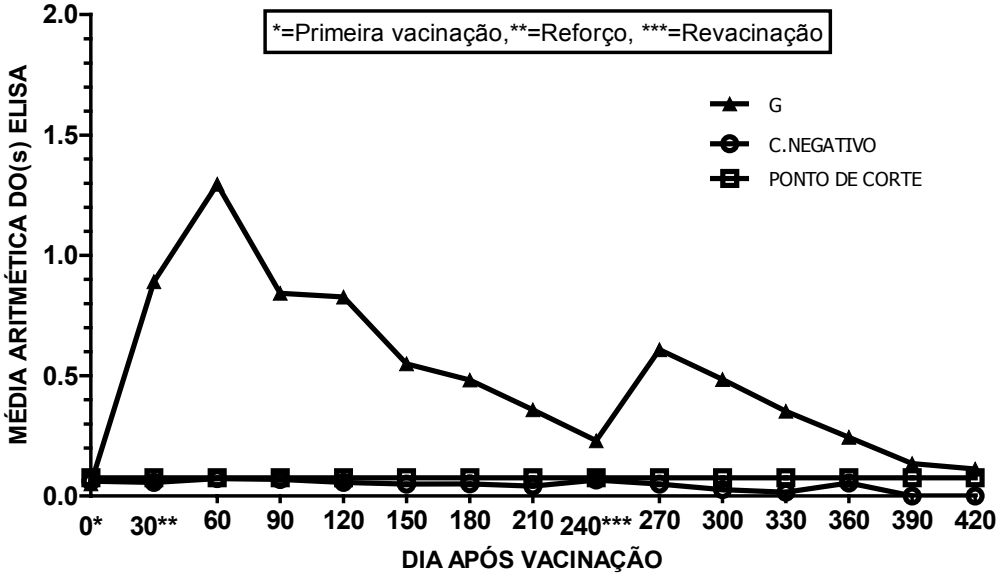


Gráfico 28 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo G.

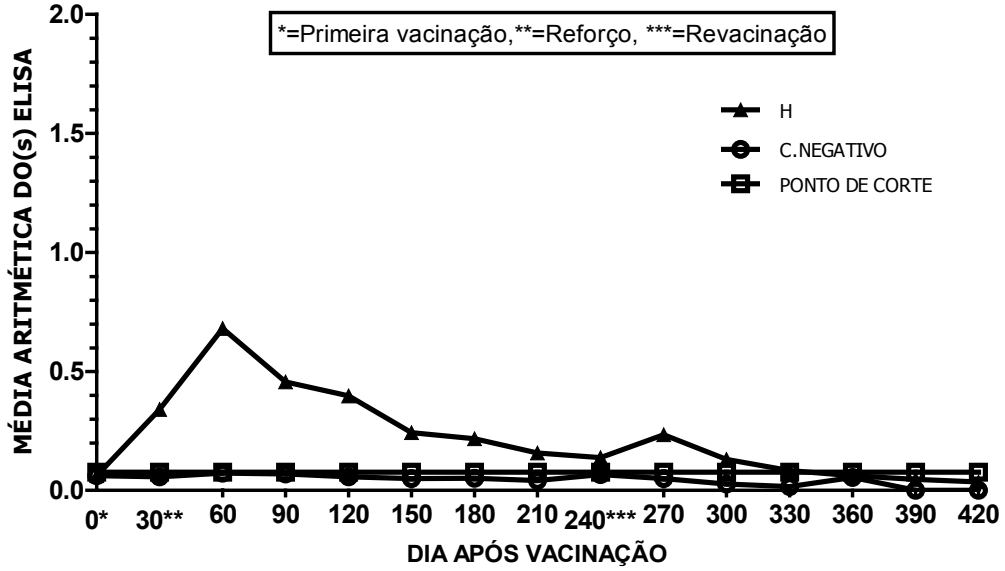


Gráfico 29 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo H.

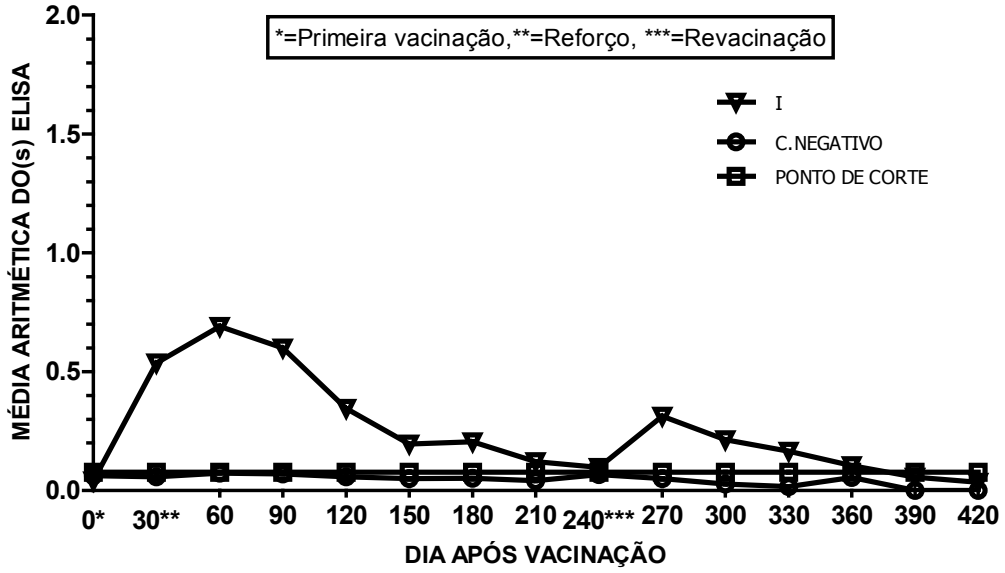


Gráfico 30 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo I.

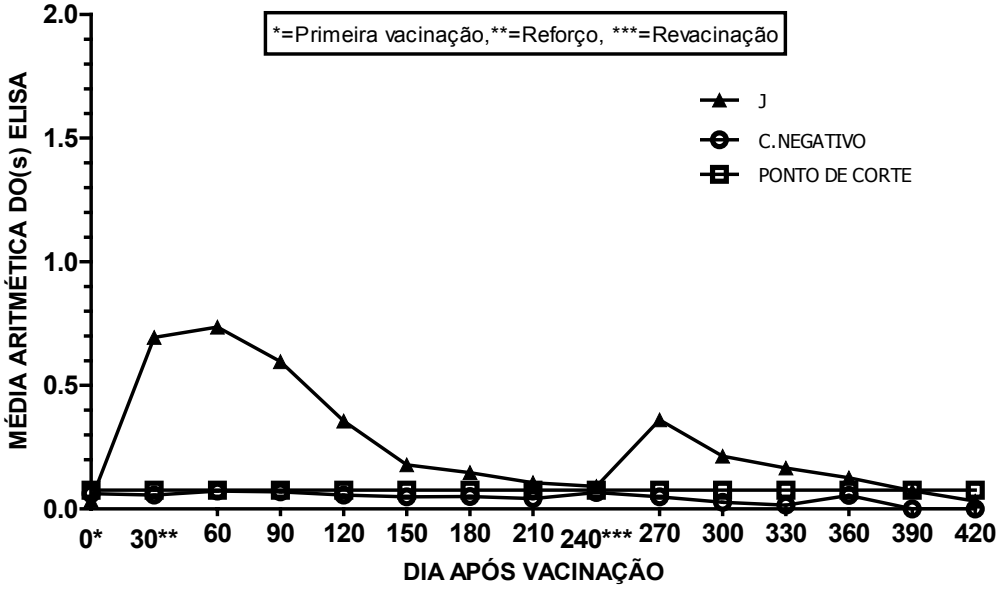


Gráfico 31 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo J.

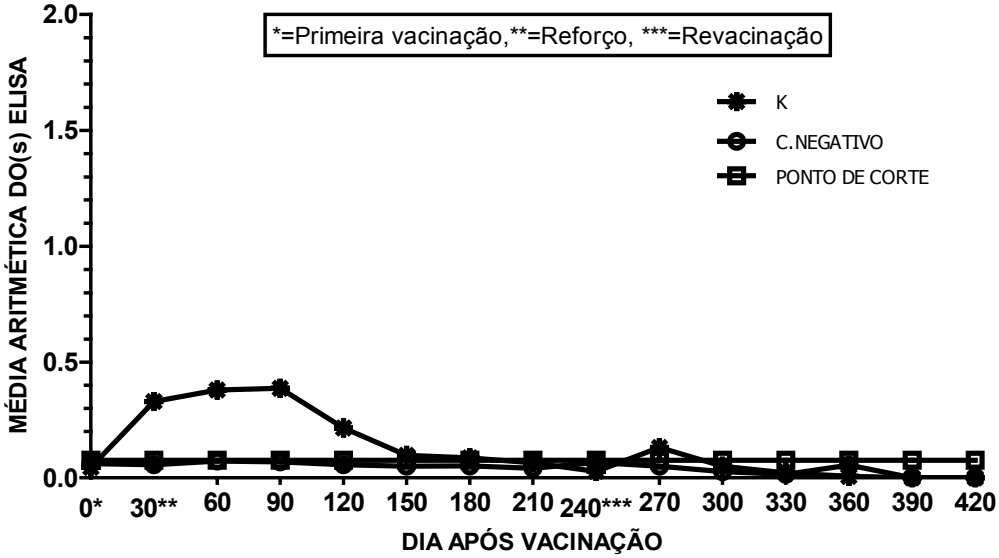


Gráfico 32 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjoprajitino após a vacinação em bovinos do grupo K.

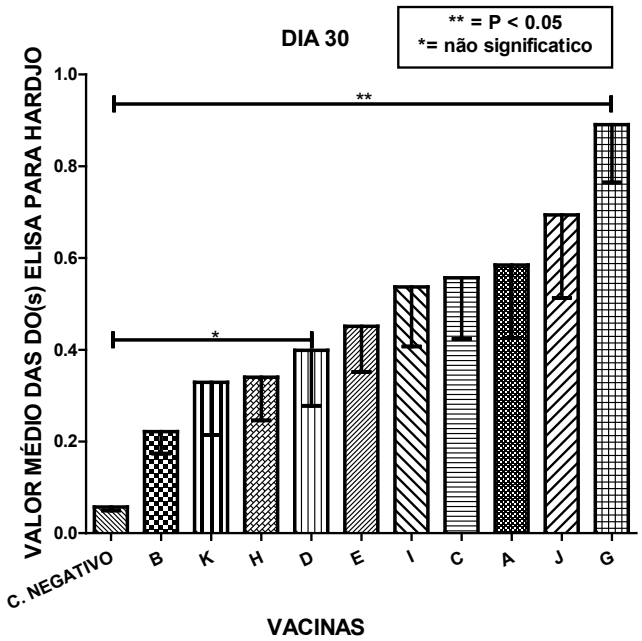


Gráfico 33 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo ELISA amostra Hardjoprajitino.

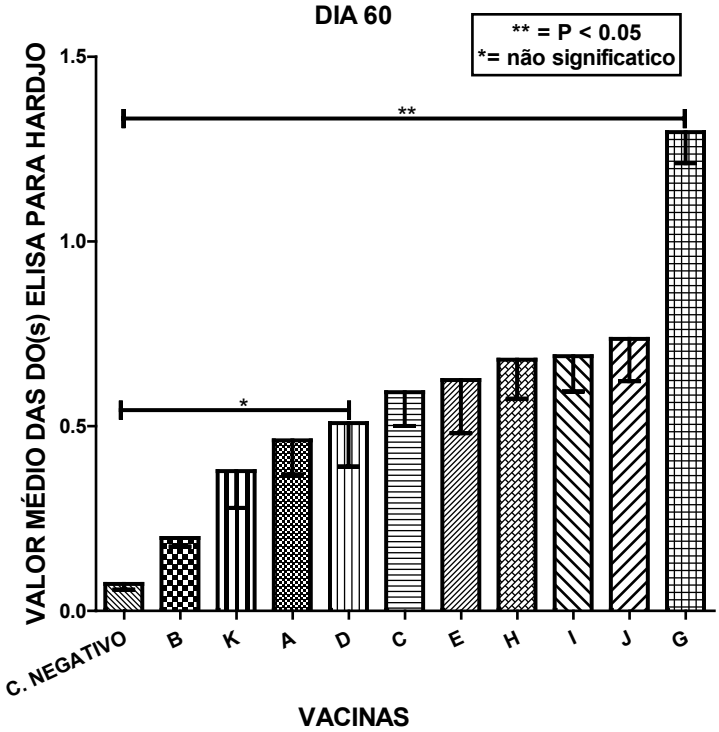


Gráfico 34 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo ELISA amostra Hardjoprajitino.

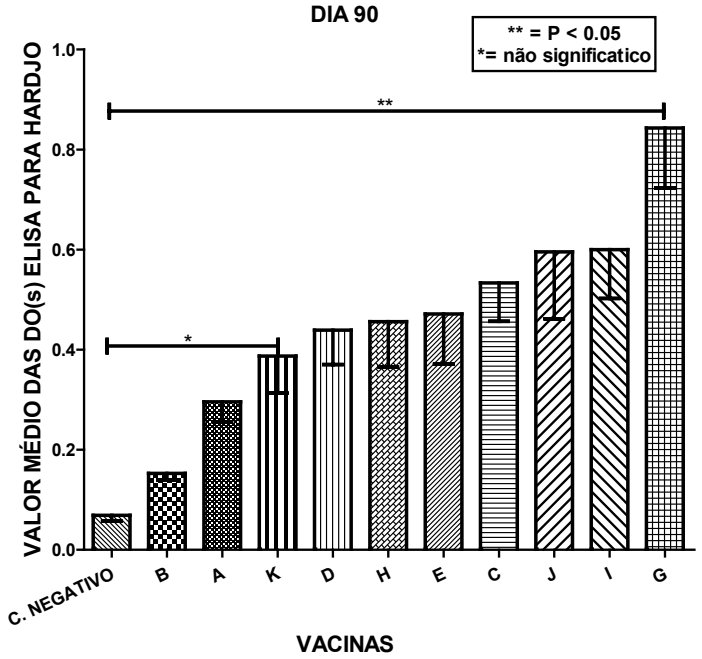


Gráfico 35 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo ELISA Amostra Hardjoprajitino.

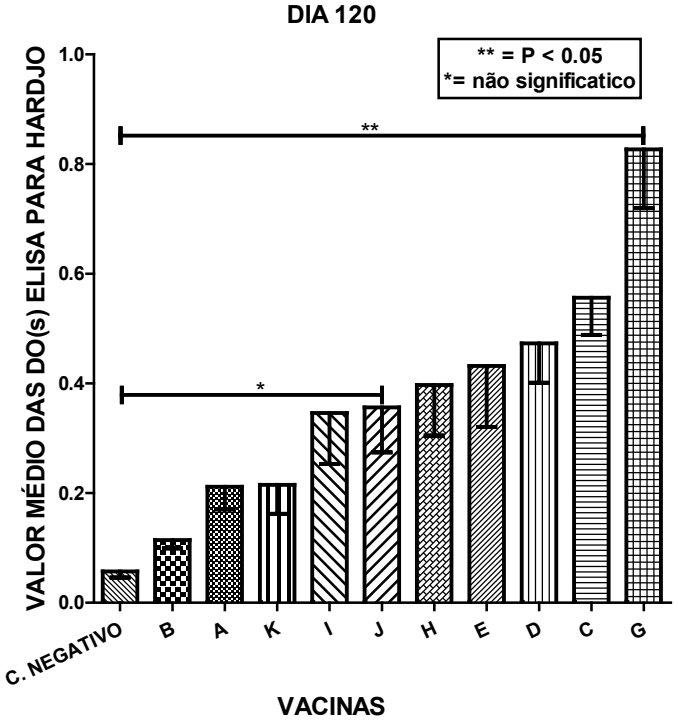


Gráfico 36 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo ELISA amostra Hardjoprajitino.

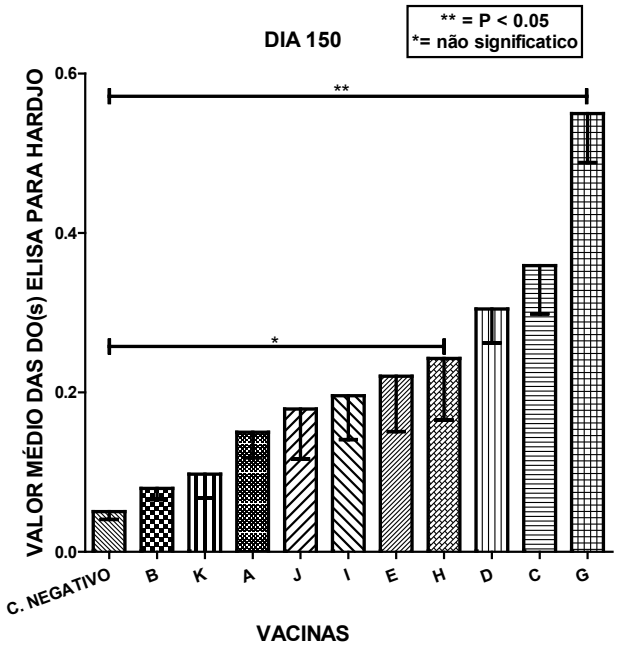


Gráfico 37 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 150 pelo ELISA amostra Hardjoprajitino.

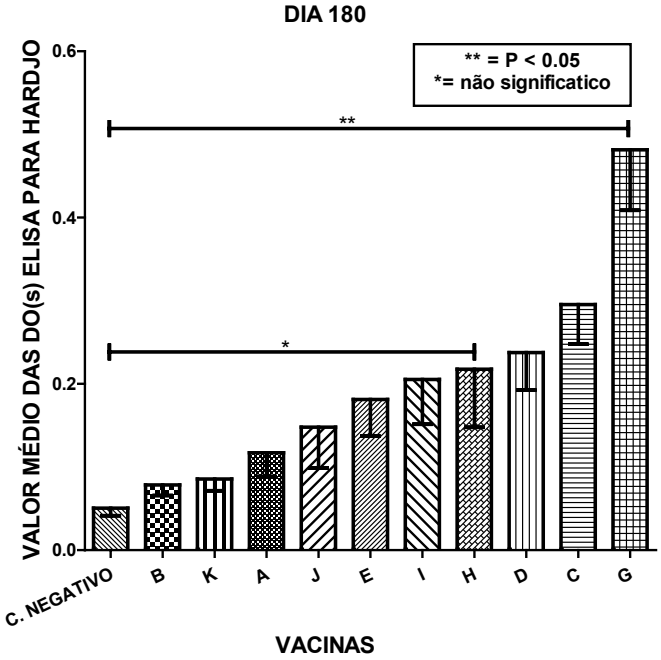


Gráfico 38 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 180 pelo ELISA amostra Hardjoprajitino.

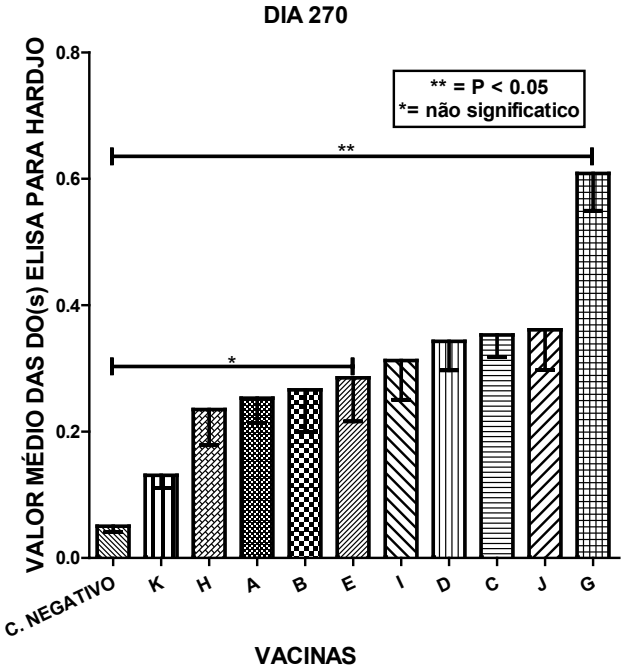


Gráfico 39 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo ELISA amostra Hardjoprajitino.

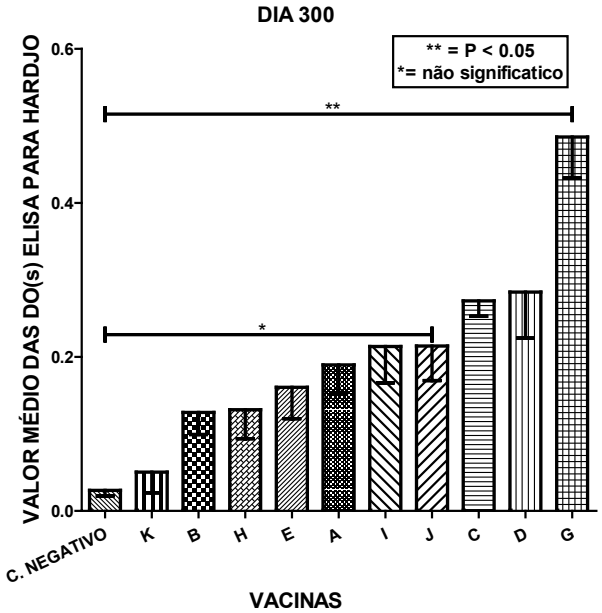


Gráfico 40 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 300 pelo ELISA amostra Hardjoprajitino.

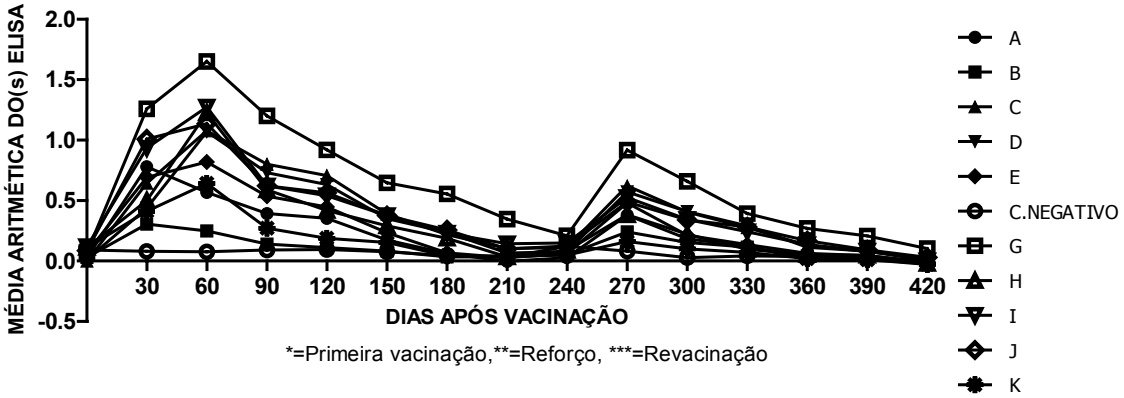


Gráfico 41 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos de todos os grupos.

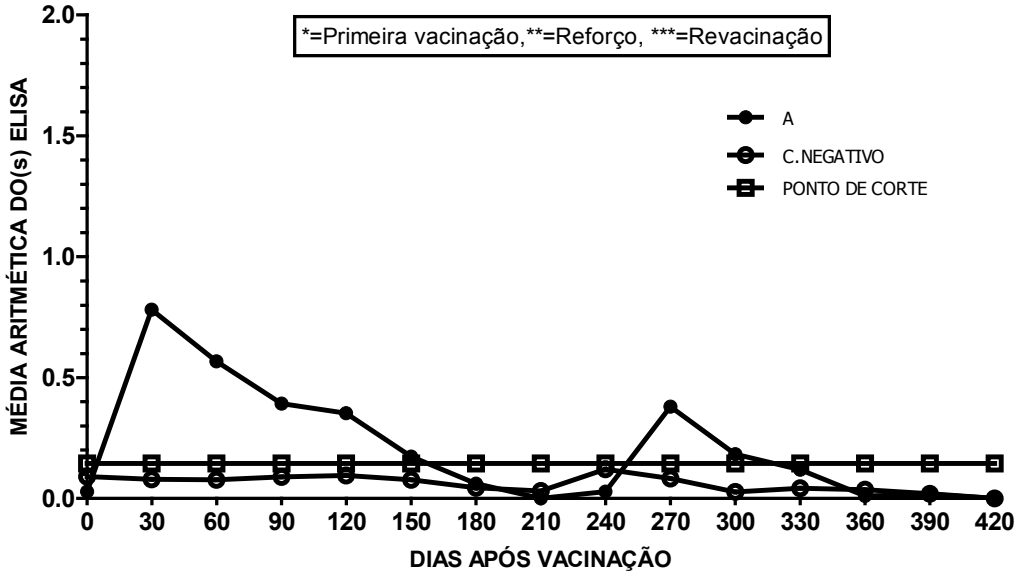


Gráfico 42 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo A.

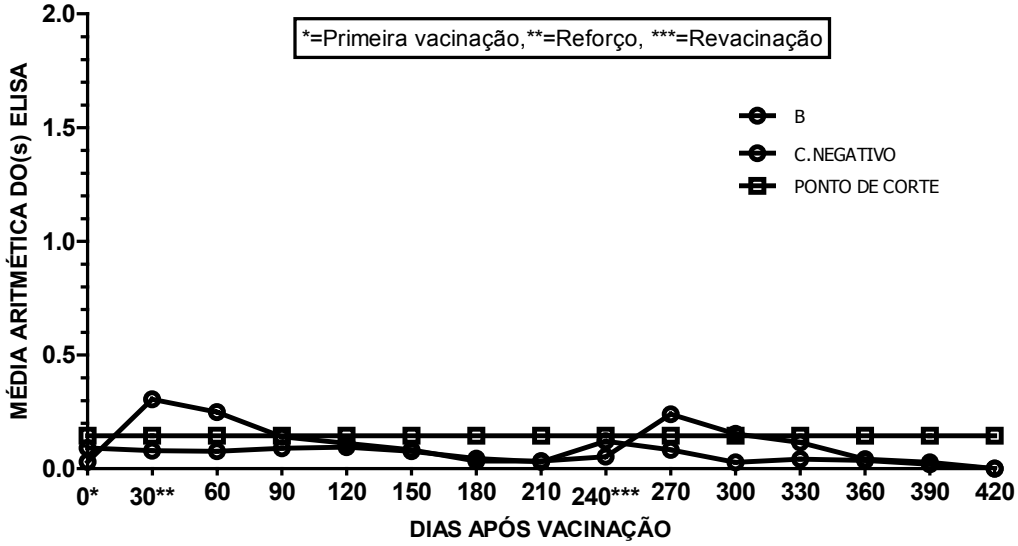


Gráfico 43 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo B.

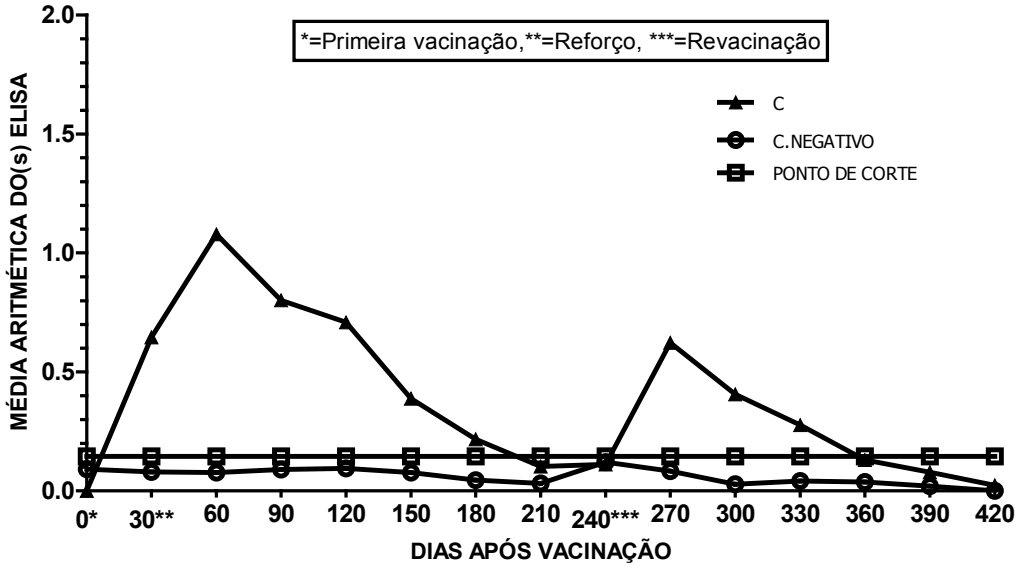


Gráfico 44 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo C.

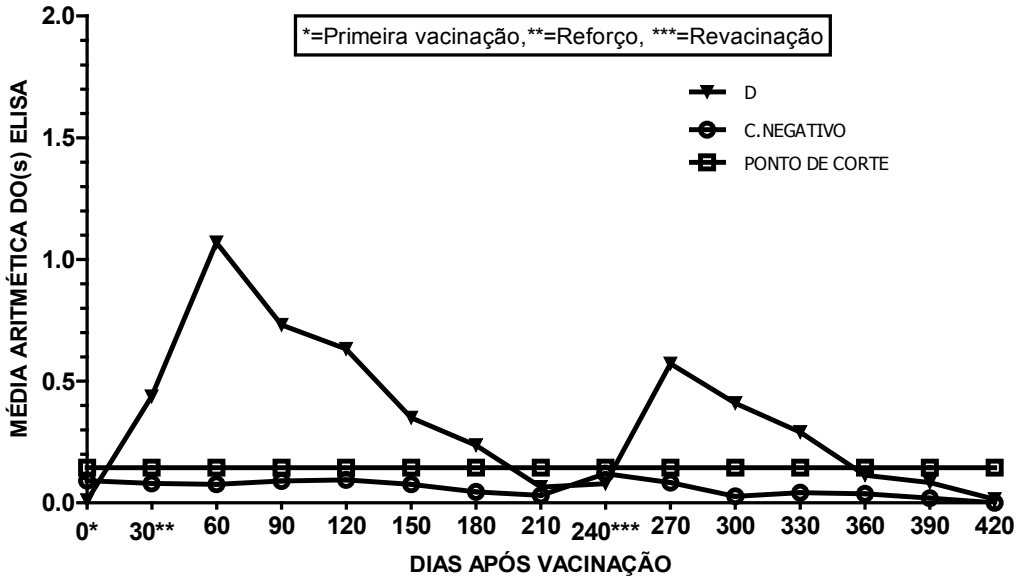


Gráfico 45 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo D.

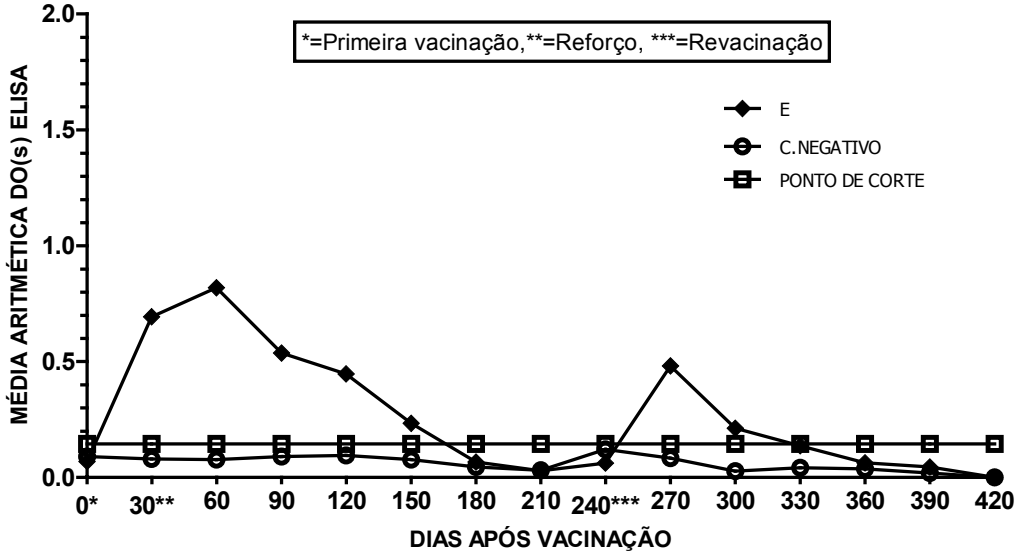


Gráfico 46 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo E.

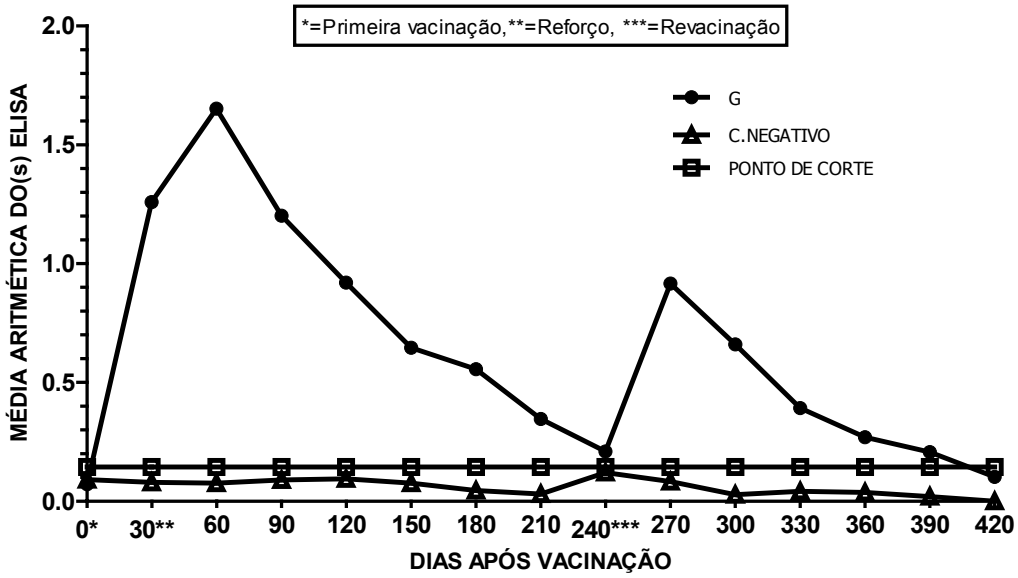


Gráfico 47 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo G.

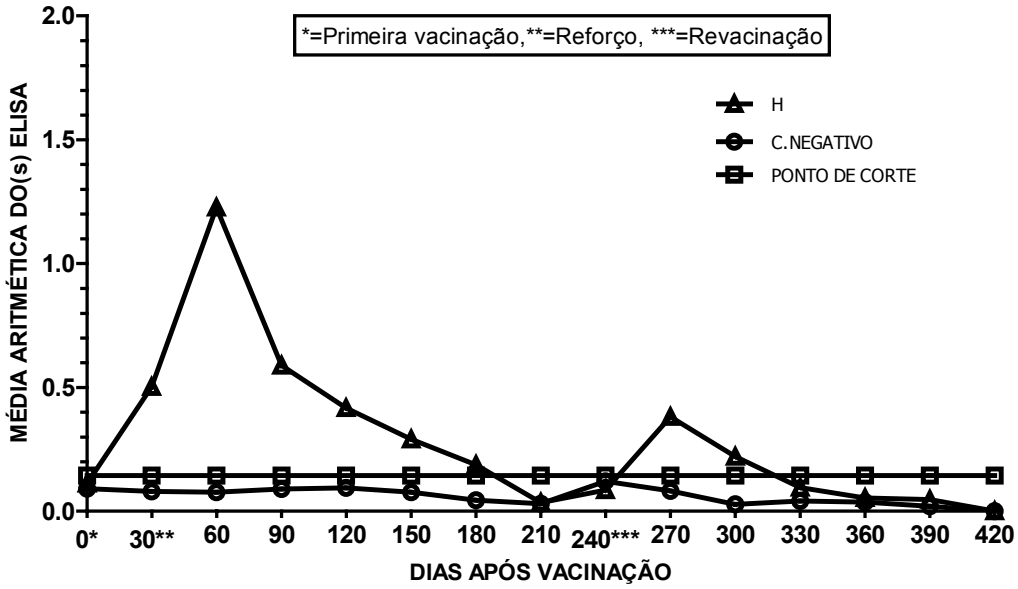


Gráfico 48 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo H.

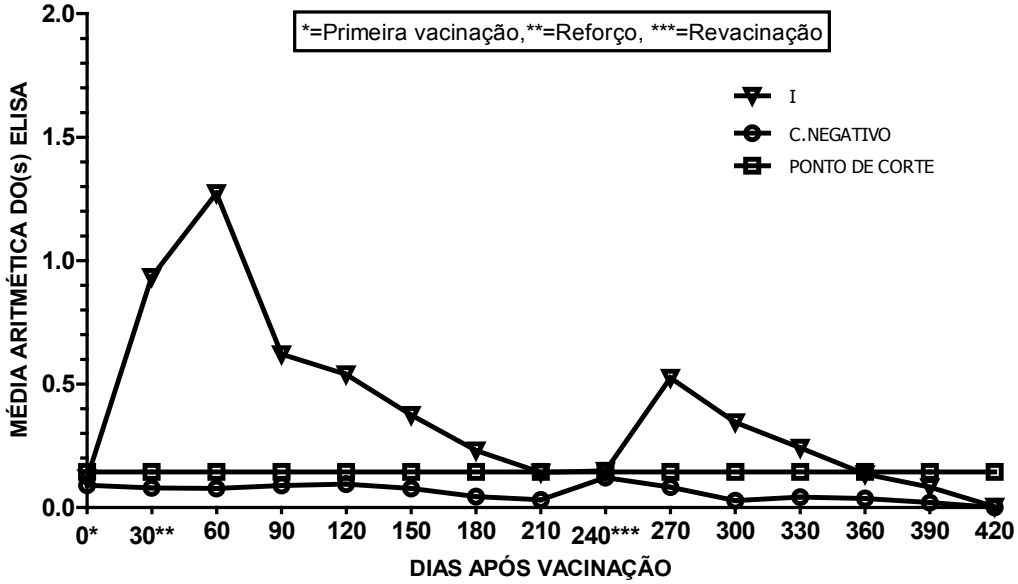


Gráfico 49 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo I.

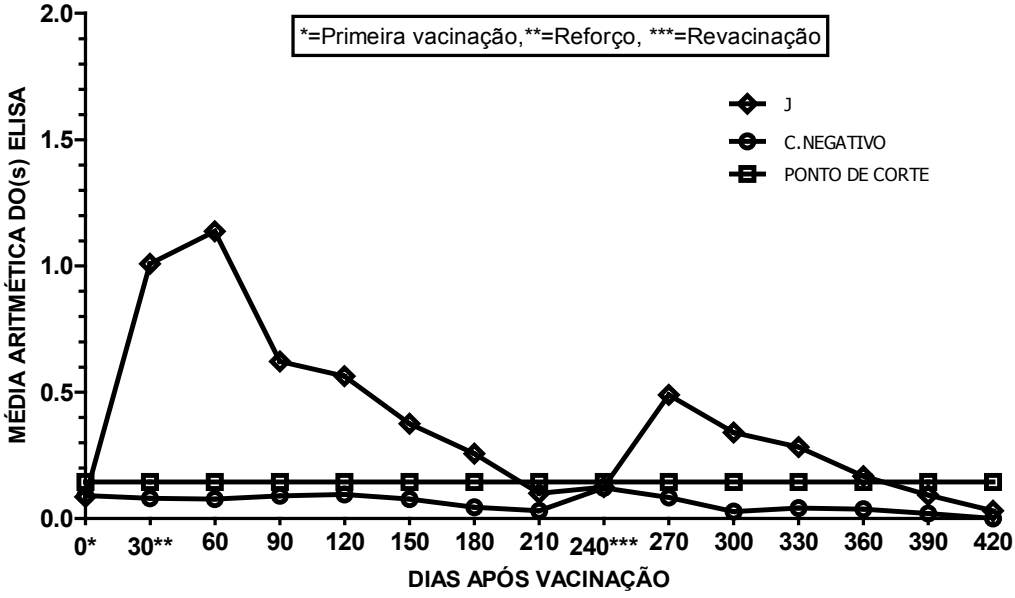


Gráfico 50 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo J.

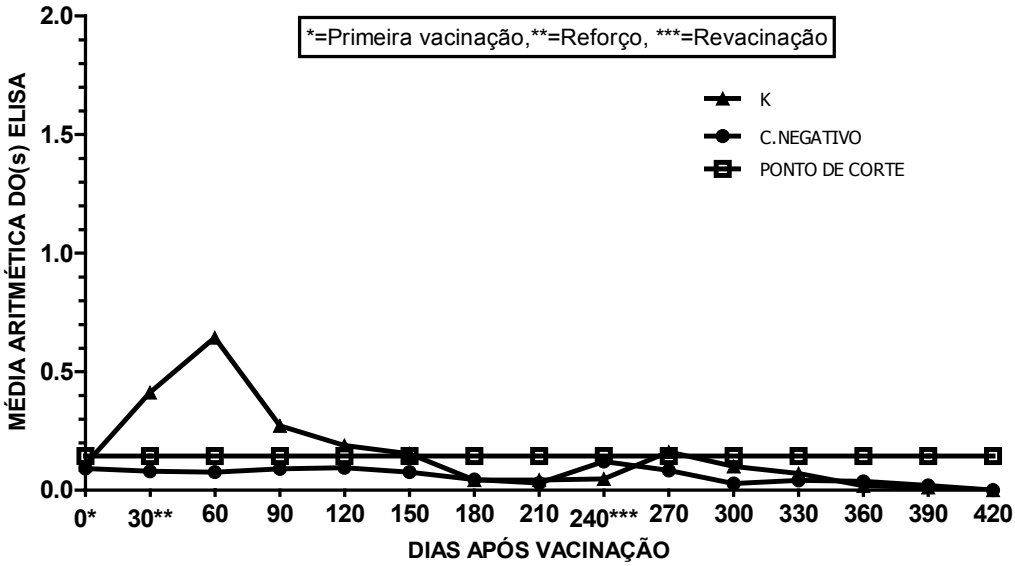


Gráfico 51 : Níveis de IgG determinados pelo ELISA com a amostra Hardjobovis após a vacinação em bovinos do grupo K.

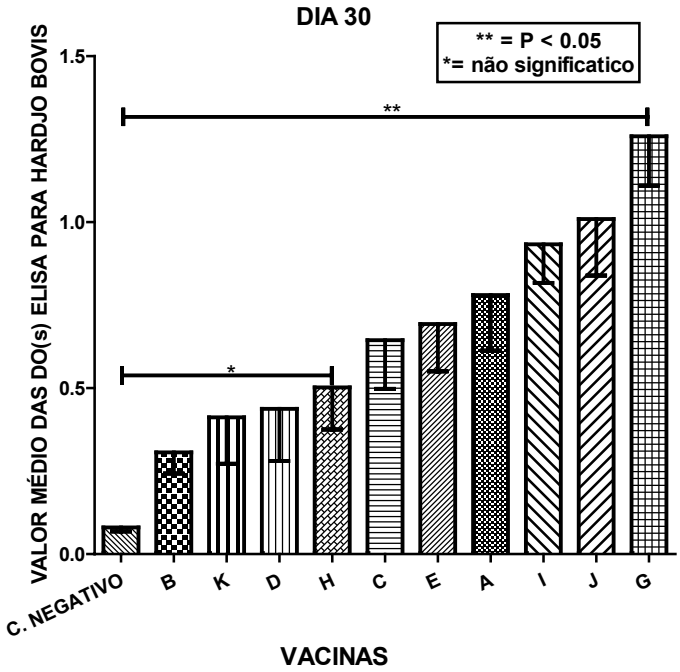


Gráfico 52 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo ELISA amostra Hardjobovis.

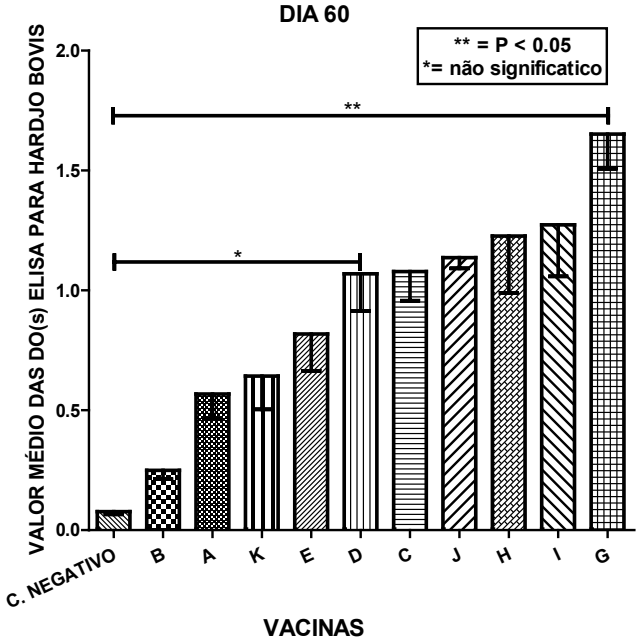


Gráfico 53 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo ELISA amostra Hardjobovis.

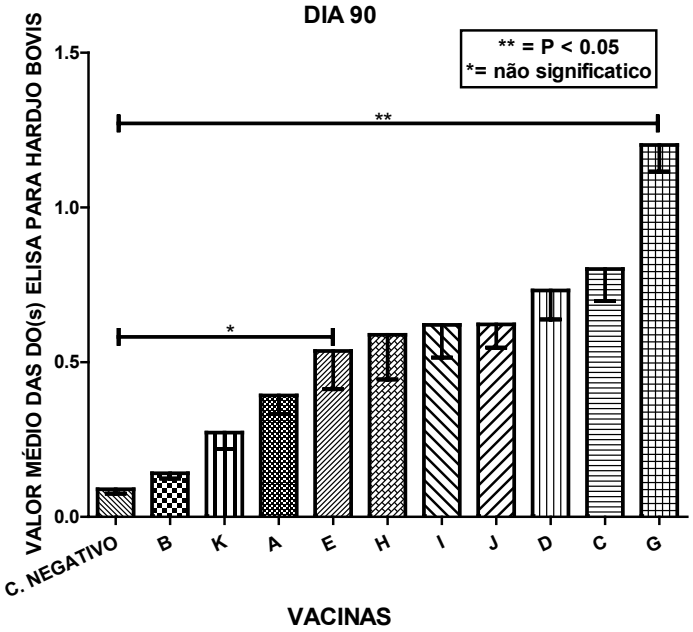


Gráfico 54 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo ELISA amostra Hardjobovis.

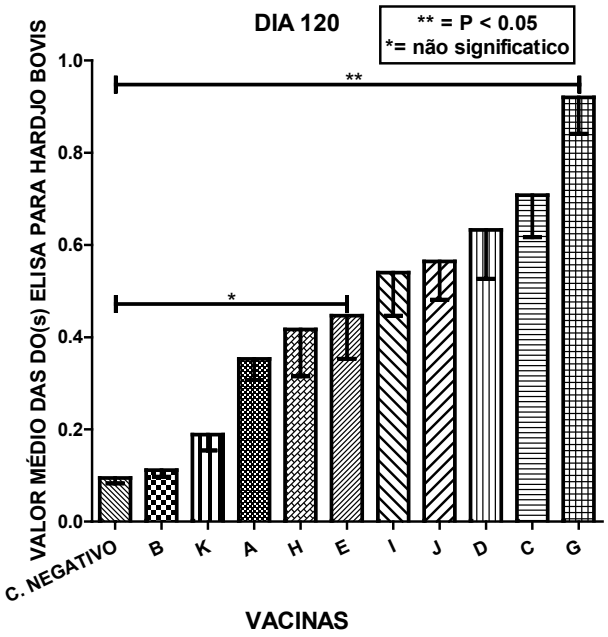


Gráfico 55 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo ELISA amostra Hardjobovis.

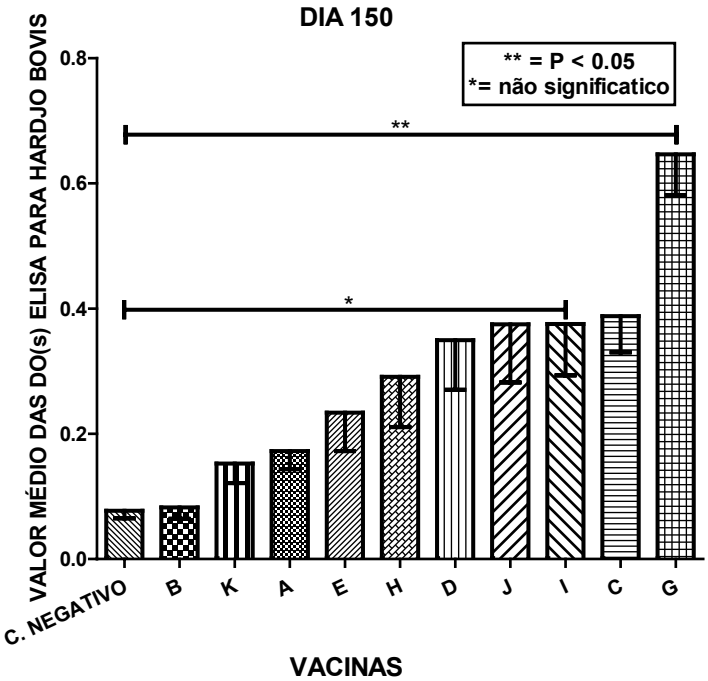


Gráfico 56 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 150 pelo ELISA amostra Hardjobovis.

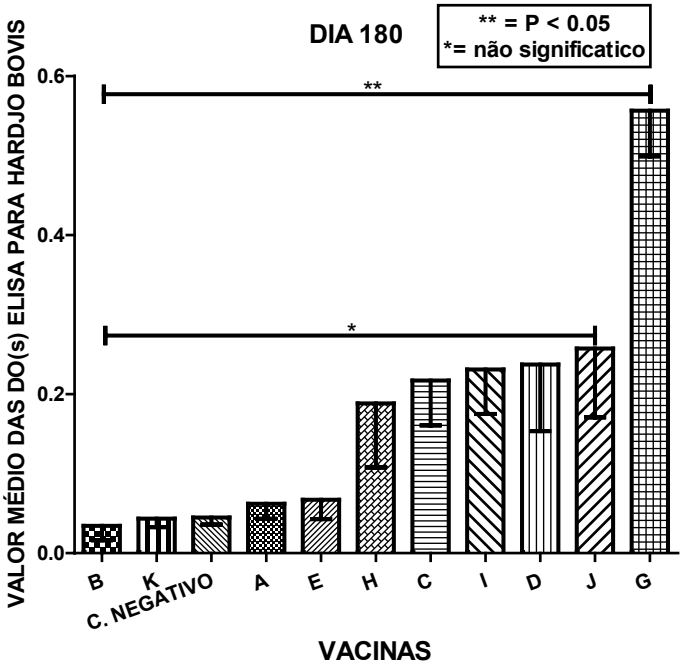


Gráfico 57 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 180 pelo ELISA amostra Hardjobovis.

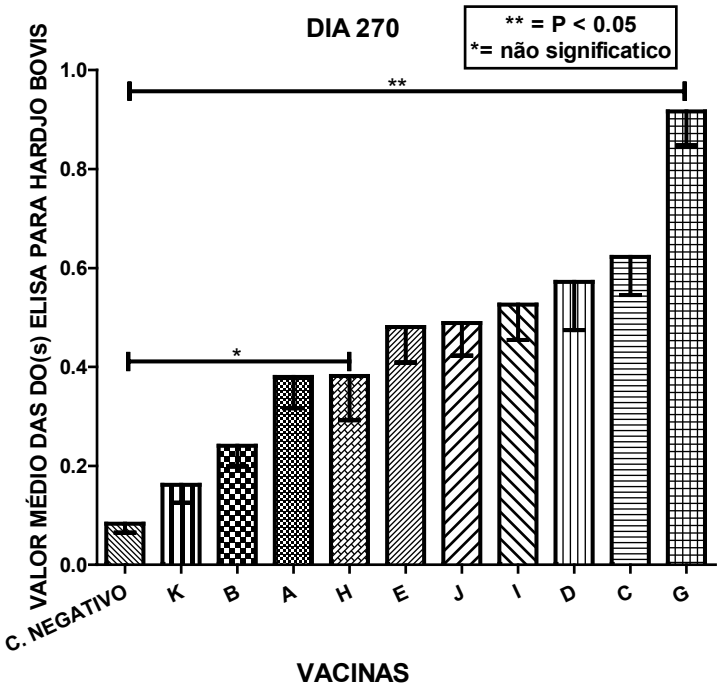


Gráfico 58 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo ELISA amostra Hardjobovis.

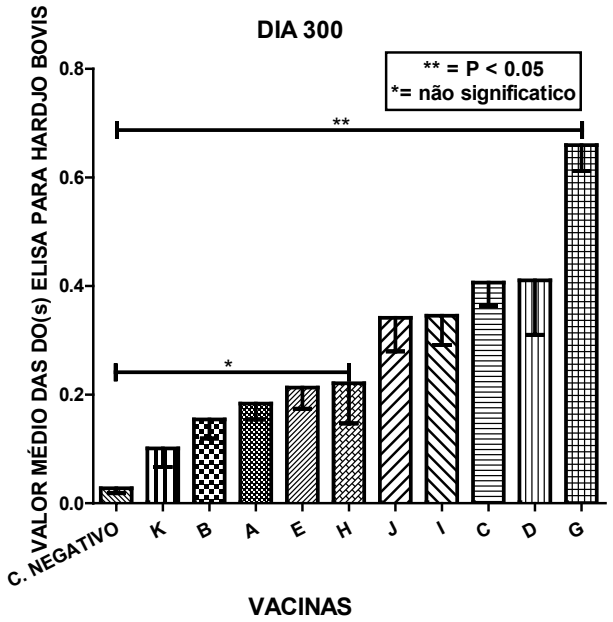
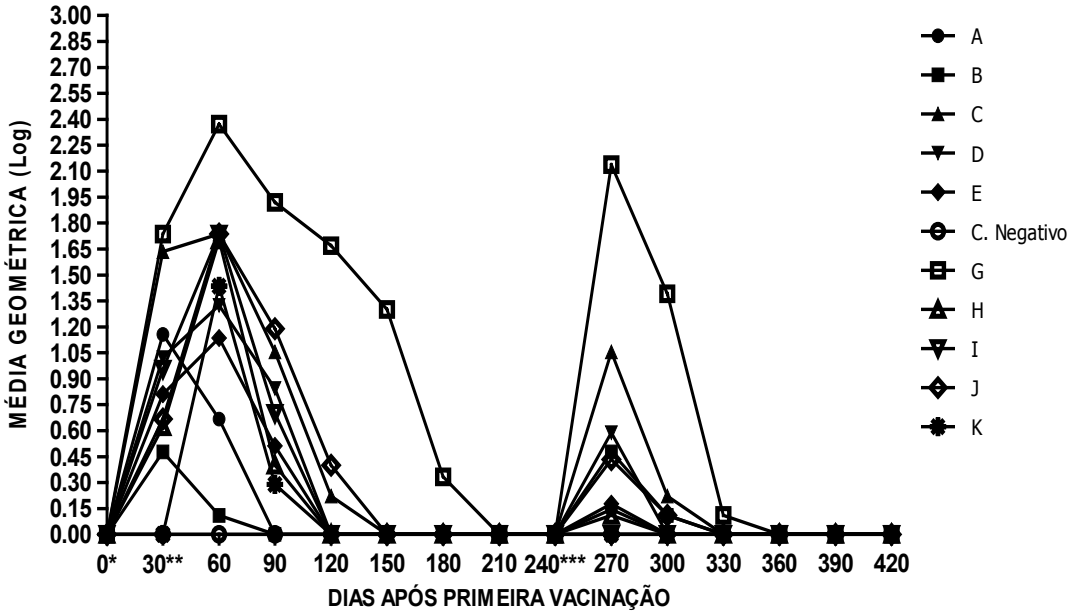


Gráfico 59 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 300 pelo ELISA amostra Hardjobovis.



(*=Primeira vacinação, **=Reforço, ***=Revacinação)

Gráfico 60 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos de todos os grupos.

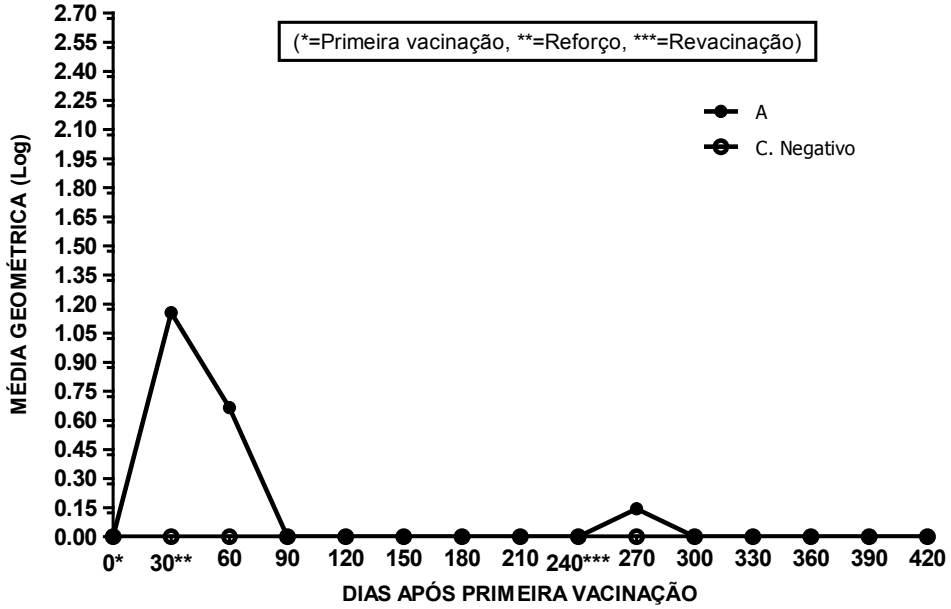


Gráfico 61 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo A.

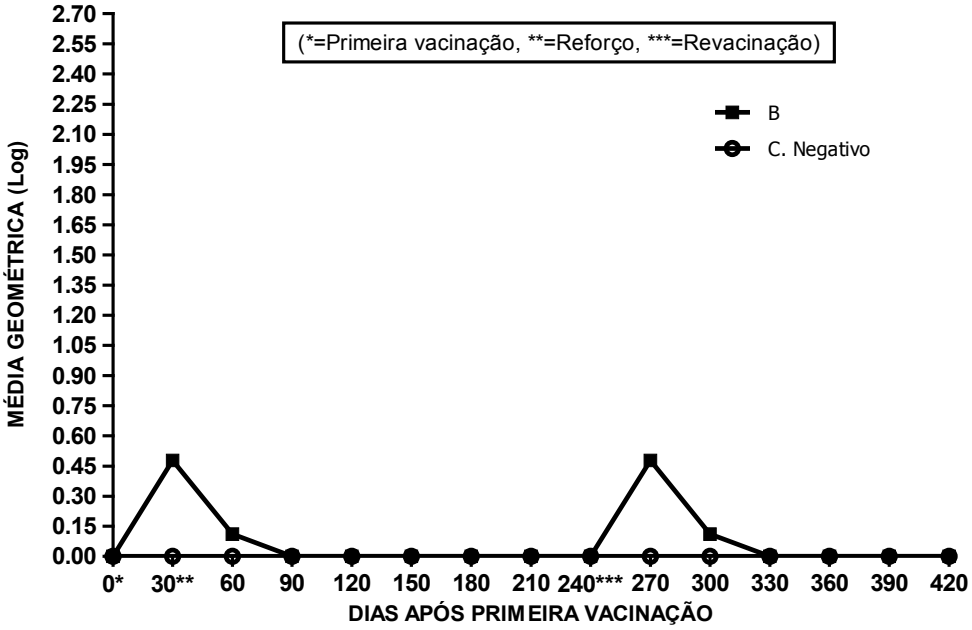


Gráfico 62 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo B.

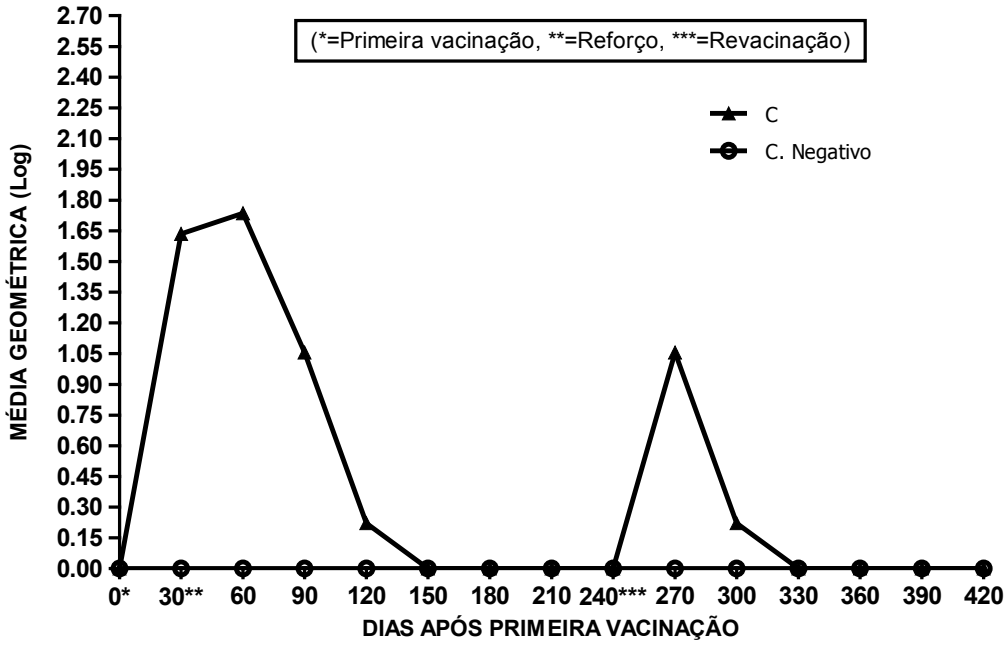


Gráfico 63 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo C.

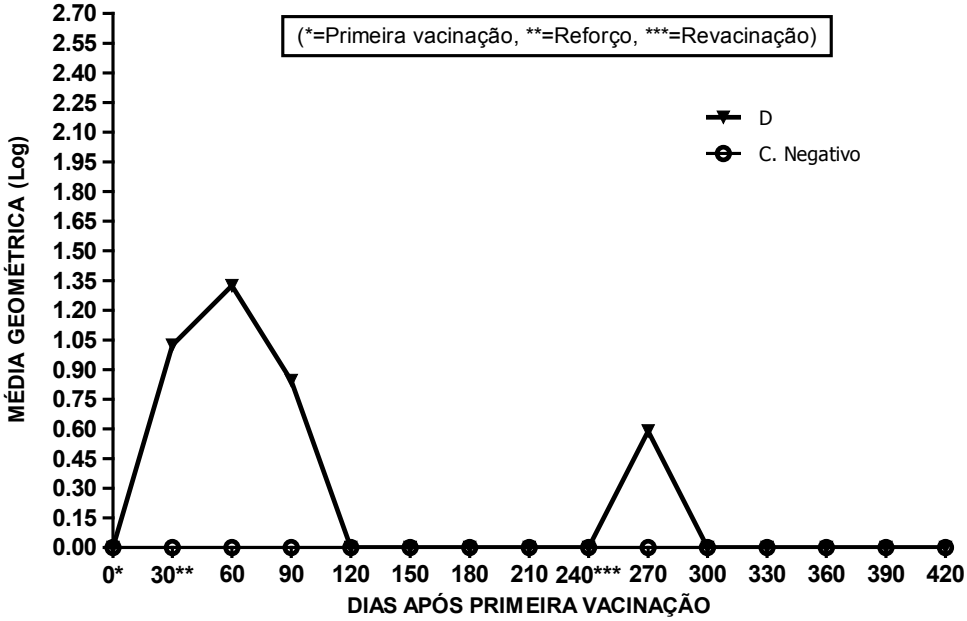


Gráfico 64 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo D.

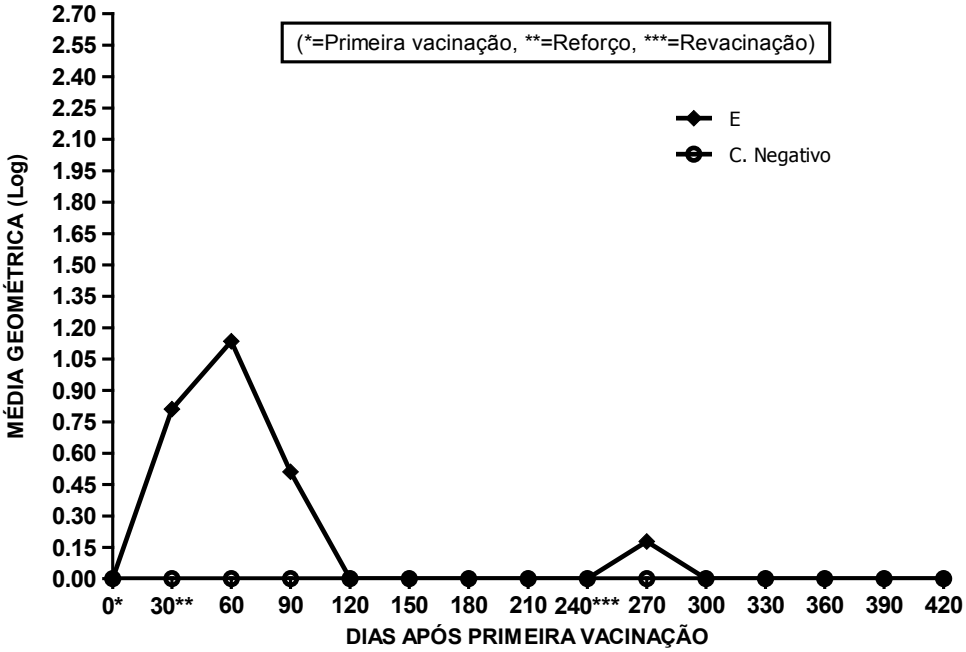


Gráfico 65 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo E.

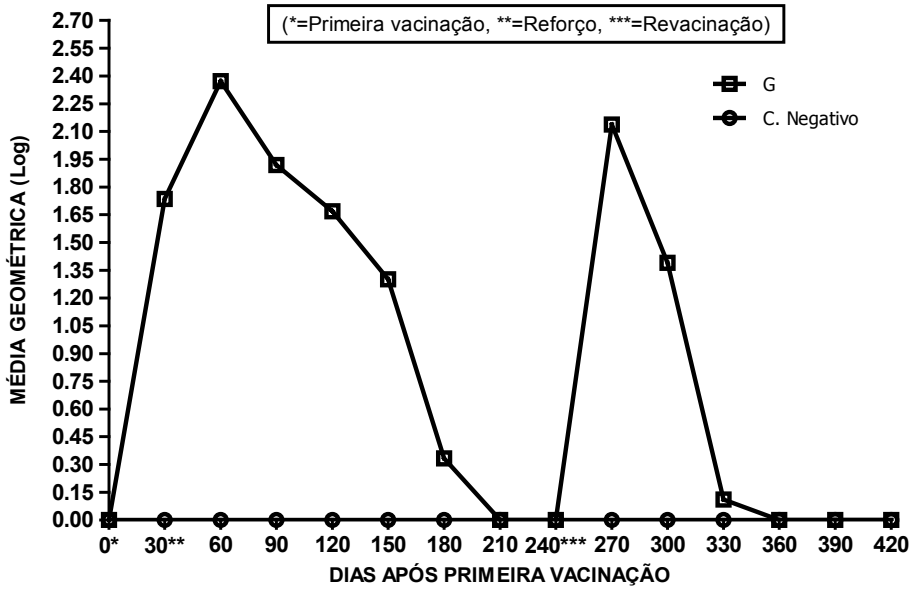


Gráfico 66 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo G.

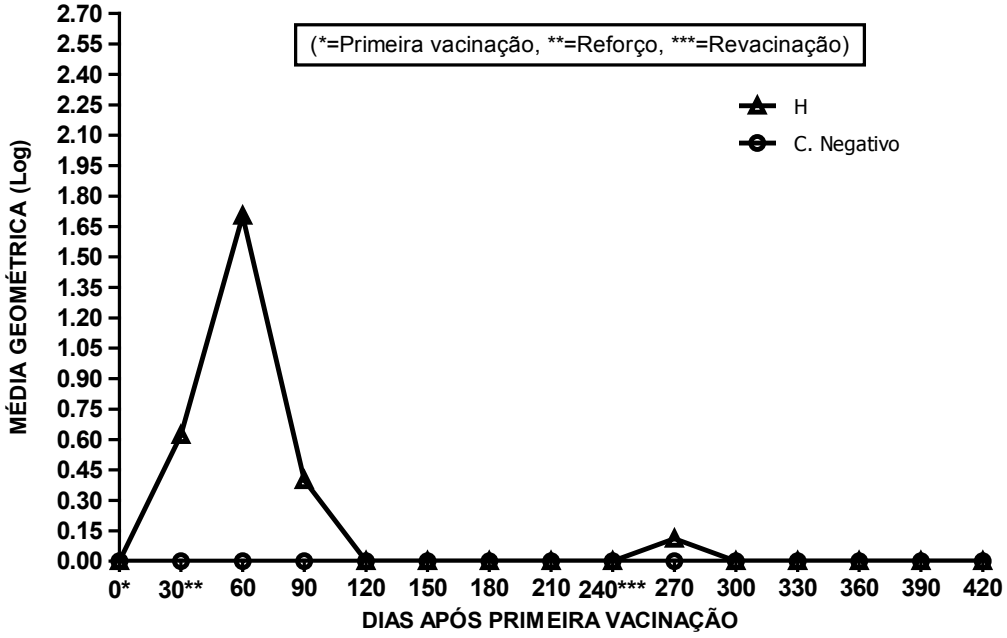


Gráfico 67 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo H.

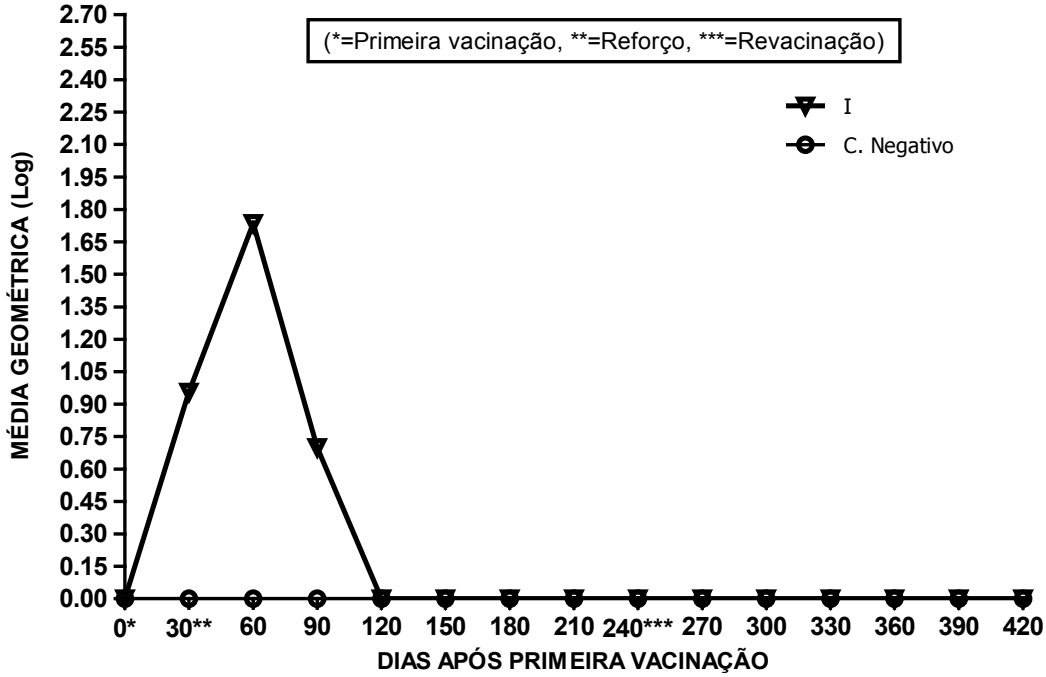


Gráfico 68 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo I.

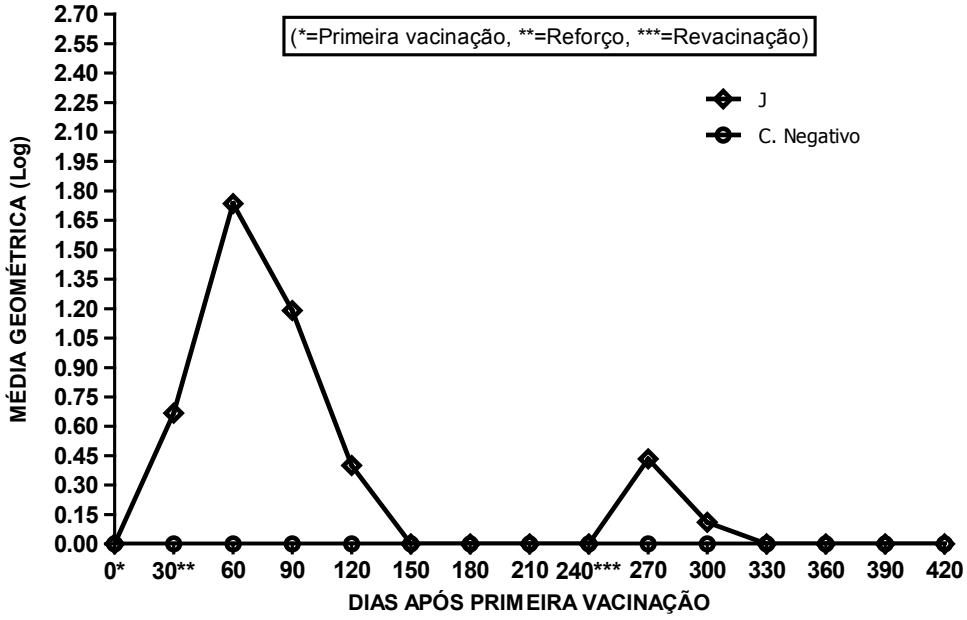


Gráfico 69 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo J.

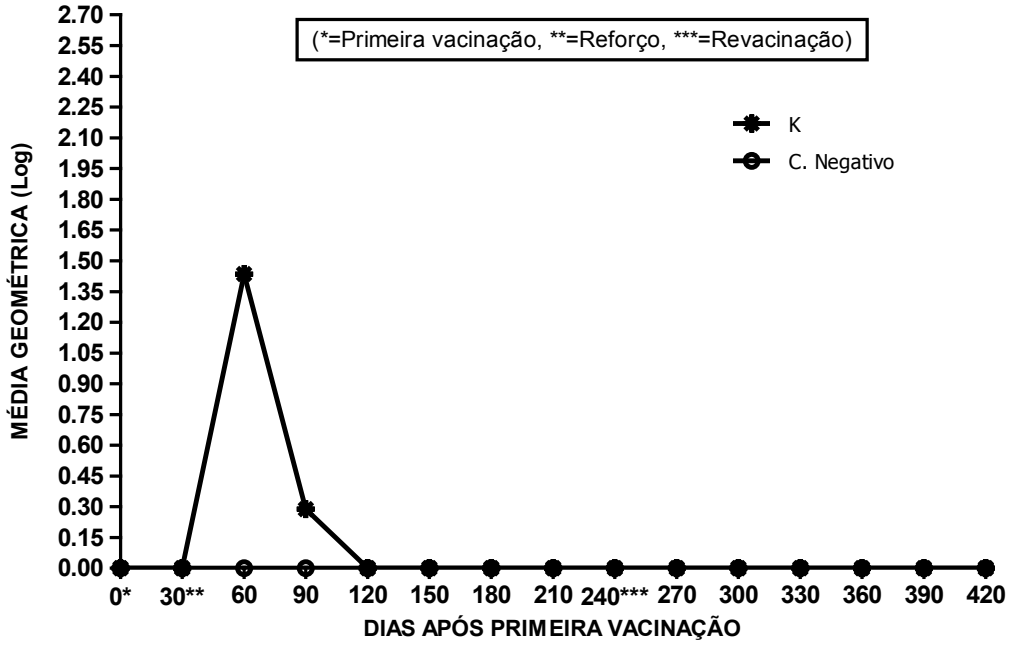


Gráfico 70 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjo amostra Norma detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo K.

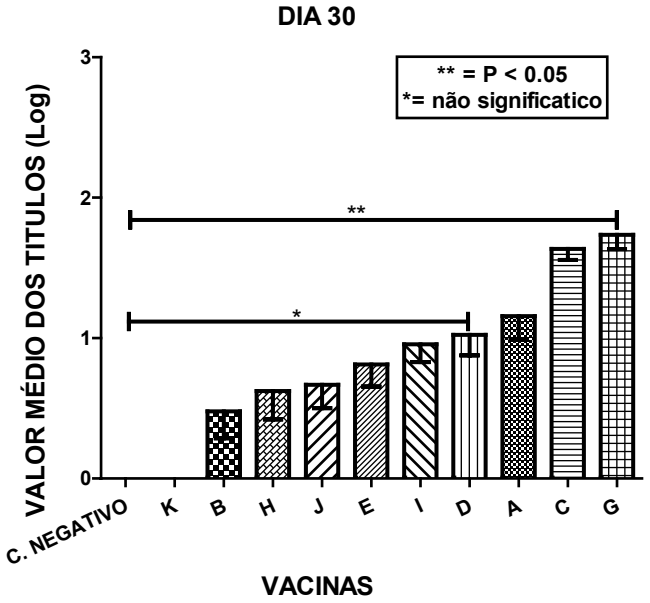


Gráfico 71 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo teste de microaglutinação com a amostra Norma.

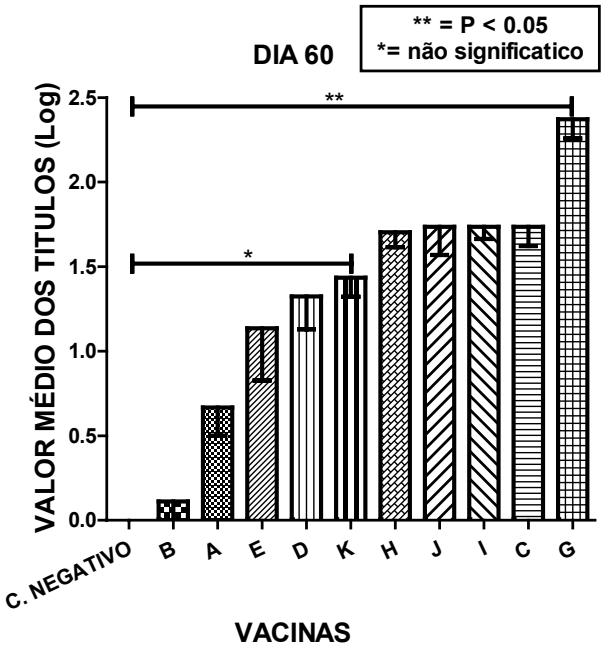


Gráfico 72 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo teste de microaglutinação com a amostra Norma.

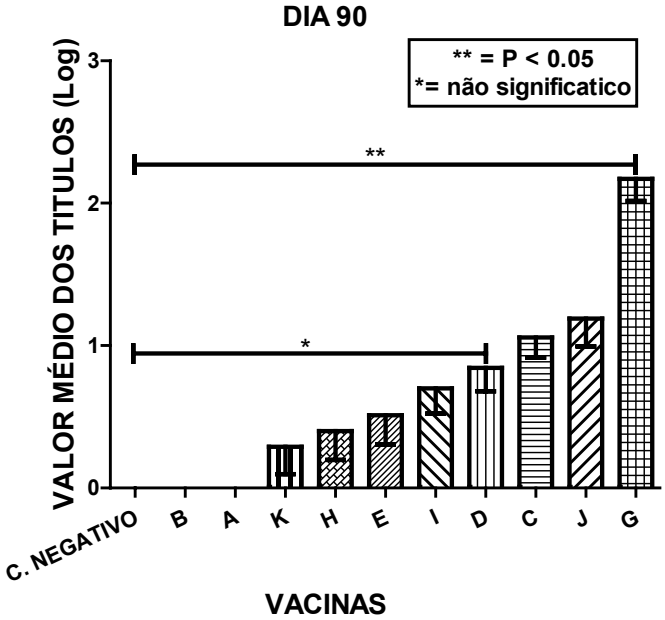


Gráfico 73 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo teste de microaglutinação com a amostra Norma.

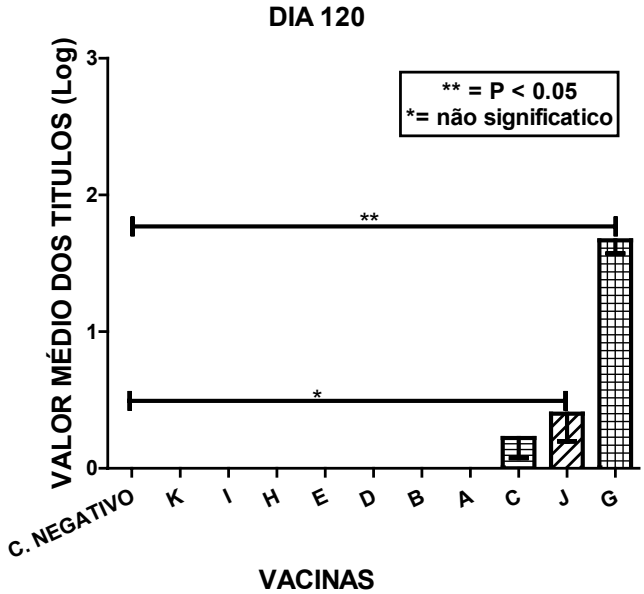


Gráfico 74 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo teste de microaglutinação com a amostra Norma.

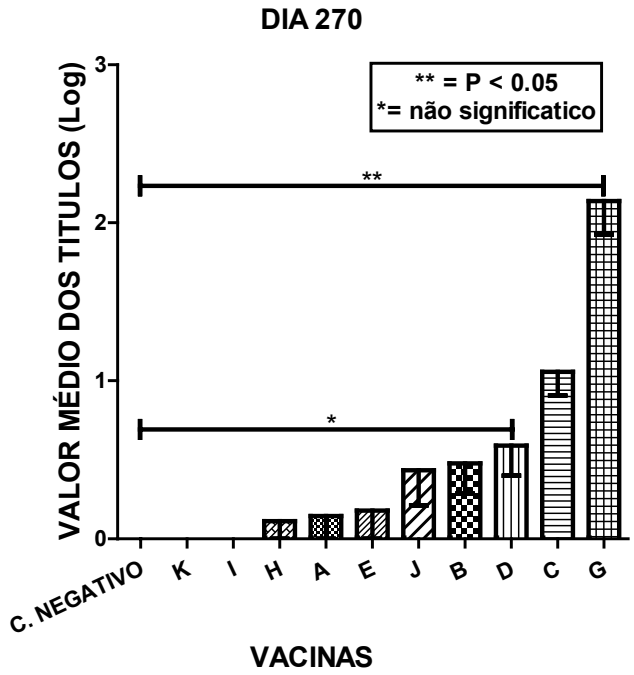
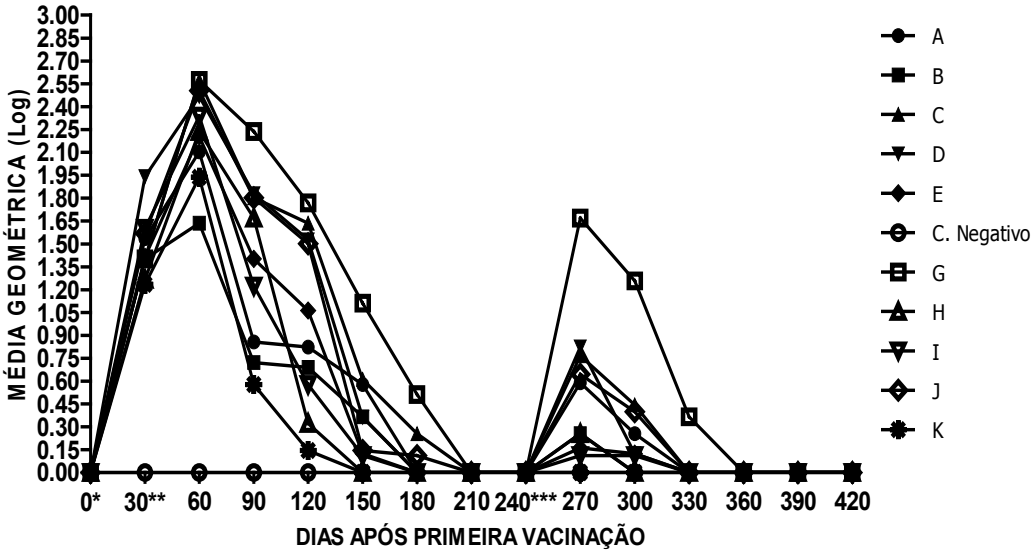


Gráfico 75 : Comparação de médias pelo Teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo teste de microaglutinação com a amostra Norma.



(*=Primeira vacinação,**=Reforço, ***=Revacinação)

Gráfico 76 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos de todos os grupos.

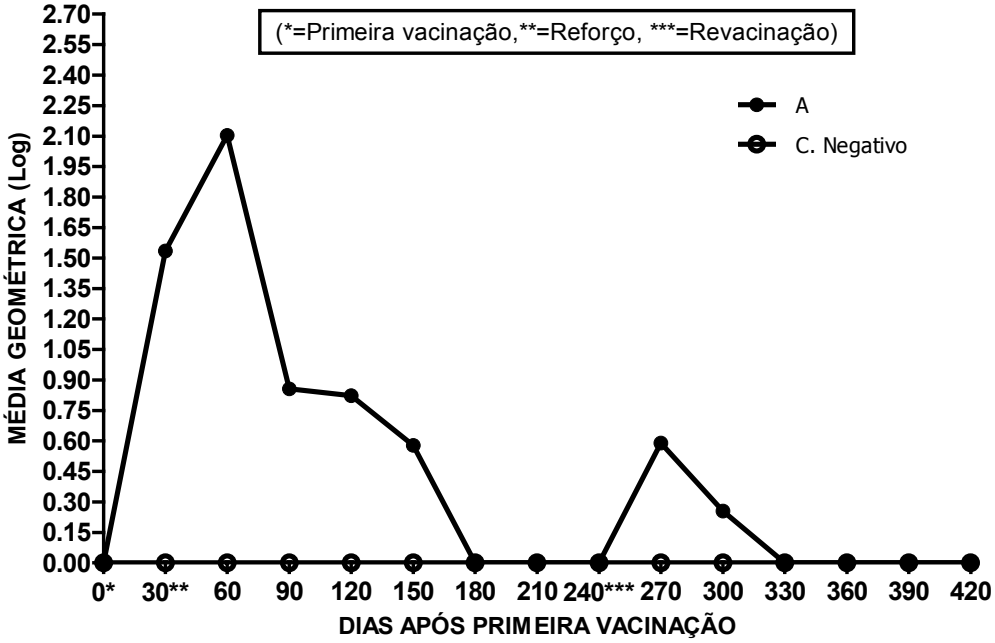


Gráfico 77 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo A.

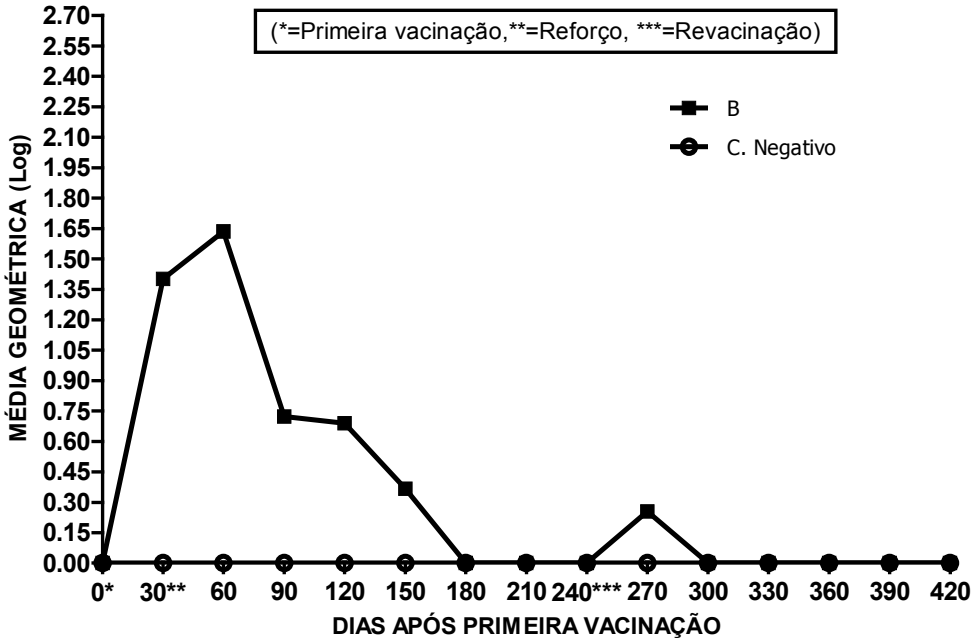


Gráfico 78 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo B.

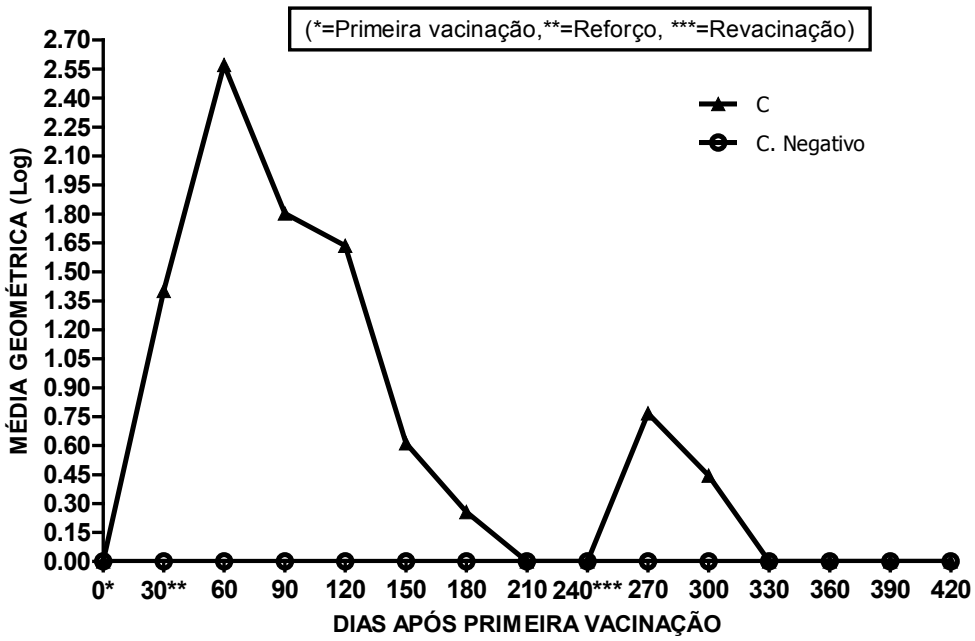


Gráfico 79 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo C.

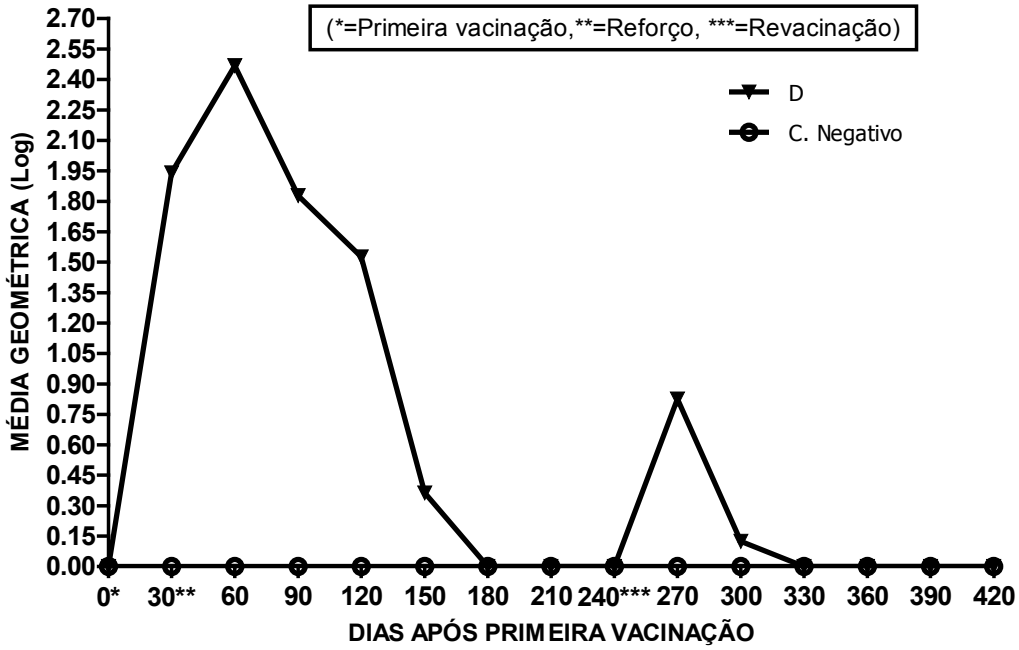


Gráfico 80 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo D.

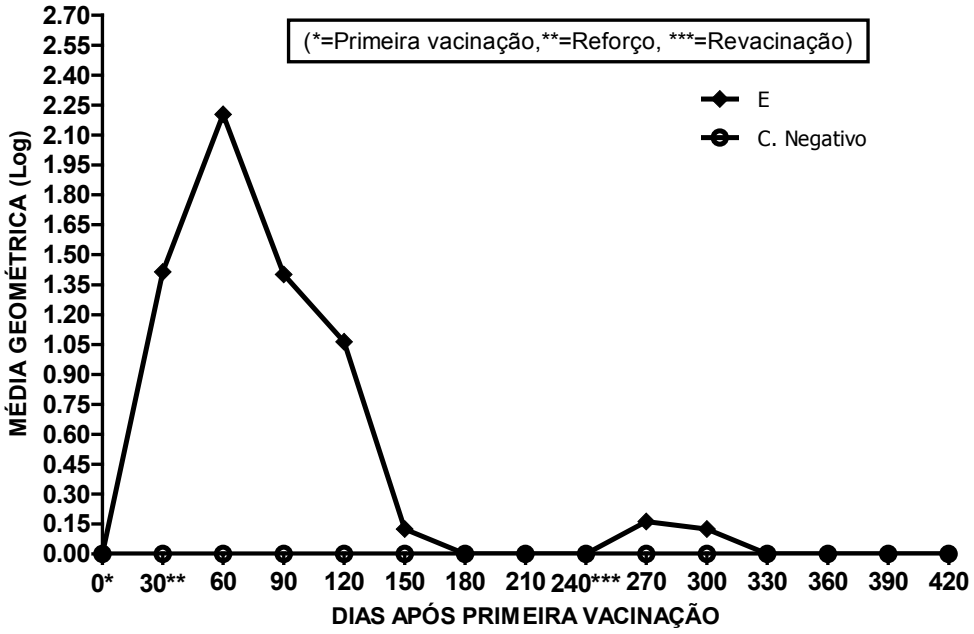


Gráfico 81 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo E.

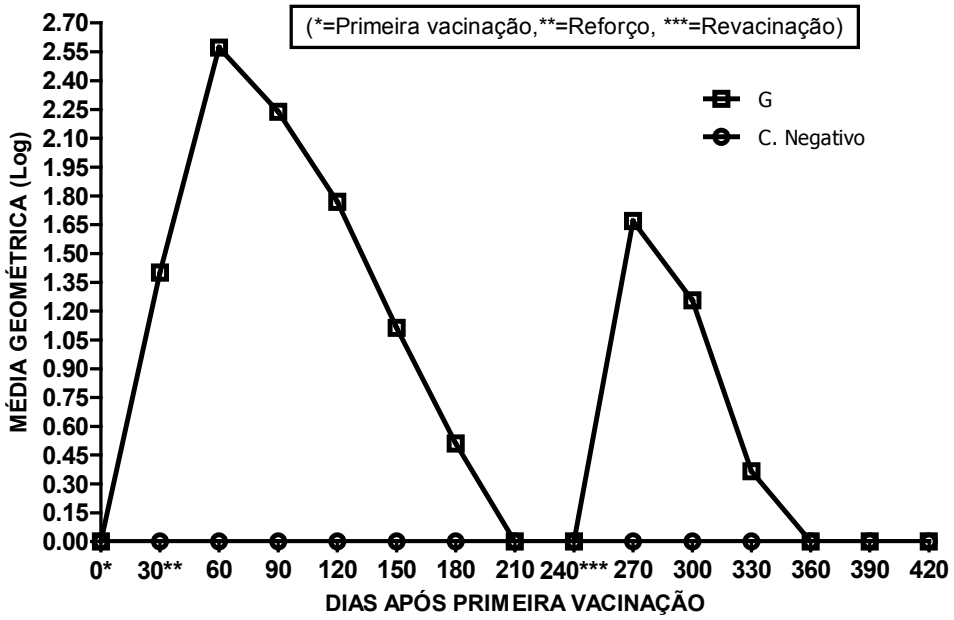


Gráfico 82 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo G.

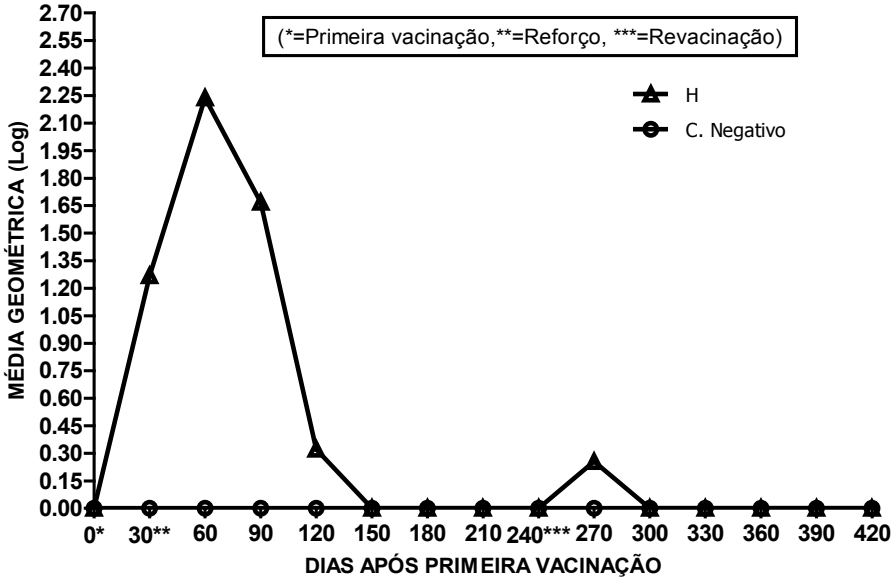


Gráfico 83 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo H.

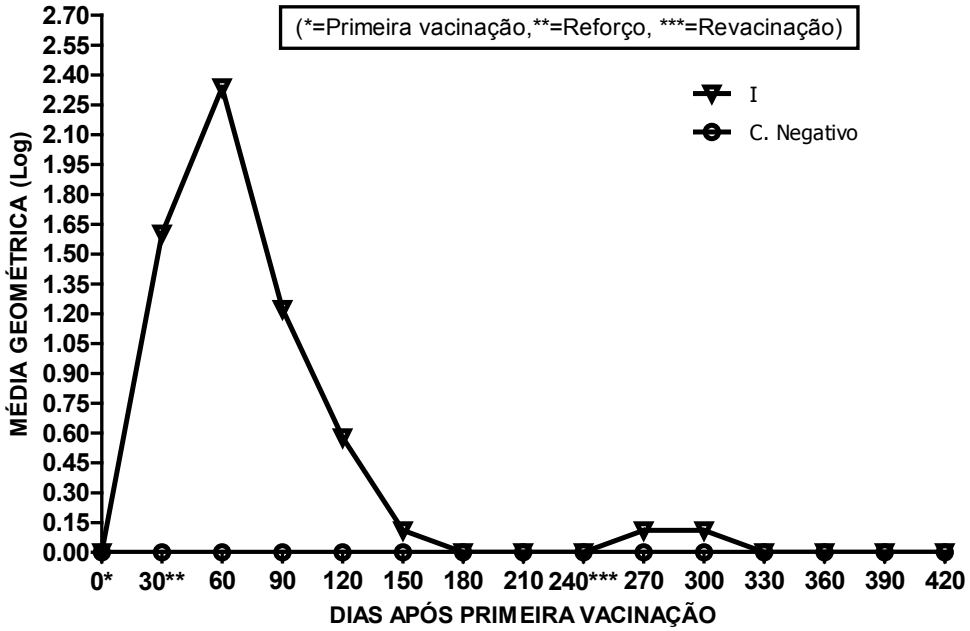


Gráfico 84 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo I.

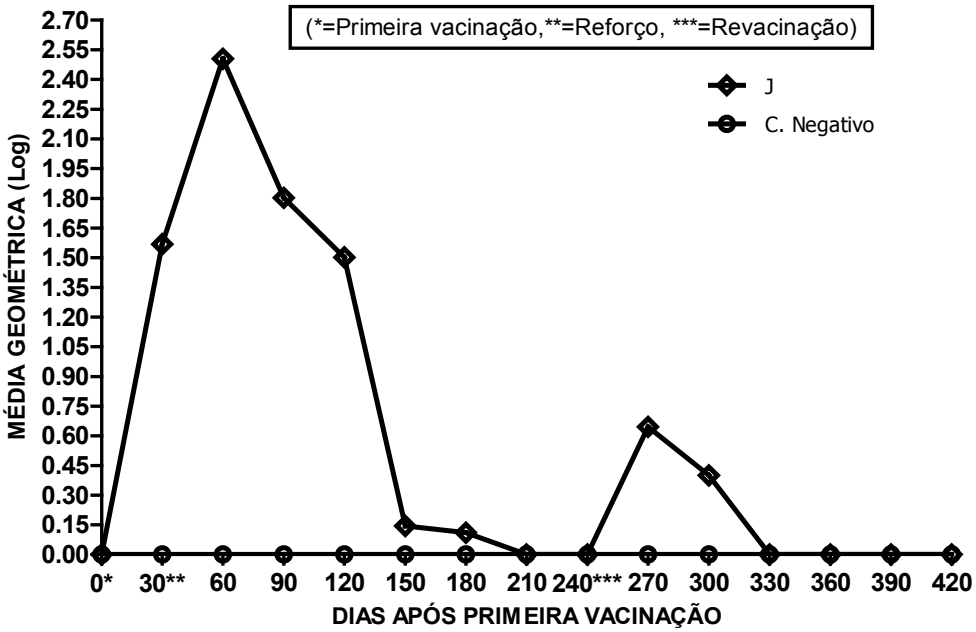


Gráfico 85 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo J.

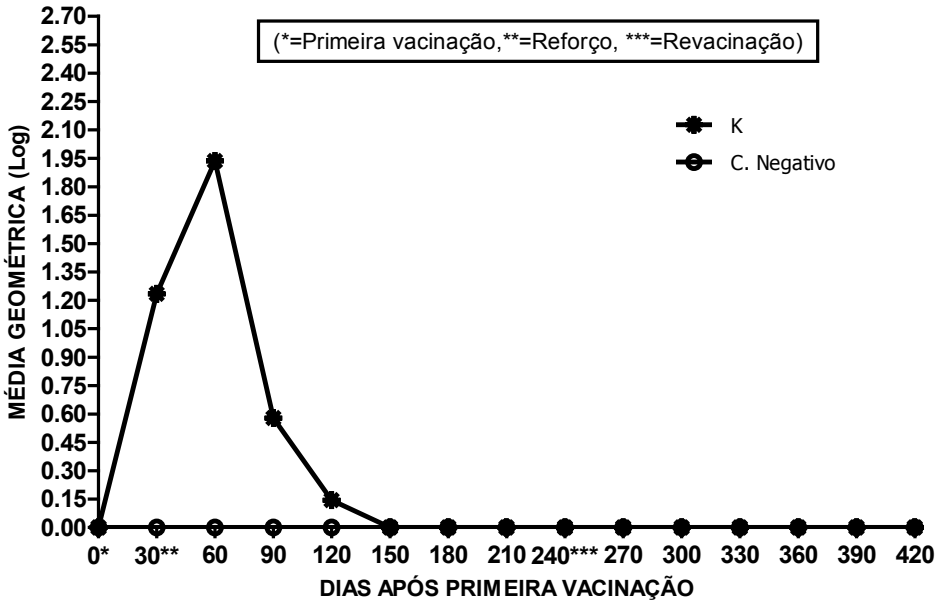


Gráfico 86 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjoprajitino detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo K.

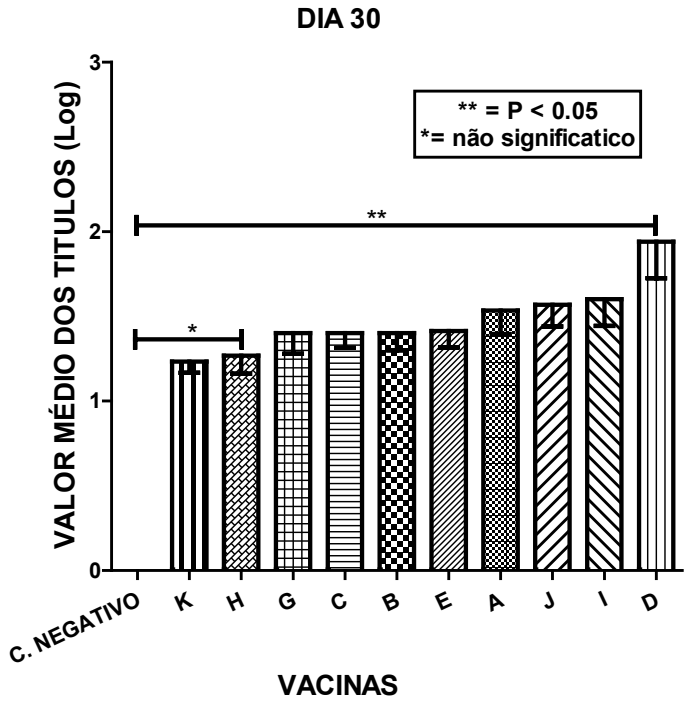


Gráfico 87 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjo.

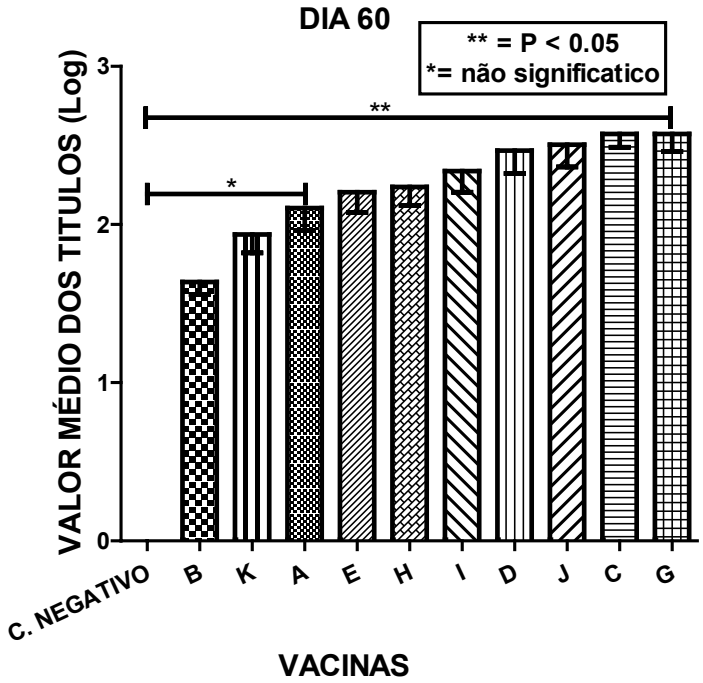


Gráfico 88 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjo.

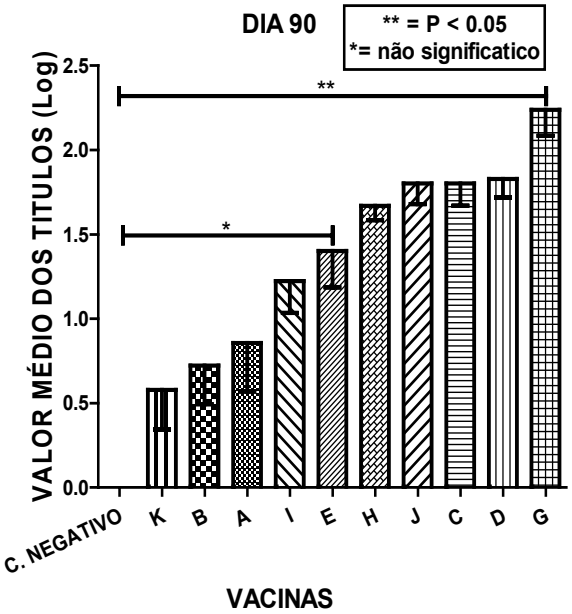


Gráfico 89 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjo.

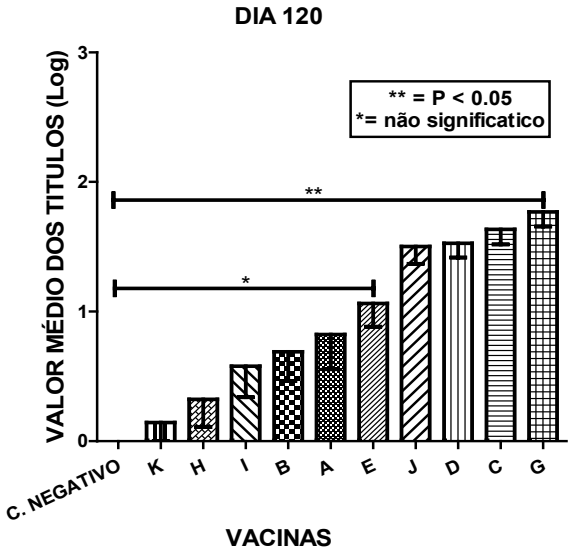


Gráfico 90 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjo.

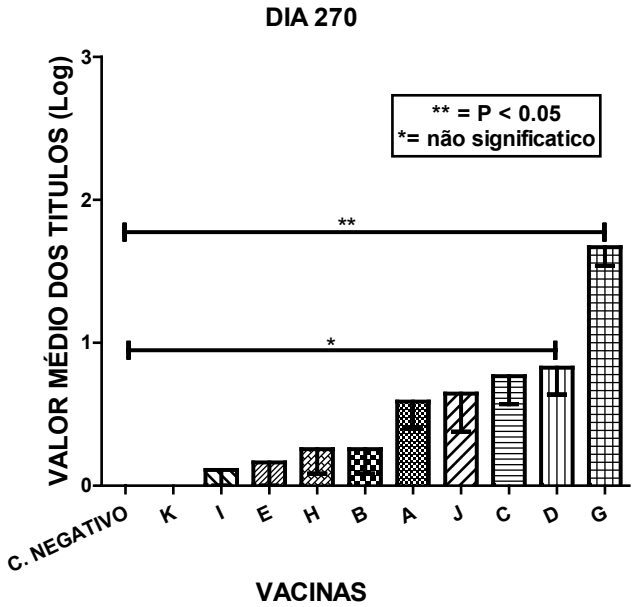
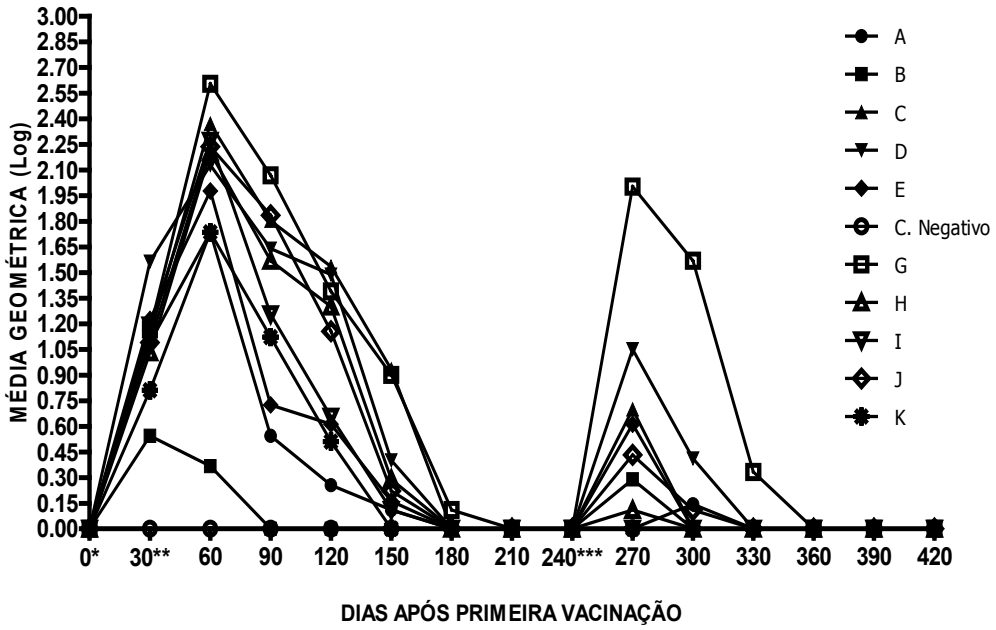


Gráfico 91 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjo.



(*=Primeira Vacinação, **=Reforço, ***=Revacinação)

Gráfico 92 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos de todos os grupos.

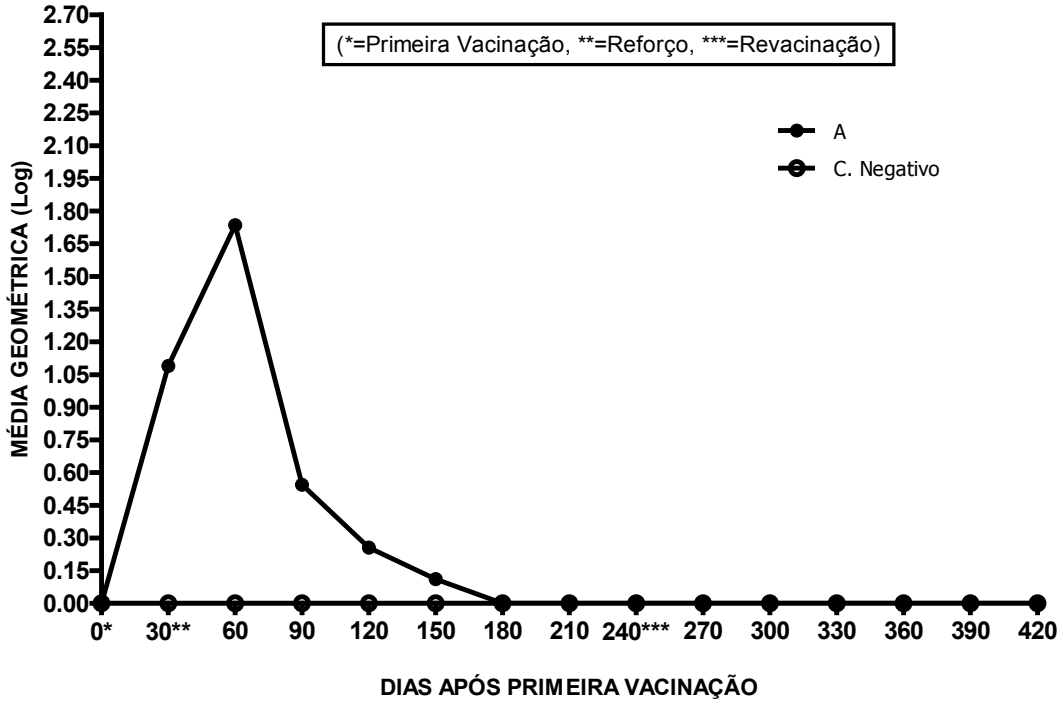


Gráfico 93 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo A.

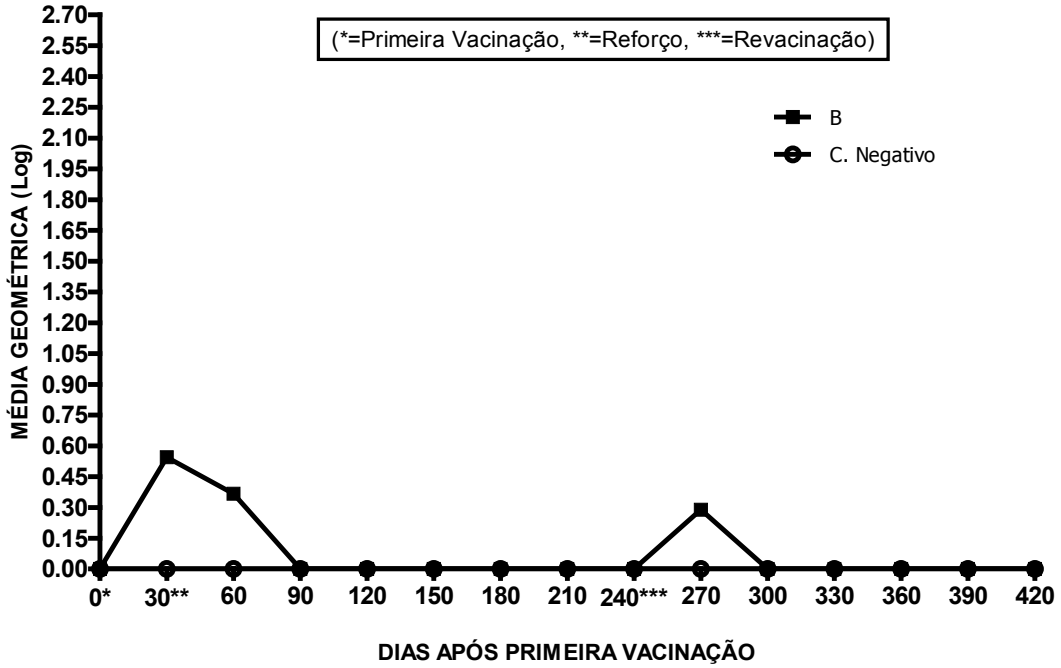


Gráfico 94 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo B.

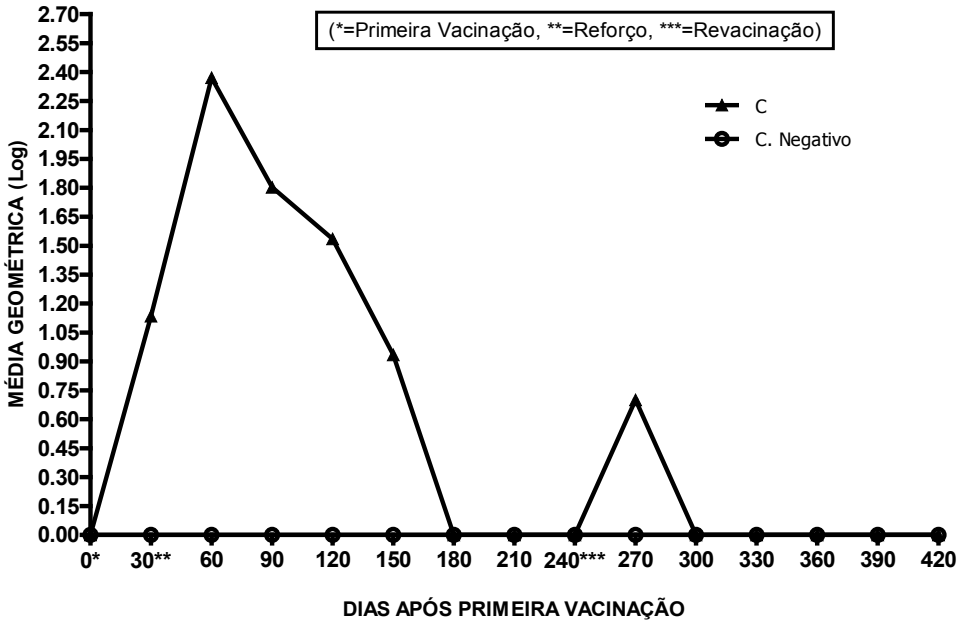


Gráfico 95 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo C.

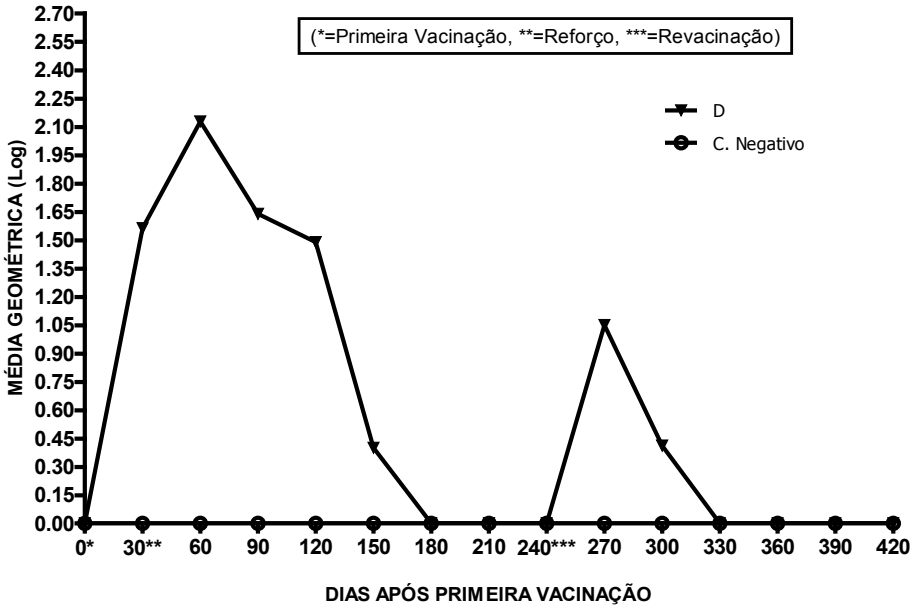


Gráfico 96 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo D.

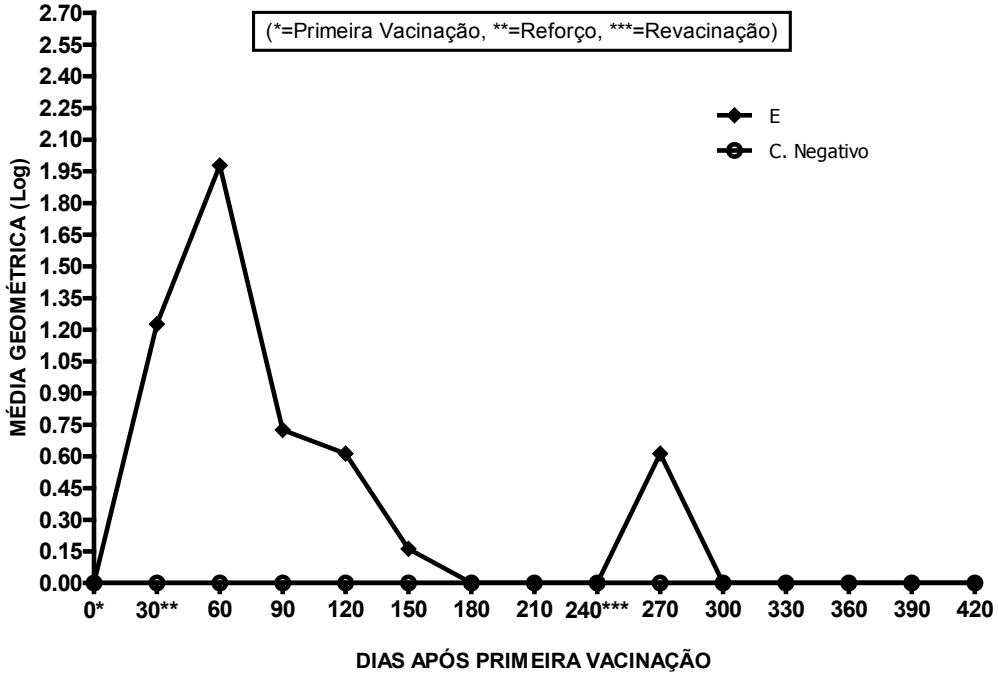


Gráfico 97: Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo E.

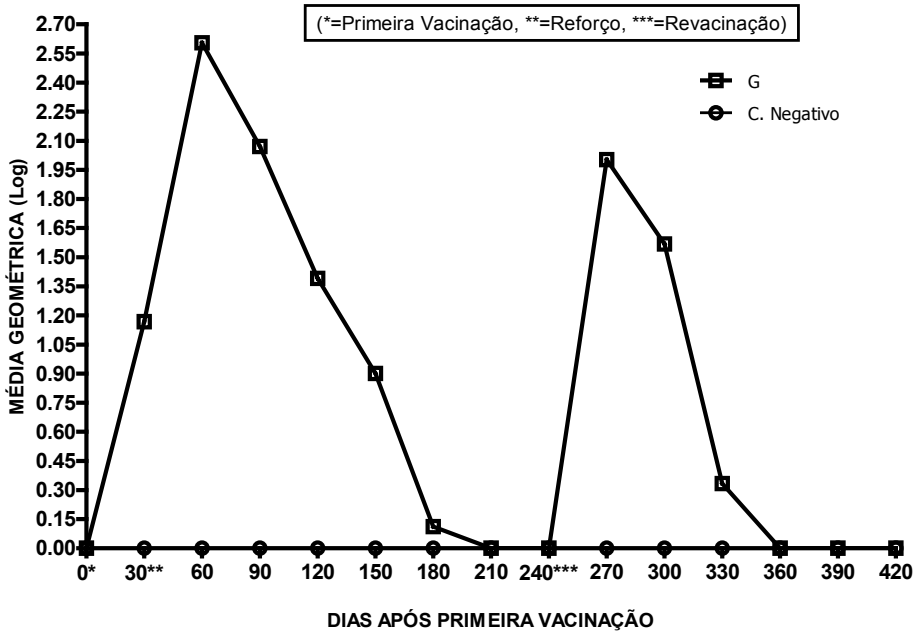


Gráfico 98 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo G.

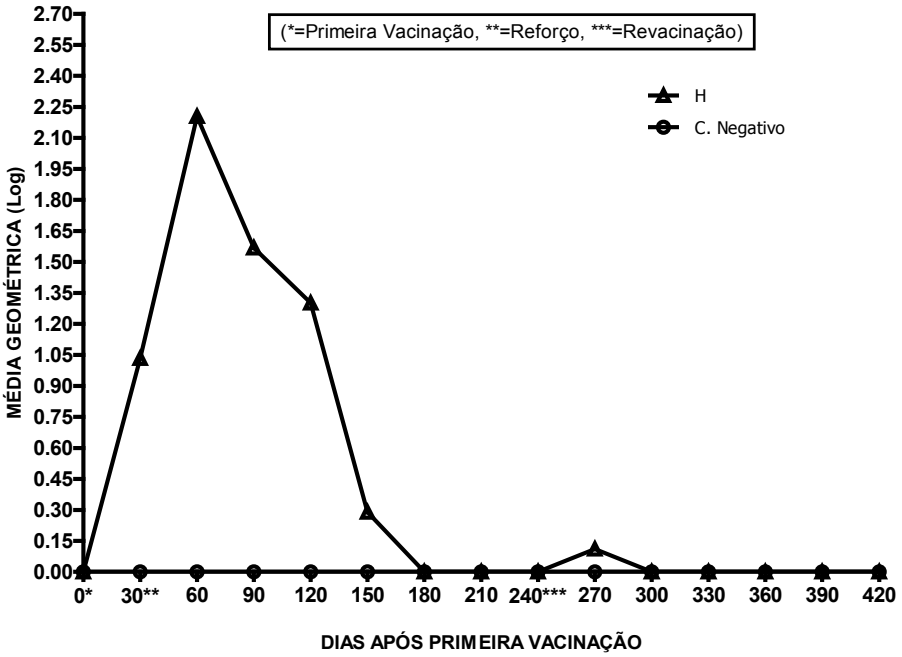


Gráfico 99 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo H.

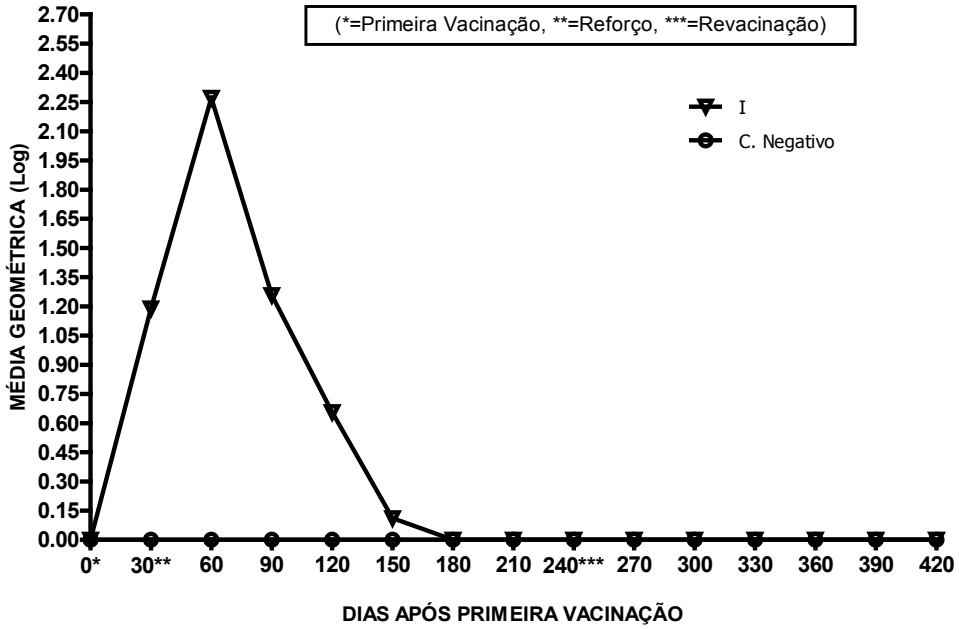


Gráfico 100 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo I.

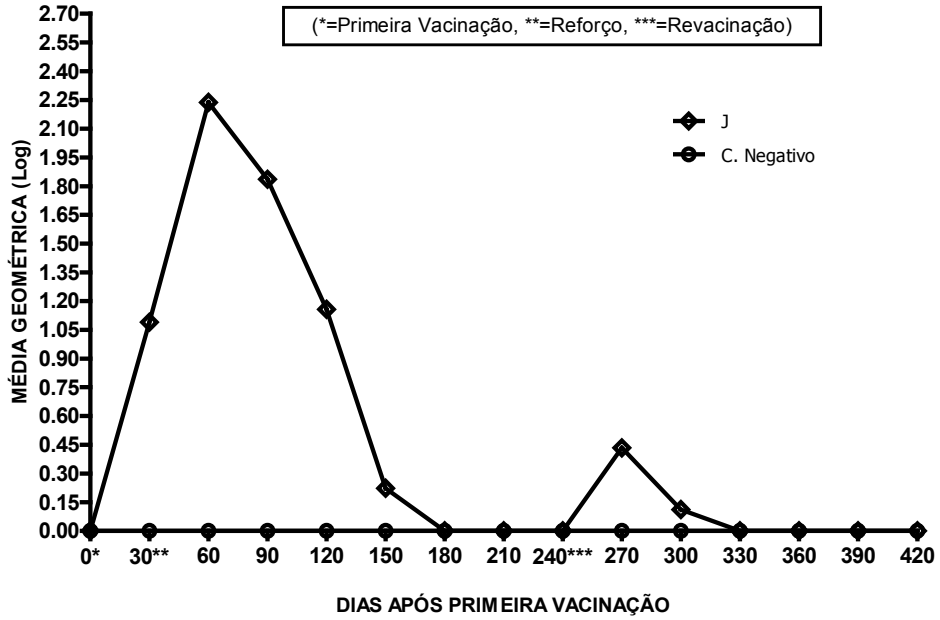


Gráfico 101 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo J.

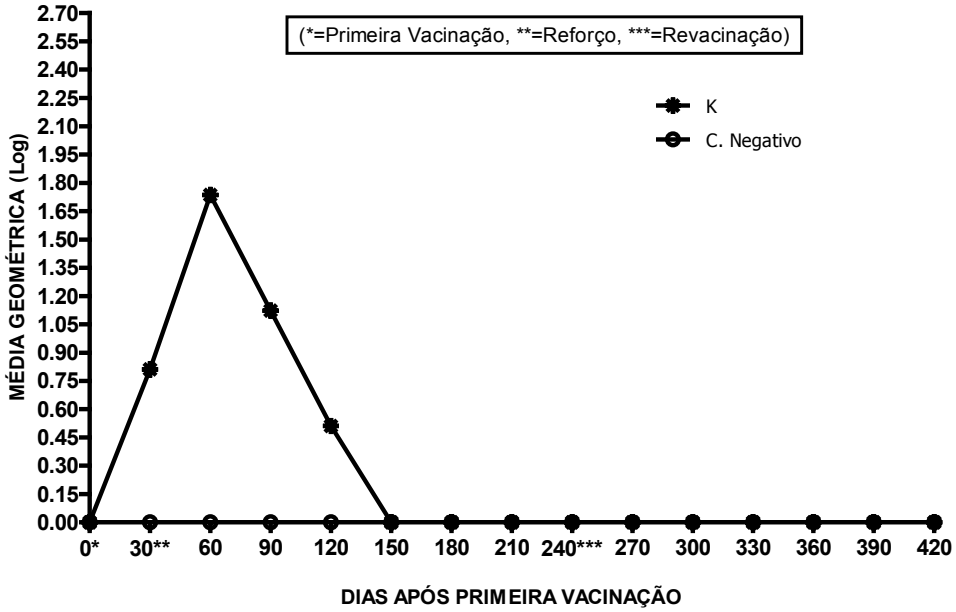


Gráfico 102 : Aglutininas contra a sorovariedade Hardjobovis detectadas pelo Teste de Microaglutinação, no período de 0 a 420 dias após a vacinação, em bovinos do grupo K.

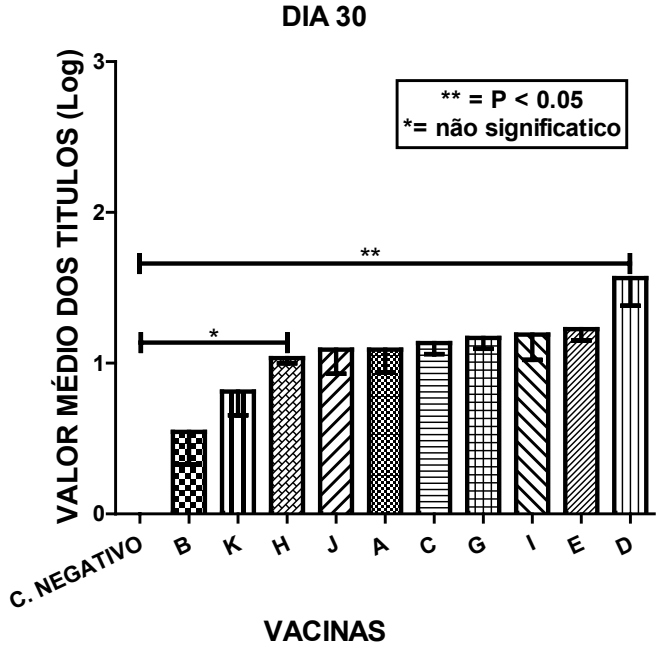


Gráfico 103 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 30 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjobovis.

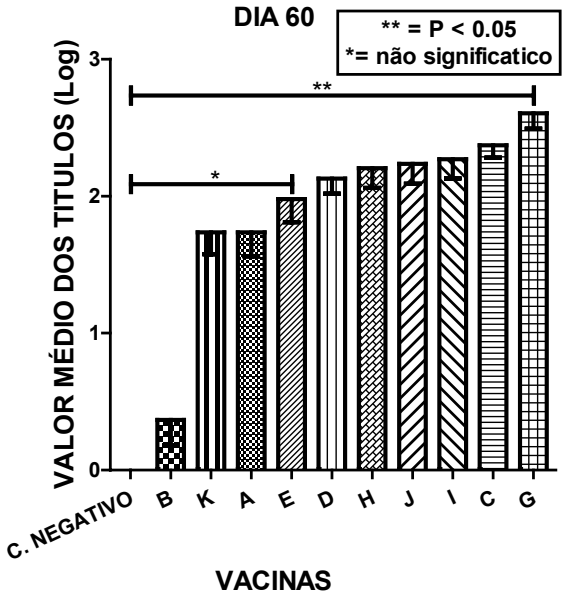


Gráfico 104 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 60 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjobovis.

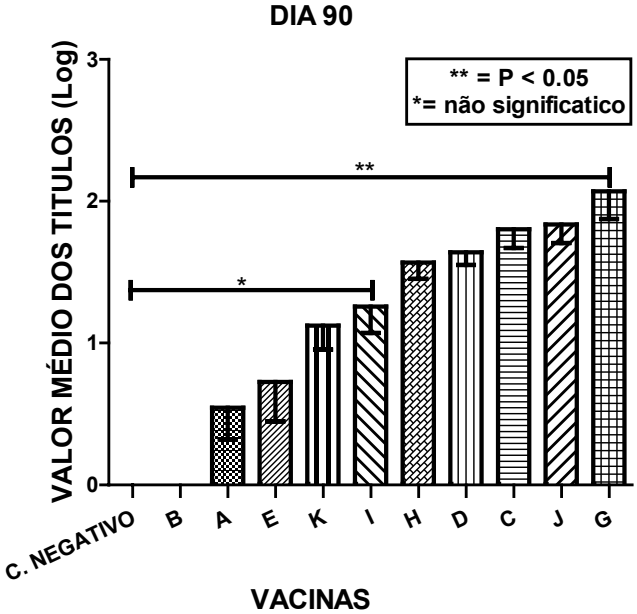


Gráfico 105 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 90 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjobovis.

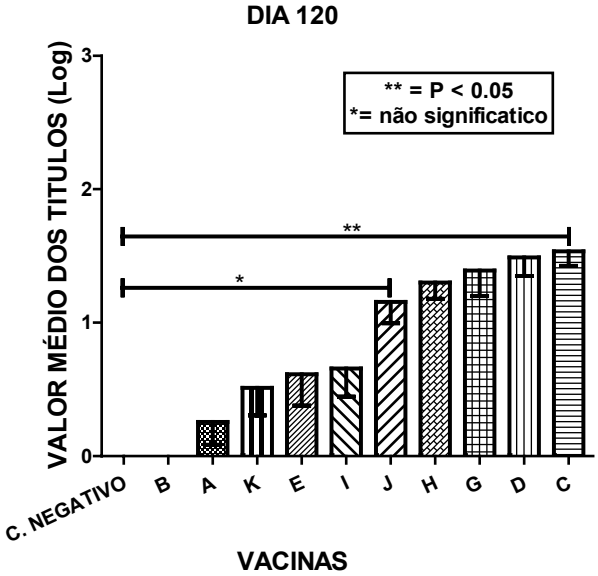


Gráfico 106 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 120 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjobovis.

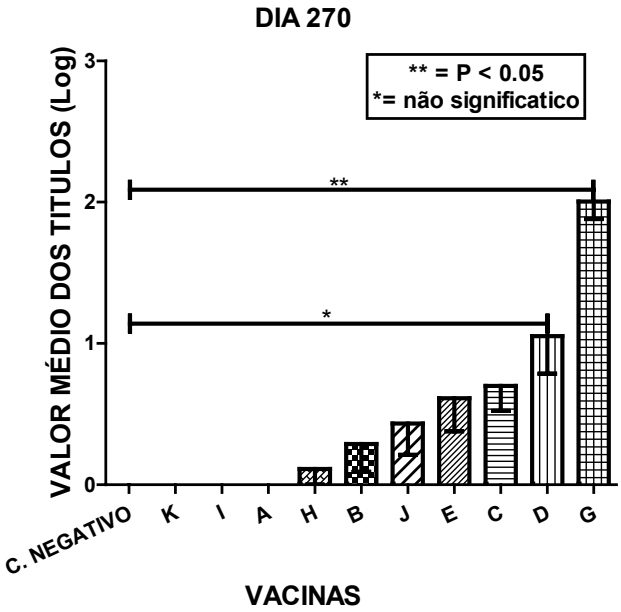


Gráfico 107 : Comparação de médias pelo teste de Dunn dos grupos vacinados no dia 270 pelo teste de microaglutinação com a amostra Hardjobovis.

5 – DISCUSSÃO

No presente estudo desenvolveu-se uma bacterina monovalente utilizando a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma justificada, devido ser isolado local. Os inquéritos sorológicos no país demonstram a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma como a mais prevalente no país, fato que já havia sido sugerido por (Moreira, 1994).

A Associação Americana de Saúde Animal (USAH) através do comitê de Leptospirose recomendava uma bacterina monovalente de L. Hardjo e uma de L. Grippotyphosa, além de uma trivalente de L.Pomona, L. Hardjo e L. Grippotyphosa levando em consideração as taxas sororeagentes de bovinos naquele país (Hanson et al., 1972).

A simultaneidade de duas ou mais sorovariedades infectando animais de um mesmo rebanho é registro raro na literatura, mesmo depois do alerta de Roth e Galton (1960), que sugeriram existir essa possibilidade entre as sorovariedades Hardjo e Serjoe.

Ellis (1984), refere-se, em teoria, qualquer L. interrogans pode infectar um animal, mas que na prática somente um pequeno número de sorovariedades é encontrado em determinadas regiões e espécies. No caso especifico de L. Hardjo, considera que a transmissão direta de bovino para bovino é o mecanismo mais importante para a sua manutenção no plantel. Essa situação foi observada por Ribeiro et al. (1988), que assinalaram ser a transmissão do bovino/bovino responsável pela epidemia de abortos por leptospirose numa fazenda de gado de corte no estado de Minas Gerais.

A resposta imune de animais vacinados com bacterinas de leptospirose tem sido mensurada com vários testes sorológicos (Hanson et al., 1972). O teste de microaglutinação no qual mensura primariamente a classe de anticorpos IgM que surge anteriormente, mas declinam rapidamente dentro de várias semanas ou meses, provindo inadequada medida da reação imune (Negi et al., 1971), fato observado com todas as bactervacinas utilizadas.

O monitoramento sorológico dos animais durante 420 dias após a primeira vacinação revelou títulos aglutinantes máximos que foram obtidos em torno do dia 60 após a primeira vacinação para todas as sorovariedades testadas e todas as vacinas utilizadas. Respostas similares foram descritas por Nardi Júnior et al. (2007) e Arduino et al. (2004), observando títulos máximos pelo teste de microaglutinação entre os dias 45 e 60 após a vacinação em fêmeas búfalas utilizando uma bacterina de membrana externa e uma bacterina pentavalente em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial frente a dois protocolos de vacinação, respectivamente.

A persistência de aglutininas da classe IgM das vacinas dos bovinos vacinados durante três meses após a revacinação foi observada, e a melhor resposta da vacina foi a produzida pela bacterina monovalente, dados condizentes com os apresentados por Nardi Junior (2007), utilizando um regime de dose semelhante com vacinação e revacinação.

Os títulos máximos observados após a revacinação (240 dias) foram de menor magnitude comparativamente ao obsevado após o reforço (30 dias) contrariando os achados de Nardi Junior et al. (2006), para a sorovariedade Hardjo. Estes títulos são considerados de baixa persistência fato que concorda com os dados apresentados por Nardi Junior et.al. (2003), os quais verificaram que o uso de vacina comercial polivalente contra leptospirose induziu resposta sorológica fugaz no Teste de Microaglutinação após o reforço e as revacinações. Esses resultados sugeriram a necessidade de revacinações periódicas – a partir do reforço - em intervalos entre quatro ou seis meses, visando otimizar a profilaxia vacinal na leptospirose, com especial ressalva para a sorovariedade Hardjo.

A classe IgG de anticorpos aparece mais tardiamente do que a resposta de IgM, mas persiste por períodos mais extensos, requerendo testes adicionais tal como o teste proteção em hamster, teste de hemaglutinação passiva, teste de inibição de crescimento (Crawford, 1972), e ensaios imunoenzimáticos indiretos para sua avaliação que foram evidenciados pelo estudo esse padrão de resposta da imunoglobulina da classe IgG.

Considerando os valores das DO(s) dos ELISA(s) de todas as vacinas utilizadas no presente estudo, aparentemente a que melhor comportou-se foi à vacina monovalente. Comparando estes valores aos descritos por Goddard et al. (1991), onde bezerros vacinados com a dose total para a espécie obtiveram aumento nos títulos de duas a quatro vezes que foram limitados, estes dados são condizentes com a investigação atual.

Em um estudo envolvendo 120 bovinos vacinados com bacterina de Leptospira Pomona, aglutininas foram detectáveis em somente dois dos 120 bovinos de dois meses após a vacinação e em nenhum aos quatro meses (Killinger et al., 1970), resultados estes concordantes com a atual investigação. Entretanto, um "pool" de anticorpos IgM obtidos do soro doze meses seguintes a vacinação protegeram 62,5% dos hamsters em um teste de proteção.

Estes resultados indicam que soros coletados após a vacinação geralmente produzirão resultados negativos quando testados com o teste de microaglutinação, entretanto o animal pode resistir à exposição natural de campo (Hanson et al., 1972). Uma avaliação válida da resposta imune deve incluir um teste como o teste de proteção passiva em hamsters, entre outros, que são capazes de mensurar a classe IgG de anticorpos (Huhn et al., 1971).

O uso de vários procedimentos disponíveis atualmente é adequado para prover uma avaliação real das bacterinas de leptospira. Estes procedimentos incluem vacinação e desafio de animais susceptíveis de laboratório, avaliação da resposta imune de animais vacinados por teste de proteção hamsters ou teste de inibição de crescimento conduzida com soros coletados em vários intervalos, e avaliação de campo das bacterinas em rebanhos apropriados. O uso destes procedimentos tem demonstrado que bacterinas de L. Pomona, L. Grippotyphosa e L. Hardjo serem efetivas (Hanson et al., 1972), fato contrário da presente investigação onde todas as bacterinas polivalentes e a bacterina monovalente não promoveram proteção adequada nos vários intervalos avaliados.

Estes procedimentos também provêm resultados mais consistentes com menor custo do que estudos que envolvem desafio de bovinos vacinados.

Os soros testados não apresentaram uma mesma intensidade de resposta de anticorpos aglutinantes e neutralizantes detectáveis pelo microaglutinação e ELISA contra as sorovariedades utilizadas, quando considerados as médias aritméticas e as médias geométricas dos logaritmos dos títulos de anticorpos. Siddique e Shah (1990), discutem que as vacinas não induzem uma mesma resposta sorológica contra todas as sorovariedades nelas contidas, podendo isso ocorrer devido a uma diferença na concentração antigênica final, ou pela supressão da resposta antigênica causada por uma sorovariedade sobre a outra, presente na vacina. O poder imunogênico segundo a variante utilizada também deve ser levado em consideração, devido ao fato de que diferenças entre elas existem (Tabata, 2002; Bolin et al., 1989, Bolin et al., 1991). De fato, Bolin et al. (1991), referem que o aumento da massa antigênica da estirpe Hardjoprajitino em uma vacina pode aumentar a imunogenicidade e, conseqüentemente, a proteção conferida pela mesma, resultados concordantes com a presente investigação e amplamente discutida por Favero et al (1997), exercendo grande influência na produção de aglutininas pós-vacinais.

O componente Hardjo de vacinas de células inteiras de leptospiras é um fraco imunógeno que produz imunidade de curta duração, como evidenciado pelos baixos

títulos de anticorpos aglutinantes e neutralizantes em bovinos vacinados, dados que concordam conforme observado por Marshal et al. (1979) e Bolin et al. (1989), provavelmente devido os lipopolissacárideos expostos na superfície desta amostra como os LPS em geral são pobres indutores de células B de memória levando a uma não resposta imune secundária (Klein, 1982).

Outros fatores podem influenciar a eficácia das vacinas destacando a influência dos programas de vacinação empregados, a qualidade e a quantidade de microorganismos imunizantes (Bey e Johnson., 1986), grau de similaridade entre os antígenos que compõem a bacterina e o tipo de adjuvante utilizado e a temperatura de conservação e transporte da vacina até a propriedade (Arduino, 2005).

A modificação da concentração do antígeno, adjuvante, formulação vacinal ou o modo de preparação do antígeno pode aumentar a efetividade destas vacinas. Futuras modificações no regime de vacinação pode também aumentar a proteção conferida por estes produtos, entretanto é improvável que um produto com menos de seis meses de duração de imunidade seja pratico para o uso na produção animal (Bolin et al., 1989).

Nenhum regime de dose empregados dentro de todas as bacterinas comerciais e a monovalente experimental utilizando amostra Norma foram capazes de proteger bovinos vacinados com Hardjoprajitino e os títulos confrontados com Hardjoprajitino amostra Norma após seis meses de vacinação, resultados que conferem com os apresentados por Bolin et al. (1989).

Todos os animais que receberam a dose de vacina com Hardjoprajitino e Hardjoprajitino amostra Norma produziram médias aritméticas e geométricas de títulos superiores quando comparados com a amostra Hardjobovis como antígeno provavelmente devido esta possuir maior expressão de antígenos de superfície imunogênica (Membrana externa) em termos quantitativos em relação às duas amostras anteriores, fato que já havia sido comprovado anteriormente por Bolin et al. (1989), quando utilizaram as amostras Hardjoprajitino e Hardjobovis em vacinas diferentes e mensuraram as respostas de anticorpos aglutinantes e neutralizantes individualmente.

Os resultados também foram semelhantes aos encontrados em estudos anteriores (Negi et al., 1971; Tripathy et al.,1975; Tripathy et al., 1976; Tripathy et al., 1979), que indicaram a alta concentração de anticorpo específico IgG (dias 60 e 270) anti-leptospira mensurado pelo teste de proteção em hamster e pelo teste de inibição de crescimento por estes autores, correlacionavam-se com proteção. Entretanto estes dados foram discordantes aos encontrados por Bolin et al., (1989), onde a alta concentração de IgG não foi protetora.

Vacinas de baixa potência conforme trabalho realizado por (Huhn et al., 1971), indicam que uma pequena porcentagem de hasmters foram protegidos em um determinado teste de potência produzindo níveis de anticorpos em bovinos vacinados por um breve período de tempo, algumas vezes menores do que dois meses. Isto fortemente indica que a imunidade por períodos longos impedindo a leptospirose renal podem não ocorrer nestas vacinas utilizadas em bovinos, desde que, a leptospiremia precede a infecção renal. Este fato de extrema relevância deve ser levado em consideração, pois todos os resultados demonstraram uma imunidade por um curto período de tempo o que leva a sugerir que provavelmente todas as vacinas utilizadas não impediriam o estabelecimento do estado de portador renal.

Palit et.al. (1996), propõem a utilização de amostras de isolados locais e estocadas em nitrogênio líquido em lotes de sementes separados por amostra e em várias alíquotas para a utilização na fabricação de vacinas. Além disso, propõe-se que estas amostras sejam reativadas antes de serem congeladas em modelos animais. O estudo relatou maior eficiência destas amostras inclusive a L. Hardjo em testes de potência em relação a uma bacterina comercial

utilizando o modo tradicional de fabricação da vacina de leptospirose, fato que pode ser inferido na atual investigação, pois provavelmente estas amostras utilizadas perderam sua imunogenicidade e os fabricantes poderiam manter estas amostras congeladas para obterem um produto de melhor poder imunogênico.

O desempenho de todas as vacinas foi considerado insatisfatório quando se considerou a distribuição temporal da concentração de anticorpos protetores, cujos resultados foram obtidos pelo teste de inibição do crescimento. Isto provavelmente resultou da dificuldade em avaliar quantitativamente a potência imunogênica de vacinas de células inteiras. É possível avaliar o número de células presentes, entretanto a relação entre o número de células e a massa celular nem sempre são constantes (Bey et.al., 1974).

Em decorrência deste fato, as vacinas de células inteiras são difíceis de serem avaliadas quantitativamente para a potência imunogênica, devido o numero de células presentes poderem ser conhecidos, entretanto a relação entre o número de células e a massa celular nem sempre é constante (Bey et.al.,1974).

Além disso, uma quantidade desconhecida de antígeno de células de leptospira é liberada dentro dos meios de cultura, e todas as vacinas contém este meio de cultura tanto quanto células. Bey et.al. (1974), determinaram que a centrifugação e a lavagem destas células na preparação da vacina para remover quantidades grosseiras de meio de cultura, a liofilização do produto final para a determinação do peso seco final e conseqüentemente, a padronização do produto final com uma quantidade definida, melhoraram substancialmente o poder imunogênico destas vacinas de células inteiras quando comparados com os resultados de vacinas utilizando membrana externa em sua constituição.

Outro fator a ser ressaltado é o tipo de adjuvante utilizado. Os adjuvantes de alumínio atuam principalmente pela formação de resposta inflamatória seguido da liberação lenta do antígeno e com isto promovendo um tempo maior de interação do antígeno com as células apresentadoras de antígeno principalmente macrófagos e linfócitos. Entretanto, a emulsão oleosa provou ser mais potente indutora de imunidade humoral, dados que conferem com o estudo atual mas são discordantes aos encontrados por Vega et al. (2005).

Seu uso possui certa resistência por parte dos fabricantes de vacinas, pois estes tipos de adjuvantes produzem reações locais que oferecem risco de carcinogenicidade. Porém, Gupta et al. (1993), ressaltaram que o balanço entre toxicidade e a adjuvanticidade e o limiar de toxicidade para animais, principalmente ruminantes, apresenta uma faixa mais ampla em comparação com o limiar para humanos permitindo seu uso para bovinos com relativa segurança (Singh e O'hagan, 2003).

6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- Não há homogeneidade de resposta de anticorpos aglutinantes e neutralizantes detectados pelo teste de microaglutinação e ELISA em bovinos vacinados contra leptospira Hardjo.

- As duas vacinas que não desenvolveram resposta sorológica nos bovinos provavelmente possuem baixa concentração do antígeno Hardjo em sua composição.

- O ELISA indireto anti-IgG revelou ser mais adequado que o teste de microaglutinação para avaliar a distribuição temporal dos anticorpos antileptospira Hardjo.

- As bacterinas polivalentes apresentam resposta sorológica de curta duração o que exige no mínimo revacinações a cada 4 meses.

- A vacina monovalente de Hardjo revelou maior duração de títulos de anticorpos e

a revacinação pode ser feita a cada seis meses.

- A leptospira Hardjobovis produziu títulos significativos em todos os animais vacinados provavelmente pela sua melhor imunogenicidade em relação a outra Hardjo, característica já identificada anteriormente.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; COUSINS, D.V.; FAINE, S.; et al. Bovine IgM and IgG response to Leptospira interrogans serovar Hardjo as measured by enzyme immunoassay. *Veterinary Microbiology*, v. 7, n. 6, p. 577-585, 1982.

ARAÚJO, V.E.M. MOREIRA, E.C; NAVEDA, et al. Freqüência de aglutininas anti-Leptospira interrogans em soros sangüíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*., v.57, n.4, p.430-435, 2005.

ARDUINO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S.; FREIRE, M.M.; et al. Anticorpos contra leptospira spp em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial. Perfil sorológico frente a dois esquemas de vacinação. *Ciência Rural*, v. 34, n. 3, p. 865-871, 2004.

ARDUINO, G.G.C. *Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina.* 2005, 115f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ÁVILA, F.A.; ÁVILA, S.H.P.; BECHARA, G.H.; et al. Evaluation of the immune humoral response in swine experimentally vaccinated against leptospira interrogans serotypes Pomona and Canicola. *Ars Veterinária*, v. 1, n.1, p. 51-55, 1985.

AVRAMEAS S, TERNYNCK T. Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* v. 8, n.12, p. 1175 – 1179, 1971.

BEY, R.F.; AURAN, N. E.; JOHNSON, R.C. Immunogenicity of whole cell and outer envelope leptospiral vaccines in hamsters. *Infection and Immunity*. v. 10, n. 5, p. 1051-1056, 1974.

BEY, R.F.; JOHNSON, R.C. Humoral immune response of dogs vaccinated with leptospiral pentavalent outer envelope and whole culture vaccines. *Am. J. Vet. Res.* v.39, n.5, p. 831-836, 1978b.

BEY, R.F.; JOHNSON, R.C. Humoral immune responses of cattle vaccinated with leptospiral pentavalent outer envelope and whole culture vaccines. *Am. J. Vet. Res.* v.39, n.5, p. 1109-1114, 1978a.

BEY,R.F.; JOHNSON, R.C. Protein-free and low-protein media for the cultivation of Leptospira. *Infect. Immunity*, v.19, n.2, p.562-569, 1978c.

BEY, R.F.; JOHNSON, R.C. Leptospiral vaccines: immnunogenicity of protein-free medium cultivated whole cell and outer envelope vaccines prepared in protein-free medium. *Am. J. Vet. Res*., v. 43, p. 831-834, 1982.

BEY, R.F.; JOHNSON, R.C. Leptospiral vaccines: immunogenicity of protein-free medium cultivated whole cell bacterins in swine. *Am. J. Vet. Res.* v. 44, n. 12, p. 2299-2301, 1983.

BEY, R.F.; JOHNSON, R.C. Current status of Leptospiral vaccines. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.,* v.2, p. 175-197, 1986.

BHARTI A.R; NALLY J.E; RICALDI J.N. *et al*. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, v. 4, n.9, p. 757-771, 2003.

BOLIN, C.A.; ZUERNER, R.L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on Leptospira interrogans serovar Hardjo type Hardjo-bovis infection of cattle. *Am. J. Vet. Res*., v. 50, n.12, p. 2004-2008, 1989.

BOLIN, C.A.; PHIL, J.A.C.; ZUERNER, R.L.; et al. Effect of vaccination with a monovalent Leptospira interrogans serovar Hardjo type Hardjo-bovis vaccine on type Hardjo-bovis infection of cattle. *Am. J. Vet. Res*., v. 52, n. 10, p. 1639-1643, 1991.

BRAMEL, R.G.; SCHEIDY, S.F. The effect of revaccination of horses and cattle with Leptospira Pomona bacteria. *J. Am. Vet. Med. Ass.,* v. 128, n. 8, p. 399-400, 1956.

BROOM J.C. The protective value of Leptospiral vaccines in hamsters. *Vet. Rec.*v. 61, n. 11, p. 127-130, 1949.

BROWN, A.L.; JENSEN, J.H.; CREAMER, A.A.; et al. Evaluation of a Leptospira bacterin prepared in culture medium. *Vet. Med*. v. 50, p. 167-171, 1955.

BRUNNER K.T; MEYER K.F. Immunization of hamsters and dogs against experimental leptospirosis. *J Immunol.* v.64, n. 5, p. 365-372, 1950.

BURNSTEIN, T.; BRAMEL, R.G.; JENSEN, J. Vaccination of swine with a Leptospira Pomona bacterin. *Vet. Med*., v.52, p. 58-61, 1957.

MANUAL de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis.Centro panamericano de zoonosis. Washington, 1985. 46p. (Nota Técnica, 30).

CHO, H.J.; GALE,S.P.; MALKIN, M.; et al. Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against leptospira interrogans serovars Pomona, sejroe and Hardjo in cattle. *Can.J. Vet. Res.* v.53, n. 3, p. 285-289, 1989.

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

COSTA, M.C.R.; MOREIRA, E.C.; LEITE, R.C.; et al. Avaliação da imunidade cruzada entre Leptospira Hardjo e L. Wolffi. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,* v. 50, n. 1, p. 11-17, 1998.

CRAWFORD, R.P. Molecular characteristics of antibody detected by the microscopic aglutination test in serum of guinea pigs with Leptospirosis. *Am. J. Vet. Res*, v. 33, n. 7, p. 1507-1512, 1972.

DANCZIG, E.; POLNER, A. Vaccination against leptospirosis in a pig herd. *Magyar Allatorvosal Lapja*. v. 119, n.3 , p. 420-424, 1997.

DELBEM, A.C.B. *Purificação, caracterização e avaliação da capacidade imunogênica do lipopolissacarídeo (LPS) de Leptospira spp. Isolada no Brasil associado ao hidróxido de alumínio ou monofosforil lipídeo A como adjuvantes.* 2004. 117f. Tese (Doutorado em MedicvacinaVeterinária) – Faculdade de MedicvacinaVeterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; DOBSON, H.; et al. Effect of vaccination against Leptospira interrogans serovar Hardjo on milk production and fertility in dairy cattle. *Vet. Rec.* v. 138, n. 14, p. 334-335, 1996.

DOBSON, K.J.; DAVOS, D.E. Leptospiral titers in pigs after vaccination. *Aust. Vet. J,* v.51, n. 9, p. 443-444, 1975.

EBERT, E.; REED, N.; VARNEY, C. et al. Guinea-pig serology as an alternative to the hamster challenge test for the potency testing of *Leptospira Hardjo* vaccines. *Pharmeuropa,* Special Issue bio,v. 99, n.2, p.102-110, 1999.

ELLINGHAUSEN, H.C.; McCULLOUGH, W.G. Nutrition of Leptospira Pomona and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex. *Am. J. Vet.Res.* v.26, p. 39-44, 1965.

ELLIS, W. A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Prev. Vet. Med*, v. 2, n. 1-4, p. 411-421, 1984.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C., et al. *Leptospira and Leptospirosis*. 2. ed. Melbourne, Medisci, 1999. 272 p.

FÁVERO, A.C.M.; MANGERONA, A.C.S.; ALESSI, L.J.; et al. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra a leptospirose. Influência de reações pré-vacinais, homólogas e heterólogas. *Arq. Inst. Biol*., v. 64, n. 2, p. 45-55, 1997.

FLINT, S.H.; LIARDET, D.M. A trivalent leptospiral vaccine with emphasis on a Leptospira interrogans serovar Hardjo component to prevent leptospiruria. *N.Z.Vet.J.* v. 28, n.12, p. 263-266, 1980.

FONTANALS, A.; LORENETE, P.; SAMARTINO, L.; et al. *Leptospira interrogans* serovar pomona: deteccíon de diferencias antigénicas entre tres aislamientos regionales de bovinos y una cepa de referencia. *Rev Argent Microbiol.* v.33, n.2, p.108-112, 2001.

FRANÇOIS, S.; GUALTIERI, C.; CARAB, S.; et al. Estudio serologico posterior a la vacunation contra leptospirosis en porcinos. *Vet. Arg.,* v. 118, n. 12, p. 530-533, 1995.

FREUDENSTEIN H.; HEIN, B. Potency of leptospiral vaccines and protection against chronic infection in golden hamster. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* v. 14; n. 3; p. 229-234, 1991.

BASE de informações municipais. Instituto brasileiro geografia e estatística. 2.ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2000. 1 CD-ROM.

GALTON M.M.; SULZER C.R.; SANTAROSA C.A.; et al. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Appl Microbiol.* v. 13, p. 81-85, 1965.

GILLESPIE, R.W.H.; KENZY, S.G. Immunization of cattle against leptospirosis. I. Comparative evaluation of Leptospira Pomona bacterins. *Vet.Med.,* v. 53, p.401-408, 1958.

GILLESPIE, R.W.H.; KENZY, S.G. Immunization of cattle against leptospirosis. II. Further observations on duration of immunity induced by vaccination. *Vet.Med.,* v.53, p. 611-617, 1958.

GODDARD, R. D., HOPKINS, I. G.;THORNTON, D. H. The development of a potency test for *Leptospira Hardjo* vaccines: a comparison of protection in calves and serology in guinea-pigs*. J Biol Stand*, v. 14, n. 4, p. 337-344, 1986.

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. *Vet Microbiol*., n. 26, n. 1-2, p. 191-201, 1991.

GUPTA R.K; RELYVELD E.H; LINDBLAD E.B.; et al. Adjuvants a balance between toxicity and adjuvanticity. *vaccine.* v.11, n. 3, p. 293-306, 1993.

HAAKE, D.A.; WALKER, E.M.; BLANCO, D.R.; et al. Changes in the surface of Leptospira interrogans serovar grippotyphosa during in vitro cultivation*. Infect Immun.* v. 59, n. 3, p. 1131 - 1140, 1991.

HALDER, M. Three Rs potential in the development and quality control of immunobiologicals. *ALTEX*, v.18, Suppl 1, p. 13-47, 2001.

HANSON, L.E.; TRIPATHY, D.N., KILLINGER, A.H. Current status of Leptospiorosis immunization in Swine and Cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.,* v. 161, n. 11, p. 1235-1242, 1972.

HANSON, L.E. Immunology of bacterial diseases, with special reference to leptospirosis. *J. Am Vet Med Assoc.,* v.170, n.9, p.991-994, 1997.

HARTSKEERL, R. ELISA for the quantification of leptospiral antigens in canine vaccines. *Pharmeuropa,* Special Issue bio, v. 99, n. 2, p. 50-59, 1999.

HARTSKEERL, R.; SMITHS, H.L.; KORVER, H.; GORIS, M.G.A.; TERPSTRA, W.J. International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Royal Tropical Institute, 2001, 100p.

HARTMAN, E.G.; VAN HOUTEN, M.V.; FRIK, J.F.; et al. Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM and IgG-specific ELISA. *Vet. Immunol. Immunopathol.,* v. 7, n. 3-4, p. 245-254, 1984.

HEATH, K.R.; BOX, P.G. Immunity to leptospirosis: Antibodies in vaccinated and infected dogs. *J. Comp. Pathol.,* v. 75, p. 127-136, 1965.

HERRMANN, G.P. *Leptospira sp em ovinos do Rio Grande do Sul soroprevalência e avaliação da imunogenicidade da bacterina Leptospira Hardjo.* 2002. 41f. Tese (Doutorado em MedicvacinaVeterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

HERRMANN, G.P.; LAGE, A.P.; MOREIRA, E.C.; et al. Soroprevalência de aglutininas anti-Leptospira spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc. Rural* , v. 34, n. 2, p.443-448, 2004.

HICKEY, T. Leptospira bacterin batch potency testing. *Pharmeuropa,* Special Issue bio, v. 99, n.2, p. 60-76, 1999.

HOAG, W.G.; BELL, W.B. An immunogenic agent for the protection of cattle against leptospira Pomona. *Am. J. Vet. Res.,* v.16, n. 60, p.381-385, 1955.

HODGES, R.T.; YOUNG, G.W.; THOMSON, J.T. The efficacy of a leptospirosis vaccine in preventing leptospiruria in pigs. *N.Z.Vet. J.* v. 33, n.3, p. 31-34, 1985.

HUHN, R.G.; CLAUS, K.D.; MACHEAK, M.E. Vaccination of cattle with Leptospira Pomona bacterins. II: potency assay using the hamster passive protection test. In: ANNUAL MEETING UNITED STATED ANIMAL HEALTH, 74, 1970, Proceedings. 74th Ann Meeting. US Anim. Health A, 1971, p. 178-196.

HUHN, R.G.; HANSON, L.E.; KILLINGER, A.H., et al. Immunity to leptospirosis: Leptospira interrogans serotype Pomona bacterins in cattle. *Am. J. Vet. Res*, v. 36, n. 1, p. 59-65, 1975.

JOHNSON, R.C.; WILSON, J.B. Nutrition of Leptospira Pomona. *J Bacteriol.* v.80, p.406-411, 1960.

JOHNSON, R.C.; HARRIS, V.G. Antileptospiral activity of serum. II. Leptospiral virulence factor. *J Bacteriol.,* v. 93, n. 2, p. 513-519, 1967.

JOHNSON, R.C.; HARRIS, V.G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol.,* v.94, n.1, p.27-31, 1967.

JOHNSON, R.C.; MUSCHEL, L.H. Antileptospiral activity of serum. I. Normal and immune. *J Bacteriol.,* v. 91, n. 4, p. 1403-1409, 1966.

KIDA, H.; ISHII, T.; TSUNEHISA, Y.; et al. Comparison of vaccines prepared from leptospires grown in a serum medium and in a chemically defined medium. *Zentbl. Bakt. Parasitkde,* v.238, n. 1, p. 86-96, 1977.

KIESEL, G.K.; DACRES, W.G. A study of Leptospira Pomona bacterin in cattle. *Cornell Vet*., v. 49, n. 3, p. 332-343, 1959.

KILLINGER, A.H.; HANSON, L.E.; MANSFIELD, M.E.; et al. Vaccination of cattle with Leptospiral bacterins. I: serologicals and cultural results of challenge. In: ANNUAL MEETING UNITED STATED ANIMAL HEALTH, 74, 1970, Proceedings. 74 th Ann. Meeting. U.S. Anim. Health a, 1970, p. 165-177.

KLAASEN, H.L.B.M.; MOLKENBOER, M.J.C.H.; VRIJENHOEK, M.P.; et al. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet Microbiol*., v. 95, n. 1, p. 121-132, 2003.

KLEIN J. *Immunology: the science of self-nonself discrimination.* New York: John Wiley & Sons, 1982, p. 512.

LANGONI, H.; DEL FAVA, C.; CABRAL,K.G. Aglutininas antileptospíricas em búfalos do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. *Cienc. Rural*, v.29, n.2, p.305-307, 1999.

LANGONI H.; SOUZA L.C.; SILVA A.V.; et al. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev Vet Med.* v. 40, n. 3-4, p. 271-275, 1999.

LANGONI, H.; PIMENTEL, V.L.; SILVA, A.V.DA.; et al. Avaliação da dinâmica de anticorpos pós-vacinais contra Leptospira spp, em cães vacinados, pela prova de soroaglutinação microscópica. *Ars Veterinaria*, v. 18, n. 1, p. 54-61, 2002.

LEITE, R.M.H *Caracterização de formas de produção de bovinos e distribuição espacial e por idade de brucelose,BVD, IBR, e leptospirose no estado da Paraíba.* 2003. 63f. Tese (Doutorado em MedicvacinaVeterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Mvacinas Gerais, Belo Horizonte.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACKINTOSH, C.G.; MARSHALL, R.B.; BROUGHTON, E.S. The use of a Hardjo-pomona vaccine to prevent leptospiruria in cattle exposed to natural challenge with leptospira interrogans serovar Hardjo. *N.Z. Vet. J.,* v.28, n. 9, p. 174-177, 1980.

MARBEHANT, P. Leptospiral vaccines batch potency testing. European monograph status review. *Pharmeuropa,* Special Issue bio, v. 99, n.2, p. 11-16, 1999.

MARSHALL R.B.; BROUGHTON E.S.; HELLSTROM J.S. Protection of cattle against natural challenge with Leptospira interrogans serovar Hardjo using a Hardjo-pomona vaccine. *N Z Vet J.,* v. 27, n.6, p.114-116, 1979.

MARSHALL, R.B.; BASKERVILLE, A.; HAMBLETON, P.; et al. Benign leptospirosis: the pathology of experimental infections of monkeys with Leptospira interrogans serovars balcanica and tarassovi. *Br. J. Exp.Pathol*, v. 61, n.2, p. 124-131, 1980.

MARTINON, O. ELISA tests for the direct quantification of antigen in leptospiral vaccines and their use in batch release. *Pharmeuropa*, Special issue bio, v.99, n. 2, p. 46-49, 1999.

MOREIRA, E.C. *Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros.* 1994. 94 f. Tese (Doutorado em MedicvacinaVeterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Mvacinas Gerais, Belo Horizonte.

MORSI, H.M.; SHIBLEY, G.P. Cellular and whole culture bivalent leptospiral bacterins: safety and potency in guinea pigs and hamsters. *Am. J. Vet. Res.,* v. 34, n. 1, p.115-117, 1973.

NAIMAN, B.M.; ALT, D.; BOLIN, C.A.; et al. Protective killed Leptospira borgpetersenii vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Infect. Immun.,* v. 69, n. 12, p. 7550-7558, 2001.

NARDI JÚNIOR, G.; RIBEIRO, M.G.; VASCONCELLOS, S.A.; et al. Perfil de aglutininas anti-Leptospira em bezerras búfalas vacinadas com bacterina pentavalente comercial contra leptospirose. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. v. 58, n. 3, p. 299-304, 2006.

NARDI JÚNIOR, G.; GENOVEZ, M.E.; RIBEIRO, M.G.; et al. Interference of vaccinal antibodies on serological diagnosis of leptospirosis in vaccinated buffalo using two types of commercial cines. *Braz. J. Microb*., v. 38, n. 2, p. 363-368, 2007.

NEGI, S.K.; MYERS, W.L.; SEGRE, D. Antibody response of cattle to Leptospira Pomona: Response as measured by Hemagglutination, Microscopic Agglutination and Hamsters protection Tests. *Am. J. Vet. Res.,* v. 32, n. 12, p. 1915-1920, 1971.

NUNES-EDWARDS, P.L.; THIERMANN, A.B.; BASSFORD JR P.J.; et al. Identification and characterization of the protein antigens of Leptospira interrogans serovar Hardjo. *Infec. Immun*. v.48, n. 2, p. 492 - 497, 1985.

MANUAL of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, Leptospirosis. Paris: World Organization for Animal Health, 2001, p-198-217.

OLITZKI, L.; STUEZYNSKI, L.A.; HALEVI, C.; et al. Immunologic studies on bovine leptospirosis. *J. Infect. Dis.* v. 84, p. 15-20, 1953.

COADYUVANTES inmunológicos. Ginebra: Organizacion mundial de la saude, 1976.7p. (Serie de Informes Técnicos. n. 595).

OTANI, S.; ARIMITSU, Y.; AKAMA, K. Antibody activities of immunoglobulins in anti-leptospiral horse sera. *Jpn J Med Sci Biol.* v. 33, n. 5, p. 239-247, 1980.

PALIT, A.; ALEXANDER, A.M.; SLACEK, B.; TAYLOR, C. The efficacy of Leptospira interrogans serovars Pomona and copenhageni and Leptospira borgpeternsii serovar Hardjo vaccine in cattle. *N.Z.Vet.J.,* v.44, n.2, p.64-66, 1996.

PHILLIPS, C.E. Leptospiral vaccine evaluation. *Vet. Med.,* v. 53, p. 301-307, 1958.

RIBEIRO, S.C.A., GOUVEIA, M.A.V., SILVA, P.L. Levantamento sorológico em dois surtos de leptospirose bovina, em Uberlândia, Triangulo Mineiro, *Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot.,* v. 40, n. 6, p. 415-423, 1988.

RIBOTTA, M.J.; HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M.; et al. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. *Can. J. Vet. Res.,* v. 64, n.1, p. 32-37, 2000.

ROTH, E.E.; GALTON, M.M. Isolation and identification of Leptospira Hardjo from cattle in Louisiana. *Am. J. Vet. Research,* v. 21, n.5, p. 422-427, 1960.

RUBY, K.W. Evaluation of the Leptospira Pomona ELISA and its Correlation with the Hamster Potency Assay. *Dev. Biol. Stand.,* v. 86, p. 340, 1996.

RUBY, K.W.; CARDELLA, M.A.; KNUDTSON, W.U. Assay for measuring relative potency of leptospiral bacterins containing serovar Pomona. *Biologicals,* v. 20, n. 4, p. 259-266, 1992.

RUBY, K. Development of *in vitro* assays for measuring relative potencies of leptospiral bacterins. *Pharmeuropa,* Special Issue bio, v.99, n.2, p.35-45, 1999.

RAO, A.S.; KESHAVAMURTHY, B.S. Study of the immune response of buffalo calves to heat-killed pentavalent leptospiral vaccine. *Indian Vet. J.,* v. 62, p. 357-361, 1985.

RUIZ, V.M.B.; RUBIO, E.L.; SÁNCHEZ, P.M. Eficiencia del hidroxido de alumínio, vitaminas liposolubles y levamisol, empleados em uma bacterina de leptospira en vaquillas para la generacion de anticuerpos especificos. *Téc. Pec. Méx.,* v. 29, n.3, p.139-143, 1991.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em MedicvacinaVeterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SANFORD, S.E.; MORRIS, P.J. Serological titers to various leptospiral serovars before and after vaccinating gilts with three commercial vaccines. *Can. Vet. J.,* v. 31, n.4, p. 277-279, 1990.

SCHALLING, H. Development of an alternative leptospira potency test (ELISA): some preliminary results for the laboratory. *Pharmeuropa,* Special Issue bio, n. 99, n. 2, p. 95-101, 1999.

SHENBERG, E. Growth of pathogenic Leptospira in chemically defined media. *J. Bact.,* v. 93, n. 5, p.1598-1606, 1967.

SIDDIQUE, I.H.; SHAH, S.M. Evaluation of polyvalent leptospiral vaccine in hamsters. *Indian Vet. J.,* v.67, p. 1006-1010, 1990.

SINGH M, O'HAGAN D.T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol.* v.33, n. 5-6: p. 469-478, 2003.

SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; et al. Evidence of cross-protection within Leptospira interrogans in an experimental model. *cine*, v.19, n. 1, p. 86-94, 2000.

SRIVASTAVA SK. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. *Indian J Med Microbiol.* v. 24, n.4, p.331-336, 2006.

STALHEIM, O.H.M. Leptospiral selection, growth, and virulence in synthetic medium. *J Bacteriol.,* v.92, n. 4, p.946-951, 1966.

STANECK, J.L., HENNEBERRY, R.C., COX, C.D. Growth requirements of pathogenic Leptospira. *Infect. Immunity*, v.7, n. 6, p. 886-897, 1973.

TABATA, R.; NETO,H.S.; ZUANAZE, M.A.F.; et al. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup sejroe. *Braz. J. Microb*., v. 33, n. 3, p. 265-268, 2002.

THIERMANN, A.B.; GARRET, L.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Leptospira interrogans serovars Hardjo and pomona in cattle. *Am. J. Vet. Res.* v. 44, n. 5, p. 884-887, 1982.

TORRES, J.B.; UENO, K.; YANAGAWA, R. Specificity of leptospiricidal activity test mediated by antiserum and complement. *Zentbl. Bakt. ParasitKde*, v. 249, n. 1, p. 124-132, 1981.

TRIFUNOVIC, Z.; MARKOVIC, R.; PUSIC, R. Results of investigations on the immunogenicity of a commercial and experimental vaccine against leptospirosis in cattle. *Vet. Glas*. v. 43, n. 10, p.869-874, 1989.

TRIPATHY, D.N.; HANSON, L.E.; KRUMREY, W.A. An in vitro Growth Inhibition Test for Leptospiral Neutralization. In: ANNUAL MEETING UNITED STATED ANIMAL HEALTH, 75, 1971, Proceedings 75th Ann Meeting. US Anim. Health A, 1972, p. 138-143.

TRIPATHY, D.N.; HANSON, L.E.; MANSFIELD, M.E. Growth inhibition test for measurement of immune response of animals vaccinated with leptospiral bacterins. In: ANNUAL MEETING UNITED STATED ANIMAL HEALTH, 77, 1973, Proceedings 77th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 1974, p.113-118.

TRIPATHY, D.N.; SMITH, A.R.; HANSON, L.E. Immunoglobulins in cattle vaccinated with Leptospiral bacterins. *Am. J. Vet. Res*. v. 36, n.12, p. 1735-1736, 1975.

TRIPATHY D.N, HANSON L.E, MANSFIELD M.E. Evaluation of the immune response of cattle to leptospiral bacterins. *Am J Vet Res*. v. 37, n. 1; p. 51-55; 1976.

TRIPATHY D.N, HANSON L.E, MANSFIELD M.E. Evaluation of serologic reactions in cattle following vaccination with multivalent leptospiral commercial bacterins and comparison of the microscopic agglutination (MA) antibody response by various laboratories. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*.; v. 83; p.180-188, 1979.

Internal Reference Guide for Potency Assay of *Leptospirose interrogans* serotype *grippotyphosa* bacterins, Iowa ,USDA Veterinary Services, 1976, 12p.

VANESELTINE, W.P.; STAPLES, S.A. Nutritional requirements of leptospirae. I. Studies on oleic acid as a growth factor for a stain of Leptospira Pomona. *J. Infect. Dis.,* v.108, p.262-269, 1961.

VANESELTINE, W.P.; ADAMAS, M.M.; PROCHAZHA, J.K.; WOOLEY, R.E. Nutritional requirements of leptospirae. II. A chemically defined medium supporting growth of Leptospira Pomona*. Bull.Ga. Acad. Sci*., v. 25, p. 222-242, 1967.

VARNEY, C. The development of a monoclonal antibody based ELISA for measuring antibodies to canine leptospiral vaccine. *Pharmeuropa,* Special Issue bio, v. 99, n.2, p. 81-84, 1999.

VANSELOW, B.A., The application of the adjuvants to veterinary medicine. *Vet. Bull*., v. 57, n. 11, p.881-896, 1987.

VASCONCELOS, S.A.; BARBARINI Jr. O.; UMEHARA, O. Leptospirose bovina níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. *Arquiv. Instit. Biol.* v.64, n.2, p.7-15, 1997.

VEGA L.E.; FLORES R.L.; MOLES Y CERVANTES L.P.; VALIENTE JQ. Evaluation of an homologous bacterin against bovine leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop*. v. 57, n. 1; p. 38-42, 2005.

VENUGOPAL K.; RATNAM S. Preparation and standardization of trivalent leptospiral vaccine*. Indian Vet. J.*, v. 68, p. 108-111, 1991.

VOGEL, H.; HUNTER, S.H. Growth of Leptospira in defined media. *J. Gen. Microbiol.* v.26, p. 223-230, 1961.

WEISSER, K.; HECHLER, U. Animal welfare aspects in the quality control of immunobiologicals. A critical evaluation of animal tests in pharmacopoeial monographs. London: Nottingham, FRAME. 1997, 1p.

WOLFF, J. W. History of Leptospira Hardjo. *American Jornal of Veterinary Research*, v.30, n.3, p.485, 1969.

YAN, Y.; CHEN, Y.; LIOU, W.; et al. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to Leptospira. *J. Chin. Med. Assoc.* v. 66, n. 4, p. 224-230, 2003.

YORK,C.J.; BAKER, J.A. A vaccination for bovine leptospirosis. *Am.J.Vet.Res.,* v.14, n.50, p. 5-8, 1953.

Anexo 1 : Resultados dos títulos obtidos no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjoprajiitino em todos os tratamentos de acordo com o tempo de colheita da amostra. Belo Horizonte, 2006/07.

Grupos	DIAS DE COLHEITA														
	0	**30**	**60**	**90**	**120**	**150**	**180**	**210**	**240**	**270**	**300**	**330**	**360**	**390**	**420**
A	0	40	1280	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
A	0	160	160	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
A	0	20	160	20	20	10	0	0	0	20	0	0	0	0	0
A	0	10	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	20	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	80	80	40	40	20	0	0	0	10	0	0	0	0	0
A	0	80	80	160	80	80	0	0	0	10	0	0	0	0	0
A	0	40	40	20	20	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
A	0	10	80	20	20	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0
B	0	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	80	160	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	20	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	20	40	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	40	40	20	40	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
B	0	20	40	20	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	10	20	20	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
C	0	40	320	80	80	20	0	0	0	20	10	0	0	0	0
C	0	40	640	320	160	40	20	0	0	20	10	0	0	0	0
C	0	20	320	160	80	20	10	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	20	160	20	20	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0
C	0	20	640	40	20	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0
C	0	80	320	80	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	10	640	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	20	640	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	20	160	80	40	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	0	20	160	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	0	320	640	160	80	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0
D	0	80	160	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	640	1280	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	80	320	160	80	20	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	0	320	640	160	80	40	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	0	20	80	40	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
D	0	20	160	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	10	640	20	40	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0
E	0	20	320	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	40	80	40	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

E	0	20	160	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	20	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	40	160	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	80	160	80	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	20	160	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	40	320	80	40	20	0	0	0	80	40	10	0	0	0
G	0	20	640	1280	160	40	20	0	0	20	10	0	0	0	0
G	0	20	160	80	80	20	10	0	0	80	40	0	0	0	0
G	0	10	160	80	20	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0
G	0	40	160	80	40	20	10	0	0	40	160	20	0	0	0
G	0	80	640	80	20	0	0	0	0	320	40	10	0	0	0
G	0	80	320	640	80	20	0	0	0	40	10	0	0	0	0
G	0	10	640	160	80	40	0	0	0	40	20	0	0	0	0
G	0	10	1280	320	160	40	20	0	0	20	0	0	0	0	0
H	0	20	40	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
H	0	10	160	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	160	80	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	20	160	80	20	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
H	0	80	160	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	40	320	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	640	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	320	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	20	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	20	160	40	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
I	0	160	320	80	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	80	320	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	20	160	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	320	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	40	640	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	160	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	80	640	20	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
J	0	160	320	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	20	160	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	20	640	80	40	0	0	0	0	80	20	0	0	0	0
J	0	80	320	20	160	20	0	0	0	40	20	0	0	0	0

J	0	40	640	160	80	20	20	0	0	10	0	0	0	0	0
J	0	10	80	160	40	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0
J	0	20	640	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	80	80	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	40	1280	160	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	20	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	40	320	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	20	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	20	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	10	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	10	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	20	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	20	320	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

† = Animais que morreram durante o experimento
0 = não reagentes
10 = Reação positiva à diluição 1/10
20 = Reação positiva à diluição 1/20
40 = Reação positiva à diluição 1/40
80 = Reação positiva à diluição 1/80
160 = Reação positiva à diluição 1/160
320 = Reação positiva à diluição 1/320
640 = Reação positiva à diluição 1/640
1280 = Reação positiva à diluição 1/1280

Anexo 2 : Resultados dos títulos em Logaritmo no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjoprajiitino.

DIA	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420
A	0	1,60206	3,10721	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
A	0	2,20412	2,20412	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	2,20412	1,30103	1,30103	1	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
A	0	1	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	2,20412	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,90309	1,90309	1,60206	1,60206	1,30103	0	0	0	1	0	0	0	0	0
A	0	1,90309	1,90309	2,20412	1,90309	1,90309	0	0	0	1	0	0	0	0	0
A	0	1,60206	1,60206	1,30103	1,30103	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
A	0	1	1,90309	1,30103	1,30103	1	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0
B	0	1	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1,60206	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1,60206	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1,90309	2,20412	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1,30103	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1,30103	1,60206	1,30103	1,30103	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1,60206	1,60206	1,30103	1,60206	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B	0	1,30103	1,60206	1,30103	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1	1,30103	1,30103	1,30103	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
C	0	1,60206	2,50515	1,90309	1,90309	1,30103	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
C	0	1,60206	2,80618	2,50515	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
C	0	1,30103	2,50515	2,20412	1,90309	1,30103	1	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1,30103	2,20412	1,30103	1,30103	0	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
C	0	1,30103	2,80618	1,60206	1,30103	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
C	0	1,90309	2,50515	1,90309	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	1	2,80618	1,30103	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	1,30103	2,80618	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	1,30103	2,20412	1,90309	1,60206	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	1,30103	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	2,50515	2,80618	2,20412	1,90309	0	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
D	0	1,90309	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	2,80618	3,10721	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	1,90309	2,50515	2,20412	1,90309	1,30103	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	2,50515	2,80618	2,20412	1,90309	1,60206	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	1,30103	1,90309	1,60206	1,30103	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
D	0	1,30103	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	1	2,80618	1,30103	1,60206	0	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
E	0	1,30103	2,50515	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1,60206	1,90309	1,60206	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1,30103	2,20412	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1,30103	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	1,60206	2,20412	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1,90309	2,20412	1,90309	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1,30103	2,20412	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	1,60206	2,50515	1,90309	1,60206	1,30103	0	0	0	1,90309	1,60206	1	0	0	0
G	0	1,30103	2,80618	3,10721	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
G	0	1,30103	2,20412	1,90309	1,90309	1,30103	1	0	0	1,90309	1,60206	0	0	0	0
G	0	1	2,20412	1,90309	1,30103	0	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
G	0	1,60206	2,20412	1,90309	1,60206	1,30103	1	0	0	1,60206	2,20412	1,30103	0	0	0
G	0	1,90309	2,80618	1,90309	1,30103	0	0	0	0	2,50515	1,60206	1	0	0	0
G	0	1,90309	2,50515	2,80618	1,90309	1,30103	0	0	0	1,60206	1	0	0	0	0
G	0	1	2,80618	2,20412	1,90309	1,60206	0	0	0	1,60206	1,30103	0	0	0	0
G	0	1	3,10721	2,50515	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
H	0	1,30103	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
H	0	1	2,20412	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	2,20412	1,90309	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1,30103	2,20412	1,90309	1,30103	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H	0	1,90309	2,20412	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1,60206	2,50515	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	2,80618	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	2,50515	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1,30103	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,30103	2,20412	1,60206	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
I	0	2,20412	2,50515	1,90309	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,90309	2,50515	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,30103	2,20412	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	2,50515	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,60206	2,80618	1,60206	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	2,20412	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,90309	2,80618	1,30103	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
J	0	2,20412	2,50515	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1,30103	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1,30103	2,80618	1,90309	1,60206	0	0	0	0	1,90309	1,30103	0	0	0	0
J	0	1,90309	2,50515	1,30103	2,20412	1,30103	0	0	0	1,60206	1,30103	0	0	0	0
J	0	1,60206	2,80618	2,20412	1,90309	1,30103	1,30103	0	0	1	0	0	0	0	0
J	0	1	1,90309	2,20412	1,60206	0	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
J	0	1,30103	2,80618	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1,90309	1,90309	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1,60206	3,10721	2,20412	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1,30103	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1,60206	2,50515	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1,30103	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K	0	1,30103	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1,30103	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1,30103	2,50515	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

† = Animais que morreram durante o experimento

Anexo 3 : Resultados dos títulos obtidos no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma em todos os tratamentos de acordo com o tempo de colheita da amostra. Belo Horizonte, 2006/07.

Grupos	DIAS DE COLHEITA														
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420
A	0	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	10	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
A	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	10	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
B	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	80	40	20	0	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0
C	0	80	40	20	10	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0
C	0	80	40	20	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	40	20	0	0	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0
C	0	40	160	20	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	40	20	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	20	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	40	160	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	20	80	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
D	0	10	40	20	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	0	40	20	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
D	0	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	20	160	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	10	20	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	0	20	20	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	0	10	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	10	20	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	10	160	20	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0
E	0	10	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	10	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	10	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	10	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

E	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	160	160	80	40	20	10	0	0	20	10	0	0	0	0
G	0	40	160	1280	80	40	10	0	0	640	80	10	0	0	0
G	0	40	80	40	20	20	0	0	0	80	40	0	0	0	0
G	0	40	160	40	20	10	0	0	0	80	10	0	0	0	0
G	0	40	160	160	80	10	10	0	0	320	80	0	0	0	0
G	0	160	640	160	20	10	0	0	0	80	40	0	0	0	0
G	0	80	640	160	80	40	0	0	0	1280	80	0	0	0	0
G	0	40	160	160	80	40	0	0	0	320	40	0	0	0	0
G	0	20	640	320	80	20	0	0	0	20	0	0	0	0	0
H	0	0	20	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
H	0	0	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	20	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	20	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	20	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	80	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	20	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	10	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	10	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	10	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	10	40	20	20	0	0	0	0	40	10	0	0	0	0
J	0	10	160	80	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
J	0	0	20	40	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
J	0	0	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	10	640	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K	0	0	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

† = Animais que morreram durante o experimento

0 = não reagentes
10 = Reação positiva à diluição 1/10
20 = Reação positiva à diluição 1/20
40 = Reação positiva à diluição 1/40
80 = Reação positiva à diluição 1/80
160 = Reação positiva à diluição 1/160
320 = Reação positiva à diluição 1/320
640 = Reação positiva à diluição 1/640
1280 = Reação positiva à diluição 1/1280

Anexo 4 : Resultados dos Títulos em Logaritmo no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma.

DIA	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420
A	0	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1,90309	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
C	0	1,90309	1,60206	1,30103	1	0	0	0	0	1,60206	0	0	0	0	0
C	0	1,90309	1,60206	1,30103	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
C	0	1,60206	2,20412	1,30103	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1,60206	1,30103	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1,30103	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	1,60206	2,20412	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1,30103	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
D	0	1	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	1,60206	1,30103	1,30103	0	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
D	0	1	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	1,30103	2,20412	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	1	1,30103	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	1,30103	1,30103	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	1	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	1	1,30103	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	1	2,20412	1,30103	0	0	0	0	0	1,60206	0	0	0	0	0
E	0	1	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	1	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	2,20412	2,20412	1,90309	1,60206	1,30103	1	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
G	0	1,60206	2,20412	3,10721	1,90309	1,60206	1	0	0	2,80618	1,90309	1	0	0	0
G	0	1,60206	1,90309	1,60206	1,30103	1,30103	0	0	0	1,90309	1,60206	0	0	0	0
G	0	1,60206	2,20412	1,60206	1,30103	1	0	0	0	1,90309	1	0	0	0	0
G	0	1,60206	2,20412	2,20412	1,90309	1	1	0	0	2,50515	1,90309	0	0	0	0
G	0	2,20412	2,80618	2,20412	1,30103	1	0	0	0	1,90309	1,60206	0	0	0	0
G	0	1,90309	2,80618	2,20412	1,90309	1,60206	0	0	0	3,10721	1,90309	0	0	0	0
G	0	1,60206	2,20412	2,20412	1,90309	1,60206	0	0	0	2,50515	1,60206	0	0	0	0
G	0	1,30103	2,80618	2,50515	1,90309	1,30103	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
H	0	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H	0	0	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1,30103	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1,30103	2,20412	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,30103	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,30103	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1	1,60206	1,30103	1,30103	0	0	0	0	1,60206	1	0	0	0	0
J	0	1	2,20412	1,90309	1	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
J	0	0	1,30103	1,60206	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
J	0	0	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1	2,80618	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	2,20412	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

† = Animais que morreram durante o experimento

Anexo 5 : Resultados dos títulos obtidos no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjobovis em todos os tratamentos de acordo com o tempo de colheita da amostra. Belo Horizonte, 2006/07.

Grupos	DIAS DE COLHEITA														
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420
A	0	20	640	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	10	80	20	10	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0
A	0	10	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	20	80	40	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	20	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	10	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	10	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0
B	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	20	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	40	160	80	40	20	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	20	320	320	80	40	0	0	0	20	0	0	0	0	0
C	0	10	160	160	80	20	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	10	80	20	20	20	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	10	320	40	20	20	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	20	320	80	80	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	10	320	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	10	640	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
C	0	10	160	80	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	10	160	40	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
D	0	160	80	80	80	0	0	0	0	40	10	0	0	0	0
D	0	40	80	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	160	640	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	40	160	80	80	40	0	0	0	20	10	0	0	0	0
D	0	80	160	80	80	40	0	0	0	160	20	0	0	0	0
D	0	10	80	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	0	10	80	40	40	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
D	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	20	640	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
E	0	10	160	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	10	40	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	20	160	40	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
E	0	10	40	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
E	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	20	160	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0

E	0	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	20	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	20	320	80	20	10	0	0	0	160	80	10	0	0	0
G	0	40	640	1280	80	40	0	0	0	40	40	0	0	0	0
G	0	10	160	80	40	20	0	0	0	80	40	0	0	0	0
G	0	20	160	20	20	0	0	0	0	80	40	0	0	0	0
G	0	10	160	80	40	20	10	0	0	40	10	0	0	0	0
G	0	20	640	20	0	0	0	0	0	640	160	10	0	0	0
G	0	10	640	320	80	20	0	0	0	160	80	10	0	0	0
G	0	10	640	160	40	40	0	0	0	80	20	0	0	0	0
G	0	10	1280	320	20	0	0	0	0	80	10	0	0	0	0
H	0	10	40	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	160	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	80	40	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	640	80	80	20	0	0	0	10	0	0	0	0	0
H	0	20	80	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	320	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	640	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	160	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	10	80	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	20	160	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	40	320	80	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	20	320	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	160	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	10	160	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	20	320	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	40	160	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	40	640	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	0	160	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	10	80	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	20	160	80	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
J	0	40	160	80	20	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
J	0	10	320	160	40	10	0	0	0	40	10	0	0	0	0
J	0	10	80	320	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	20	320	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	40	40	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	10	1280	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K	0	20	320	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	10	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	10	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	10	80	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	10	40	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	10	80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	10	160	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

† = Animais que morreram durante o experimento

0 = não reagentes
10 = Reação positiva à diluição 1/10
20 = Reação positiva à diluição 1/20
40 = Reação positiva à diluição 1/40
80 = Reação positiva à diluição 1/80
160 = Reação positiva à diluição 1/160
320 = Reação positiva à diluição 1/320
640 = Reação positiva à diluição 1/640
1280 = Reação positiva à diluição 1/1280

Anexo 6 : Resultados dos Títulos em Logaritmo no Teste de Microaglutinação para a sorovariedade Hardjobovis.

	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420
A	0	1,30103	2,80618	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1	1,90309	1,30103	1	0	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0
A	0	1	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	1,90309	1,60206	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1,60206	0	0	0	0	0
B	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1,60206	2,20412	1,90309	1,60206	1,30103	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1,30103	2,50515	2,50515	1,90309	1,60206	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
C	0	1	2,20412	2,20412	1,90309	1,30103	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1	1,90309	1,30103	1,30103	1,30103	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1	2,50515	1,60206	1,30103	1,30103	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1,30103	2,50515	1,90309	1,90309	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	1	2,50515	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	1	2,80618	1,60206	1,30103	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	1	2,20412	1,90309	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	1	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
D	0	2,20412	1,90309	1,90309	1,90309	0	0	0	0	1,60206	1	0	0	0	0
D	0	1,60206	1,90309	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	2,20412	2,80618	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	1,60206	2,20412	1,90309	1,90309	1,60206	0	0	0	1,30103	1	0	0	0	0
D	0	1,90309	2,20412	1,90309	1,90309	1,60206	0	0	0	2,20412	1,30103	0	0	0	0
D	0	1	1,90309	1,60206	1,30103	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	1	1,90309	1,60206	1,60206	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	1,30103	2,80618	1,60206	1,30103	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
E	0	1	2,20412	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1	1,60206	1,30103	1,30103	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1,30103	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
E	0	1	1,60206	0	0	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
E	0	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0	1,30103	2,20412	0	0	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
E	0	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	1,30103	1,90309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	1,30103	2,50515	1,90309	1,30103	1	0	0	0	2,20412	1,90309	1	0	0	0
G	0	1,60206	2,80618	3,10721	1,90309	1,60206	0	0	0	1,60206	1,60206	0	0	0	0
G	0	1	2,20412	1,90309	1,60206	1,30103	0	0	0	1,90309	1,60206	0	0	0	0
G	0	1,30103	2,20412	1,30103	1,30103	0	0	0	0	1,90309	1,60206	0	0	0	0
G	0	1	2,20412	1,90309	1,60206	1,30103	1	0	0	1,60206	1	0	0	0	0
G	0	1,30103	2,80618	1,30103	0	0	0	0	0	2,80618	2,20412	1	0	0	0
G	0	1	2,80618	2,50515	1,90309	1,30103	0	0	0	2,20412	1,90309	1	0	0	0
G	0	1	2,80618	2,20412	1,60206	1,60206	0	0	0	1,90309	1,30103	0	0	0	0
G	0	1	3,10721	2,50515	1,30103	0	0	0	0	1,90309	1	0	0	0	0
H	0	1	1,60206	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	2,20412	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	1,90309	1,60206	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	2,80618	1,90309	1,90309	1,30103	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H	0	1,30103	1,90309	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	2,50515	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	2,80618	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	2,20412	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	1	1,90309	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,30103	2,20412	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,60206	2,50515	1,90309	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,30103	2,50515	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	2,20412	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,30103	2,50515	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,60206	2,20412	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1,60206	2,80618	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	0	2,20412	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1	1,90309	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1,30103	2,20412	1,90309	1,30103	0	0	0	0	1,30103	0	0	0	0	0
J	0	1,60206	2,20412	1,90309	1,30103	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
J	0	1	2,50515	2,20412	1,60206	1	0	0	0	1,60206	1	0	0	0	0
J	0	1	1,90309	2,50515	1,60206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1,30103	2,50515	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1,60206	1,60206	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	1	3,10721	1,90309	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1,30103	2,50515	1,60206	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K	0	1	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1	1,90309	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1	1,60206	1,30103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1	1,90309	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	1	2,20412	1,60206	1,30103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

† = Animais que morreram durante o experimento

Anexo 7: Resultados do Teste de Elisa das DO(s) normalizadas utilizando a sorovariedade Hardjoprajiitino amostra Norma.

DIA	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420
A	-0,058	0,046	0,110	0,156	0,049	0,004	0,008	-0,022	-0,013	0,292	0,045	0,058	0,039	0,052	-0,025
A	-0,011	0,25	1,040	0,179	0,113	0,118	0,093	0,048	0,054	0,385	0,129	0,144	0,095	0,081	-0,008
A	-0,015	0,305	0,389	0,472	0,429	0,485	0,425	0,220	0,092	0,646	0,338	0,096	0,051	0,051	0,024
A	0,002	0,139	0,125	0,147	0,130	0,101	0,079	0,044	0,052	0,187	0,082	0,063	0,037	0,055	-0,023
A	-0,024	0,119	0,131	0,148	0,010	0,064	0,037	0,014	0,016	0,257	0,189	0,144	0,118	0,073	0,010
A	0,003	0,386	0,705	0,527	0,484	0,381	0,234	0,132	0,132	0,412	0,277	0,167	0,138	0,126	-0,037
A	0,013	0,336	0,545	0,508	0,418	0,344	0,212	0,134	0,137	0,472	0,229	0,235	0,092	0,100	-0,013
A	-0,011	0,154	0,340	0,336	0,268	0,108	0,051	0,018	-0,016	0,252	0,167	0,127	0,086	0,092	-0,015
A	-0,050	0,076	0,136	0,245	0,220	0,376	0,264	0,043	0,050	0,375	0,178	0,120	0,067	0,078	-0,020
B	-0,056	0,054	0,095	0,117	-0,029	0,022	0,000	-0,026	-0,011	0,020	0,040	0,061	0,030	-0,016	-0,018
B	-0,049	0,046	0,089	0,138	0,168	0,013	0,001	-0,030	-0,024	0,220	0,192	0,088	0,059	0,046	-0,020
B	0,050	0,306	0,300	0,155	0,057	0,139	0,043	-0,043	-0,027	0,081	0,035	0,032	-0,015	-0,024	-0,025
B	0,005	0,171	0,191	0,158	0,039	0,014	0,015	0,010	0,004	0,408	0,193	0,129	0,103	0,106	0,016
B	-0,008	0,067	0,106	0,152	0,081	0,047	0,024	0,019	-0,022	0,235	0,177	0,145	0,091	0,057	-0,029
B	0,000	0,122	0,151	0,183	0,177	0,168	0,134	0,034	0,033	0,346	0,219	0,172	0,149	0,056	-0,003
B	0,023	0,145	0,170	0,260	0,242	0,200	0,112	0,016	0,016	0,311	0,277	0,162	0,073	0,009	-0,004
B	-0,046	0,373	0,354	0,250	0,077	0,144	0,026	-0,027	-0,002	0,172	0,109	0,088	0,059	-0,009	-0,023
B	-0,026	0,220	0,230	0,226	0,032	0,146	0,037	-0,005	0,003	0,273	0,218	0,214	0,127	-0,002	-0,019
C	-0,055	0,430	0,400	0,396	0,634	0,361	0,268	0,036	0,034	0,640	0,306	0,286	0,247	0,176	-0,003
C	-0,063	0,808	0,705	0,916	0,839	0,846	0,489	0,119	0,083	0,591	0,580	0,457	0,178	0,148	0,000
C	-0,007	0,460	0,425	0,963	0,990	0,615	0,321	0,184	0,141	0,628	0,495	0,491	0,323	0,182	0,037
C	0,058	0,176	0,194	0,143	0,123	0,108	0,037	-0,017	-0,021	0,535	0,393	0,377	0,263	0,178	0,004
C	-0,014	0,318	0,309	0,373	0,371	0,203	0,075	-0,013	-0,010	0,437	0,284	0,220	0,195	0,142	-0,022
C	-0,050	0,546	0,494	0,548	0,568	0,484	0,218	0,086	0,035	0,287	0,266	0,174	0,125	0,153	-0,008
C	0,040	0,500	0,457	0,318	0,290	0,317	0,109	-0,016	-0,022	0,358	0,335	0,205	0,163	0,062	-0,006
C	0,022	0,794	0,694	0,895	0,585	0,330	0,275	0,031	0,026	0,409	0,351	0,335	0,311	0,183	0,028
C	-0,025	0,508	0,463	0,551	0,568	0,354	0,208	0,114	0,103	0,452	0,429	0,280	0,247	0,162	0,003
D	-0,060	0,197	0,212	0,262	0,396	0,270	0,156	0,048	0,036	0,468	0,378	0,163	0,127	0,083	0,122
D	-0,007	0,054	0,095	0,370	0,705	0,457	0,241	0,230	0,164	0,685	0,679	0,550	0,508	0,309	0,033
D	0,029	0,251	0,255	0,288	0,130	0,135	0,079	0,043	-0,013	0,352	0,162	0,154	0,056	-0,004	-0,014
D	-0,045	0,379	0,359	0,362	0,487	0,302	0,192	0,149	0,089	0,388	0,322	0,321	0,280	0,076	0,000

D	-0,019	0,136	0,162	0,278	0,573	0,407	0,377	0,135	0,138	0,500	0,474	0,268	0,244	0,087	0,016
D	0,056	0,936	0,809	0,865	0,885	0,677	0,396	0,187	0,124	0,591	0,556	0,516	0,233	0,148	0,061
D	0,028	0,121	0,150	0,204	0,405	0,326	0,202	0,141	0,108	0,290	0,230	0,227	0,135	0,113	0,014
D	0,007	0,154	0,177	0,224	0,484	0,484	0,346	0,156	0,101	0,532	0,211	0,183	0,103	0,108	0,014
D	-0,057	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	-0,026	0,564	0,509	1,049	1,257	0,733	0,504	0,233	0,183	1,000	0,432	0,436	0,339	0,177	0,029
E	0,023	0,958	0,827	0,857	0,919	0,594	0,409	0,160	0,095	0,305	0,262	0,182	0,111	0,110	0,019
E	-0,035	0,519	0,472	0,534	0,362	0,177	0,172	0,108	0,081	0,343	0,179	0,100	0,070	0,066	-0,013
E	-0,049	0,413	0,386	0,450	0,410	0,176	0,162	0,140	0,083	0,532	0,177	0,171	0,146	0,117	0,044
E	0,009	0,191	0,207	0,208	0,124	0,071	0,040	0,018	-0,003	0,377	0,248	0,204	0,184	0,080	-0,001
E	-0,020	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	-0,004	0,142	0,167	0,176	0,141	0,191	0,125	0,018	0,018	0,219	0,180	0,098	0,072	0,072	-0,042
E	-0,011	0,278	0,277	0,302	0,116	0,076	-0,011	-0,035	-0,030	0,369	0,087	0,096	0,071	0,012	-0,027
E	-0,055	0,341	0,328	0,402	0,190	0,090	0,031	-0,022	-0,045	0,215	0,066	0,084	0,059	0,015	0,001
C.-	0,037	0,035	0,080	0,106	0,090	0,119	0,077	0,032	-0,001	0,043	0,047	0,054	0,027	-0,024	-0,003
C.-	0,006	0,049	0,092	0,058	0,037	0,064	0,064	0,044	0,052	0,020	0,042	0,022	-0,008	-0,007	-0,008
C.-	0,052	0,173	0,192	0,009	0,129	0,094	0,036	0,035	0,038	0,048	0,007	0,012	-0,009	-0,005	-0,018
C.-	-0,005	-0,009	0,045	0,027	-0,065	0,010	-0,022	-0,027	-0,020	0,026	-0,037	-0,010	-0,039	-0,012	-0,015
C.-	0,100	0,217	0,228	0,111	0,181	0,195	0,089	0,074	0,077	0,116	0,073	0,098	0,057	0,050	0,054
C.-	0,275	0,202	0,215	0,032	0,133	0,071	0,043	0,027	0,043	0,136	0,047	0,138	0,066	0,046	0,039
C.-	0,021	0,214	0,225	0,056	0,043	0,054	0,092	0,043	0,045	0,071	0,005	0,140	0,075	-0,006	-0,014
C.-	0,048	0,005	0,056	0,042	0,049	0,099	0,028	0,032	0,039	0,032	0,047	0,052	0,019	0,000	0,011
C.-	-0,001	0,075	0,113	0,056	0,067	0,068	0,070	0,057	0,098	0,050	0,050	0,059	0,038	-0,001	-0,006
G	-0,043	0,525	0,476	0,530	0,946	0,797	0,413	0,128	0,100	0,962	0,830	0,730	0,590	0,519	0,101
G	-0,044	1,273	1,082	1,888	1,565	1,323	0,980	0,721	0,369	1,108	0,947	0,661	0,204	0,098	0,086
G	-0,011	0,373	0,354	0,677	0,999	0,635	0,341	0,235	0,202	0,586	0,372	0,280	0,171	0,167	0,143
G	-0,007	0,278	0,277	0,226	0,391	0,463	0,249	0,209	0,177	0,577	0,546	0,450	0,208	0,192	0,076
G	-0,034	1,140	0,974	0,897	0,813	0,584	0,533	0,262	0,228	1,039	0,563	0,442	0,247	0,242	0,156
G	-0,048	0,363	0,345	0,320	0,118	0,139	0,277	0,266	0,160	0,478	0,179	0,173	0,138	0,020	0,009
G	-0,037	1,129	0,965	1,072	1,443	0,800	0,764	0,518	0,400	0,942	0,684	0,394	0,218	0,144	0,110
G	0,001	1,078	0,925	0,923	1,416	0,786	0,670	0,389	0,295	1,034	0,913	0,592	0,442	0,334	0,123
G	-0,037	0,757	0,665	0,954	1,387	0,687	0,622	0,506	0,217	0,902	0,534	0,381	0,359	0,169	0,165
H	-0,048	0,180	0,198	0,260	0,523	0,208	0,163	0,052	0,054	0,235	0,098	0,065	0,013	0,016	-0,016

H	0,009	0,447	0,413	0,449	0,467	0,137	0,063	0,038	0,016	0,272	0,170	0,103	0,046	0,040	0,054
H	0,025	0,766	0,672	1,215	1,133	0,691	0,656	0,436	0,398	0,744	0,588	0,472	0,209	0,159	0,051
H	-0,039	0,523	0,475	0,717	1,049	1,163	0,801	0,435	0,336	0,634	0,534	0,365	0,251	0,179	0,006
H	0,043	0,130	0,157	0,269	0,276	0,090	0,140	0,099	0,094	0,107	0,056	0,070	0,029	0,041	0,008
H	0,032	0,415	0,387	0,424	0,251	0,096	0,102	0,053	0,036	0,318	0,158	0,049	0,013	0,029	0,011
H	-0,027	0,101	0,134	0,151	0,149	0,003	0,000	-0,021	-0,013	0,115	0,026	0,042	-0,013	-0,014	-0,003
H	0,072	0,237	0,244	0,303	0,247	0,193	0,093	0,074	0,020	0,189	0,066	0,043	0,000	0,000	-0,001
H	-0,036	0,115	0,145	0,248	0,172	0,108	0,069	0,031	0,026	0,357	0,180	0,170	0,109	0,082	0,011
I	-0,014	0,139	0,165	0,135	0,003	0,003	-0,003	-0,022	-0,016	0,210	0,080	-0,026	0,020	0,031	-0,029
I	0,025	0,670	0,594	0,597	0,729	0,439	0,298	0,161	0,117	0,260	0,531	0,393	0,118	0,122	-0,001
I	-0,019	0,840	0,731	0,981	0,943	0,887	0,554	0,359	0,212	0,871	0,698	0,437	0,228	0,219	0,077
I	-0,015	0,314	0,306	0,403	0,371	0,216	0,137	0,026	-0,015	0,289	0,203	0,096	0,075	0,077	-0,015
I	0,017	0,356	0,340	0,269	0,104	0,302	0,209	0,134	0,113	0,212	0,144	0,068	0,011	0,011	0,009
I	0,051	0,771	0,676	1,222	1,167	0,733	0,315	0,239	0,137	0,645	0,448	0,317	0,184	0,096	0,010
I	-0,064	1,175	1,002	1,028	0,704	0,430	0,323	0,154	0,086	0,539	0,271	0,285	0,180	0,107	0,039
I	-0,010	0,708	0,625	0,644	0,354	0,302	0,065	0,045	0,040	0,232	0,167	0,158	0,142	0,082	-0,011
I	-0,057	0,473	0,434	0,415	0,261	0,207	0,114	0,016	-0,003	0,283	0,185	0,197	0,108	0,045	-0,015
J	-0,025	0,203	0,217	0,272	0,248	0,131	0,049	0,019	0,024	0,152	0,068	0,070	0,047	0,021	0,011
J	-0,006	0,950	0,821	0,807	0,594	0,294	0,172	0,042	0,029	0,464	0,173	0,174	0,168	0,137	0,038
J	-0,034	0,332	0,321	0,499	0,523	0,315	0,169	0,053	0,054	0,451	0,269	0,241	0,153	0,073	0,048
J	-0,028	1,808	1,515	1,681	0,822	1,443	1,015	0,695	0,389	0,899	0,639	0,630	0,400	0,066	-0,016
J	-0,010	0,750	0,658	0,651	0,758	0,734	0,568	0,351	0,109	0,692	0,333	0,332	0,218	0,187	0,023
J	-0,039	0,823	0,718	0,782	0,503	0,318	0,335	0,118	0,013	0,185	0,160	0,133	0,091	0,097	0,022
J	-0,004	0,171	0,191	0,188	0,489	0,329	0,194	0,096	0,091	0,665	0,239	0,252	0,166	0,080	0,034
J	-0,010	0,228	0,236	0,274	0,404	0,335	0,204	0,152	0,048	0,263	0,136	0,107	0,068	0,083	0,011
J	-0,028	0,257	0,260	0,277	0,495	0,240	0,163	0,093	0,047	0,417	0,307	0,211	0,061	0,067	0,009
K	-0,019	0,297	0,292	0,201	-0,005	0,077	0,080	0,078	0,033	0,175	0,077	0,081	0,035	0,019	-0,004
K	-0,002	0,358	0,342	0,356	0,147	0,126	0,050	0,019	-0,025	0,101	-0,002	0,054	0,009	0,040	-0,001
K	0,047	0,277	0,276	0,262	0,147	0,198	0,179	0,080	0,010	0,146	-0,012	0,058	0,009	0,011	-0,028
K	-0,033	1,609	1,354	0,120	0,147	0,117	0,047	0,032	0,031	0,156	0,019	0,020	-0,016	-0,016	-0,015
K	0,010	0,370	0,351	0,780	0,700	0,671	0,393	0,332	0,254	0,415	0,224	0,131	0,100	0,070	0,034
K	-0,021	0,132	0,158	0,179	0,087	0,139	0,049	-0,006	-0,020	0,140	0,020	0,006	-0,003	0,009	0,011
K	0,022	0,545	0,493	0,491	0,558	0,440	0,204	0,096	0,022	0,326	0,152	0,113	0,094	0,047	-0,042

K	0,054	0,454	0,420	0,485	0,420	0,237	0,140	0,032	-0,010	0,176	0,106	0,097	0,049	0,044	0,034
K	-0,026	0,202	0,215	0,229	0,049	0,050	0,020	0,006	0,010	0,106	0,083	0,086	0,048	0,057	0,037

† = Animais que morreram durante o experimento

Anexo 8: Resultados do Teste de Elisa das DO(s) normalizadas utilizando a sorovariedade Hardjoprajiitino.

	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420
A	-0,040	0,000	0,140	0,123	0,080	0,056	0,044	0,015	0,016	0,104	0,047	0,025	0,012	-0,002	-0,008
A	0,120	1,266	0,911	0,242	0,098	0,066	0,097	0,057	0,054	0,221	0,096	0,060	-0,001	0,000	0,019
A	0,014	0,979	0,658	0,408	0,365	0,357	0,329	0,202	0,184	0,460	0,392	0,225	0,074	0,010	0,028
A	0,062	0,278	0,225	0,185	0,118	0,106	0,097	0,091	0,083	0,190	0,130	0,022	0,004	0,004	0,016
A	-0,028	0,342	0,312	0,309	0,107	0,133	0,077	0,020	0,022	0,366	0,323	0,231	0,117	0,022	0,028
A	0,043	1,279	0,851	0,444	0,335	0,211	0,147	0,143	0,114	0,335	0,197	0,075	0,061	-0,017	0,007
A	0,107	0,312	0,455	0,461	0,393	0,205	0,121	0,070	0,071	0,276	0,255	0,159	0,084	0,033	0,042
A	0,061	0,619	0,318	0,280	0,226	0,068	0,090	0,068	0,066	0,124	0,110	0,091	0,046	0,044	0,029
A	-0,031	0,189	0,290	0,211	0,183	0,149	0,053	0,035	0,038	0,200	0,157	0,072	0,064	0,004	0,023
B	-0,036	0,060	0,125	0,088	0,060	0,057	0,050	0,010	0,013	0,367	0,107	0,001	0,015	0,011	-0,011
B	-0,036	0,104	0,088	0,125	0,141	0,135	0,106	0,076	0,002	0,091	0,066	0,025	0,013	-0,008	-0,009
B	0,004	0,202	0,227	0,138	0,110	0,017	0,003	-0,019	-0,011	0,138	0,032	0,009	0,002	0,001	-0,017
B	0,087	0,289	0,239	0,155	0,130	0,106	0,108	0,023	0,034	0,707	0,331	0,164	0,108	0,045	0,012
B	0,014	0,166	0,131	0,126	0,079	0,013	0,040	0,036	0,022	0,407	0,150	0,094	0,055	-0,021	0,007
B	0,095	0,545	0,283	0,152	0,150	0,104	0,099	0,038	0,025	0,232	0,137	0,106	0,056	0,035	0,019
B	0,205	0,299	0,222	0,215	0,202	0,108	0,104	0,030	0,029	0,166	0,149	0,101	0,089	0,050	0,075
B	0,006	0,137	0,282	0,197	0,083	0,090	0,101	-0,008	-0,002	0,090	0,083	0,043	0,041	-0,029	-0,005
B	-0,048	0,194	0,182	0,178	0,073	0,086	0,096	0,024	0,027	0,198	0,097	0,082	0,050	0,022	0,045
C	-0,045	0,640	0,407	0,333	0,482	0,349	0,221	0,128	0,052	0,277	0,264	0,235	0,064	0,048	0,068
C	-0,025	0,424	0,807	0,756	0,739	0,696	0,496	0,122	0,066	0,385	0,350	0,143	0,150	0,054	0,064
C	-0,015	0,987	0,840	0,963	1,036	0,573	0,460	0,126	0,091	0,515	0,319	0,468	0,424	0,065	0,049
C	0,071	0,393	0,328	0,349	0,470	0,192	0,152	0,106	0,087	0,478	0,309	0,268	0,227	0,069	0,067
C	0,037	0,157	0,295	0,352	0,422	0,200	0,189	0,007	-0,004	0,386	0,262	0,205	0,146	0,051	0,041
C	0,024	0,453	0,525	0,479	0,504	0,435	0,461	0,090	0,089	0,213	0,177	0,092	0,062	0,064	0,055
C	-0,013	0,256	0,453	0,372	0,424	0,161	0,132	-0,010	-0,003	0,271	0,194	0,141	0,093	-0,005	-0,007
C	0,001	1,400	1,118	0,744	0,459	0,294	0,243	0,030	0,027	0,398	0,333	0,220	0,115	0,070	0,049
C	0,017	0,301	0,557	0,452	0,471	0,331	0,305	0,198	0,111	0,255	0,249	0,187	0,068	0,047	0,048
D	-0,017	0,162	0,215	0,220	0,395	0,237	0,125	0,083	0,077	0,277	0,105	0,102	0,064	0,034	0,011
D	-0,041	0,161	0,420	0,400	0,627	0,397	0,334	0,188	0,052	0,581	0,590	0,513	0,174	0,159	0,158
D	-0,004	0,169	0,192	0,243	0,120	0,128	0,090	0,075	0,046	0,195	0,146	0,040	0,049	-0,013	-0,002
D	-0,007	0,204	0,374	0,431	0,430	0,257	0,120	0,132	0,085	0,351	0,285	0,255	0,188	0,044	0,058

D	0,016	0,297	0,401	0,419	0,471	0,317	0,310	0,118	0,110	0,399	0,373	0,228	0,104	0,058	0,066
D	0,022	1,152	1,238	0,838	0,834	0,531	0,461	0,195	0,138	0,443	0,431	0,351	0,198	0,197	0,168
D	0,102	0,517	0,658	0,564	0,444	0,244	0,210	0,125	0,091	0,211	0,182	0,150	0,091	0,027	0,032
D	0,103	0,527	0,573	0,398	0,464	0,328	0,252	0,136	0,094	0,286	0,162	0,144	0,051	0,047	0,051
D	-0,054	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0,064	0,255	1,253	0,894	1,020	0,577	0,376	0,211	0,187	0,711	0,397	0,329	0,254	0,082	0,091
E	0,104	0,869	1,045	0,848	0,740	0,475	0,377	0,181	0,120	0,214	0,148	0,135	0,081	0,025	0,055
E	0,034	0,499	0,835	0,537	0,556	0,143	0,133	0,125	0,067	0,159	0,150	0,132	0,076	0,027	0,032
E	0,068	0,789	0,778	0,536	0,338	0,155	0,157	0,068	0,065	0,419	0,192	0,125	0,071	0,003	0,019
E	0,093	0,219	0,245	0,230	0,295	0,053	0,114	0,015	0,025	0,281	0,222	0,165	0,079	-0,003	0,004
E	0,072	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0,113	0,380	0,243	0,140	0,134	0,185	0,051	0,030	0,027	0,145	0,068	-0,013	0,013	-0,002	0,004
E	0,074	0,053	0,219	0,243	0,194	0,123	0,135	0,053	0,055	0,214	0,067	0,058	0,052	-0,014	0,019
E	0,011	0,547	0,380	0,345	0,179	0,052	0,107	-0,007	-0,023	0,139	0,041	0,028	0,008	-0,037	-0,009
C.-	0,108	0,043	0,061	0,089	0,067	0,058	0,065	0,062	0,067	0,058	-0,002	-0,021	0,423	-0,035	-0,026
C.-	0,022	0,038	0,009	0,060	0,024	0,033	0,069	0,064	0,053	0,009	0,045	-0,019	-0,015	-0,018	-0,029
C.-	0,125	0,059	0,113	0,078	0,057	0,073	0,052	0,048	0,072	0,073	0,019	-0,004	0,008	-0,043	-0,037
C.-	0,018	0,037	0,035	0,031	0,018	0,005	-0,007	-0,009	0,036	0,008	0,019	0,036	0,017	-0,047	-0,028
C.-	0,111	0,099	0,067	0,060	0,071	0,050	0,062	0,053	0,100	0,083	0,042	0,063	0,028	-0,015	-0,018
C.-	0,043	0,057	0,157	0,139	0,111	0,061	0,075	0,021	0,055	0,082	0,065	0,033	0,000	-0,010	0,017
C.-	0,075	0,088	0,118	0,070	0,090	0,104	0,068	0,069	0,087	0,052	0,018	0,039	0,025	-0,013	0,007
C.-	0,010	0,036	0,031	0,023	0,015	0,022	0,019	0,033	0,032	0,043	0,033	0,019	0,017	0,012	-0,007
C.-	0,043	0,055	0,067	0,070	0,059	0,048	0,052	0,040	0,099	0,046	0,002	-0,006	-0,005	-0,014	0,005
G	0,037	0,398	1,198	0,468	0,468	0,624	0,281	0,334	0,150	0,655	0,585	0,225	0,169	0,111	0,100
G	0,094	0,943	1,636	1,676	0,986	0,771	0,846	0,586	0,359	0,823	0,634	0,577	0,445	0,182	0,115
G	0,019	1,002	1,304	0,731	0,817	0,527	0,517	0,220	0,183	0,368	0,295	0,176	0,138	0,131	0,109
G	0,025	0,236	0,769	0,425	0,325	0,358	0,214	0,129	0,123	0,477	0,439	0,290	0,286	0,131	0,113
G	0,037	0,983	1,154	0,840	0,701	0,582	0,476	0,344	0,221	0,712	0,517	0,383	0,406	0,140	0,128
G	0,109	0,818	1,259	0,850	0,632	0,213	0,214	0,230	0,069	0,333	0,173	0,138	0,101	0,078	0,088
G	0,041	1,309	1,369	0,940	1,245	0,709	0,702	0,579	0,408	0,740	0,620	0,431	0,184	0,175	0,106
0 G	0,040	1,405	1,458	0,836	1,139	0,723	0,603	0,382	0,312	0,756	0,623	0,583	0,173	0,171	0,171
G	0,060	0,921	1,521	0,823	1,129	0,444	0,480	0,416	0,243	0,612	0,484	0,374	0,297	0,099	0,078
H	0,059	0,343	0,743	0,585	0,431	0,217	0,177	0,116	0,118	0,177	0,104	0,052	0,047	0,044	0,001

H	0,018	0,745	1,052	0,387	0,401	0,141	0,175	0,048	0,046	0,179	0,085	0,046	0,039	0,045	0,043
H	0,063	0,835	0,978	1,049	0,920	0,663	0,544	0,457	0,349	0,518	0,317	0,208	0,100	0,091	0,076
H	0,093	0,069	1,088	0,665	0,778	0,621	0,610	0,469	0,410	0,489	0,307	0,241	0,214	0,162	0,099
H	0,040	0,138	0,481	0,255	0,232	0,144	0,091	0,072	0,071	0,082	0,061	0,019	0,015	0,018	0,005
H	0,111	0,289	0,750	0,393	0,294	0,109	0,107	0,092	0,095	0,321	0,183	0,111	0,102	0,024	0,003
H	0,016	0,152	0,418	0,232	0,141	0,057	0,046	0,014	0,034	0,055	0,010	-0,005	-0,009	-0,027	0,015
H	0,062	0,416	0,377	0,322	0,225	0,181	0,148	0,086	0,072	0,150	0,067	0,049	0,037	0,006	0,023
H	0,097	0,073	0,233	0,215	0,152	0,053	0,061	0,055	0,049	0,144	0,049	0,033	0,013	0,049	0,059
I	0,030	0,117	0,216	0,264	0,025	0,009	0,032	0,028	0,062	0,142	0,031	-0,022	-0,042	-0,035	-0,022
I	0,072	1,068	0,900	0,564	0,422	0,356	0,330	0,342	0,147	0,580	0,374	0,275	0,085	0,074	0,078
I	0,094	0,998	0,915	0,888	0,804	0,469	0,446	0,110	0,108	0,605	0,459	0,390	0,300	0,158	0,120
I	0,029	0,523	0,470	0,475	0,291	0,043	0,057	0,057	0,055	0,120	0,145	0,085	0,082	0,006	0,027
I	0,086	0,418	0,477	0,289	0,098	0,111	0,178	0,119	0,110	0,128	0,125	0,060	0,052	0,026	0,015
I	0,048	0,985	0,894	1,052	0,735	0,372	0,420	0,217	0,212	0,382	0,327	0,288	0,130	0,095	0,039
I	-0,008	0,452	1,130	0,928	0,435	0,170	0,132	0,126	0,090	0,369	0,211	0,194	0,173	0,136	0,025
I	0,005	0,184	0,606	0,586	0,218	0,180	0,221	0,064	0,065	0,190	0,110	0,084	0,101	0,032	0,031
I	0,003	0,089	0,601	0,353	0,088	0,054	0,032	0,022	0,029	0,298	0,141	0,130	0,066	0,014	0,000
J	0,017	0,218	0,574	0,427	0,074	0,031	0,043	0,048	0,045	0,212	0,036	0,030	0,014	-0,016	0,013
J	0,131	1,083	0,837	0,743	0,393	0,222	0,165	0,061	0,056	0,485	0,132	0,119	0,100	0,066	0,046
J	-0,027	0,431	0,640	0,471	0,334	0,125	0,132	0,108	0,103	0,348	0,241	0,184	0,138	0,124	0,074
J	0,049	1,875	1,579	1,565	0,943	0,620	0,521	0,311	0,208	0,724	0,502	0,422	0,282	0,126	0,076
J	0,037	0,884	0,855	0,639	0,450	0,308	0,168	0,165	0,159	0,370	0,251	0,237	0,179	0,086	0,017
J	0,089	0,628	0,587	0,643	0,287	0,109	0,098	0,098	0,076	0,083	0,135	0,062	0,055	0,007	0,025
J	0,091	0,685	0,514	0,287	0,300	0,066	0,068	0,063	0,065	0,470	0,239	0,197	0,139	0,122	0,025
J	-0,012	0,136	0,529	0,323	0,175	0,044	0,052	0,050	0,049	0,174	0,110	0,075	0,059	0,046	-0,010
J	-0,059	0,304	0,511	0,263	0,251	0,087	0,084	0,058	0,059	0,386	0,283	0,168	0,176	0,107	0,022
K	-0,030	0,102	0,133	0,161	0,102	0,032	0,037	0,017	0,007	0,082	0,030	0,002	0,011	-0,011	-0,038
K	0,005	0,182	0,142	0,305	0,129	0,015	0,115	0,032	0,013	0,089	0,005	-0,014	-0,015	-0,001	-0,007
K	0,064	0,133	0,225	0,222	0,123	0,106	0,056	0,070	0,032	0,113	-0,019	-0,034	-0,001	-0,022	-0,011
K	0,089	1,213	1,126	0,816	0,151	0,020	0,060	0,034	-0,005	0,155	0,008	-0,014	-0,029	-0,037	-0,027
K	0,061	0,384	0,333	0,650	0,429	0,272	0,145	0,173	0,072	0,275	0,251	0,172	0,039	0,062	0,000
K	0,074	0,200	0,391	0,239	0,126	0,006	0,051	0,118	0,002	0,120	0,003	-0,009	-0,009	-0,002	0,004
K	0,055	0,274	0,423	0,428	0,488	0,186	0,129	0,079	0,076	0,100	0,046	0,034	0,030	0,006	-0,011

K	0,084	0,338	0,353	0,444	0,335	0,147	0,129	0,024	0,022	0,096	0,070	0,019	0,002	-0,012	0,005
K	0,004	0,137	0,281	0,222	0,054	0,095	0,049	0,036	0,036	0,148	0,061	0,037	0,031	0,007	0,009

† = Animais que morreram durante o experimento

Anexo 9: Resultados do Teste de Elisa das DO(s) normalizadas utilizando a sorovariedade Hardjobovis.

	DIA 0	DIA 30	DIA 60	DIA 90	DIA 120	DIA 150	DIA 180	DIA 210	DIA 240	DIA 270	DIA 300	DIA 330	DIA 360	DIA 390	DIA 420
A	-0,001	0,528	0,205	0,175	0,186	0,152	0,041	-0,021	0,019	0,205	0,099	0,076	-0,001	0,002	-0,033
A	-0,009	1,519	0,449	0,371	0,228	0,079	0,040	-0,003	0,034	0,299	0,106	0,124	-0,004	0,016	-0,019
A	0,042	1,346	0,908	0,592	0,573	0,269	0,158	-0,004	0,029	0,713	0,250	0,100	0,004	0,029	-0,067
A	0,056	0,430	0,410	0,214	0,318	0,080	0,030	-0,003	0,020	0,132	0,060	0,013	-0,016	-0,014	-0,048
A	-0,003	0,350	0,298	0,256	0,274	0,248	0,153	0,024	0,061	0,484	0,186	0,098	0,067	0,066	0,039
A	0,005	1,462	1,110	0,583	0,422	0,252	0,075	-0,030	-0,009	0,535	0,272	0,167	-0,014	0,015	-0,019
A	0,062	0,539	0,766	0,671	0,559	0,267	0,029	-0,004	0,029	0,502	0,329	0,202	0,015	-0,005	-0,029
A	0,111	0,510	0,368	0,336	0,291	0,064	0,040	0,042	0,078	0,256	0,190	0,157	0,024	0,011	-0,032
A	-0,006	0,343	0,593	0,337	0,326	0,143	-0,007	-0,030	0,004	0,291	0,160	0,134	0,026	0,031	0,005
B	-0,014	0,107	0,113	0,057	0,042	0,022	-0,015	-0,015	0,025	0,230	0,060	0,026	-0,011	-0,027	-0,071
B	-0,025	0,217	0,231	0,218	0,155	0,049	0,026	0,026	0,087	0,197	0,074	0,069	0,021	-0,020	-0,081
B	0,089	0,412	0,235	0,159	0,133	0,049	-0,009	-0,009	0,013	0,096	0,053	0,081	0,033	0,012	-0,017
B	0,101	0,259	0,222	0,124	0,103	0,106	0,050	0,050	0,004	0,470	0,086	0,098	-0,026	-0,021	-0,053
B	-0,005	0,138	0,114	0,084	0,058	0,016	-0,028	-0,028	0,020	0,179	0,225	0,064	0,047	0,052	0,087
B	0,053	0,741	0,259	0,154	0,097	0,098	0,049	0,049	0,059	0,330	0,293	0,179	0,083	0,079	-0,018
B	0,087	0,375	0,365	0,203	0,178	0,174	0,154	0,154	0,133	0,377	0,329	0,299	0,240	0,194	0,092
B	-0,005	0,209	0,238	0,105	0,109	0,153	0,053	0,053	0,085	0,129	0,100	0,105	0,005	-0,011	-0,011
B	-0,008	0,297	0,464	0,170	0,133	0,078	0,028	0,028	0,054	0,157	0,169	0,115	-0,018	-0,007	-0,038
C	-0,043	0,636	1,295	0,670	0,623	0,459	0,270	0,113	0,113	0,841	0,419	0,344	0,182	0,101	0,075
C	0,004	0,552	1,822	1,102	0,929	0,418	0,409	0,047	0,085	0,780	0,457	0,290	0,015	0,015	-0,020
C	0,013	1,046	1,243	1,208	1,123	0,614	0,372	0,212	0,186	0,744	0,618	0,451	0,231	0,102	0,010
C	-0,022	0,412	0,687	0,284	0,273	0,070	-0,047	-0,012	0,038	0,609	0,583	0,251	0,094	0,056	-0,018
C	0,009	0,213	0,728	0,650	0,460	0,443	0,053	0,047	0,078	0,968	0,372	0,276	0,146	0,056	-0,003
C	0,000	0,514	1,093	0,963	0,888	0,608	0,454	0,332	0,214	0,231	0,237	0,218	0,084	0,110	0,005
C	0,001	0,427	0,687	0,440	0,465	0,305	0,157	0,030	0,061	0,486	0,315	0,205	0,127	0,062	0,022
C	-0,014	1,646	1,083	0,914	0,719	0,328	0,123	0,063	0,128	0,434	0,283	0,200	0,103	0,062	0,028
C	0,033	0,357	1,064	0,978	0,894	0,247	0,164	0,095	0,104	0,509	0,372	0,255	0,182	0,149	0,107
D	0,011	0,120	0,912	0,655	0,487	0,387	0,108	0,062	0,062	0,434	0,156	0,138	0,050	0,060	0,023
D	-0,005	0,074	0,942	0,897	0,853	0,789	0,757	0,185	0,191	0,891	0,880	0,504	0,215	0,110	0,080
D	-0,037	0,124	0,485	0,209	0,146	0,053	-0,004	-0,017	0,010	0,081	0,079	0,097	0,035	0,039	0,013
D	-0,020	0,219	1,564	0,642	0,429	0,179	0,123	0,018	-0,001	0,617	0,441	0,273	0,103	0,055	-0,004

D	-0,010	0,275	0,691	0,634	0,555	0,284	0,224	0,112	0,105	0,723	0,548	0,376	0,086	0,080	0,006
D	0,115	1,372	1,816	1,090	1,114	0,465	0,376	0,121	0,169	0,884	0,703	0,532	0,180	0,082	0,022
D	0,045	0,573	1,004	0,892	0,633	0,220	0,116	0,001	0,029	0,356	0,229	0,148	0,092	0,095	0,020
D	0,024	0,748	1,137	0,833	0,846	0,420	0,198	0,039	0,066	0,588	0,247	0,256	0,150	0,141	-0,042
D	-0,023	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	-0,010	0,305	1,090	1,031	0,824	0,509	0,177	0,119	0,140	0,879	0,423	0,208	0,063	0,066	0,020
E	0,095	1,239	1,337	1,147	0,862	0,419	0,154	0,050	0,067	0,400	0,212	0,224	0,102	0,061	0,008
E	0,103	0,680	1,234	0,378	0,282	0,115	0,082	0,058	0,097	0,409	0,219	0,192	0,152	0,124	0,005
E	0,101	1,241	1,202	0,496	0,506	0,313	0,016	0,008	0,047	0,632	0,203	0,170	0,067	0,064	0,006
E	0,059	0,343	0,465	0,294	0,313	0,286	0,025	0,000	0,021	0,510	0,283	0,176	0,101	0,095	0,010
E	0,001	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
E	0,158	0,808	0,507	0,367	0,331	0,028	-0,011	-0,018	0,018	0,201	0,101	0,022	-0,005	-0,007	-0,042
E	0,088	0,191	0,259	0,219	0,141	0,101	0,077	0,022	0,049	0,468	0,203	0,080	0,023	0,000	-0,023
E	0,025	0,737	0,454	0,361	0,314	0,100	0,017	-0,005	0,054	0,346	0,060	0,022	-0,001	-0,039	-0,042
C.-	0,103	0,062	0,153	0,121	0,119	0,021	-0,007	0,026	0,176	0,060	0,019	0,012	-0,042	-0,035	-0,057
C.-	0,074	0,089	0,080	0,068	0,031	0,037	0,030	0,058	0,033	0,024	0,059	0,020	0,028	-0,030	-0,048
C.-	0,128	0,134	0,053	0,112	0,129	0,111	0,094	-0,003	0,162	0,132	-0,020	0,032	0,014	-0,027	-0,033
C.-	0,065	0,012	0,079	0,124	0,087	0,047	0,040	0,006	0,046	0,011	0,044	0,011	0,001	0,044	0,023
C.-	0,172	0,075	0,051	0,129	0,050	0,073	0,034	-0,003	0,116	0,127	0,066	0,119	0,113	0,049	-0,024
C.-	0,095	0,058	0,042	0,079	0,087	0,124	0,053	0,058	0,190	0,169	0,011	0,064	0,018	0,001	-0,032
C.-	0,067	0,081	0,045	0,050	0,124	0,091	0,059	0,108	0,229	0,108	0,039	0,103	0,068	0,059	0,009
C.-	0,015	0,083	0,075	0,002	0,086	0,080	0,046	0,031	0,066	0,080	-0,001	-0,006	0,063	0,057	-0,032
C.-	0,099	0,128	0,118	0,121	0,140	0,110	0,055	-0,005	0,072	0,036	0,031	0,027	0,067	0,061	0,029
G	-0,019	0,561	1,056	0,952	0,788	0,541	0,491	0,177	0,214	0,857	0,670	0,447	0,230	0,223	0,113
G	0,142	1,215	1,767	1,738	0,964	0,756	0,732	0,560	0,217	0,879	0,890	0,315	0,267	0,251	0,108
G	0,168	1,409	2,147	0,964	0,656	0,305	0,191	0,261	0,220	0,706	0,459	0,365	0,262	0,208	0,117
G	0,024	0,539	2,151	1,426	1,112	0,538	0,425	0,306	0,190	0,685	0,622	0,566	0,405	0,340	0,071
G	-0,004	1,470	1,340	1,004	0,823	0,646	0,574	0,404	0,178	1,158	0,479	0,211	0,136	0,129	0,111
G	-0,019	1,437	1,218	1,148	0,997	0,671	0,685	0,334	0,061	0,647	0,717	0,449	0,325	0,157	0,070
G	0,118	1,760	1,270	1,074	0,882	0,732	0,691	0,207	0,226	1,113	0,646	0,430	0,358	0,144	0,008
G	0,106	1,739	1,860	1,167	0,654	0,607	0,538	0,494	0,273	1,134	0,832	0,528	0,267	0,207	0,219
G	0,131	1,201	2,057	1,345	1,404	1,023	0,679	0,370	0,308	1,070	0,621	0,223	0,180	0,212	0,115
H	0,060	0,443	2,218	1,195	0,560	0,130	0,123	0,055	0,067	0,308	0,121	0,102	0,062	0,046	-0,015

H	0,080	1,086	1,285	0,457	0,437	0,408	0,228	0,121	0,126	0,419	0,308	0,140	0,091	0,062	0,018
H	0,137	1,089	1,629	1,089	0,679	0,538	0,247	0,018	0,066	0,738	0,563	0,214	0,174	0,145	0,008
H	0,089	0,139	2,200	1,193	1,062	0,795	0,792	0,054	0,129	0,830	0,577	0,202	0,142	0,164	-0,004
H	0,121	0,135	1,149	0,289	0,141	0,110	0,034	-0,019	0,075	0,308	0,248	0,058	0,028	0,015	0,001
H	0,107	0,364	0,860	0,289	0,196	0,176	0,084	0,014	0,095	0,495	0,013	0,040	0,000	-0,009	-0,045
H	0,088	0,141	1,144	0,323	0,247	0,195	0,003	-0,003	0,040	0,169	0,061	0,032	-0,014	-0,009	-0,048
H	0,174	0,419	0,296	0,254	0,232	0,178	0,148	0,058	0,094	0,095	0,041	0,069	0,030	0,005	-0,081
H	0,155	0,703	0,256	0,208	0,197	0,090	0,036	0,013	0,086	0,073	0,054	0,004	-0,025	0,000	-0,009
I	0,033	0,426	0,236	0,095	0,087	0,030	-0,018	-0,046	0,009	0,299	0,245	0,167	0,068	-0,011	-0,037
I	0,083	1,298	0,490	0,478	0,463	0,334	0,280	0,263	0,243	0,806	0,499	0,331	0,278	0,162	-0,033
I	0,123	1,195	1,842	0,935	0,985	0,529	0,533	0,039	0,106	0,853	0,688	0,348	0,201	0,091	0,027
I	0,118	0,701	1,806	0,507	0,381	0,161	0,106	0,064	0,073	0,461	0,279	0,212	0,166	0,094	0,069
I	0,070	0,610	1,038	0,362	0,381	0,286	0,208	0,196	0,166	0,342	0,299	0,298	0,123	0,119	0,065
I	0,172	1,406	0,964	0,826	0,845	0,818	0,379	0,366	0,245	0,642	0,404	0,257	0,140	0,087	-0,023
I	0,134	1,156	1,506	0,984	0,788	0,634	0,317	0,167	0,167	0,643	0,299	0,206	0,084	0,056	-0,009
I	0,176	0,654	2,151	0,435	0,413	0,221	0,187	0,177	0,221	0,313	0,208	0,203	0,118	0,125	0,039
I	0,164	0,956	1,421	0,964	0,519	0,365	0,086	0,054	0,113	0,376	0,186	0,152	0,045	0,024	-0,065
J	-0,013	0,948	1,178	0,367	0,300	0,141	0,145	0,089	0,064	0,249	0,193	0,108	0,059	0,032	0,013
J	-0,009	1,672	1,287	0,683	0,659	0,363	0,187	0,112	0,138	0,414	0,299	0,200	0,150	0,090	0,064
J	0,103	1,203	1,058	0,739	0,672	0,514	0,201	0,166	0,192	0,655	0,454	0,276	0,135	0,104	0,069
J	0,060	1,373	1,255	1,118	1,133	1,004	0,910	0,223	0,268	0,721	0,735	0,686	0,439	0,228	0,120
J	0,141	1,505	0,860	0,686	0,574	0,532	0,376	0,085	0,110	0,692	0,439	0,362	0,204	0,077	-0,017
J	0,094	1,159	1,224	0,515	0,373	0,203	0,111	0,044	0,081	0,192	0,153	0,167	0,123	0,089	0,047
J	0,162	0,698	1,204	0,390	0,386	0,116	0,070	0,064	0,090	0,587	0,219	0,230	0,091	0,090	0,029
J	0,136	0,225	1,126	0,548	0,490	0,274	0,145	0,101	0,113	0,328	0,199	0,184	0,140	0,097	-0,010
J	0,099	0,302	1,036	0,553	0,492	0,229	0,169	0,021	0,058	0,561	0,380	0,338	0,165	0,031	-0,032
K	0,052	0,098	1,001	0,174	0,150	0,061	-0,012	-0,023	0,020	0,139	0,080	0,060	0,014	0,015	-0,005
K	0,103	0,365	0,236	0,107	0,122	0,115	0,021	0,012	0,047	0,133	-0,016	0,034	-0,005	-0,036	-0,056
K	0,145	0,237	0,343	0,182	0,122	0,172	0,071	-0,022	0,034	0,075	0,000	0,034	-0,014	-0,027	-0,052
K	0,142	1,474	0,447	0,333	0,312	0,288	0,073	0,004	0,004	0,197	0,074	0,020	-0,014	-0,010	-0,047
K	0,056	0,432	0,598	0,485	0,350	0,286	0,071	0,064	0,059	0,430	0,333	0,123	-0,010	-0,002	-0,031
K	0,136	0,271	0,704	0,240	0,136	0,075	0,044	0,015	0,072	0,062	0,048	0,045	-0,003	-0,006	-0,009
K	0,156	0,308	1,399	0,373	0,278	0,222	0,044	0,006	0,068	0,170	0,130	0,110	0,096	0,110	-0,033

K	0,071	0,437	0,959	0,496	0,191	0,106	0,074	0,047	0,088	0,142	0,153	0,132	0,064	0,037	0,010
K	0,120	0,085	0,098	0,060	0,038	0,049	0,005	0,003	0,039	0,109	0,106	0,082	0,039	0,025	-0,027

† = Animais que morreram durante o experimento

Anexo 10: Resultados do Teste de Inibição de Crescimento com valores de DO(s) de soros individuais para todas as vacinas .

VACINAS	VALOR OD (INDIVIDUAL)	RESULTADO	DIA
A	-0,001	Crescimento	0
A	0,041984733	Crescimento	0
A	0,055979644	Crescimento	0
A	0,005089059	Crescimento	0
A	0,062340967	Crescimento	0
A	0,110687023	Crescimento	0
A	-0,006361323	Crescimento	0
B	-0,014	Crescimento	0
B	-0,025445293	Crescimento	0
B	0,089058524	Crescimento	0
B	0,100508906	Crescimento	0
B	0,053435115	Crescimento	0
B	0,086513995	Crescimento	0
B	-0,005089059	Crescimento	0
C	-0,043	Crescimento	0
C	0,003816794	Crescimento	0
C	0,012722646	Crescimento	0
C	0,008905852	Crescimento	0
C	0	Crescimento	0
C	0,001272265	Crescimento	0
C	-0,013994911	Crescimento	0
D	0,011	Crescimento	0
D	-0,005089059	Crescimento	0
D	-0,036895674	Crescimento	0
D	-0,020356234	Crescimento	0
D	-0,010178117	Crescimento	0
D	0,114503817	Crescimento	0
D	0,044529262	Crescimento	0
E	-0,010	Crescimento	0
E	0,095419847	Crescimento	0
E	0,103053435	Crescimento	0
E	0,058524173	Crescimento	0
E	0,001272265	Crescimento	0
E	0,157760814	Crescimento	0
E	0,025445293	Crescimento	0
G	-0,019	Crescimento	0
G	0,167938931	Crescimento	0
G	0,024173028	Crescimento	0
G	-0,003816794	Crescimento	0
G	-0,019083969	Crescimento	0
G	0,105597964	Crescimento	0
G	0,131043257	Crescimento	0
H	0,060	Crescimento	0
H	0,080152672	Crescimento	0

H	0,13740458	Crescimento	0
H	0,089058524	Crescimento	0
H	0,106870229	Crescimento	0
H	0,174300254	Crescimento	0
H	0,155216285	Crescimento	0
I	0,033	Crescimento	0
I	0,123409669	Crescimento	0
I	0,118320611	Crescimento	0
I	0,171755725	Crescimento	0
I	0,133587786	Crescimento	0
I	0,175572519	Crescimento	0
I	0,164122137	Crescimento	0
J	-0,013	Crescimento	0
J	-0,008905852	Crescimento	0
J	0,059796438	Crescimento	0
J	0,141221374	Crescimento	0
J	0,094147583	Crescimento	0
J	0,136132316	Crescimento	0
J	0,099236641	Crescimento	0
K	0,052	Crescimento	0
K	0,103053435	Crescimento	0
K	0,145038168	Crescimento	0
K	0,142493639	Crescimento	0
K	0,136132316	Crescimento	0
K	0,15648855	Crescimento	0
K	0,071246819	Crescimento	0
A	0,205	Crescimento	60
A	0,449257426	Inibição	60
A	0,908415842	Crescimento	60
A	0,409653465	Crescimento	60
A	0,298267327	Crescimento	60
A	1,110148515	Inibição	60
A	0,367574257	Crescimento	60
B	0,113	Crescimento	60
B	0,231435644	Crescimento	60
B	0,235148515	Crescimento	60
B	0,221534653	Crescimento	60
B	0,36509901	Crescimento	60
B	0,237623762	Crescimento	60
B	0,464108911	Crescimento	60
C	1,295	Crescimento	60
C	1,242574257	Inibição	60
C	0,686881188	Crescimento	60
C	0,727722772	Crescimento	60
C	1,092821782	Inibição	60
C	1,082920792	Inibição	60
C	1,064356436	Inibição	60

D	0,912	Crescimento	60
D	0,941831683	Crescimento	60
D	0,485148515	Crescimento	60
D	1,564356436	Crescimento	60
D	0,690594059	Crescimento	60
D	1,815594059	Inibição	60
D	1,003712871	Crescimento	60
E	1,090	Inibição	60
E	1,336633663	Inibição	60
E	1,201732673	Crescimento	60
E	0,465346535	Crescimento	60
E	0,507425743	Crescimento	60
E	0,258663366	Crescimento	60
E	0,454207921	Crescimento	60
G	1,056	Inibição	60
G	1,767326733	Inibição	60
G	2,147277228	Crescimento	60
G	2,150990099	Crescimento	60
G	1,217821782	Inibição	60
G	1,860148515	Inibição	60
G	2,056930693	Inibição	60
H	2,218	Crescimento	60
H	1,284653465	Crescimento	60
H	1,628712871	Inibição	60
H	0,860148515	Crescimento	60
H	1,143564356	Crescimento	60
H	0,295792079	Crescimento	60
H	0,256188119	Crescimento	60
I	0,236	Crescimento	60
I	0,49009901	Inibição	60
I	1,841584158	Inibição	60
I	0,964108911	Inibição	60
I	1,506188119	Inibição	60
I	2,150990099	Inibição	60
I	1,420792079	Crescimento	60
J	1,287	Inibição	60
J	1,058168317	Crescimento	60
J	1,254950495	Inibição	60
J	0,860148515	Inibição	60
J	1,224009901	Inibição	60
J	1,126237624	Crescimento	60
J	1,035891089	Crescimento	60
K	1,001	Crescimento	60
K	0,236386139	Crescimento	60
K	0,342821782	Crescimento	60
K	0,446782178	Inibição	60
K	0,597772277	Crescimento	60

K	0,704207921	Crescimento	60
K	1,398514851	Inibição	60
A	0,034	Crescimento	240
A	0,02022756	Crescimento	240
A	0,06068268	Crescimento	240
A	-0,008849558	Crescimento	240
A	0,029077118	Crescimento	240
A	0,078381795	Crescimento	240
A	0,003792668	Crescimento	240
B	0,087	Crescimento	240
B	0,012642225	Crescimento	240
B	0,003792668	Crescimento	240
B	0,059418458	Crescimento	240
B	0,132743363	Crescimento	240
B	0,084702908	Crescimento	240
B	0,054361568	Crescimento	240
C	0,085	Crescimento	240
C	0,186	Crescimento	240
C	0,078381795	Crescimento	240
C	0,213653603	Crescimento	240
C	0,06068268	Crescimento	240
C	0,127686473	Crescimento	240
C	0,103666245	Crescimento	240
D	0,062	Crescimento	240
D	0,190897598	Crescimento	240
D	0,01011378	Crescimento	240
D	-0,001264223	Crescimento	240
D	0,104930468	Crescimento	240
D	0,169405815	Crescimento	240
D	0,06573957	Crescimento	240
E	0,140	Crescimento	240
E	0,067003793	Crescimento	240
E	0,097345133	Crescimento	240
E	0,046776233	Crescimento	240
E	0,021491783	Crescimento	240
E	0,017699115	Crescimento	240
E	0,049304678	Crescimento	240
G	0,217	Crescimento	240
G	0,219974716	Crescimento	240
G	0,189633375	Crescimento	240
G	0,178255373	Crescimento	240
G	0,06068268	Crescimento	240
G	0,226295828	Crescimento	240
G	0,308470291	Crescimento	240
H	0,066	Crescimento	240
H	0,128950695	Crescimento	240
H	0,074589128	Crescimento	240

H	0,094816688	Crescimento	240
H	0,04045512	Crescimento	240
H	0,093552465	Crescimento	240
H	0,08596713	Crescimento	240
I	0,009	Crescimento	240
I	0,242730721	Crescimento	240
I	0,10619469	Crescimento	240
I	0,073324905	Crescimento	240
I	0,245259166	Crescimento	240
I	0,221238938	Crescimento	240
I	0,112515803	Crescimento	240
J	0,138	Crescimento	240
J	0,19216182	Crescimento	240
J	0,268015171	Crescimento	240
J	0,109987358	Crescimento	240
J	0,089759798	Crescimento	240
J	0,112515803	Crescimento	240
J	0,058154235	Crescimento	240
K	0,020	Crescimento	240
K	0,034134008	Crescimento	240
K	0,003792668	Crescimento	240
K	0,059418458	Crescimento	240
K	0,068268015	Crescimento	240
K	0,088495575	Crescimento	240
K	0,039190898	Crescimento	240
A	0,205	Crescimento	270
A	0,298507463	Crescimento	270
A	0,712686567	Inibição	270
A	0,131840796	Crescimento	270
A	0,534825871	Crescimento	270
A	0,256218905	Crescimento	270
A	0,291044776	Crescimento	270
B	0,230	Crescimento	270
B	0,470149254	Crescimento	270
B	0,179104478	Crescimento	270
B	0,32960199	Crescimento	270
B	0,376865672	Crescimento	270
B	0,129353234	Crescimento	270
B	0,156716418	Crescimento	270
C	0,841	Inibição	270
C	0,743781095	Inibição	270
C	0,609452736	Inibição	270
C	0,231343284	Crescimento	270
C	0,486318408	Crescimento	270
C	0,434079602	Crescimento	270
C	0,508706468	Inibição	270
D	0,434	Inibição	270

D	0,890547264	Inibição	270
D	0,080845771	Crescimento	270
D	0,616915423	Crescimento	270
D	0,722636816	Inibição	270
D	0,355721393	Crescimento	270
D	0,588308458	Inibição	270
E	0,879	Inibição	270
E	0,400497512	Crescimento	270
E	0,40920398	Crescimento	270
E	0,631840796	Inibição	270
E	0,509950249	Crescimento	270
E	0,201	Crescimento	270
E	0,345771144	Crescimento	270
G	0,857	Crescimento	270
G	0,685323383	Inibição	270
G	1,157960199	Inibição	270
G	0,646766169	Inibição	270
G	1,11318408	Inibição	270
G	1,134328358	Inibição	270
G	1,069651741	Inibição	270
H	0,738	Inibição	270
H	0,82960199	Inibição	270
H	0,308457711	Crescimento	270
H	0,495024876	Crescimento	270
H	0,169154229	Crescimento	270
H	0,094527363	Crescimento	270
H	0,073383085	Crescimento	270
I	0,299	Crescimento	270
I	0,805970149	Crescimento	270
I	0,461442786	Crescimento	270
I	0,342039801	Crescimento	270
I	0,641791045	Inibição	270
I	0,313432836	Crescimento	270
I	0,375621891	Crescimento	270
J	0,414	Inibição	270
J	0,655472637	Inibição	270
J	0,721393035	Inibição	270
J	0,691542289	Inibição	270
J	0,191542289	Crescimento	270
J	0,587064677	Inibição	270
J	0,328358209	Crescimento	270
K	0,139	Crescimento	270
K	0,133084577	Crescimento	270
K	0,430348259	Crescimento	270
K	0,062189055	Crescimento	270
K	0,17039801	Crescimento	270
K	0,141791045	Crescimento	270

K	0,109452736	Crescimento	270
A	0,076	Crescimento	330
A	0,12377451	Crescimento	330
A	0,013480392	Crescimento	330
A	0,098039216	Crescimento	330
A	0,166666667	Crescimento	330
A	0,156862745	Crescimento	330
A	0,133578431	Crescimento	330
B	0,026	Crescimento	330
B	0,068627451	Crescimento	330
B	0,080882353	Crescimento	330
B	0,098039216	Crescimento	330
B	0,178921569	Crescimento	330
B	0,299019608	Crescimento	330
B	0,105392157	Crescimento	330
C	0,344	Crescimento	330
C	0,450980392	Crescimento	330
C	0,25122549	Crescimento	330
C	0,218137255	Crescimento	330
C	0,204656863	Crescimento	330
C	0,199754902	Crescimento	330
C	0,254901961	Crescimento	330
D	0,138	Crescimento	330
D	0,503676471	Crescimento	330
D	0,096813725	Crescimento	330
D	0,273284314	Crescimento	330
D	0,531862745	Crescimento	330
D	0,148284314	Crescimento	330
D	0,256127451	Crescimento	330
E	0,208	Crescimento	330
E	0,192401961	Crescimento	330
E	0,170343137	Crescimento	330
E	0,176470588	Crescimento	330
E	0,022058824	Crescimento	330
E	0,079656863	Crescimento	330
E	0,022058824	Crescimento	330
G	0,315	Crescimento	330
G	0,365196078	Crescimento	330
G	0,566176471	Crescimento	330
G	0,210784314	Crescimento	330
G	0,448529412	Crescimento	330
G	0,528186275	Crescimento	330
G	0,223039216	Crescimento	330
H	0,102	Crescimento	330
H	0,139705882	Crescimento	330
H	0,214460784	Crescimento	330
H	0,202205882	Crescimento	330

H	0,057598039	Crescimento	330
H	0,031862745	Crescimento	330
H	0,068627451	Crescimento	330
I	0,167	Crescimento	330
I	0,330882353	Crescimento	330
I	0,212009804	Crescimento	330
I	0,257352941	Crescimento	330
I	0,205882353	Crescimento	330
I	0,203431373	Crescimento	330
I	0,151960784	Crescimento	330
J	0,108	Crescimento	330
J	0,199754902	Crescimento	330
J	0,275735294	Crescimento	330
J	0,361519608	Crescimento	330
J	0,166666667	Crescimento	330
J	0,230392157	Crescimento	330
J	0,183823529	Crescimento	330
K	0,060	Crescimento	330
K	0,034313725	Crescimento	330
K	0,019607843	Crescimento	330
K	0,12254902	Crescimento	330
K	0,045343137	Crescimento	330
K	0,110294118	Crescimento	330
K	0,082107843	Crescimento	330
A	-0,033	Crescimento	420
A	-0,019083969	Crescimento	420
A	-0,048346056	Crescimento	420
A	0,039440204	Crescimento	420
A	-0,019083969	Crescimento	420
A	-0,032	Crescimento	420
A	0,005	Crescimento	420
B	-0,071	Crescimento	420
B	-0,081424936	Crescimento	420
B	-0,01653944	Crescimento	420
B	-0,053435115	Crescimento	420
B	-0,017811705	Crescimento	420
B	0,091603053	Crescimento	420
B	-0,011450382	Crescimento	420
C	0,075	Crescimento	420
C	0,010178117	Crescimento	420
C	-0,017811705	Crescimento	420
C	0,005089059	Crescimento	420
C	0,021628499	Crescimento	420
C	0,027989822	Crescimento	420
C	0,106870229	Crescimento	420
D	0,023	Crescimento	420
D	0,080152672	Crescimento	420

D	0,012722646	Crescimento	420
D	-0,003816794	Crescimento	420
D	0,022	Crescimento	420
D	0,020	Crescimento	420
D	-0,042	Crescimento	420
E	0,020	Crescimento	420
E	0,007633588	Crescimento	420
E	0,005089059	Crescimento	420
E	0,006361323	Crescimento	420
E	0,010178117	Crescimento	420
E	-0,022900763	Crescimento	420
E	-0,041984733	Crescimento	420
G	0,108	Crescimento	420
G	0,117048346	Crescimento	420
G	0,071246819	Crescimento	420
G	0,110687023	Crescimento	420
G	0,069974555	Crescimento	420
G	0,218829517	Crescimento	420
G	0,114503817	Crescimento	420
H	-0,015	Crescimento	420
H	0,017811705	Crescimento	420
H	0,007633588	Crescimento	420
H	-0,003816794	Crescimento	420
H	0,001272265	Crescimento	420
H	-0,081424936	Crescimento	420
H	-0,008905852	Crescimento	420
I	-0,037	Crescimento	420
I	-0,03307888	Crescimento	420
I	0,026717557	Crescimento	420
I	0,06870229	Crescimento	420
I	-0,023	Crescimento	420
I	-0,009	Crescimento	420
I	-0,064885496	Crescimento	420
J	0,013	Crescimento	420
J	0,063613232	Crescimento	420
J	-0,01653944	Crescimento	420
J	0,047073791	Crescimento	420
J	0,029262087	Crescimento	420
J	-0,010178117	Crescimento	420
J	-0,031806616	Crescimento	420
K	-0,005	Crescimento	420
K	-0,055979644	Crescimento	420
K	-0,047073791	Crescimento	420
K	-0,030534351	Crescimento	420
K	-0,03307888	Crescimento	420
K	0,010178117	Crescimento	420
K	-0,026717557	Crescimento	420