

Curva de anticorpos pós-vacinais em ovinos imunizados com uma ou duas doses de bacterina oleosa anti-leptospirose, produzida com a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma, isolada no Brasil¹

Geder Paulo Herrmann^{2*}, Rogério Oliveira Rodrigues³, Carlos Eugênio Soto Vidal⁴, Gustavo Machado⁵, Elvio Carlos Moreira⁶ e Rômulo Cerqueira Leite⁷

ABSTRACT.- Herrmann G.P., Rodrigues R.O., Vidal C.E.S., Machado G., Moreira E.C. & Leite R.C. 2011. [Post vaccinal antibodies profile of sheep immunized with one or two doses of an oil emulsified anti leptospirosis bacterin produced with serovar Hardjo, type Hardjoprajitno, strain Norma, isolated in Brazil.] Curva de anticorpos pós-vacinais em ovinos imunizados com uma ou duas doses de bacterina oleosa anti-leptospirose, produzida com a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma, isolada no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(8):683-689. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 20, Sala 4011, Campus Universitário, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil, E-mail: gederpaulo@hotmail.com

It was compared the level of antibodies of sheep immunized with one or two doses of an oil bacterin produced with serovar Hardjo, type Hardjoprajitno, strain Norma, isolated from cattle urine in Brazil. Cultures of 2×10^8 leptospires/mL were inactivated with formalin 0.3%, final concentration and emulsified in oil Emulsigen® 12%. The vaccine dose was standardized to the concentration of 1×10^8 leptospires/mL. Forty adult sheep, Santa Inês breed from a herd free of leptospirosis by clinical and serological examinations during one year were chosen for the experiment. Group A (n=15) received two subcutaneous 3.0 mL vaccine dose, interval of 30 days. Group B (n=15) received one subcutaneous 3.0 mL vaccine dose. Group C (control) received one subcutaneous dose of 3.0 mL of 0.85% sodium chloride solution. Post vaccination antibody titers were measured by microscopic agglutination test (MAT) and an in house enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) every 30 days during 120 days. At 30 days post-vaccination, the titers of the groups A and B ranged from 80 to 160. In group A, after the booster dose, the titers increased two to four times until 3,200, while in the group B the titers were lower than 160 and decreased by one to two times after 60 days after vaccination. Using a single dose, the antibodies persisted for only 30 days, and with two doses with 30 days of interval, the antibodies were detectable for 60 days through the MAT test and 120 days through the ELISA. The MAT test detected IgM titers of vaccine only for 60 days, while the ELISA was able to detect antibodies during the 120 days. In the negative control group, nonspecific reactions occurred in the ELISA up to titer 80, however titers in the MAT of the same animals remained at zero. The ELISA test can be used to assess anti leptospire vaccinal antibody level to the serovar Hardjo, type Hardjoprajitno, strain Norma in sheep.

INDEX TERMS: Vaccine, sheep, ELISA, adjuvant.

¹ Recebido em 10 de fevereiro de 2011.

Aceito para publicação em 25 de abril de 2011.

² Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima 1.000, Prédio 20, Sala 4011, Campus Universitário, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: gederpaulo@hotmail.com

³ Departamento Ciências da Saúde, Universidade Vale do Rio Doce, Rua Israel Pinheiro 2000, Cx. Postal 295, Governador Valadares, MG 35020-220, Brasil. E-mail: rogerrodriguesvet@gmail.com

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Avenida

Roraima 1.000, Prédio 44, Sala 5137, Campus Universitário, Santa Maria, RS. E-mail: carlosesvidal@hotmail.com

⁵ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM, Santa Maria, RS. E-mail: gustavoetal@gmail.com

⁶ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos 6627, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brasil. E-mail: elviocm@vet.ufmg.br

⁷ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: romulo@vet.ufmg.br

RESUMO.- Foi comparado o nível de anticorpos de ovelhas imunizadas com uma ou duas doses de bacterina oleosa produzida com a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma, isolada da urina de bovino no Brasil. Culturas de 2×10^8 leptospiras/mL foram inativadas com formalina a 0,3%, à concentração final e emulsionada em óleo Emulsigen® 12%. A dose da vacina foi padronizada para a concentração de 1×10^8 leptospiras/mL. Quarenta ovinos adultos, da raça Santa Inês, de um rebanho livre de leptospirose por exames clínicos e sorológicos durante um ano foram escolhidos para o experimento. O grupo A (n=15) recebeu duas doses de 3,0mL da vacina por via subcutânea, com intervalo de 30 dias. O grupo B (n=15) recebeu dose única de 3,0mL, via subcutânea e o grupo C (controle) recebeu uma dose subcutânea de 3,0mL de solução 0,85% de cloreto de sódio. Os títulos de anticorpos pós-vacinação foram mensurados pelo teste de soroprecipitação microscópica (SAM) e um teste imunoenzimático (ELISA) a cada 30 dias durante 120 dias. Os títulos dos grupos A e B na primeira colheita variaram de 80 a 160. No grupo A, após a segunda dose, os títulos aumentaram duas a quatro vezes, até 3.200, enquanto no grupo B os títulos de aglutininas foram menores que 160 e diminuíram uma a duas vezes após 60 dias da vacinação. Utilizando-se dose única, os anticorpos persistiram por somente 30 dias e, com duas doses, com 30 dias de intervalo, os anticorpos foram detectáveis por 60 dias por meio do teste de SAM e 120 dias no teste de ELISA. Assim, o teste de SAM detectou títulos de IgM vacinal somente por 60 dias, enquanto o teste de ELISA foi capaz de detectar anticorpos durante os 120 dias. No grupo controle negativo, ocorreram no ELISA reações inespecíficas de títulos até 80, porém no SAM os títulos dos mesmos animais se mantiveram em zero. O teste de ELISA pode ser utilizado para medir anticorpos vacinais para a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma em ovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Vacina, ovinos, ELISA, adjuvante.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que afeta os animais domésticos, selvagens e o homem. A doença é causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, classificados, na atualidade, em 13 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii*, distribuídas em mais de 260 sorovarietades agrupadas em 23 sorogrupos (Adler & Pena Moctezuma 2010).

Teoricamente qualquer uma das diferentes espécies de leptospiras pode infectar o homem e os animais, porém na prática um pequeno número de sorovarietades torna-se endêmica em uma determinada espécie ou área (Ellis 1994).

A leptospirose nos ovinos geralmente ocorre na forma de surtos e a doença na sua forma mais grave está associada à sorovariedade Pomona (Vermunt et al. 1994). Contudo, estudos sorológicos e o cultivo de amostras provenientes de fetos ovinos abortados também têm revelado a presença da sorovariedade Hardjo, estirpe Hardjoprajitno, responsável por grandes prejuízos na reprodução representados por: retorno do cio, abortamento, mastite sanguinolenta e o nascimento de cordeiros frácoos com a morte nas duas primeiras semanas de vida (Ellis et al. 1983).

No Brasil, já foi demonstrada a presença de anticorpos anti-leptospiras em ovinos criados em vários Estados, especialmente em rebanhos de ovinos com histórico de problemas reprodutivos (Santa Rosa & Castro 1963, Langoni et al 1995).

A sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma foi isolada da urina de bovino no Brasil por Moreira (1994) e identificada por técnicas de anticorpos monoclonais (Terpstra et al 1985).

Inquéritos soroepidemiológicos da leptospirose em ovinos efetuados em rebanhos localizados nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, têm encontrado proporções de animais reagentes positivos (título ≥ 100) de até 48,7% (Herrmann et al. 2004). A sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma foi encontrada com maior frequência (30,6%). Herrmann et al. (2004) ainda sugeriram que esta sorovariedade pudesse estar envolvida com os problemas reprodutivos dos ovinos e que esses animais fossem os reservatórios desta sorovariedade para os ovinos e bovinos, como já foi demonstrado para outras leptospiras da sorovariedade Hardjo em outros países (Gerritsen et al. 1994).

No Brasil, os programas de controle das leptospiroses em bovinos com uso de vacinas comerciais formuladas com bacterinas são pouco conhecidos, assim como na maioria dos países com grandes criações de bovinos. A vacina tem se revelado um recurso importante que promove o aumento da imunidade do rebanho de bovinos, diminuindo os sinais clínicos da doença, de modo a serem atingidos índices de morbidade favoráveis ao controle dos focos (Moreira 1994).

A vacinação é recomendada para o controle da leptospirose. O seu uso contínuo e a adequada aplicação produz boa imunidade nos animais e previne os sinais clínicos como o abortamento, a morte embrionária, o aparecimento de outros sinais clínicos característicos da doença (Moreira 1994).

As vacinas empregadas no controle das leptospiroses dos animais domésticos utilizam na sua formulação veículos denominados adjuvantes, substâncias inertes capazes de estimular o sistema imune. Por muitos anos o hidróxido de alumínio tem sido empregado como adjuvante primário nas vacinas de uso veterinário, porém, vem sendo gradativamente substituído por veículos oleosos capazes de proporcionar maior resposta imunológica (Tizard 2008).

A proteção desenvolvida pelas vacinas também pode ser avaliada em animais de laboratório ou por métodos sorológicos. O teste de soroprecipitação microscópica (SAM), que detecta predominantemente a IgM, anticorpo pouco persistente no sangue circulante, responsável pela aglutinação que pode ser detectado por aproximadamente de 30 dias após a vacinação. O ensaio imunoenzimático (ELISA) é um teste sorológico que quantifica essencialmente IgG, principal anticorpo responsável pela proteção, presente no soro, e que persiste por períodos de tempo que variam de seis meses até um ano (Tripathy et al 1975).

O uso de vacinas de boa qualidade tem sido muito eficiente no controle da leptospirose e tem se apoiado com o uso sistemático de bacterinas preparadas com as variantes sorológicas presentes nas espécies de animais exploradas da região (Vasconcelos 1997).

O objetivo do presente estudo foi a produção de uma bacterina oleosa monovalente com a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma para ovinos e de acompanhar os níveis de anticorpos por ela induzidos em ovinos primo vacinados com uma ou duas aplicações de vacina, empregando-se as técnicas de SAM e ELISA para a dosagem dos anticorpos vacinais mensalmente durante 120 dias após a primo-vacinação.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção da bacterina

A bacterina foi produzida com a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma, isolada de bovino no Brasil, em partida única, no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG. As leptospiros foram cultivadas em meio de EMJH (Ellinghausen & McCullough 1965) durante 14 dias a 28°C. Quando a cultura apresentou adequado crescimento foi padronizada para conter 2×10^8 /mL, foi inativada com formalina na concentração final a 0,3% e emulsionada em um adjuvante oleoso Emulsigem® 12%, por período de 24 horas em homogeneizador circular a 96 rpm. A vacina foi padronizada a 1×10^8 /mL. A pureza foi avaliada por microscopia de campo escuro e cultivo microbiológico em meios apropriados para verificar a ausência de contaminantes e a inocuidade, em coelhos jovens por 14 dias, conforme normas preconizadas (OIE 2006).

Grupos experimentais

Os animais utilizados no experimento foram 40 ovelhas, não gestantes, da raça Santa Inês, com mais de um ano de idade, criadas em um rebanho livre de leptospirose previamente monitorado por SAM por período de um ano. Foram mantidas em piquetes coletivos alimentadas com capineiras e leguminosas nativas da região, no rebanho de uma propriedade, localizada no município de Fortuna de Minas, MG, 130 km de Belo Horizonte.

Grupo A: Formado por 15 ovelhas que receberam duas doses de 3 mL da bacterina; a primeira dose foi aplicada no dia zero e a segunda trinta dias depois e as duas aplicações foram efetuadas pela via subcutânea no terço médio do pescoço.

Grupo B: formado por 15 ovelhas que receberam, no dia zero, uma dose de 3 mL da bacterina pela via subcutânea no terço médio do pescoço.

Grupo C (controle negativo): formado por 10 ovelhas que receberam, no dia zero, uma dose de 3 mL de solução salina, via subcutânea no terço médio do pescoço.

Foram realizadas cinco colheitas de sangue nos três grupos em intervalos de 30 dias; a primeira colheita, dia zero, foi efetuada imediatamente antes da aplicação da vacina e as demais colheitas foram feitas com dias 30, 60, 90 e 120 dias após a primeira vacinação.

O soro controle negativo foi o *pool* dos soros obtidos das 40 ovelhas, momento que os animais ainda não haviam sido vacinados.

Soro controle positivo

O soro controle positivo foi produzido conforme protocolo de Faine (1994), em quatro ovelhas com idade aproximada de oito meses, de um rebanho pertencente ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Lanagro-Pedro Leopoldo-MG, livre de *Leptospira* spp. As quatro ovelhas receberam cinco doses da bacterina padronizada para conter 1×10^8 /mL da sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma. As cinco doses foram aplicadas com intervalo de sete dias, com os seguintes volumes: 1, 2, 4, 6 e 6mL. A primeira dose do antígeno foi aplicada pela via endovenosa e as demais pela via subcutânea na região do pescoço.

Semanalmente, foram colhidas amostras de sangue para o acompanhamento dos títulos de anticorpos dos quatro animais pelo tes-

te de SAM, (Cole et al. 1973). Os soros foram testados a partir da diluição de 1:80, em uma série de diluições geométricas de razão dois iniciada em 10. O título máximo positivo foi de 12.800, encontrado na quinta colheita, realizada no 28º dia, sete dias após a quarta aplicação. As leituras das reações foram efetuadas diretamente na microplaca (NUNC F, Dinamarca) com microscópio, equipado com condensador seco de campo escuro, objetiva de longa distância Epiplan LD 10X/0.20, oculares E-pi 10X/20 e EP-L 10X/20, Axiolab®.

ELISA IgG Anti-Leptospira Hardjo

O antígeno foi preparado em uma partida única, conforme os procedimentos recomendados por Terpstra et al. (1980), com uma cultura da sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma, isolada de bovino no Brasil, mantida no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, cultivada em meio de EMJH e incubada por 7-14 dias a 28°C. Quando o cultivo apresentou bom crescimento e pureza com concentração celular aproximada de 1×10^8 /mL, e uma turbidez equivalente ao tubo três da escala de MacFarland, foi inativado com formalina na concentração final de 0,3%, por uma hora e em seguida foi centrifugado em temperatura de 4°C por 30 minutos a 8.000 xg. A cultura foi aquecida a 100°C em banho-maria por 30 minutos e deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado do sedimento e novamente centrifugado em temperatura de 4°C para a retirada de resíduos celulares por 30 minutos a 8.000 xg. Finalmente, foi dividido em alíquotas de 50mL e o antígeno foi estocado em geladeira até o momento do uso.

O antígeno foi fixado nas microplacas (Maxisorp Nunc, Dinamarca), utilizando 100ml de antígeno por poço, exceto os quatro primeiros poços da primeira coluna, em temperatura ambiente até que todo o líquido evaporasse, o que usualmente ocorria em até três dias. As microplacas foram tampadas e estocadas em temperatura ambiente sob ausência de luz até o momento do uso.

No momento do uso, as microplacas foram submetidas a três lavagens com PBS pH 7,2 com Tween 20 (0,05%) e incubadas com PBS Tween 20 (0,05%), acrescido de 5% de leite em pó desnatado por 30 minutos a 37°C, para o bloqueio dos sítios inespecíficos. As placas foram lavadas vigorosamente por três vezes com PBS Tween 20 (0,05%) acrescido de leite em pó 1%. Uma série de diluições dos soros dos 40 ovinos dos grupos A, B e C, de um total de cinco colheitas, foram diluídos na razão dois, iniciando-se em 1:10 e indo até 1:10.240, em volume de 100ml de PBS Tween 20 (0,05%). As placas foram incubadas por uma hora em câmara úmida 37°C, lavadas novamente por três vezes com PBS Tween 20 (0,05%) acrescido de leite em pó 1%. Em seguida, foram adicionados 100ml de conjugado anti (IgG) ovina diluído a 1:10.000, marcado com peroxidase (Bethyl, USA). Após a incubação por uma hora, novamente foram lavadas por três vezes com PBS Tween 20 (0,05%) acrescido de leite em pó 1%. A seguir, foram acrescidos 100ml de substrato cromogênico (15mg de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidina (TMB, Sigma, USA), mais H_2O_2 a 1%, imediatamente incubados por 10 minutos, sob ausência de luz. Como solução de parada da reação utilizaram-se 30ml de H_2SO_4 1M. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro com filtro de 450nm. Controles positivos e negativos adequados foram incluídos no teste.

O ponto-de-corte negativo do teste ELISA foi calculado pela média geométrica, conforme os procedimentos recomendados por Hartskeerl et al. (2001) e consistiu em titular os soros das quatro ovelhas da colheita do dia zero, confirmadamente negativas por meio do teste de SAM. A maior leitura em densidade óptica (D.O.) obtida destes soros foi dividida por dois e essa D. O. correspondeu

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

à diluição 10. Este ponto-de-corte foi utilizado para definir quais amostras de soro foram utilizadas para controle negativo no teste ELISA. Para um ponto-de-corte positivo no ELISA, a maior leitura obtida dos soros das 4 ovelhas hiperimunizadas com bacterina no teste de ELISA em D. O. foi dividida por dois. Esta D.O. correspondeu ao título 80. Portanto, os soros dos animais hiperimunizados que apresentavam leitura igual ou superior a 0,342 de D.O. foram considerados positivos.

Os dados foram testados quanto à normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Os títulos de anticorpos obtidos pelo teste de SAM e pelo teste de ELISA foram categoricamente pareados de acordo com o variável tempo (dias decorridos após a primeira aplicação da vacina), tratamento (A,B,C). Os títulos do teste de SAM foram transformados nos seus logaritmos na base 10 e as médias geométricas destes respectivos títulos foram calculadas, bem como as médias aritméticas para os valores obtidos de D.O.s do ELISA. Ambas médias (aritméticas e geométricas) foram submetidas ao teste Kruskal-Wallis, e comparados pelo teste Dunn de comparação múltipla ($P < 0,05$) (Sampaio, 1998). A tabulação e o tratamento dos dados foram efetuados com o auxílio de um aplicativo computacional estatístico denominado Graphpad prism 5.0 Instat for Windows⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a capacidade para produzir anticorpos em ovinos de uma bacterina oleosa experimental, monovalente da sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajtino, estirpe Norma, num período de 120 dias, aplicada uma ou duas vezes, por meio de dois testes diagnósticos: SAM e ELISA. O SAM detecta predominantemente a IgM, que é a primeira resposta do sistema imune dos animais. Esta imunoglobulina é responsável pela aglutinação e é detectada a partir de 11 a 21 dias após contato com o antígeno vacinal (Ellis & Michna 1977, Blackmore 1982, Smith et al. 1994). Por sua vez, o teste de ELISA é indicador de produção de IgG, responsável pela proteção vacinal anti-leptospirose (Tripathy et al. 1975). A resposta imunológica nos ovinos foi avaliada a partir do trigésimo dia após a aplicação da primeira dose da bacterina, momento considerado ideal, já que houve tempo suficiente para uma boa soroconversão, geralmente a partir da segunda semana após vacinação (Ellis & Michna 1977).

Na colheita de sangue realizada no dia zero, antes da administração da primeira dose da vacina e da solução salina aplicada no grupo C (Quadro 1) não foi detectada no soro de nenhum dos ovinos dos três grupos a presença de anticorpos para a leptospira sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajtino, estirpe Norma, determinados por eventual infecção natural, ou por uso de vacinas.

Na segunda colheita de sangue, 30 dias após a primeira vacinação, os títulos foram relativamente baixos, pois usualmente são menores que os observados em infecções naturais (Kingscote & Proulx 1986). Nos grupos A e B (Quadro 1, Fig.1) pôde ser observada a presença de títulos no teste de SAM e as reações variaram de 40 até 160. Já no teste de ELISA, os títulos encontrados nos grupos A e B, foram de duas a quatro vezes maiores do que no SAM, variando de 80 até 640. Na terceira colheita, os títulos do teste de SAM do grupo A, que recebeu a segunda dose, aumentaram uma a quatro vezes,

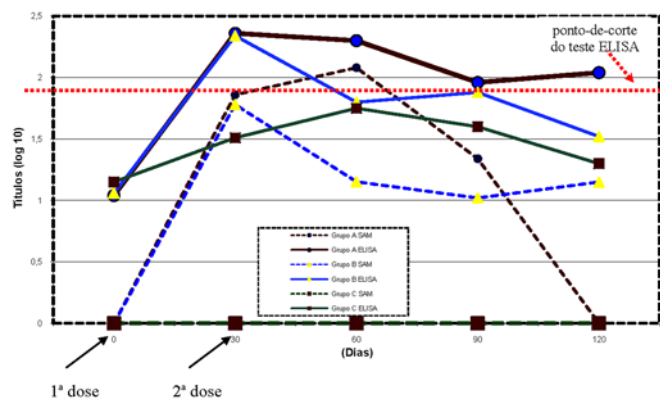


Fig.1. Médias dos logaritmos na base 10 dos títulos pós-vacinais anti-leptospira de ovinos nos grupos (A = duas doses, B = dose única e C = controle negativo) imunizados com bacterina da sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajtino, estirpe Norma segundo o momento da colheita de sangue e a técnica empregada para dosagem de anticorpos (SAM = teste de soroaglutinação microscópica; ELISA = ensaio imunoenzimático).

praticamente em todos os 15 ovinos do grupo, variando de 80 a 320. Entretanto, no teste de ELISA, os títulos permaneceram praticamente estáveis com poucas mudanças em valores semelhantes aos encontrados na segunda colheita, com uma variação individual de animal para animal, pois em alguns houve elevação e em outros ficaram estáveis, variando de 80 a 640. Os títulos variaram grandemente, pois dependem diretamente da resposta individual dos animais. Em determinados indivíduos, os títulos foram inferiores a dez e em outros foram de até 800 (Smith et al. 1994). Geralmente os títulos produzidos por vacinas são inferiores aos encontrados na infecção natural (Kingscote & Proulx 1986).

Na terceira colheita de sangue, os títulos do teste de SAM, após a aplicação da segunda dose da vacina, aumentaram de duas a quatro vezes em todos os ovinos do grupo A e, no grupo B, que não recebeu a segunda dose de reforço, os títulos diminuíram duas a três vezes. Na quarta colheita, os títulos do teste de SAM do grupo A decresceram consideravelmente e todos os animais apresentaram títulos menores que 40 e na quinta colheita todos menores do que 10. Ainda que títulos menores que 80 tenham sido encontrados no teste de SAM, considerados baixos, poderiam ser ainda considerados como indicadores de imunogenicidade (Schollum & Marshall 1985). Isto pôde ser comprovado pelo teste de ELISA na terceira e quarta colheita, quando foram encontrados no soro dos ovinos do grupo B títulos que variavam de 40 a 160.

Nos grupos vacinados (A e B), os títulos encontrados durante todo o experimento foram pouco expressivos, variando de 40 a 640, comportamento também já observado em rebanhos livres de leptospirose (Mackintosh et al. 1980). É bem provável que se a vacina for utilizada em rebanhos naturalmente infectados, os títulos resultantes serão maiores que os alcançados nos ovinos do presente trabalho, submetidos unicamente ao estímulo antigênico da vacina.

No grupo C (controle negativo) foram obtidas leituras no teste ELISA maiores que o ponto-de-corte (0,342) até as diluições do soro de 10 até 80, na 2ª, 3ª e 4ª colheita, ou seja, de 30 a 90 dias do experimento. Estas leituras foram consideradas inespecíficas, porque no teste de SAM, que detecta infec-

⁹ GraphPad Software 11452 El Camino Real, #215 San Diego, CA 92130, USA.

Quadro 1. Títulos de anticorpos pós-vacinais anti leptospira de ovinos imunizados com bacterina produzida com a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma segundo o grupo experimental, em cinco colheitas de sangue, para mensuração de anticorpos

Grupo A	Dia 0		Dia 30		Dia 60		Dia 90		Dia 120	
	SAM*	ELISA**	SAM	ELISA	SAM	ELISA	SAM	ELISA	SAM	ELISA
1	0	10	160	640	160	320	40	80	0	160
2	0	10	80	320	160	320	40	80	0	80
3	0	10	80	160	80	320	20	80	0	80
4	0	10	80	160	80	160	10	40	0	40
5	0	20	80	640	160	160	20	160	0	80
6	0	10	40	160	160	160	20	160	0	160
7	0	10	40	320	160	80	20	80	0	80
8	0	10	40	320	320	320	10	160	0	160
9	0	10	40	160	80	320	40	40	10	160
10	0	10	160	320	80	640	20	80	10	80
11	0	20	160	320	160	80	20	160	0	80
12	0	10	80	80	80	320	20	80	0	160
13	0	10	80	160	80	320	20	80	0	160
14	0	10	80	160	80	160	20	160	0	320
15	0	10	40	160	160	40	40	80	0	80
Média	0	11	83	272	133	248	24	101	1	125
Grupo B										
1	0	10	160	160	20	80	20	160	0	80
2	0	10	40	160	40	80	10	80	0	80
3	0	10	40	320	20	160	10	40	20	40
4	0	10	40	640	20	80	10	40	0	160
5	0	10	40	160	20	40	10	80	0	80
6	0	10	80	160	20	40	10	160	0	80
7	0	10	80	320	10	80	10	10	0	40
8	0	10	80	160	10	160	10	40	0	40
9	0	20	80	320	10	160	10	80	10	40
10	0	20	40	160	80	80	10	160	0	10
11	0	10	80	160	10	40	10	160	0	20
12	0	20	80	320	80	40	10	160	0	10
13	0	10	80	160	10	40	10	40	0	10
14	0	10	40	160	10	10	10	160	0	10
15	0	10	40	320	10	80	10	80	0	20
Média	0	12	66	245	24	78	10	96	2	48
Grupo C										
1	0	20	0	80	0	40	0	40	0	40
2	0	10	0	40	0	20	0	40	0	20
3	0	10	0	20	0	80	0	80	0	20
4	0	10	0	40	0	80	0	80	0	20
5	0	20	0	40	0	40	0	20	0	20
6	0	20	0	20	0	80	0	80	0	20
7	0	10	0	10	0	80	0	20	0	20
8	0	20	0	40	0	40	0	10	0	20
9	0	10	0	40	0	80	0	80	0	10
10	0	20	0	40	0	80	0	40	0	20
Média	0	15	0	37	0	52	0	49	0	21

* Teste de soroaglutinação microscópica. ** Ensaio imunoenzimático.

ções mais recentes, não houve absolutamente nenhuma reação em nenhum dos animais do grupo. Esta reação-de-fundo acredita-se ser devida a uma associação de fatores indeterminados, que poderiam ser variações diárias do teste e placas, resíduos celulares nas amostras de soro, amostras contaminadas, considerando-se que não houve outras variações, tais como operador, marca, modelo e partida das placas, reagentes e soluções, instrumentos e materiais (Crowther 2001).

As vacinas utilizadas ao longo dos anos nos programas de controle da leptospirose bovina empregam predominantemente o hidróxido de alumínio como adjuvante (Ris & Hamel 1979, Moreira 1994). Lentamente, o Hidróxido de Alumínio vem sendo substituído por adjuvantes oleosos, que podem

perfeitamente ser utilizados para ovelhas. As pesquisas têm demonstrado, e neste experimento também foi observado que o adjuvante oleoso possibilitou o desenvolvimento de uma vacina com bom aspecto visual, distribuição uniforme do antígeno no adjuvante, boa estabilidade e, devido a pouca viscosidade, foi de fácil aplicação, mesmo após ter sido conservada em temperatura de 3-8°C. Após a administração não foram observadas reações indesejáveis no local da aplicação, nem o desconforto generalizado dos animais. Não obstante ser o adjuvante um importante componente das vacinas para a liberação dos antígenos e, assim, para a persistência no estímulo à produção dos anticorpos pelos linfócitos B, os resultados aqui encontrados parecem indicar que os títulos de anticorpos vacinais declinaram a partir dos 90 dias, mesmo com

Quadro 2. Análise estatística das médias dos títulos logaritmizados na base 10 de anticorpos pós-vacinais anti-leptospira de ovinos imunizados com bacterina produzida com a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma segundo o grupo experimental, em cinco colheitas de sangue

TESTE Tempo GRUPO	SAM*					ELISA				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
A	0,000 ^a	0,1863 ^a	2,084 ^a	1,341 ^a	0,133 ^a	1,040 ^a	2,365 ^a	2,304 ^a	1,963 ^a	2,044 ^a
B	0,000 ^a	1,783 ^a	1,262 ^b	1,020 ^b	0,153 ^a	1,060 ^a	2,345 ^a	1,803 ^b	1,883 ^a	1,522 ^b
C	0,000 ^a	0,000 ^b	0,000 ^c	0,000 ^c	0,000 ^a	1,151 ^a	1,512 ^b	1,753 ^b	1,602 ^b	1,301 ^b
Valor p ***	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0001	<0,0001

* Teste de soroglutinação microscópica. ** Ensaio imunoenzimático. *** Valores com letras diferentes dentro da mesma coluna e mesmo teste diferem entre si ($p < 0,05$).

a dose de reforço. Desta forma, a re-vacinação é importante para que a imunidade dos ovinos possa ser mantida por período mais longo, à semelhança do que foi comprovado para bovinos (Rodrigues et al. 2011).

O teste de Shapiro-Wilk dos dados para normalidade demonstrou que não possuíam distribuição normal, nem para o teste de SAM nem para os dados do ELISA, mesmo depois de transformados aos seus logaritmos na base 10, razão pela qual se optou por testes de significância não-paramétricos. A análise das médias aritméticas dos títulos logaritmizados permitiu ver que a vacina induziu produção de títulos de anticorpos para o teste de SAM a partir dos 30 dias pós-vacinação em relação ao grupo controle não-vacinado, aos 60 dias diferiram entre grupos com uma e duas doses de vacina, que persistiu e ainda diferiu até 90 dias, quando houve diferença significativa entre vacinados com uma dose e duas doses (Quadro 2). Porém, por meio do teste ELISA, a diferença entre os grupos com uma dose e o controle, que também começa aos 30 dias, não tem diferença entre o grupo vacinado com uma dose e o grupo controle. Portanto, com duas doses, aos 60 dias existe diferença entre os grupos vacinados com uma e duas doses. Aos 90 dias a diferença entre os grupos vacinados com uma e duas doses não difere estatisticamente e aos 120 dias somente no grupo vacinado com duas doses os títulos de anticorpos induzidos pela vacina foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A vacina monovalente produzida com a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma, adsorvida em adjuvante oleoso, utilizada em dose única, produziu anticorpos que persistiram por 30 dias.

Com o emprego de duas doses, aplicadas com 30 dias de intervalo, foram detectados anticorpos por 60 dias com a técnica de soroglutinação microscópica e por 120 dias pelo teste de ELISA.

Agradecimentos.- Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

REFERÊNCIAS

Adler B. & Peña Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 149:287-296.

Blackmore D.K., Bahaman A.R. & Marshall R.B. 1982. The epidemiological interpretation of serological response to leptospiral serovars in sheep. *N. Z. Vet. J.* 30:38-42.

Cole J.R., Sulzer C.R. & Pursell A.R. 1973. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl. Microbiol.* 25:976-980.

Crowther J.R. 2001. *The ELISA Guidebook*. Humana Press, New Jersey, USA. 421p.

Ellinghausen H.C. & McCullough W.G. 1965. Nutrition of *Leptospira* Pomona and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 26:45-51.

Ellis W.A. & Michna S.W. 1977. Bovine Leptospirosis: Experimental infection of pregnant heifers with a strain belonging to the Hebdomadis Serogroup. *Res. Vet. Sci.* 22:229-236.

Ellis W.A., Bryson D.G., Neill S.D., McParland P.J. & Malone F.E. 1983. Possible involvement of leptospires in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. *Vet. Rec.* 26:291-293.

Ellis W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 10:463-478.

Faine S. 1994. *Leptospira* and Leptospirosis. 4th ed. CRC Press, Florida, Boca Raton. 272p.

Gerritsen M.J., Koopmans M.J., Peterse D. & Olyhoek T. 1994. Sheep as maintenance host or *Leptospira interrogans* serovars Hardjo subtype Hardjobovis. *Am. J. Vet. Res.* 55:1232-1237.

Hartskeerl R.A., Smits H.L., Korver H., Goris M.G.A. & Terpstra W.J. 2001. International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Royal Tropical Institute, Holanda. 100p.

Herrmann G.P., Lage A.P., Moreira E.C., Haddad J.P.A., Resende J.R., Rodrigues R.O. & Leite R.C. 2004. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 34:443-448.

Kingscote B.F. & Proulx J. 1986. The successful management of *Leptospira hardjo* infection in a beef herd in northern Ontario. *Can. Vet. J.* 11:435-439.

Langoni H., Marinho M., Bakini S., Silva A.V., Cabral K.G. & Silva E.D. 1995. Pesquisa de aglutininas anti-leptospiros em soros ovinos do Estado de São Paulo, Brasil, utilizando provas de macroaglutinação em placa e soroglutinação microscópica. *Revta Bras. Med. Vet.* 17:264-268.

Mackintosh C.G., Marshall R.B. & Broughton E.S. 1980. The use of Hardjopomona vaccine to prevent leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *N. Z. Vet. J.* 4:171-172.

Moreira E.C. 1994. Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Tese de Doutorado em Ciência Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 94p.

OIE 2006. *Leptospirosis. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*. World Organization for Animal Health, Paris, p.198-217.

Ris D.R. & Hamel K.L. 1979. *Leptospira interrogans* serovar Pomona vaccines with different adjuvants in cattle. *N. Z. Vet. J.* 27:169-171.

Rodrigues R.O., Herrmann G.P., Heinemann M.B., Lage A.P., Lopes L.B. & Moreira E.C. 2011. Comparação entre a imunidade induzida em bovinos vacinados com bacterinas polivalentes comerciais e uma monovalente experimental. *Pesq. Vet. Bras.* 31(1):10-16.

Sampaio I.B.M. 1998. *Estatística aplicada e experimental animal*. Funda-

- ção de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte. 221p.
- Santa Rosa C.A & Castro A.F.P. 1963. Presença de aglutininas anti-leptospiras em soro de ovinos e caprinos no Estado de São Paulo. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 30:93-98.
- Schollum L. & Marshall R.B. 1985. Age and the ability of calves to respond to a leptospiral vaccine. N. Z. Vet. J. 33:146-147.
- Smith C.R., Ketterer P.J., McGowan M.R. & Corney B.G. 1994. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar Hardjoprajitno infection in cattle. Aust. Vet. J. 71:290-294.
- Terpstra W.J., Ligthaert G.A. & Schoone G.J. 1980. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Zentralbl. Bakteriologie A 247:400-405.
- Terpstra W.J., Korver H., Van Leewen J., Klatser P.K. & Kolk A.H.J. 1985 The classification of Sejroe group serovar of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. Zbl. Bakteriologie Hyg. A. 259:498-506.
- Tizard I.R. 2008. Imunologia Veterinária: uma introdução. 8ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 587p.
- Tripathy D.N., Smith A.R. & Hanson L.E. 1975. Immunoglobulins in cattle vaccinated with leptospiral bacterins. Am. J. Vet. Res. 36:1735-1736.
- Vasconcelos S.A. 1997. Leptospirose bovina. Anais II Simpósio Pfizer sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos, Caxambú, p.34-38. (Resumo)
- Vermunt J.J., West D.M., Cooke M.M., Aalley M.R. & Collins E.J. 1994. Observation on three outbreaks of *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection in lambs. N. Z. Vet. J. 42:133-136.