

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TÍTULOS DE ANTICORPOS AGLUTINANTES INDUZIDOS
POR VACINAS COMERCIAIS CONTRA LEPTOSPIROSE
BOVINA**

Gabriela de Godoy Cravo Arduino
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TÍTULOS DE ANTICORPOS AGLUTINANTES INDUZIDOS
POR VACINAS COMERCIAIS CONTRA LEPTOSPIROSE
BOVINA**

Gabriela de Godoy Cravo Arduino

Orientador: Prof. Dr. Raul José Silva Girio

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
NOVEMBRO - 2005

Arduino, Gabriela de Godoy Cravo Arduino
A677t Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas
comerciais contra leptospirose bovina / Gabriela de Godoy Cravo
Arduino. -- Jaboticabal, 2005
xii, 115 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2005
Orientador: Raul José Silva Girio
Banca examinadora: Iveraldo dos Santos Dutra, Luís Antonio
Mathias, Humberto Eustáquio Coelho, Sonia Regina Pinheiro
Bibliografia

1. Leptospirose. 2. Vacina. 3. Bovinos. 4. Aglutininas. I. Título. II.
Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.986.7:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



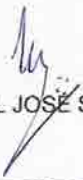
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

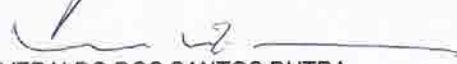
TÍTULO: TÍTULOS DE ANTICORPOS AGLUTINANTES INDUZIDOS POR VACINAS
COMERCIAIS CONTRA LEPTOSPIROSE BOVINA

AUTORA: GABRIELA DE GODOY CRAVO ARDUINO

ORIENTADOR: Dr. RAUL JOSÉ SILVA GIRIO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA
VETERINÁRIA (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA) pela Comissão Examinadora:


Dr. RAUL JOSÉ SILVA GIRIO

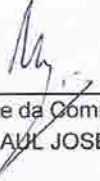

Dr. IVERALDO DOS SANTOS DUTRA


Dr. LUIS ANTONIO MATHIAS


Dr. HUMBERTO EUSTÁQUIO COELHO


Dra. SONIA REGINA PINHEIRO

Data da realização: 11 de novembro de 2005.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. RAUL JOSÉ SILVA GIRIO

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

GABRIELA DE GODOY CRAVO ARDUINO, nascida em 23 de outubro de 1974, em São Paulo, SP, é Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, em janeiro de 1999. Tendo estagiado por dois anos no Departamento de Nutrição Animal e Pastagens, na Área de Forragicultura, recebendo incentivo financeiro do PIBIC/CNPq/UNESP; no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, na Área de Anatomia Topográfica, apresentando seu trabalho em Congresso; no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal participando do Programa de Acompanhamento Intensivo em Propriedades Rurais, sendo um convênio entre a Nestlé/DMVP-UNESP, nas áreas de Sanidade Animal e Reprodução, e posteriormente coordenando os alunos deste mesmo programa. Realizou curso de pós-graduação "*Latu Sensu*" em Administração na Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, durante agosto de 1999 a julho de 2001. Mestra em Medicina Veterinária Preventiva pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, em fevereiro de 2002. Doutoranda no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, durante o período de 2002 a 2005. Professora de Doenças Infecciosas, Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Anatomia dos Animais Domésticos na Universidade de Uberaba (Uniube).

DEDICO

Aos meus pais, Margarida e Antonio, pelo apoio irrestrito, amor imensurável e exemplos de honestidade e caráter, dos quais sempre procurei espelhar-me.

OFEREÇO

Ao meu primo, Abílio Marcondes Godoy (*in memoriam*), com o qual aprendi os primeiros passos da Medicina Veterinária e sempre foi um exemplo de vida, de onde estiver acompanhou mais este passo vencido. Aos meus irmãos Ricardo e Fernando. Aos meu avós Márcia e João, e tios Izilda e Vitório pela imensa torcida e apoio, espero estar correspondendo às expectativas e sendo motivo de orgulho. E aos “agregados” Eline, Imaculada, Marco Antonio e Rogério, os quais sempre estiveram presentes, torcendo e apoiando cada novo passo.

AGRADEÇO

Ao Prof. Dr. Raul José Silva Girio, pela orientação científica e pelos ensinamentos de vida. Obrigada pela amizade sincera.

À Sra. Beatriz Biagi Becker, proprietária da Beabisa Agricultura Ltda, onde foi conduzido este estudo, que gentilmente cedeu seus animais e mão-de-obra para a realização deste. Também pela amizade e conselhos que muito acrescentaram tanto profissionalmente quanto em crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, pela cordialidade e dedicação a este trabalho.

Aos professores Dra. Ângela C. F. B de Carvalho (Unesp-Jaboticabal), Dra. Sônia Regina Pinheiro (USP-São Paulo), Dr. Fernando Antônio Ávila (Unesp-Jaboticabal), Dr. Humberto Eustáquio Coelho (Uniube-Uberaba), Dr. Iveraldo dos Santos Dutra (Unesp-Araçatuba), Luiz Antonio Mathias (Unesp-Jaboticabal) e Dr. Luiz Augusto do Amaral (Unesp-Jaboticabal) pela valiosa colaboração nas opiniões e correções.

Ao técnico Nivaldo Assis, pelo auxílio na realização dos exames laboratoriais.

À pós-graduanda Msc. Fernanda Magajevski, pela valiosa colaboração na condução das análises preliminares.

Aos grandes amigos que me apoiaram em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, Ana Paula, Flávia, Selma, Patrícia, Fabiano e César.

Aos docentes, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação e do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pelos ensinamentos e convivência.

Aos funcionários da Biblioteca da FCAV-Unesp-Jaboticabal, especialmente à funcionária Tiêko Takamiya Sugahara, pela correção das referências.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Levantamentos Sorológicos.....	5
2.2. Imunidade.....	8
2.3. Respostas imunes às bacterinas.....	10
2.4. Vacinas contra leptospira.....	13
2.5. Situação atual das vacinas e dos métodos de diagnóstico.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Local.....	28
4.2. Animais estudados.....	28
4.3. Colheita das amostras.....	29
4.4. Grupos experimentais.....	30
4.5. Composição dos grupos experimentais.....	30
4.6. Tratamentos realizados.....	31
4.7. Pesquisa de anticorpos.....	32
4.7.1. Preparo dos antígenos de leptospira.....	32
4.7.2. Técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM).....	33
4.8. Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS.....	35
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Estirpes de <i>Leptospira interrogans</i> , empregadas como antígeno na reação de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose, segundo o sorogrupo e a variante sorológica. Jaboticabal, 2003.....	29
2. Descrição das dosagens e vias de aplicação dos tratamentos e respectivos grupos experimentais. Jaboticabal, SP. 2003.	31
3. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra todos os sorovares pesquisados segundo os tempos de colheita das amostras. Jaboticabal, SP. 2003.....	35
4. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra cada sorovar no decorrer do estudo. Jaboticabal, SP. 2003.	37
5. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra cada vacina no decorrer do estudo. Jaboticabal, SP. 2003.....	38
6. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.	40
7. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.	40
8. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.	40
9. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.	41
10. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.	41

11. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.	41
12. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento A de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003	49
13. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento B de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003	49
14. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento C de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003	50
15. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento D de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003	50
16. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento E de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM de todos os animais envolvidos no experimento no decorrer do tempo. Jaboticabal-SP. 2003.....	36
2. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM de acordo com o sorovar testado no decorrer do estudo. Jaboticabal-SP. 2003.....	38
3. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM de acordo com a vacina testada pela SAM no decorrer do estudo. Jaboticabal-SP. 2003.....	39
4. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Canicola de acordo com a vacina aplicada e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	42
5. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com a vacina aplicada e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	43
6. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Hardjo de acordo com a vacina aplicada e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	44
7. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com a vacina aplicada e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	45
8. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Pomona de acordo com a vacina aplicada e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	47
9. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Wolffi de acordo com a vacina aplicada e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	48
10. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para o tratamento A (controle) de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	52
11. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para o tratamento B de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	53
12. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para o tratamento C de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	55
13. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para o tratamento D de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	56
14. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para o tratamento E de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.	58

LISTA DE ANEXOS

	Página
1. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	36
2. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	87
3. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	88
4. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	89
5. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	90
6. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	91
7. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	92
8. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	93
9. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	94
10. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	95
11. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	96
12. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	97
13. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	98
14. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	99
15. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	100
16. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	101
17. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	102
18. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	103

19. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	104
20. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	105
21. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	106
22. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	107
23. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	108
24. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	109
25. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	110
26. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	111
27. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	112
28. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.	113
29. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	114
30. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.....	115

RESUMO

TÍTULOS DE ANTICORPOS AGLUTINANTES INDUZIDOS POR VACINAS COMERCIAIS CONTRA LEPTOSPIROSE BOVINA

No presente estudo, 100 fêmeas bovinas foram divididas em cinco tratamentos de 20 animais cada. Os grupos experimentais receberam quatro diferentes vacinas comerciais (B, C, D e E), e um grupo permaneceu como controle. Amostras foram colhidas no dia da aplicação da primeira dose e nos dias 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 120, 150 e 180 pós-vacinação (pv). A triagem dos animais foi feita pela análise sorológica com 24 antígenos de leptospiros, escolhendo-se os animais não reagentes. Os títulos de anticorpos foram monitorados pela soroaglutinação microscópica (SAM) com os sorovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi. Todas as vacinas induziram, aos 3 dias pv, títulos de anticorpos aglutinantes para os sorovares Hardjo e Wolffi, que persistiram até o 150^o dia pv. Os sorovares Hardjo e Wolffi induziram os maiores títulos de anticorpos aglutinantes. A vacina D, apesar de não possuir o sorovar Wolffi em sua composição, foi capaz de induzir anticorpos aglutinantes contra este sorovar. Somente foram detectados anticorpos contra o sorovar Canicola nos animais vacinados com a bacterina D. A vacina que induziu os maiores títulos médios de anticorpos, considerando todos os sorovares testados, foi a D. Há a necessidade de melhoria no poder imunogênico e na concentração dos sorovares utilizados como antígenos nas vacinas comerciais.

Palavras-chave: *leptospirose, vacina, bovinos, aglutininas*

SUMMARY

AGGLUTINATING ANTIBODY TITRES INDUCED BY COMMERCIAL VACCINES AGAINST BOVINE LEPTOSPIROSIS

In this research 100 heifers were used, divided in 5 groups of 20 animals each. The four experimental groups were vaccinated using distinct commercial polyvalent bacterines: A, B, C and D, and a group was the control. Samples were collected at the days 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 42, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 120, 150 and 180 from the first injection of the vaccine. The selection of the animals for the experimental groups was done based on a serological screening with 24 antigens of *Leptospira* sp., constituted by non-reagent animals. The vaccine titres were monitored using the microscopic agglutination test (MAT) for Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona and Wolffi serovars. All vaccines used were capable to product agglutinins for the Hardjo and Wolffi serovars observed at 3 days after vaccination, remaining until the 150th day; these serovars induced the highest titres of agglutinins. The vaccine D, in spite of not containing the Wolffi serovar, was able to induce the production of agglutinins to this serovar. Agglutinins to the Canicola serovar were only observed in the animals vaccinated with the D bacterine. The vaccine D induced the highest average titres of antibodies to all serovars tested. The improvement of the immunogenic power and serovars concentration utilized as antigens of the commercial vaccines are necessary.

Keywords: *leptospirosis, bovine, vaccine, agglutinins*

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, a bovinocultura nacional apresenta grande importância no que diz respeito à exportação de produtos cárneos e de genética diferenciada, bem como o abastecimento do mercado interno com carne e leite de qualidade. Com esta maior exigência de produtividade e barreiras não tarifárias impostas pelos países importadores, tem surgido a necessidade de oferecer produtos que possuam biossegurança, o que se obtém pela condução de rígidos programas sanitários nos rebanhos produtores.

Entre as enfermidades incriminadas como fonte de perdas econômicas na produção e segurança alimentar está a leptospirose. Caracterizando-se por uma enfermidade de caráter populacional e ambiental, seu controle está intimamente ligado a medidas de prevenção, aplicadas aos animais e ao ambiente no qual os mesmos são mantidos. No caso do meio ambiente, há que se considerar o controle de roedores, a qualidade da água e dos alimentos fornecidos aos animais. Das medidas preventivas relacionadas ao manejo, a vacinação é uma das mais importantes, pois pode proporcionar uma imunidade humoral aos animais de forma que estes estejam protegidos contra a manifestação dos sinais clínicos da leptospirose, impedindo que a enfermidade seja transmitida entre os animais e os seres humanos. A transmissão para os seres humanos ocorre tanto pelo contato direto como de forma indireta, pelo consumo de produtos de animais infectados, sejam estes o leite ou a carne.

As vacinas disponíveis atualmente no mercado brasileiro, em sua maioria, se caracterizam por serem culturas de leptospiras inativadas acrescidas de adjuvantes. Elas são compostas pelos sorovares com maior prevalência nos estudos efetuados em nosso país, sendo muito comum adquirir bacterinas penta e hexavalentes. Entre os sorovares mais utilizados se encontram o Hardjo, Wolffi, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa e Bratislava. Há também disponíveis comercialmente vacinas contra leptospirose produzidas pela técnica de cultivo celular. Estas sempre estão associadas a outras enfermidades da esfera reprodutiva, tais como rinotraqueíte

infecciosa bovina e diarreia bovina a vírus, sendo o seu preço mais elevado quando comparado ao das vacinas contra somente os sorovares de leptospira.

Nos dias atuais a imunização por meio da vacinação é uma das práticas mais relevantes no manejo sanitário dos bovinos, com reflexos imediatos e diretos no retorno econômico da atividade, na garantia do excelente padrão sanitário do rebanho e na abertura e manutenção dos mercados. Embora represente um dos menores custos dentro do processo produtivo, de 2% a 5%, a vacinação pode ser decisiva para a obtenção de bons resultados na produção de carne e leite de qualidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose é uma zoonose endêmica no Brasil, que ocasiona perdas econômicas à bovinocultura (SAMPAIO et al., 2002). Até os anos 30 a 40, a leptospirose não era reconhecida como um problema veterinário para animais produtores de alimentos, e os bovinos também não eram apontados como fontes de infecção para os seres humanos. A doença nos bovinos foi primeiramente registrada na Rússia por SEMSKOV (1940) e TERSKICH (1940a e 1940b).

A leptospirose bovina é uma importante causa de distúrbios reprodutivos e de zoonoses ao redor do mundo (PANDEY, 1994; BOLIN & ALT, 1999). A infecção crônica é reconhecida por induzir falência reprodutiva em animais de produção (SONRIER et al., 2001; DELBEM, 2004). Nos Estados Unidos da América (EUA), entre os anos de 1942 e 1951, as perdas econômicas na espécie bovina, decorrentes da leptospirose, foram estimadas em aproximadamente 112 milhões de dólares, dos quais 93 milhões referem-se às perdas de animais e 19 milhões em decorrência da diminuição da produção leiteira (PEARSON et al., 1980; GUIMARÃES et al., 1982/83). No Brasil, a doença é amplamente difundida e acarreta elevados prejuízos econômicos para a pecuária nacional (VASCONCELLOS, 1993; PANDEY, 1994). A leptospirose, importante zoonose de distribuição mundial (PINTO, 1997), não provoca sinais patognomônicos e, portanto, seu diagnóstico clínico é difícil, exigindo usualmente a confirmação laboratorial (STOENNER, 1972). A vacinação é o método mais comumente utilizado para a prevenção da leptospirose (BOLIN & ALT, 1999).

Na bovinocultura as perdas econômicas produzidas pela leptospirose estão direta ou indiretamente relacionadas a aborto, queda de produção de leite, falhas reprodutivas e custos de assistência veterinária, medicamentos, vacinas e testes laboratoriais (BLOOD & RADOSTITS, 1989; QUINLAN & McNICKOLL, 1993; FAINE, 1994; FAINE et al., 1999). GUIMARÃES et al. (1982/83) mencionam prejuízos com a elevação nos coeficientes de mortalidade de bezerros bovinos nos rebanhos afetados.

Na literatura observa-se que os transtornos reprodutivos na espécie bovina, como aborto, infertilidade e agalaxia, podem estar relacionados com os sorovares:

Pomona (THORNTON, 1993), Hardjo, (PALECHEK, 1987; THURMOND et al., 1990), Icterohaemorrhagiae e Canicola (THURMOND et al., 1990). Em bovinos a infecção pela variante sorológica Hardjo causa abortamentos, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos (GIORGI et al., 1995; BOLIN et al., 1989a; BOLIN et al., 1989b; BOLIN et al., 1991), mastite (BOLIN et al., 1989a; BOLIN et al., 1989b) e agalaxia (BOLIN et al., 1989a).

Os altos riscos de infecção são caracterizados pelo contato direto ou indireto com urina (PANDEY, 1994) e produtos provenientes de animais infectados (BLOOD & RADOSTITS, 1989). BLAHA (1995) cita a transmissão por meio da água parada, por urina contaminada, ou, de um animal infectado a outro, pelo coito. O solo úmido contaminado permanece infectante por duas semanas ou mais, e as leptospiros sobrevivem por muitos meses na água (PANDEY, 1994).

A transmissão transplacentária é comum entre os animais. Foi relatada a ocorrência da transmissão de animal para animal e do animal para o homem, e raras ocorrências de transmissão de homem para homem (BRASIL, 1995).

A transmissão entre os bovinos ocorre principalmente pelo contato com a urina de roedores e bovinos infectados, via transplacentária, via mamária e pelo sêmen contaminado (SMITH, 1996).

As fontes de infecção são os reservatórios, os portadores são, convalescentes e os animais doentes. Os reservatórios, na maioria dos casos, são os roedores das espécies *Mus musculus*, *Rattus rattus* e, principalmente, *Rattus norvegicus* (MASCARO & SANTOS, 1990; LANGONI, 1999). São considerados susceptíveis e doentes os bovinos, suínos, eqüinos, cães, ovinos, caprinos e animais silvestres. As portas de entrada são a pele lesada ou íntegra e mucosas, em contato com urina contaminada em ambiente ou água, sendo a urina a via de eliminação do agente. A transmissibilidade depende da leptospiúria (eliminação do agente pela urina), que pode variar de meses até anos, tendo caráter intermitente (EYS et al., 1989).

Quando discute a mortalidade embrionária e fetal em programas de transferência de embriões, RODRIGUES (2003) incrimina a leptospirose como uma das causas infecciosas, e a *L. interrogans* sorovar Hardjo tem sido a mais freqüentemente associada a perdas embrionárias em bovinos nos EUA. No Brasil, tem-se detectado a

presença do sorovar Wolffi em receptoras que apresentaram perdas embrionárias. Esse autor menciona ainda que os resultados obtidos contra o sorovar Hardjo são de difícil interpretação, pois os animais infectados apresentam títulos baixos, raramente excedendo 1.600, contrastando com o sorovar Pomona, contra o qual os títulos de anticorpos aglutinantes são consideravelmente mais altos, podendo exceder 12.800.

A leptospira tem sido detectada em praticamente todos os países que realizam investigações epidemiológicas (PANDEY, 1994) e está mundialmente distribuída. Sua incidência tem forte associação com períodos de alta pluviosidade (SULLIVAN, 1974; ACHA & SZYFRES, 1986; PLANK & DEAN, 2000), e, sob condições favoráveis e na presença de hospedeiros adequados, as leptospirosas podem persistir por semanas (SULLIVAN, 1974) a meses (PLANK & DEAN, 2000) no ambiente, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (SULLIVAN, 1974). Em regiões secas, infecções acidentais ocorrem próximas a águas represadas com alta concentração de animais. Em regiões temperadas as infecções são sazonais, ocorrendo com maior frequência nos meses quentes e chuvosos (THIERMANN, 1984).

A leptospirose é mais difundida nos países tropicais, sendo o agente infectante um dos muitos sorovares, carreados por uma grande variedade de hospedeiros (PANDEY, 1994).

Na Nova Zelândia, a incidência da leptospirose humana pela variante sorológica Hardjo reflete a situação da enfermidade nos bovinos (BROUGHTON et al., 1984). Assim sendo, a redução da incidência da leptospirose humana é primariamente dependente do controle da doença nos bovinos (SULLIVAN, 1974; COLEMAN, 2000).

2.1. Levantamentos sorológicos

Segundo SMITH (1996), nos EUA, os sorovares Hardjo, Pomona e Grippotyphosa são os mais comumente diagnosticados em infecções nos bovinos.

No Brasil, já foram registradas aglutininas contra vários sorovares de *L. interrogans* na espécie bovina, e os de maior ocorrência foram Pomona, Wolffi, Hardjo, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Tarassovi, Bratislava, Australis, Ballum e Sejroe (SZYFRES, 1976). SANTA ROSA et al. (1969/70) constataram predomínio do

sorovar Wolffi, em exames sorológicos realizados entre os anos de 1960 e 1968, em soros de bovinos oriundos dos estados de São Paulo, Paraná, Pernambuco, Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Amapá, Pará e Rio de Janeiro.

Em exames sorológicos realizados entre 1974 e 1980, GIORGI et al. (1995) constataram o predomínio do sorovar Wolffi seguido das variantes Pomona e Tarassovi em soros bovinos provenientes de vários estados (Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Pará). Nessa época, o sorovar Hardjo ainda não fazia parte da coleção de antígenos empregados.

Ao encaminharem soros de bovinos em inquérito epidemiológico probabilístico no Estado de Minas Gerais, MOREIRA et al. (1979) constataram predominância do sorovar Wolffi, seguido de Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Canicola.

Em levantamento sorológico de duas propriedades de bovinos leiteiros azebuados e mestiços da região do Triângulo Mineiro/MG, RIBEIRO et al. (1983) mencionaram a predominância do sorovar Wolffi, seguido do Hardjo.

Nos exames sorológicos de bovinos da bacia leiteira de Porto Alegre/RS, ABUCHAIM & DUTRA (1985) verificaram o predomínio dos sorovares Pomona, Hardjo e Sejroe.

No Estado do Rio de Janeiro, LILEBAUM et al. (1995) observaram a ocorrência do sorovar Hardjo, seguido do Wolffi e do Bratislava, em vacas com problemas reprodutivos e não vacinadas contra leptospirose.

Em bovinos da região de Salvador/BA, CALDAS et al. (1995/96) verificaram maior frequência dos sorovares Wolffi, Icterohaemorrhagiae e Autumnalis.

VASCONCELLOS et al. (1997), por meio de levantamento sorológico, constataram o predomínio do sorovar Hardjo em rebanhos bovinos de seis estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

Na região do Pantanal/MS, GIRIO et al. (1998) verificaram a ocorrência dos sorovares Wolffi, Grippotyphosa e Pomona em bois baguás (*Bos taurus indicus*), e Pomona, Hardjo e Wolffi em búfalos (*Bubalus bubalis*).

Em estudo retrospectivo dos exames sorológicos de leptospirose realizados no período de 1984 a 1997 pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP,

FAVERO (2000) verificou a predominância de reações com os sorovares Hardjo e Wolffi em soros bovinos provenientes dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Bahia, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Piauí, Ceará, Maranhão, Pará, Rondônia, e do Distrito Federal. Nessa observação, foram considerados como mais prováveis os sorovares que apresentaram maior título no teste de soroaglutinação microscópica, e foram desconsiderados os animais que apresentaram títulos mais elevados iguais contra dois ou mais sorovares.

Em 2002, BENEDICTO et al., quando estimaram a prevalência da leptospirose bovina em rebanhos leiteiros de dois municípios localizados na região Noroeste do Estado de São Paulo pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) utilizando de 18 sorovares como antígenos em 1.416 amostras de soro sanguíneo, identificaram 645 (45,55%) reagentes contra um ou mais sorovares, sendo 471 contra o sorovar Hardjo (33,26%), 359 contra o Wolffi (25,35%), 54 contra o Bratislava (3,81%), 27 contra o Icterohaemorrhagiae (1,90%), 22 contra o Grippotyphosa (1,55%), 20 contra o Pomona (1,41%), 17 contra o Copenhageni (1,20%) e cinco amostras reagentes contra o sorovar Canicola (0,35%); 250 amostras foram reagentes tanto contra o sorovar Wolffi quanto contra o Hardjo, fato esperado por pertencerem ao mesmo sorogrupo (Sejroe).

WUNDER et al. (2002), quando em investigação sorológica e histopatológica de um feto bovino abortado enviado ao departamento de patologia clínica da FAVET-UFRGS, identificaram no exame de microaglutinação dos soros fetal e materno reatividade contra *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis e *L. interrogans* sorovar Wolffi.

Na tentativa de determinar as causas que afetavam a reprodução em bovinos no Estado de Minas Gerais, KONRAD et al. (2002) realizaram um levantamento soroepidemiológico em 15 propriedades com histórico de transtorno reprodutivo, localizadas em diferentes regiões do Estado. Foram pesquisados, em 1.304 amostras, anticorpos contra agentes da brucelose, leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarréia bovina a vírus (BVD) e língua azul. Observaram que 21,78% (284) dos soros de fêmeas bovinas eram reagentes contra a leptospirose, a maioria contra mais de um sorovar, com predominância do sorovar Hardjo (18,09%).

Para identificar a frequência da leptospirose bovina no Rio Grande do Sul, SAMPAIO et al. (2002), por meio da análise do soro bovino pela SAM, verificaram, em 3.863 amostras encaminhadas ao laboratório da Universidade de Santa Maria entre julho de 2001 e julho de 2002, que 1.791 (46,36%) foram reagentes, sendo 1.443 contra o sorovar Hardjo (80,57%), 702 contra o Wolffi (39,19%), 227 contra o Grippotyphosa (12,67%), 221 contra o Bratislava (12,34%), 109 contra o Australis (6,09%), 82 contra o Pomona (4,58%), 46 contra o Icterohaemorrhagiae (2,57%) e 22 contra o sorovar Canicola (1,23%); demonstrando a alta frequência de soropositividade nos soros de animais suspeitos e a importância de um manejo sanitário adequado.

ARDUINO (2002) estudou, por meio da prova de SAM, a prevalência dos sorovares de leptospira em seis propriedades de bovinos da Região Noroeste do Estado de São Paulo. Os sorovares Hardjo e Wolffi foram os mais frequentes, seguidos pelos sorovares Pomona, Icterohaemorrhagiae, Australis, Bratislava, Autumnalis, Castelonis e Pyrogenes.

2.2. Imunidade

O conhecimento essencial da imunidade contra a leptospira foi estabelecido muito cedo (INADA et al. 1916; UHLENHUTH & FROMME, 1916). Estudos posteriores de patogenicidade e imunidade demonstraram que a infecção inicial e a reinfecção resultam na manutenção e no desenvolvimento de uma resposta mediada por células B (STAVITSKY, 1945; STAVITSKY, 1948; FENNESTAD & BORG-PETERSEN, 1962; FAINE et al., 1974; ADLER & FAINE, 1976; ADLER et al., 1980). O fenômeno da imunidade pode ser transferido passivamente pelas imunoglobulinas, cuja especificidade é devida aos determinantes polissacarídeos dos lipopolissacarídeos das leptospiros (ADLER & FAINE, 1976; ADLER & FAINE, 1978; VINH et al., 1982; MCGRATH et al., 1984; BALLARD et al., 1986; JOST et al., 1986; CHAPMAN et al., 1987).

Uma vez que a imunidade é essencialmente humoral, associada a anticorpos contra os componentes lipopolissacarídeos, a mensuração dos títulos de anticorpos pela SAM proporciona um bom meio para medir a imunidade sem utilizar experimentos de

desafio (FAINE et al., 1974; ADLER & FAINE, 1978; BEY & JOHNSON, 1978; GODDARD et al., 1986; JOST et al., 1986; CHAPMAN et al., 1988, CHAPMAN et al., 1990). Todas as vacinas devem ser administradas parenteralmente em duas doses, com intervalo de cerca de um mês. NOLAN (1990) descreve que a utilização de duas doses de uma vacina para bovinos confere títulos maiores do que quando se utiliza apenas dose única. A imunização necessita ser repetida ou reforçada anualmente. Essas necessidades aumentam consideravelmente os custos da imunização, somados aos da administração e do manejo dos animais. Efeitos adversos são relatados como insignificantes (FAINE et al., 1999).

No caso da vacinação contra leptospirose, esta deve ser capaz de promover um estímulo imunológico adequado, contribuindo para que o organismo produza títulos de anticorpos efetivamente protetores, que passam a ser eficazes contra o agente infeccioso, ou melhor, com capacidade de controlar ou bloquear o processo infeccioso (FAINE et al., 1999).

Os anticorpos contra leptospira podem ser detectados no soro sangüíneo dos animais no início das infecções e mais tardiamente no caso das vacinações. A concentração dos anticorpos aumenta à medida que a infecção evolui ou ainda no desenvolvimento da resposta induzida pelos antígenos vacinais. As classes de anticorpos inicialmente detectadas são IgM e IgA, que em média nos bovinos chegam a concentrações mais elevadas em cerca de sete dias. A classe IgG pode ser detectada por volta de dois dias após o surgimento das anteriores, atingindo a sua magnitude por volta de duas semanas e perdurando por tempo mais prolongado (FRANCIS et al., 1983; THEVENON et al., 1987; TIZARD, 1998).

Um importante achado dos estudos genômicos das leptospirosas é o de que os agrupamentos baseados na antigenicidade (sorogrupos e sorovares) não correspondem aos grupos taxonômicos, baseados nas relações genômicas. BRENNER et al. (1999) relataram que a maioria dos sorogrupos contém muitos sorovares ou contém mais de uma espécie (ou genótipo), e a maioria dos grupos de espécies têm sorogrupos representativos e múltiplos. Como resultado desses achados, a tipificação de um isolado como um sorovar particular não provê informações confiáveis da espécie do mesmo isolado e vice-versa (O'KEEFE, 2002).

Apesar disso, os métodos de diagnóstico baseados nas reações antigênicas para a determinação do sorovar de leptospira infectante continuam a ser utilizados, o que ocorre não somente devido à significância epidemiológica e clínica da informação, mas também às exigências regulatórias em torno do comércio de animais em fronteiras internacionais (OIE, 1996).

2.3. Respostas imunes às bacterinas

Bacterinas de leptospira, quando inoculadas em animais domésticos, sempre falham em induzir níveis significantes de anticorpos aglutinantes, especialmente em suínos (BURNSTEIN et al., 1957; HANSON et al., 1972; MORSI et al., 1973; SHIBLEY et al., 1973; DOBSON & DAVOS, 1975; BEY & JOHNSON, 1982). Essas falhas conduziram os cientistas na avaliação de tipo de globulina imune, produzida em resposta ao estímulo antigênico, pois os animais eram sempre refratários à infecção na ausência de títulos aglutinantes.

Administração parenteral de um antígeno em um hospedeiro capaz de resposta resulta na produção de IgM, seguida pela IgG (PIKE, 1967). A imunoglobulina M é considerada mais eficiente para aglutinação, devido aos cinco maiores sítios de fixação de antígeno, sendo a IgG mais eficiente na neutralização e é produzida após a IgM. A imunoglobulina G apresenta uma vida média biológica muito superior à da IgM, persistindo, portanto, por tempo mais prolongado no sistema vascular sangüíneo do hospedeiro. O tipo e a quantidade de anticorpos produzidos dependem do tipo e da quantidade de antígeno administrado (VAM BEKKUM, 1966). GRAVES & FAINE (1970) inocularam leptospiras saprófitas vivas (*biflexa Waz*) em um coelho e detectaram tanto IgM como IgG séricas por 216 dias. Portanto, a administração de antígeno vivo pode resultar num constante estímulo antigênico. CRAWFORD (1972a) e CRAWFORD (1972b) também detectaram a presença de IgM e IgG após inoculação experimental de amostra viva do sorovar Pomona em cobaias. A imunoglobulina M era de atividade predominante no período compreendido entre os dias 24 e 50 pós-inoculação. A classificação de imunoglobulinas baseou-se na ultracentrifugação em gradiente de densidade, sensibilidade ou resistência ao 2-mercaptoetanol e padrões cromatográficos

de filtração molecular. BEY & JOHNSON (1978) vacinaram bovinos e cães com uma vacina pentavalente de envelope mais externo (1 mg de cada sorovar: Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo e Grippotyphosa) ou vacina de cultura total. A resposta humoral de cães e bovinos a cada sorovar foi monitorada por dois anos. Resultados indicaram que, utilizando testes diagnósticos de SAM e inibição de crescimento da leptospira (IL), ambas, IgM e IgG, estavam presentes durante os 2 anos de estudo. A imunoglobulina M foi separada do soro pela precipitação por polietilenoglicol. Títulos de aglutinação microscópica tenderam a se correlacionar com IgM, enquanto títulos de IL tenderam a se correlacionar com IgG. A inibição de crescimento da leptospira mostrou-se mais sensível na detecção de anticorpos ao sorovar Hardjo do que o teste de SAM.

HOCKER & BAUER (1965) e PIKE et al. (1965) indicaram que bacterinas de leptospira comercializadas deviam induzir a elaboração de quantidades de aglutininas IgM e IgG mais duradoura. Concordando com as observações dos cientistas pioneiros, os testes utilizados não foram capazes de detectar anticorpos aglutinantes devido aos animais serem refratários à infecção experimental (HEATH & BOX, 1975). NEGRI et al. (1971b) relataram que, após a inoculação de bovinos com vacina elaborada com o sorovar Pomona quimicamente inativada, a primeira imunoglobulina produzida foi a IgM, seguida de IgG. Utilizando um teste de hemaglutinação, detectaram níveis substanciais de IgG na ausência de títulos de SAM detectáveis. Níveis de IgG persistem, pelo menos, por 12 meses. Misturas de IgG de soros, obtidos de bezerros inoculados há 6 meses, protegeram 62% dos hamsters no teste de proteção, enquanto misturas de IgM dos mesmos animais protegeram apenas 25% dos hamsters. Animais revacinados do estudo acima citado responderam com uma elevação anamnésica em IgM e IgG. Esse fato foi também revelado em outros estudos de vacinação (GRAVES & FAINE, 1970; HANSON et al., 1972; HANSON, 1973; BEY & JOHNSON, 1978; MACHINTOSH et al., 1980; BEY & JOHNSON, 1983).

MORRIS & HUSSEINI (1974) caracterizaram os anticorpos envolvidos nos testes de hemaglutinação indireta e aglutinação microscópica contra leptospirose bovina. As imunoglobulinas M e subclasses de IgGs bovinas (IgG₁ e IgG₂) foram separadas do soro e purificadas por centrifugação em gradiente de densidade, gel de filtração e

cromatografia de troca iônica. Resultados desses estudos indicaram que anticorpos antileptospiras aglutinantes não se restringiam à subclasse M, mas que anticorpos de subclasse IgG exibiam atividade aglutinante. Como a síntese de IgG é posterior à de IgM, embora alcançando concentrações mais elevadas, o teste de SAM pode detectar anticorpos residuais por período de tempo mais longo que o indicado pelos pesquisadores mais antigos. Esses resultados amparariam as observações de BEY & JOHNSON (1978), GRAVES & FAINE (1970), CRAWFORD (1972a) e CRAWFORD (1972b). É difícil comparar os títulos obtidos por NEGRI et al. (1971a,1971b), que trabalharam duas vezes com vacinas contra leptospiras; no primeiro estudo utilizaram apenas vacinas monovalentes de massa antigênica desconhecida (NEGRI et al., 1971a), enquanto no segundo foi empregada uma vacina pentavalente liofilizada com 1 mg de envelope externo por sorovar (NEGRI et al., 1971b). Segundo os resultados, a duração dos títulos depende da massa antigênica administrada, e tanto a IgM quanto a IgG podem ser detectadas pelo teste de SAM. ADLER et al. (1982) empregaram o teste de ELISA para detecção de IgM e IgG em bovinos vacinados com vacina de cultura total inativada. Os resultados indicaram que IgM e IgG foram produzidas logo após a inoculação, com a IgM declinando substancialmente por volta da quarta semana.

O envelope externo (EE) da leptospira é a estrutura mais importante para a imunização de animais (ADLER et al., 1982; BEY & JOHNSON, 1982). Em bases quantitativas, EE é um imunógeno superior dos componentes da parede celular. É possível estabelecer imunidade adequada administrando-se 1×10^9 leptospiras por sorovar, em culturas totais, quimicamente inativadas ou 0,3 mg de peso seco de EE ou cultura total por sorovar. Animais jovens podem ser protegidos de infecção imunizando-se as mães e proporcionando a transferência passiva de anticorpos pelo colostro (MCDONALD & RUDGE, 1957; CHAUDHARY et al., 1966). Entretanto, deve-se lembrar que estes animais não podem ser imunizados pela via parenteral por muitos meses decorridos da ingestão de colostro.

2.4. Vacinas contra leptospira

Nos últimos 40 anos, numerosas vacinas contra leptospirose foram desenvolvidas e avaliadas em animais de laboratório, bovinos, suínos, cães, ovinos e eqüinos (PANDEY, 1994). Uma das primeiras bacterinas foi preparada por OLITZKI et al. (1953), empregando cultura do sorovar Pomona, inativada pelo formol. A avaliação desta vacina em animais indicou um grau moderado de imunidade nos vacinados. BROOM (1949) observou alguma proteção em hamsters com cultivo do sorovar Canicola inativado pelo fenol e administrado em doses elevadas. No ano seguinte, 1950, LUBASHENKO relatou que a administração de anti-soro homólogo promovia uma efetiva resposta profilática em bovinos, e que 78% dos animais vacinados com culturas inativadas pelo formol foram refratários ao desafio. Simultaneamente, BRUNNER & MEYER (1950) descreveram imunização exitosa de hamsters e cães com bacterina liofilizada do sorovar Canicola ou do Icterohaemorrhagiae. Esse estudo foi um dos primeiros a elucidar que era necessária menos massa antigênica em bacterinas preparadas com leptospiros virulentas, para proteger cães e hamsters de óbito, do que as bacterinas preparadas a partir de leptospiros não virulentas. Com um aumento da massa antigênica de leptospira não virulenta em cerca de três vezes, conseguia-se uma proteção equivalente. Demonstraram também a especificidade do sorovar das vacinas. Não foi observada proteção cruzada com as vacinas do sorovar Canicola e Icterohaemorrhagiae.

YORK & BACKER (1953) descreveram o preparo de uma bacterina do sorovar Pomona a partir de microrganismos propagados 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.

A bacterina de leptospira foi aprimorada por BROWN et al. (1955), que descreveram, com sucesso, a produção em meio Stuart modificado de cultura de leptospira com inativação térmica, congelamento e descongelamento. Essa bacterina apresentou capacidade de proteger bezerros e cobaias imunizados. Esses mesmos autores relataram também o desenvolvimento de uma bacterina inativada pelo formol, contendo adjuvante. Bezerros vacinados com essa bacterina desenvolveram

significantes títulos aglutinantes, enquanto a bacterina anterior não. Além disso, bezerros vacinados com essa bacterina, adsorvida em adjuvante, resistiam com sucesso ao desafio com sangue de cobaia infectada com leptospira 3 e 6 meses após. Na época em que BROWN et al. (1955) relataram seu êxito utilizando vacinas de cultura total de leptospira, HOAG & BELL (1955) desenvolviam uma bacterina do sorovar Pomona, extraída por ácido acético, que tornou os bezerros vacinados resistentes a leptospiremia, leptospirúria e lesões renais. Essa bacterina, tal qual a de BROWN et al. (1955), induziu a resposta de anticorpos aglutinantes com ligeiro aumento após o desafio (PANDEY, 1994).

As vacinas utilizadas atualmente são em sua maioria suspensões feitas a partir de células bacterianas íntegras, entretanto vacinas contendo o envelope externo têm sido produzidas (BEY et al., 1974). Meios livres de proteína derivados do método de Shenberg são geralmente utilizados. Alguns dos meios e métodos usados na fabricação são segredos comerciais e nunca foram publicados. Em princípio as leptospiras são cultivadas em meios livres de proteínas com altos níveis de oxigenação para atingir máxima densidade, pois a eficácia é dose-responsiva com respeito à concentração do antígeno. No processo chinês, para produzir vacinas para seres humanos, as culturas são concentradas por filtração com fibra total e padronizadas para a concentração desejada (CHEN, 1986). O fosfato de alumínio potássico é utilizado como adjuvante (MARSHALL et al., 1980).

Preparações contendo a célula inteira inativada são utilizadas como bacterinas na prevenção da leptospirose. Como esse tipo de proteção é considerada sendo sorogrupo-específica, vários sorovares foram adicionados às vacinas usuais, e o sorovar mais patogênico é escolhido em cada grupo. 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. Entretanto, extratos protéicos induzem proteção significativa contra ambos os tipos de desafio. Esta proteção cruzada contra *L. interrogans* é relacionada ao extrato protéico (SONRIER et al., 2001).

Vacinas polivalentes são necessárias quando um ou mais sorovares ou sorogrupos infectam os mesmos animais. A imunidade é sorovar-específica ou ao mais patogênico dos membros de um mesmo sorogrupo, mas não necessariamente para a mesma genospecie (KEMENES, 1964; PLESKO & LATASTE-DOROLLE, 1970; PLESKO & HLAVATA, 1971; FAINE et al., 1999). As vacinas são elaboradas pela combinação de suspensões de diferentes sorovares, escolhidos de acordo com as necessidades locais.

Na Europa e na América do Norte, os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae são combinados em vacinas para os cães. Esta vacina não é utilizada na Austrália, onde não há manutenção de hospedeiros de leptospira para a espécie canina. Combinações dos sorovares Hardjo e Wolffi são largamente utilizadas para bovinos. Suínos são vacinados com os sorovares Pomona, Tarassovi e, algumas vezes, com o sorovar Bratislava (FAINE et al., 1999). Hoje, nos EUA, vacinas pentavalentes são compostas pelos sorovares Canicola, Pomona, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa e são aprovadas para uso em rebanhos domésticos.

As imunizações ativas com uma variedade de preparações vacinais estão disponíveis para animais domésticos e, em alguns países, para seres humanos. As propriedades essenciais de uma vacina devem ser a imunogenicidade, a eficiência na prevenção da leptospirose aguda e do estado de portador renal, e a inocuidade. A segurança implica o fato da aplicação não ser tóxica e não ser pirogênica, teratogênica ou alergênica local ou sistemicamente. As vacinas devem também ser estáveis e proporcionar imunidade de duração aceitável após a aplicação da dose de reforço (FAINE et al., 1999).

A vacinação bovina assume importância não só no que se refere aos prejuízos no setor pecuário, mas também no que diz respeito à prevenção da infecção no ser humano, como foi observado por MARSHALL (1987) em estudo no qual constatou uma queda nos casos clínicos de leptospirose em trabalhadores rurais na Nova Zelândia após campanha de vacinação nos bovinos.

Em bovinos, a vacinação desempenha um importante papel no controle da leptospirose e deve ser associada a outras medidas de manejo, podendo com isso reduzir sensivelmente a prevalência de animais reagentes no rebanho (KINGSCOTE & PROULX, 1986; HODGES & DAY, 1987).

De acordo com VAN BEKKUM (1966) e MC CULLOUGH et al. (1992), a vacina contra a leptospirose deve induzir a produção de títulos de anticorpos específicos, os quais dependem da imunogenicidade e da qualidade do antígeno, dos esquemas de vacinação utilizados e da capacidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imune específica e eficiente para neutralizar o agente. A influência de outros fatores, tais como a intensidade do desafio e o grau de similaridade entre os antígenos que compõem a vacina, são também muito importantes para o resultado final do nível de proteção específica conferida por uma vacinação contra a leptospirose (RWEYEMAMU et al., 1977).

O intuito da vacinação deveria ser o de evitar novas infecções, mas nem sempre isso é possível (BOLIN et al., 1989a; BOLIN et al., 1989b; ELLIS et al., 1989 e KOLBL et al., 1995). A *Leptospira* sp. é um antígeno pobre, induzindo respostas imunológicas baixas e por um curto período de tempo (BOLIN et al., 1991; VENKATARAMAN et al., 1994), sendo a resposta humoral a mais importante (ISOGAI et al., 1990).

As vacinas polivalentes contendo leptospiros inativadas são as mais utilizadas rotineiramente. Na verdade, essas vacinas não produzem a mesma resposta sorológica contra todos os sorovares. Isso pode ocorrer devido a uma diferença na concentração antigênica final, ou pela supressão da resposta antigênica causada por um sorovar sobre um outro presente na vacina (SIDDIQUE & SHAH, 1990).

Outro aspecto controverso é o intervalo entre as revacinações, pois há muita variação, de meses até um ano, na duração dos títulos vacinais detectados por meio de provas sorológicas (HUHN et al., 1975; BRIHUEGA & HUTTER, 1995). ANDREWS et al. (1996) preconizam que um bom esquema de vacinação consiste de duas aplicações com um intervalo de pelo menos quatro e não maior que seis semanas. Esse procedimento pode ser efetuado em qualquer período do ano, mas preferencialmente deveria ser realizado antes do principal período de transmissão da enfermidade, que corresponde ao período de cobertura, no caso de novilhas, que deverão ser revacinadas anualmente.

Suínos vacinados com 5 mL de bacterina do sorovar Pomona, contendo 1×10^9 leptospiros/mL, tornaram-se refratários à infecção, 48 dias após imunização (BURNSTEIN et al., 1957). Nesse estudo, foi avaliada a via de aplicação (intramuscular ou

subcutânea), não tendo sido observadas diferenças na resposta. Títulos máximos encontrados variaram de 10 a 200.

Avaliando as respostas imunes em bezerros vacinados com vacinas inativadas pela aureomicina, ou pelo formol, e uma vacina comercial, GILLESPIE & KENZY (1950, 1958) indicaram que todas as três bacterinas induziram respostas em bezerros de 6 a 8 meses de idade. Observaram também que bezerros vacinados com menos de 2 meses fracassaram em desenvolver imunidade substancial, quando avaliada pelo desafio experimental, 6 a 8 meses depois.

BRAMEL & SCHEIDY (1956) estimaram o efeito da revacinação em eqüinos e bezerros com uma bacterina com antígeno do sorovar Pomona. Os resultados nos eqüinos indicaram um aumento de volume no local da inoculação, que persistiu por 3 a 4 dias, para então regredir. Após comprovarem que uma revacinação não provocava reação adversa em eqüinos, KIESEL & DACRES (1959) observaram que bovinos vacinados com uma bacterina com o sorovar Pomona estavam protegidos dos sinais clínicos da leptospirose, mas nem sempre a leptospiúria era prevenida. Notaram também que bezerros com menos de 2 meses e meio de idade falharam em desenvolver proteção adequada por mais de 3 meses, e, à semelhança de outros, a proteção relatada foi proporcionada aos animais vacinados em ausência de níveis substanciais de anticorpos.

PHILLIPS (1958) vacinou bezerros uma vez com 5 mL de caldo de cultura, inativado quimicamente e absorvido em hidróxido de alumínio, contendo $4,7 \times 10^8$ e outro grupo com $6,3 \times 10^8$ leptospiras/mL, ou ainda com 2 mL de bacterina. Todos os animais, exceto dois, apresentaram título mínimo de 1:50 no 21º dia após a vacinação. Todos os bezerros vacinados foram protegidos contra a doença clínica pelo desafio experimental. Esse mesmo autor avaliou três bacterinas em suínos. Suas observações foram semelhantes às dos relatos anteriores de BURNSTEIN et al. (1957), em que a vacinação de suínos não induziu títulos como nos bovinos imunizados, independentemente da massa antigênica ou da presença de adjuvantes. Entretanto, todos os suínos vacinados foram refratários ao desafio.

DOBSON & DAVOS (1975) verificaram a ausência de títulos de aglutininas seis semanas após a primeira vacinação, e a partir da segunda dose o título de aglutininas

não foi superior a 300. Verificaram ainda que a persistência dos níveis de aglutininas variou com o sorovar, não ultrapassando oito semanas de duração.

RAO & KESHAVAMURTHY (1985) utilizaram a prova de soroaglutinação microscópica e o teste de inibição de crescimento de leptospiras "*in vivo*" para analisar a resposta sorológica de bezerros bubalinos, vacinados com uma bactéria pentavalente preparada com os sorovares Pomona, Canicola, Hebdomadis, Tarassovi e Shermani. A soroconversão contra todos os componentes da vacina foi atingida no 15^o dia pós-vacinação. Os anticorpos contra os sorovares da vacina persistiram por três meses. Uma melhor resposta foi obtida nos bezerros vacinados com duas doses de vacina, com quatro semanas de intervalo entre as vacinações, do que naqueles que receberam dose única.

Em estudo realizado por TRIFUNOVIC et al. (1989) em um rebanho bovino com relato de problema de hemoglobinúria leptospírica, foi observado que o uso de vacina experimental produzida com o antígeno do sorovar Pomona, isolado de um animal infectado do rebanho que havia morrido apresentando hemoglobinúria, conferiu uma maior proteção em comparação com o uso de uma vacina comercial.

BOLIN et al. (1989a) estudaram uma vacina comercial pentavalente contra leptospirose contendo antígeno do sorovar Hardjo tipo Hardjoprajitno. Em um grupo de fêmeas bovinas, foi aplicada somente uma dose da vacina, um outro grupo foi vacinado com duas doses com intervalos de seis meses, e outro grupo ficou sem vacinação (controle). Após um a dois meses da última vacinação as fêmeas foram inseminadas ou sofreram monta natural. Nos grupos de fêmeas cujo período de gestação se encontrava entre quatro e seis meses, foi realizado um desafio com o sorovar Hardjo tipo Hardjo-bovis cepa patogênica, por meio de inoculação de 10^8 microrganismos por via de instilação do saco conjuntival. Observou-se que todos os animais do grupo de controle e dois dos vacinados com dose dupla foram infectados e apresentaram leptospirúria. Houve o nascimento de natimortos e de bezerros fracos, que é um sinal clínico de infecção transplacentária causada pelo sorovar Hardjo. A vacina do tipo Hardjoprajitno aplicada nos animais não demonstrou proteção contra os mesmos, pois houve uma deficiência na resposta antigênica, não conferindo uma proteção adequada contra o sorovar Hardjo tipo Hardjo-bovis.

BOLIN et al. (1991) descrevem que o sorovar Hardjo é um antígeno de baixa imunogenicidade, com isso produz uma baixa resposta de anticorpos após as vacinações, e produz proteção por um curto período de imunidade. No experimento, foi utilizada uma vacina monovalente contra leptospirose contendo o sorovar Hardjo tipo Hardjo-bovis, em duas concentrações de bacterina (cepa 93U), sendo uma com $8,32 \times 10^8$ células por 2 mL/dose e outra com $8,32 \times 10^9$ células por 4 mL/dose. A primeira, de baixa concentração, é similar às vacinas polivalentes comerciais. Os autores concluíram que não houve diferenças significativas entre os grupos vacinados com baixa e com alta concentração de antígenos.

LITTLE et al. (1992) constataram em uma criação extensiva de bovinos, na qual a leptospirose era causada pelo sorovar Hardjo de forma endêmica, que a utilização da vacinação anual por um período de cinco anos, associada ao tratamento dos animais infectados com di-hidroestreptomicina, foi suficiente para controlar e erradicar a doença. Procedimento parecido foi realizado por KINGSCOTE & PROULX (1986), quando obtiveram sucesso no controle da leptospirose bovina com o uso da di-hidroestreptomicina em dose única de 25 mg/kg de peso vivo associado com a vacinação semestral do rebanho. Segundo BLOOD & RADOSTITS (1989) e GERRITSEN et al. (1994), o tratamento é importante, pois elimina o portador renal, diminuindo o número de fontes de infecção e conseqüentemente a exposição de animais não infectados ao agente.

MOREIRA (1994) avaliou dois métodos de vacinação com bacterina produzida a partir de estirpes homólogas isoladas de rebanhos bovinos naturalmente infectados. O primeiro rebanho recebeu uma dose inicial e revacinações semestrais, e o segundo recebeu duas doses iniciais, com 45 dias de intervalo e revacinações semestrais. Também neste segundo grupo foi realizado tratamento com dose única de estreptomicina de 25 mg/Kg de peso vivo. O autor observou um declínio progressivo na proporção de animais reagentes na prova de soroaglutinação microscópica a partir do 8º mês da implantação da vacinação.

Bovinos com idade superior a cinco meses podem ser vacinados contra leptospirose, mas se estes tiverem idade inferior, os anticorpos maternos, adquiridos por meio do colostro, podem interferir na resposta à vacinação (ANDREWS et al., 1996). Tal fato também foi comprovado por BARRINGER & ROSENBERG (1995), quando aplicaram

em animais jovens vacinas polivalentes contra os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia bovina a vírus (BVD), vírus sincicial respiratório bovino (BRSV), parainfluenza do tipo 3 (PI3) e contra cinco sorovares de leptospira (Wolffi, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Grippotyphosa).

FRANÇOIS et al. (1995), quando testaram três vacinas comerciais normalmente utilizadas para controle da leptospirose suína, observaram que 96% dos animais não produziram anticorpos aglutinantes, detectáveis no ponto de corte adotado (1:100) para a SAM 15 dias após a primeira vacinação. Ao final de 60 dias observaram que 97% dos animais examinados não apresentavam títulos de anticorpos aglutinantes e que os 3% restantes apresentavam título de aglutininas de 100 contra apenas um sorovar de leptospira.

FAVERO et al. (1997) vacinaram bovinos machos com bacterina de leptospira (5 mL, via subcutânea) contendo os sorovares Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo e Wolffi nas concentrações de $9,2 \times 10^7$; $9,8 \times 10^5$; $1,8 \times 10^7$ e $13,2 \times 10^7$ de bactérias por mililitro, respectivamente, em três grupos de animais. Um grupo possuía animais não reagentes contra leptospira, um outro grupo com animais reagentes contra os sorovares Hardjo e Wolffi e um terceiro grupo com animais reagentes contra o sorovar Grippotyphosa. No dia anterior à vacinação, colheu-se sangue, assim como nos dias 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 após a vacinação. Para avaliar a resposta de anticorpos foi realizada a SAM. Os autores observaram no primeiro grupo um aumento de aglutininas no dia 15, e no dia 60 não havia animais reagentes contra o sorovar Icterohaemorrhagiae. Com relação aos outros sorovares, não houve a manutenção dos títulos sorológicos até o dia 90. Observaram, ainda, neste grupo, animais reagentes contra os sorovares Bratislava e Hebdomadis. No segundo grupo, apesar de apresentar um perfil semelhante ao do primeiro, foram detectados títulos de anticorpos mais elevados contra os sorovares Wolffi e Hardjo. Nos animais do terceiro grupo, verificou-se um comportamento irregular da curva de anticorpos contra os sorovares Hardjo e Wolffi. Resultados semelhantes a esses também foram observados contra os sorovares Hebdomadis e Grippotyphosa.

PALIT et al. (1996) desenvolveram experimentalmente uma vacina trivalente para bovinos, contendo antígenos dos sorovares Pomona, Copenhageni e Hardjo. A vacina

experimental foi testada em 71 bovinos de rebanhos infectados, e os seus resultados mostraram que a indução dos títulos sorológicos foi maior que os títulos sorológicos induzidos por uma vacina comercial.

DHALIWAL et al. (1996) realizaram estudos em três rebanhos de bovinos de leite com evidências de infecção ativa pelo sorovar Hardjo, sendo a metade dos animais submetida à vacinação com duas doses com intervalo de quatro semanas; o restante dos animais não vacinados foram considerados como controle. Após um ano da vacinação, uma dose de reforço foi aplicada nos animais que permaneciam no rebanho. Comparando-se os resultados de produtividade dos animais vacinados com os dos não vacinados, ficou demonstrado que não houve alteração significativa na duração da lactação, mas com relação ao desempenho reprodutivo houve uma melhora no grupo dos animais vacinados.

SAMINA et al. (1997), em um experimento com bovinos da raça holandesa com idade entre seis e 14 meses, testaram duas bacterinas comerciais monovalentes contra o sorovar Hardjo, uma com e outra sem adjuvante. No estudo foi utilizada a inoculação por via intradérmica e subcutânea, com duas aplicações com intervalo de sete semanas. Após a segunda inoculação, a vacina que possuía adjuvante induziu uma resposta marcante de aglutininas que foi duas vezes maior nos animais vacinados pela via intradérmica, quando comparados com o grupo inoculado por via subcutânea.

HANSON (1997) realizou uma vacinação anual de um rebanho bovino infectado pelo sorovar Hardjo e verificou que houve um declínio progressivo dos títulos de anticorpos nos animais reagentes, após um ano do início da vacinação. Após sete anos de vacinação, constatou que os animais não apresentavam mais títulos sorológicos.

PLASSE et al. (1998) analisaram dados de 14 rebanhos de corte na Venezuela. A taxa média de prenhez em mais de 71.654 novilhas era de 71%. A média de perdas antes do nascimento era de 7,9%, sendo 1,7% por abortos e 6,3% de animais que haviam sido diagnosticados com prenhez positiva, mas que não veio a termo. As principais causas identificadas de perdas antes do nascimento foram a leptospirose e a campilobacteriose, provavelmente devido a programas de vacinação inadequados.

GUITIAN et al. (1999) estudaram se a infecção pela leptospira antes ou na ocasião do primeiro parto estava associada com infertilidade e aborto durante a primeira

lactação entre vacas leiteiras que não foram vacinadas nos 12 meses anteriores. Verificaram que as fêmeas não vacinadas podem apresentar redução na fertilidade, mas não encontraram um desempenho melhor em rebanhos infectados, que foram vacinados.

FAINE et al. (1999) descrevem que as vacinas são utilizadas nos animais com dois propósitos, para proteger os animais e para proteger o ser humano, que pode contrair a leptospirose a partir desses animais. A eficácia pode ser mensurada por testes laboratoriais em animais susceptíveis por meio de experimentos, e também em animais-alvo por experimentos de imunização seguidos de desafio. A soroconversão após a imunização fornece uma medida presuntiva da imunidade, mas o desafio pela infecção natural ou experimental é o único teste realmente confiável. Testes de eficácia de vacinação podem também medir a proteção contra o estado de portador genital, renal e excreção urinária, bem como a sobrevivência após a infecção aguda.

FAINE et al. (1999) citam que as vacinas para bovinos e suínos têm sido testadas por vários anos, e seus resultados conflitam nos relatos de sua eficácia. Resultados de triagens em bovinos têm diferido desde o completo sucesso, significando que todos os animais vacinados estavam protegidos e os controles não, até a completa falência, com diferenças não significativas entre os grupos de controle e experimental e infecção de todos os animais, sendo observada a persistência da leptospira nos rins e no útero em muitos dos animais avaliados. FAINE et al. (1999) relatam, ainda, exemplos de quase nenhuma resposta sorológica após a vacinação com bacterinas comerciais.

OLIVEIRA (2000) estudou a influência do tratamento com estreptomicina (25 mg/kg) em dose única e da vacinação, duas doses com intervalo de 30 dias, seguida de revacinações semestrais, no desempenho reprodutivo. A vacina empregada foi uma bactéria comercial produzida com os sorovares Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo e Wolffi. Concluiu que não houve melhora reprodutiva com o uso da antibioticoterapia ou da vacinação.

BOLIN & ALT (2001) verificaram a proteção, contra a colonização renal e excreção urinária, de uma vacina comercial pelo desafio com uma variedade americana de *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo. A vacina empregada continha *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo (tipo hardjobovis) disponível na Austrália, Nova Zelândia,

Irlanda e Reino Unido para bovinos. Também foi efetuada a comparação desta vacina comercial com uma vacina de referência americana contra o sorovar Hardjo. As novilhas empregadas no experimento foram desafiadas por instilação conjuntival, os títulos de anticorpos aglutinantes foram monitorados semanalmente, e amostras de urina foram examinadas contra leptospiros. As novilhas vacinadas foram eutanasiadas de 11 a 14 semanas após o desafio, e os tecidos renais foram investigados procurando evidências de colonização renal. Todas as novilhas do grupo de controle apresentaram leptospiros na urina e apresentaram evidências de colonização renal. Não foram detectadas leptospiros na urina ou nos tecidos das novilhas submetidas à vacina comercial, e estas apresentaram títulos de anticorpos significativamente maiores do que as que receberam a vacina de referência. Os resultados sugeriram que os animais que receberam duas doses de vacina comercial estavam protegidos contra a colonização renal e excreção pela urina quando desafiados quatro meses após a vacinação.

TABATA (2002) trabalhou determinando a proteção cruzada entre os sorovares Wolffi, Hardjo e Guaricura em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e a inoculação de duas doses de vacinas e posteriormente inoculados com culturas não inativadas dos respectivos sorovares do sorogrupo Sejroe. Para tanto, utilizou os testes de SAM e inibição de crescimento de leptospiros “*in vitro*”, e concluiu que, apesar das variações no poder imunogênico segundo a estirpe de leptospiros empregada para a produção das bacterinas, houve proteção cruzada entre os sorovares Hardjo, Wolffi e Guaricura.

NARDI JUNIOR et al. (2003) compararam, pela SAM, o efeito relativo ao modo de preparação das sementes empregadas pela indústria na fabricação das vacinas e a interferência temporal dos títulos de dois tipos de vacinas contra leptospirose, uma bacterina e uma vacina de membrana externa, em búfalos. As duas vacinas foram capazes de induzir resposta sorológica detectável pela SAM, porém de baixa intensidade (>100) e com rápida tendência de queda. A bacterina apresentou reposta de anticorpos aglutinantes apenas contra os sorovares Canicola, Pomona, Wolffi e Hardjo, mas raramente a bacterina diferiu significativamente do grupo de controle. A vacina de membrana externa apresentou títulos de anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM contra o sorovar Wolffi, apesar de não possuir esse sorovar em sua composição.

ARDUINO et al. (2004) utilizaram a SAM para pesquisar a indução de anticorpos contra leptospira em bovinos vacinados com uma bacterina polivalente comercial. Procuraram avaliar a resposta homóloga frente a dois esquemas de vacinação. Os resultados obtidos revelaram que não houve diferença significativa entre os animais vacinados e os não vacinados, também não havendo diferença significativa nas respostas de títulos vacinais com relação ao perfil sorológico apresentado pelos animais (infectados e não infectados). Observaram que a vacinação com reforço foi a que apresentou melhor desempenho, e a indução de aglutininas somente foi contra os sorovares Hardjo, Wolffi, Icterohaemorrhagiae e Pomona (não reagindo contra os sorovares Canicola e Grippotyphosa). Concluíram que há a necessidade de maiores estudos sobre o poder imunogênico da vacina utilizada no experimento.

DELBEM, em 2004, trabalhou com uma vacina contra leptospira elaborada a partir do lipopolissacarídeo (LPS) proveniente da membrana externa das leptospiras e também comparou as respostas induzidas por essa vacina quando acrescida de hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A (MPLA) como adjuvantes. Para tanto, foram utilizados hamsters inoculados com duas doses da vacina com 15 dias de intervalo, e posteriormente esses hamsters foram desafiados com estirpe homóloga 15 dias após a aplicação da segunda dose da vacina. A vacina acrescida de MPLA induziu títulos de anticorpos neutralizantes superiores aos induzidos pela vacina que utilizou o hidróxido de alumínio como adjuvante, pois protegeu um maior número de animais contra o desafio.

DEL FAVA et al. (2004) mediram os coeficientes reprodutivos e a soropositividade contra *Leptospira* spp. em um rebanho bovino de corte no Estado de São Paulo. O sorovar mais freqüente foi o Hardjo, na ocorrência em fêmeas reagentes com título maior ou igual a 100 pela SAM, sendo esta de 48,3% (344/712). A soropositividade contra *Leptospira* spp. não interferiu no coeficiente de prenhez de matrizes reagentes e não reagentes, no coeficiente de parição, de natimortalidade, nem nas características de desempenho como ganho de peso médio, condição corporal na entrada e saída da estação de monta e peso do bezerro ao nascer. A única característica que se apresentou alterada foi o coeficiente de prenhez quando as matrizes entravam em estação de monta com escore corporal baixo (abaixo de 5, em uma escala de 1 a 9). Os

autores concluíram que matrizes de corte sororreagentes contra *Leptospira* spp. e não vacinadas contra leptospirose, sob manejo zootécnico extensivo, apresentaram bons coeficientes de prenhez, parição e natalidade, independentemente da raça, do grupo genético e da faixa etária.

2.5. Situação atual das vacinas e dos métodos de diagnóstico

Durante os 20 a 30 anos passados, bacterinas de leptospirose têm sofrido rápidas alterações. Inicialmente a Pomona foi a única leptospira que era incriminada pela leptospirose em bovinos e suínos. Assim, só existiam disponíveis vacinas monovalentes. A imunidade na leptospirose é sorovar-específica (ALEXANDER, 1976), e como vários sorovares se tornaram importantes (HANSON et al., 1972) na etiologia da doença, foram incluídos nas bacterinas, constituindo os agentes imunizantes polivalentes, existindo numerosos deles (KILLINGER et al., 1970; MORSE et al., 1973; SHIBLEY et al., 1973; BEY et al., 1974; TRIPATY et al., 1976; KILLINGER et al., 1976; MACHINTOSH et al., 1980; STRINGFELLOW et al., 1983; ALLEN et al., 1982; BEY & JOHNSON, 1983).

Muitas bacterinas são culturas totais inativadas pelo methiolate, que contém pelo menos 1×10^9 leptospirose por sorovar, por dose. Muitas delas são constituídas de leptospirose virulentas, pois são melhores imunógenos que as avirulentas (BRUNNER & MEYER, 1950; BEY et al., 1974) e exigem menos massa antigênica para induzir imunidade contra infecção renal e óbito que as leptospirose avirulentas. De importância crítica na produção de bacterina de leptospira é manter o envelope externo intacto, porque este contém os imunógenos mais relevantes, bem como os antígenos sorodiagnósticos.

Atualmente, deve-se considerar que, do ponto de vista da saúde pública, as vacinas são incapazes de eliminar a infecção renal em animais infectados. Além disso, nem todas as bacterinas são capazes, a longo prazo, de prevenir a infecção renal (HANSON, 1973; ALEXANDER, 1976).

No momento, o teste de soroprecipitação microscópica (COLE et al., 1973) é o instrumento sorodiagnóstico primário. Esse teste é sorovar-específico e altamente

sensível. Entretanto, problemas existem, como a impossibilidade de diferenciar indivíduos vacinados dos infectados. Além disso, não se distinguem também infecções recentes das antigas. Um teste diagnóstico com tais características é necessário. Um título significativo contra o sorovar Hardjo em animais não vacinados é de 40 ou superior a 100 contra outros sorovares. Em animais vacinados, um título de 40 é considerado suspeito se a vacinação foi aplicada nos 10 dias precedentes (SHOTTS, 1976).

3. OBJETIVOS

Considerando-se a pouca informação sobre a resposta sorológica das vacinas comerciais contra leptospirose bovina no Brasil, o presente trabalho teve por objetivos:

- ✓ Acompanhar a dinâmica da produção de anticorpos aglutinantes induzidos pela aplicação com dose de reforço de quatro diferentes vacinas comerciais contra leptospirose;
- ✓ Comparar o desempenho da indução de anticorpos aglutinantes das quatro marcas de vacinas contra leptospirose disponíveis no mercado brasileiro;
- ✓ Avaliar a resposta humoral por meio da pesquisa de aglutininas contra cada sorovar contido nas vacinas utilizadas;
- ✓ Acompanhar a duração dos títulos de anticorpos por meio da soroaglutinação microscópica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O presente estudo foi conduzido em uma propriedade no Município de Morro Agudo, localizado na região Norte do Estado de São Paulo. A região se constitui de fazendas de produção de cana-de-açúcar, laranja e pequenas propriedades de exploração leiteira.

A propriedade faz parte de um sistema de produção de genética diferenciada de bovinos das raças nelore e simental. Para tanto, utiliza animais de cruzamento entre as duas raças como receptoras de embriões obtidos pelas técnicas de transferência de embriões (MOET) e fertilização “*in vitro*”. Entre várias enfermidades monitoradas na propriedade está a leptospirose. Por esse motivo, optou-se por conduzir o estudo nesse local, levando-se em conta o rígido monitoramento sanitário do rebanho.

4.2. Animais estudados

Os animais estudados foram 100 fêmeas bovinas com idade entre 16 e 20 meses provenientes de cruzamento entre as raças nelore e simental. Estas fêmeas foram criadas e recriadas em uma propriedade no Estado do Mato Grosso do Sul para serem utilizadas como receptoras de embriões.

Os animais foram submetidos a quarentena logo após a sua chegada da propriedade de recria. Procedeu-se então à colheita de amostras de sangue para que fosse efetuada a prova de soroaglutinação microscópica (SAM). Nesta mesma ocasião procederam-se aos exames sorológicos contra brucelose e ao teste cervical da tuberculina contra tuberculose.

Com relação à leptospirose, foram efetuadas duas colheitas de amostras do total dos animais, com duas semanas de intervalo entre elas, para certificar que os animais em estudo não eram reagentes contra leptospiros. Foi realizada, em cada amostra de

soro, triagem com uma coleção de antígenos que incluiu 23 variantes sorológicas de *Leptospira interrogans*, como mostra o Tabela 1. Foram assim selecionados somente animais não reagentes.

Cabe ressaltar que os animais não foram tratados e nem vacinados previamente contra leptospirose. Foram somente monitorados.

Tabela 1. Estirpes de *Leptospira interrogans*, empregadas como antígeno na reação de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose, segundo o sorogrupo e a variante sorológica.

Código	Sorogrupo	Variante Sorológica *
1-A	Australis	Australis
1-B	Australis	Bratslava
2-A	Autumnalis	Autumnalis
2-B	Autumnalis	Butembo
2-C	Ballum	Castelonis
3	Batavia	Batavie
5	Canicola	Canicola
6	Celedoni	Whitcombi
7	Cynopteri	Cynopteri
8	Grippotyphosa	Grippotyphosa
9	Hebdomadis	Hebdomadis
10-A	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
10-B	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
11	Javanica	Javanica
12	Panama	Panama
13	Pomona	Pomona
14	Pyrogenes	Pyrogenes
15-A	Sejroe	Hardjo
15-B	Sejroe	Wolffi
16	Shermani	Shermani
17	Tarassovi	Tarassovi
18	Andamana	Andamana
20	Seramanga	Patoc
ST	Djasiman	Sentot

* Antígenos gentilmente cedidos pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 2000.

4.3. Colheita das amostras

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa a partir da veia mediana caudal com auxílio de frascos esterilizados Vacutainer®. Após a colheita, os

tubos ficaram em repouso, e após a coagulação foram resfriados e transportados para o laboratório. No laboratório o soro foi transferido para frascos plásticos tipo ependorf, devidamente identificados e mantidos a uma temperatura de -20°C até o momento de se proceder aos exames sorológicos.

4.4. Grupos experimentais

A seleção dos animais utilizados nos grupos experimentais foi efetuada após triagem sorológica dos mesmos pela prova de SAM, utilizando os antígenos pertencentes aos sorovares de leptospiras contidos nas vacinas que foram comparadas neste estudo (Canicola, Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi).

Foram considerados como animais não reagentes aqueles cujos exames sorológicos não apresentaram reatividade contra os seis sorovares utilizados como antígeno. Para confirmar a ausência de reação, foi efetuada colheita de sangue no momento da aplicação da vacina, tendo certeza de que os animais não haviam sido infectados.

Os animais foram divididos em cinco grupos de tratamento, cada um com 20 animais.

O esquema de vacinação empregado constituiu-se de uma primeira dose no dia zero e uma segunda dose, denominada reforço, 28 dias após a primeira vacinação, respeitando-se desse modo as recomendações de aplicação dos fabricantes das bacterinas.

4.5. Composição dos grupos experimentais

O total de animais utilizados nos grupos experimentais foi de 100, distribuídos em igual número (20 animais) nos cinco grupos. Para tanto, foram testados 140 animais do lote durante o processo de triagem.

Os grupos experimentais constituíram-se de 20 animais cada um, sendo cinco grupos de 20 animais escolhidos aleatoriamente por sorteio. Todos os animais foram

mantidos com a mesma dieta e no mesmo local, para evitar interferências externas aos tratamentos.

O primeiro grupo foi constituído por 20 fêmeas que receberam a aplicação de placebo (3 mL de solução fisiológica – tratamento A) por via subcutânea (sc). O segundo grupo (B) recebeu a aplicação da vacina B, na dose de 3 mL por via sc, como recomendado pelo fabricante, sendo constituído também por 20 animais. O terceiro grupo (C) foi vacinado com a bacterina denominada C na dose de 5 mL, por via intramuscular (im), nos 20 animais que o compuseram. A vacina D foi aplicada nos 20 animais do quarto grupo experimental (D), sendo a via de aplicação a im, e a dosagem, 2 mL. O último grupo (quinto, E) recebeu 5 mL da vacina E por via sc em seus 20 animais. A variação do volume administrado se deu devido às recomendações dos fabricantes das vacinas, que foram seguidas rigorosamente.

Para uma melhor visualização das dosagens e vias de aplicação utilizadas pode-se recorrer à Tabela 2, a seguir.

Tabela 2. Descrição das dosagens e vias de aplicação dos tratamentos e respectivos grupos experimentais. Jaboticabal, SP. 2003.

Tratamento	Dosagem	Via de Aplicação	Obs
A	3 mL	sc	Solução fisiológica
B	3 mL	sc	
C	5 mL	im	
D	2 mL	im	
E	5 mL	sc	

sc – subcutânea
im – intramuscular

As colheitas de amostras foram efetuadas nos dias zero (momento da aplicação das vacinas), 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 120, 150 e 180 pós-vacinação (pv).

4.6. Tratamentos realizados

As vacinas utilizadas constituíram-se de quatro bacterinas disponíveis no mercado, que foram obtidas de um fornecedor confiável, eliminando-se assim qualquer

dúvida no que diz respeito à sua conservação e manutenção das propriedades antigênicas.

As bacterinas são polivalentes, e os sorovares que as mesmas contêm estão descritos no Quadro 1. A inoculação foi realizada na tábua do pescoço, conforme recomendação dos laboratórios fabricantes.

Quadro 1. Tratamentos utilizados, composição e recomendações de aplicação indicadas pelos fabricantes. Jaboticabal, SP. 2003.

Tratamento	Sorovares						Volume da Dose	Via de Aplicação	Dose de Reforço (indicação)
	Canicola	Grippotyphosa	Hardjo	Icterohaemorrhagiae	Pomona	Wolffi			
A*							3 mL	sc	
B	x	x	x	x	x	x	3 mL	sc / im	4-6 semanas
C	x	x	x	x	x	x	5 mL	im	3-5 semanas
D	x	x	x	x	x		2 mL	im	3-5 semanas
E	x	x	x	x	x	x	5 mL	sc	4-6 semanas

* - Solução fisiológica

sc - Subcutânea;

im - Intramuscular.

4.7. Pesquisa de anticorpos

4.7.1. Preparo dos antígenos de leptospira

Os sorovares de leptospira utilizados como antígenos, listados no Quadro 1, foram provenientes de matrizes replicadas semanalmente em meio de cultura EMJH (Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris – Difco®) e mantidos em estufa bacteriológica (B.O.D.) a 28°C. Todos os antígenos foram utilizados ao redor do sexto dia de incubação. A concentração considerada ideal foi padronizada de forma a

corresponder à metade da turvação do tubo número 1 da escala de MacFarland (100 a 200 leptospiras por campo microscópico), livre de contaminação e de auto-aglutinação, segundo as orientações de SULZER & JONES (1980).

4.7.2. Técnica de soroaglutinação microscópica (SAM)

As amostras de soro sangüíneo foram examinadas pela prova de SAM com seis sorovares diferentes de *Leptospira*: Canicola, Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi. Os mesmos foram diluídos em solução tamponada de Sörensen, segundo SANTA ROSA (1970), sendo a diluição inicial de 1/50. Dessa diluição, foram colocadas alíquotas de 0,2 mL em tubos 13x100mm, num total de seis tubos. Em seguida, foi adicionada igual quantidade de antígeno, seis sorovares, sendo um em cada tubo, resultando em uma diluição final de 1/100. A mistura foi levemente agitada e incubada em estufa bacteriológica a 28°C por três horas, procedendo-se a seguir à leitura.

Utilizando-se alça de platina, uma gota de cada tubo foi alinhada sobre uma lâmina de vidro para microscopia (26x76mm) e levada ao microscópio binocular, equipado com condensador de campo escuro a óleo, com objetiva de 10x e ocular de 10x.

Durante a leitura, foi avaliado o grau de aglutinação, segundo o critério recomendado pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1985), sendo 1+ quando cerca de 25% das leptospiras presentes no campo microscópico estiveram aglutinadas, 2+ quando cerca de 50%, 3+ quando 75% e 4+ quando acima de 75%.

Foram consideradas reagentes as amostras de soros sangüíneos que aglutinaram pelo menos 50% das leptospiras na diluição final de 1/100. Em seguida, as amostras reagentes foram tituladas até 1.600, diluídas na proporção geométrica de razão dois.

Foi considerada como título final a maior diluição que apresentou pelo menos 50% de leptospiras aglutinadas no campo microscópico.

4.8. Análise estatística

Os títulos de anticorpos obtidos pela SAM foram categoricamente pareados de acordo com as variáveis tempo (em dias decorridos após a primeira aplicação da vacina), tratamento (A, B, C, D e E) e sorovar (Canicola, Hardjo, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi). As médias foram obtidas pelos logaritmos dos títulos observados e foram confrontadas pelo teste de Tukey, testando as hipóteses com 5% de confiabilidade. A tabulação e o tratamento dos dados foram efetuados com o auxílio de um pacote estatístico denominado SAS System, conforme preconizam os autores DIAS (1997) e SCHLOTZHAUER & LITTELL (1997).

5. RESULTADOS

Os soros dos animais utilizados neste estudo foram considerados não reagentes à prova de SAM frente aos antígenos dos sorovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi quando examinados preliminarmente para a formação dos grupos experimentais.

A análise estatística dos resultados obtidos demonstrou que houve interação entre o tempo, o sorovar e a vacina aplicada ($p < 0,05$) quando comparados os logaritmos das médias de títulos pelo teste de Tukey. Portanto houve influência dos fatores acima citados na indução da produção de anticorpos após a aplicação das vacinas nos animais.

A Tabela 3 e a Figura 1 ilustram o comportamento observado com relação aos logaritmos das médias dos títulos obtidos nas várias datas de sangria dos animais durante o presente estudo.

Tabela 3. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra todos os sorovares pesquisados segundo os tempos de colheita das amostras. Jaboticabal, SP. 2003.

Tempo (dias)	Média de Títulos
0	0,00 a
3	0,60 b
7	0,85 c
14	0,88 c
21	1,29 d
28	1,25 d
35	1,47 defg
42	1,59 efg
49	1,39 def
56	1,29 d
63	1,58 efg
70	1,48 defg
77	1,67 g
84	1,63 fg
91	1,36 de
120	0,89 c
150	0,42 b
180	0,00 a

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

A partir do 21^º até o 120^º dia pós-vacinação (pv) foi observada média de títulos (1,29) detectados pela SAM ($p < 0,05$) quando comparada às médias até o 14^º dia pv. O valor das médias de títulos continuou a aumentar até o dia 42 pv (1,59), quando apresentou uma pequena queda, voltando a aumentar no dia 63 pv (1,58). A maior média de títulos observada foi a do dia 77 pv (1,67), a partir daí voltou a declinar, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) até o dia 180 pv, quando os animais não apresentavam mais títulos de anticorpos detectáveis à SAM.

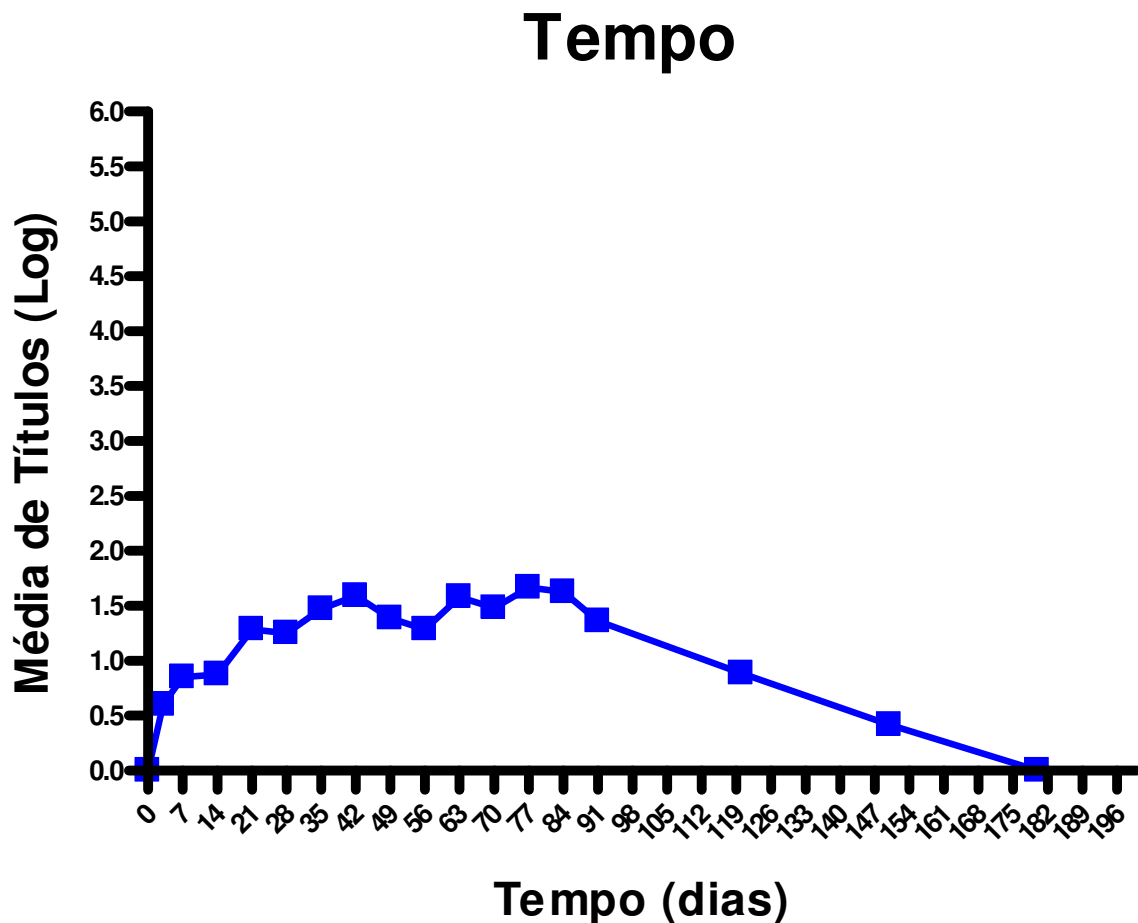


Figura 1. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM de todos os animais envolvidos no experimento no decorrer do tempo. Jaboticabal-SP. 2003.

Quando observadas as médias gerais dos logaritmos de títulos contra cada sorovar testado pela SAM, verificou-se que o sorovar Canicola (0,01) e o Grippytyphosa (0,15) foram os que induziram as menores médias de títulos à SAM, não diferindo significativamente entre si ($p>0,05$). Os sorovares Icterohaemorrhagiae e Pomona apresentaram médias de títulos de 0,49 e 0,71, respectivamente, também não apresentando diferença significativa entre os dois ($p>0,05$), porém diferiram ($p<0,05$) dos títulos observados contra os dois sorovares anteriormente citados (Canicola e Grippytyphosa). Os sorovares que induziram maiores títulos médios de anticorpos foram o Hardjo (2,49) e Wolffi (2,70), que não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre si, porém diferiram dos demais ($p<0,05$).

A Tabela 4 e a Figura 2 ilustram os logaritmos das médias de títulos observados contra os seis sorovares testados durante o estudo.

Tabela 4. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra cada sorovar no decorrer do estudo. Jaboticabal, SP. 2003.

Sorovar	Média de títulos
Canicola	0,01 a
Grippytyphosa	0,15 a
Hardjo	2,49 c
Icterohaemorrhagiae	0,49 b
Pomona	0,71 b
Wolffi	2,70 c

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

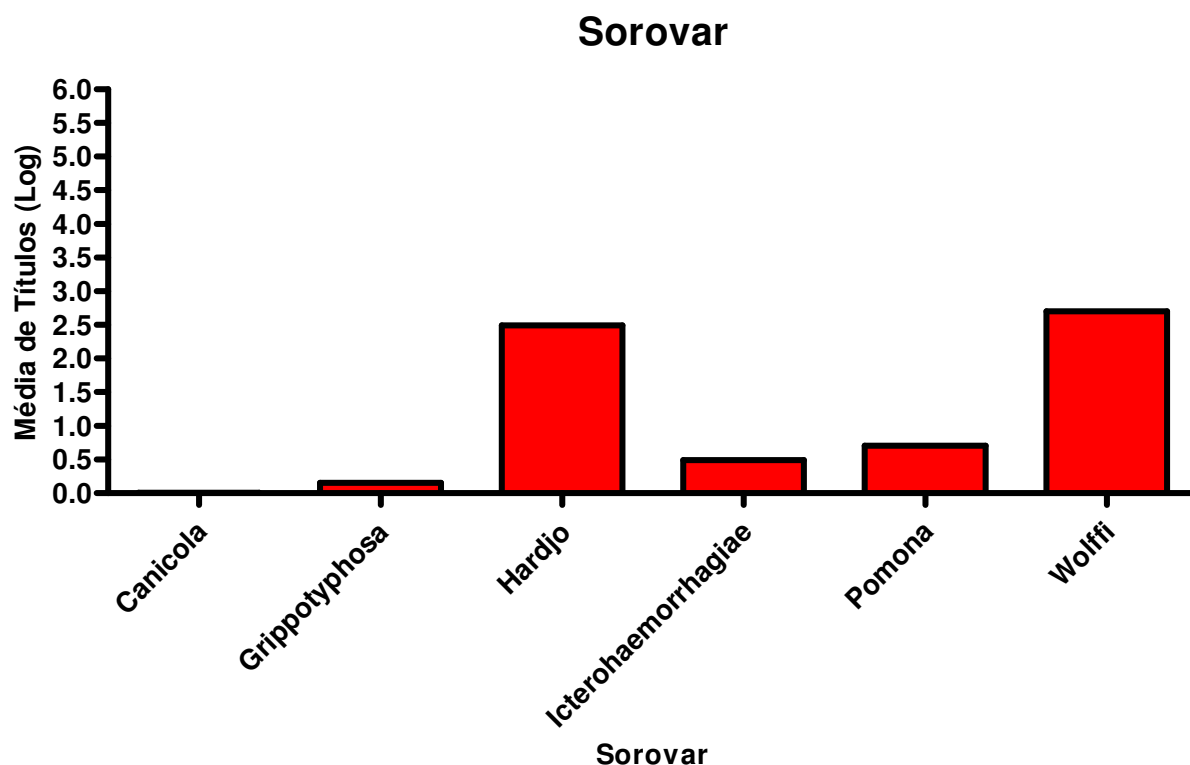


Figura 2. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM de acordo com o sorovar testado no decorrer do estudo. Jaboticabal-SP. 2003.

Levando-se em consideração todos os logaritmos das médias de títulos pela SAM observados para cada vacina, obtiveram a Tabela 5 e a Figura 3. O tratamento A, grupo de controle, não apresentou títulos de anticorpos detectáveis pela SAM. Os tratamentos C e E apresentaram médias de 1,10 e 1,09, respectivamente, não diferindo ($p>0,05$) entre si, porém diferindo significativamente do grupo controle. O tratamento B (1,45) foi capaz de causar a indução de títulos de anticorpos detectáveis pela SAM, porém foi menor que os provocados pelo tratamento D (1,82), que apresentou títulos de maior amplitude, diferindo significativamente ($p<0,05$) dos demais observados.

Tabela 5. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra cada vacina no decorrer do estudo. Jaboticabal, SP. 2003.

Tratamento	Média de Títulos
A	0,00 a
B	1,45 c
C	1,10 b
D	1,82 d
E	1,09 b

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

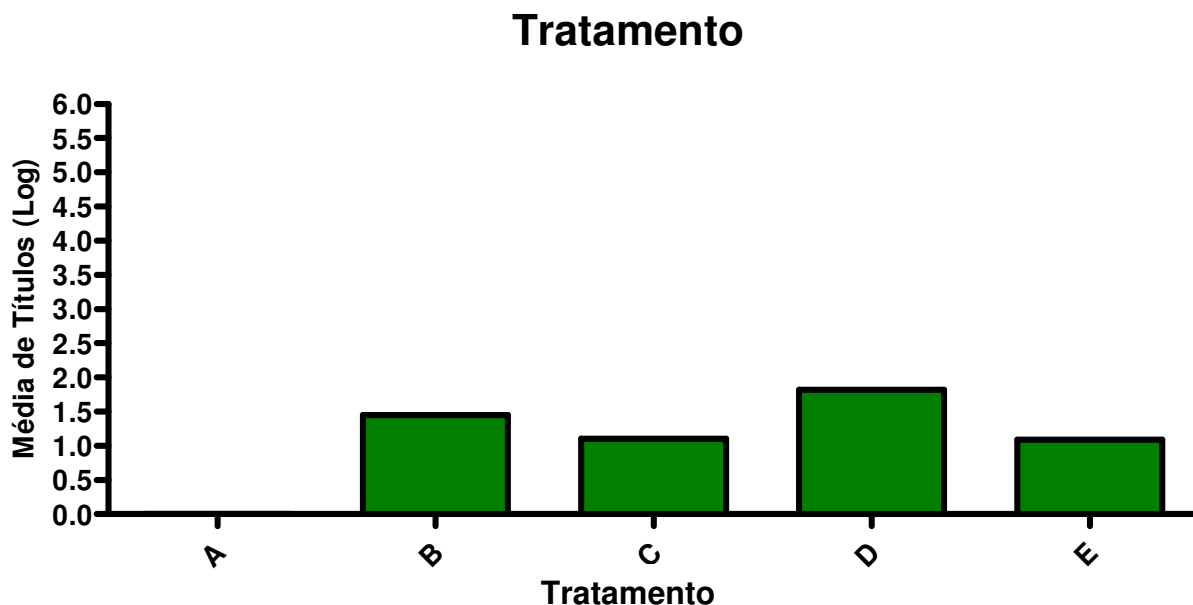


Figura 3. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM de acordo com a vacina testada pela SAM no decorrer do estudo. Jaboticabal-SP. 2003.

Nas tabelas e nos gráficos que se seguem, são descritos os resultados da dinâmica de indução dos títulos de anticorpos no decorrer do tempo segundo cada sorovar (Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi) contido nos cinco tratamentos (A, B, C, D e E), numa tentativa de estabelecer uma visão do comportamento de cada sorovar, independentemente da vacina aplicada aos animais.

As Tabelas 6, 7, 8, 9, 10 e 11 correspondem aos logaritmos das médias de títulos obtidos pela SAM contra os seis sorovares testados (Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi), de acordo com o tratamento aplicado e a data de colheita da amostra de soro sanguíneo.

Tabela 6. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

T*	Tempo (dias)														
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
A	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
B	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
C	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
D	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,0000a	0,6923a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
E	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a

* Tratamento

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

Tabela 7. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

T*	Tempo (dias)														
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
A	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
B	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
C	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,2308a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
D	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,0000a	0,0000a	0,4959a	0,4615a	0,4615a	0,6923a	1,2226a	1,3261a	1,8908a	2,0289b	1,8563a
E	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,2652a	0,2308a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a

* Tratamento

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

Tabela 8. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

T*	Tempo (dias)														
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
A	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
B	0,0000a	3,1589b	2,7451b	3,5302b	5,1426b	4,7502b	3,7370b	4,2912b	2,9757b	2,5144b	3,9676b	4,2090b	4,8081b	4,9809b	4,0708b
C	0,0000a	3,1822b	2,4109b	2,9067b	4,7738b	3,7473b	4,7392b	4,5322b	3,9677b	2,6177b	3,4716b	3,0447b	3,8745b	4,3814b	3,2751b
D	0,0000a	2,7553b	3,3098b	3,4029b	5,2355b	5,0496b	4,9358b	4,7975b	3,6678b	2,4453b	3,6092b	4,3470b	5,1425b	5,3501b	4,1743b
E	0,0000a	2,1908b	2,7450b	3,0101b	4,1161b	3,9783b	4,0711b	3,7023b	2,6760b	1,8220ab	2,9757b	2,8140b	3,4477b	3,7588b	3,1481b

* Tratamento

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

Tabela 9. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar lcterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

T*	Tempo (dias)														
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
A	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
B	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	1,1538a	1,5566b	1,9600b	1,7873ab	1,1538ab	0,6923ab	0,0000a	0,0000a
C	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308ab	0,4615ab	1,3845a	1,1538ab	0,4615ab	0,2308a	0,2308a
D	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,0000a	0,0000a	2,9068b	3,4716b	3,4821c	3,8855c	3,6439b	3,0103b	2,2144b	1,1882a	1,1538a
E	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	1,9149b	1,8450ab	0,6923ab	0,4615ab	0,6923a	0,6923a	0,4615ab	0,0000a	0,0000a

* Tratamento

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

Tabela 10. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

T*	Tempo (dias)														
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
A	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
B	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	2,1112bc	2,8481b	3,6204b	3,3204b	2,5249b	2,5249b	2,3287b	1,8563ab
C	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,2308ab	0,0000a	0,0000a	0,7955a	0,8991ab	0,7955a	0,0000a	0,0000a
D	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,0000a	0,4959a	2,7105b	2,2144c	1,9494b	2,0183b	3,2753b	3,2515b	3,4381b	3,4242b	2,6865b
E	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,7611ab	1,1538abc	0,9918ab	1,0609ab	1,3604a	1,1988ab	1,0952ab	0,7612ab	0,7267a

* Tratamento

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

Tabela 11. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento aplicado e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

T*	Tempo (dias)														
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
A	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
B	0,0000a	2,9171b	3,5992b	3,4822b	5,0394b	4,9809b	4,3708b	4,9354b	4,7499b	4,6573b	4,3465b	3,6096b	5,0735b	5,3503b	4,7743b
C	0,0000a	1,6255ab	3,5647b	3,0447b	4,9809b	4,5435b	4,1400b	4,1400b	3,2171b	2,7902b	3,3549b	3,1937b	4,4158b	4,9468b	4,4052b
D	0,0000a	1,0264ab	4,3705b	3,3683b	5,3732b	4,6812b	4,7979b	4,7288b	4,6358b	4,0817b	4,5776b	4,6466b	5,3155b	5,2924b	4,5779b
E	0,0000a	1,0608ab	2,8828b	2,7450b	4,0474b	4,2438b	3,7131b	3,7129b	3,4822b	3,3899b	3,2516b	3,4479b	4,5780b	4,9473b	3,9095b

* Tratamento

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

O sorovar Canicola não induziu produção significativa ($p>0,05$) de títulos de anticorpos detectáveis pela SAM. O tratamento D foi o único capaz de induzir nos animais alguma produção de anticorpos contra esse sorovar nos dias 14 e 28 pv, com médias de 0,2308 e 0,6923, respectivamente, porém estas não diferiram significativamente ($p>0,05$) das demais (Figura 5).

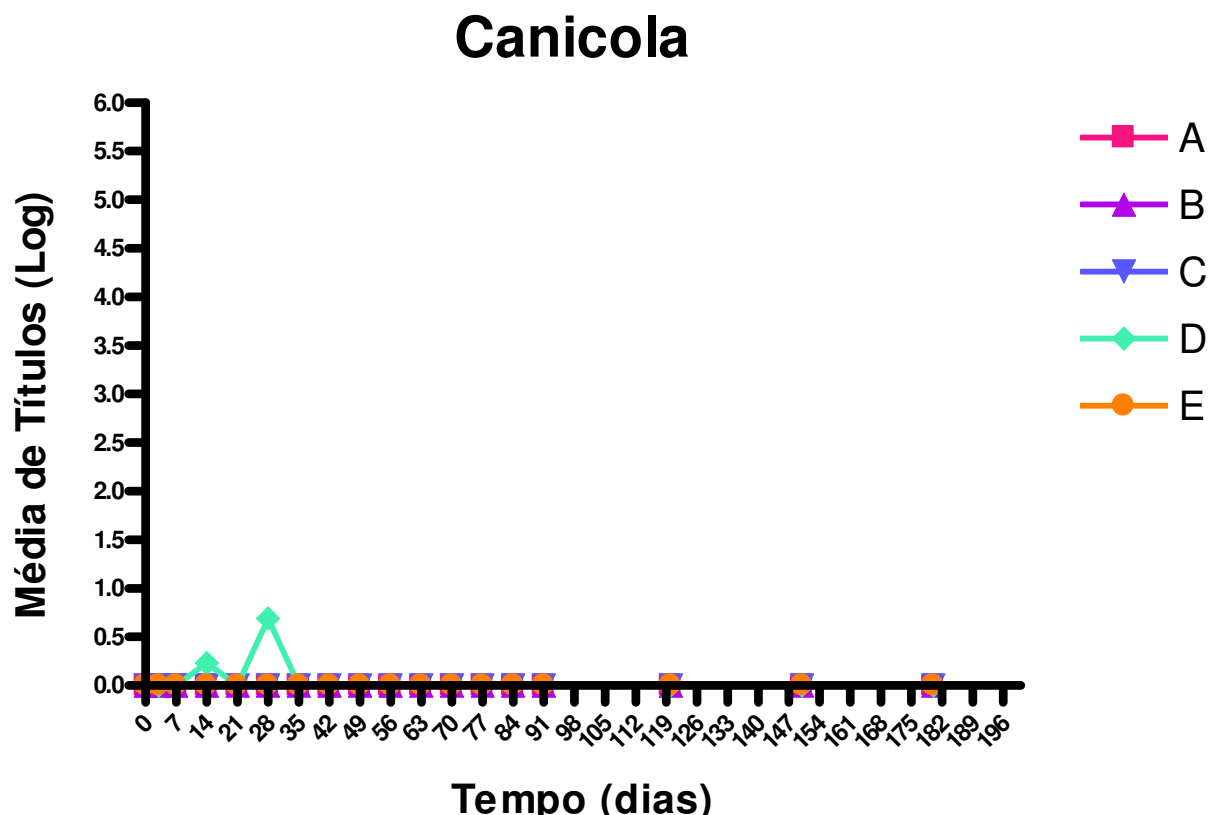


Figura 4. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento aplicado e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

A Figura 5 representa a dinâmica dos títulos de anticorpos detectados pela SAM contra o sorovar Grippotyphosa, em logaritmo, que também pode ser observada na Tabela 7. Somente o tratamento D no dia 84 pv foi capaz de induzir a produção significativa ($p<0,05$) de títulos de anticorpos detectáveis pela SAM (2,0289). Os animais desse tratamento também apresentaram títulos nos dias 14 pv (0,2308) e nos dias 35 a 150 pv (variando de 0,2308 a 2,0289). Os animais inoculados com o tratamento C apresentaram anticorpos contra o sorovar Grippotyphosa nos dias 35

(0,2308) e 42 (0,2308) pv, e os inoculados com o tratamento E, nos dias 49 (0,2308), 56 (0,2652) e 63 (0,2308) pv.

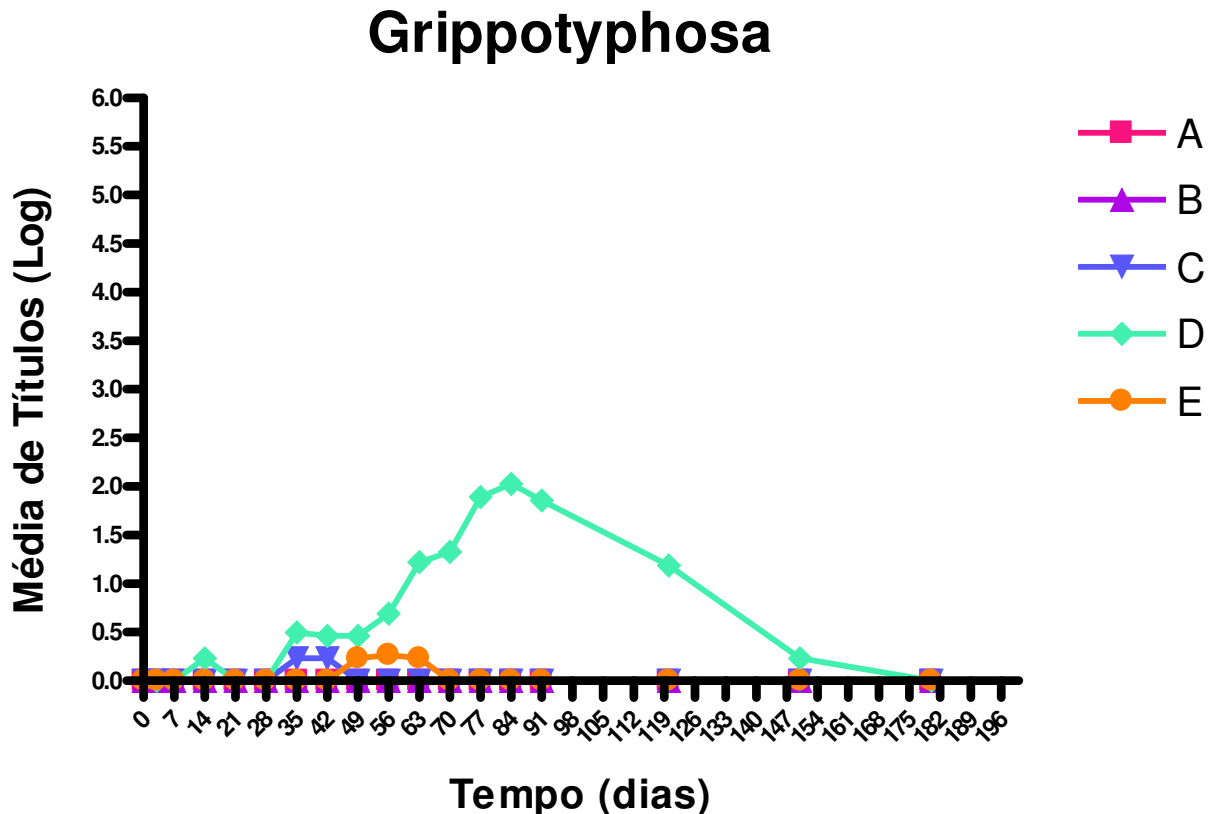


Figura 5. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento aplicado e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

Para o sorovar Hardjo (Figura 6 e Tabela 8), todos os tratamentos, com exceção do grupo de controle (tratamento A), apresentaram a mesma dinâmica de indução de produção de anticorpos detectáveis pela SAM, havendo um aumento gradual na expressão de títulos até o dia 21 pv, com queda dos títulos até o dia 56 pv, voltando a aumentar novamente até atingir o título médio máximo no dia 84 pv, que foi apresentado pelos animais inoculados com o tratamento D (5,3501). Após os 84 dias pv houve uma gradual diminuição da expressão de títulos, até a ausência de títulos detectáveis pela SAM no dia 180 pv. O tratamento D foi o qual os animais a ele submetidos apresentaram as maiores médias de títulos na maioria das datas de colheita, seguida pelo tratamento B, C e posteriormente pelo E. Todas as vacinas foram

capazes de induzir médias de títulos significativas ($p < 0,05$) de anticorpos durante o período do estudo.

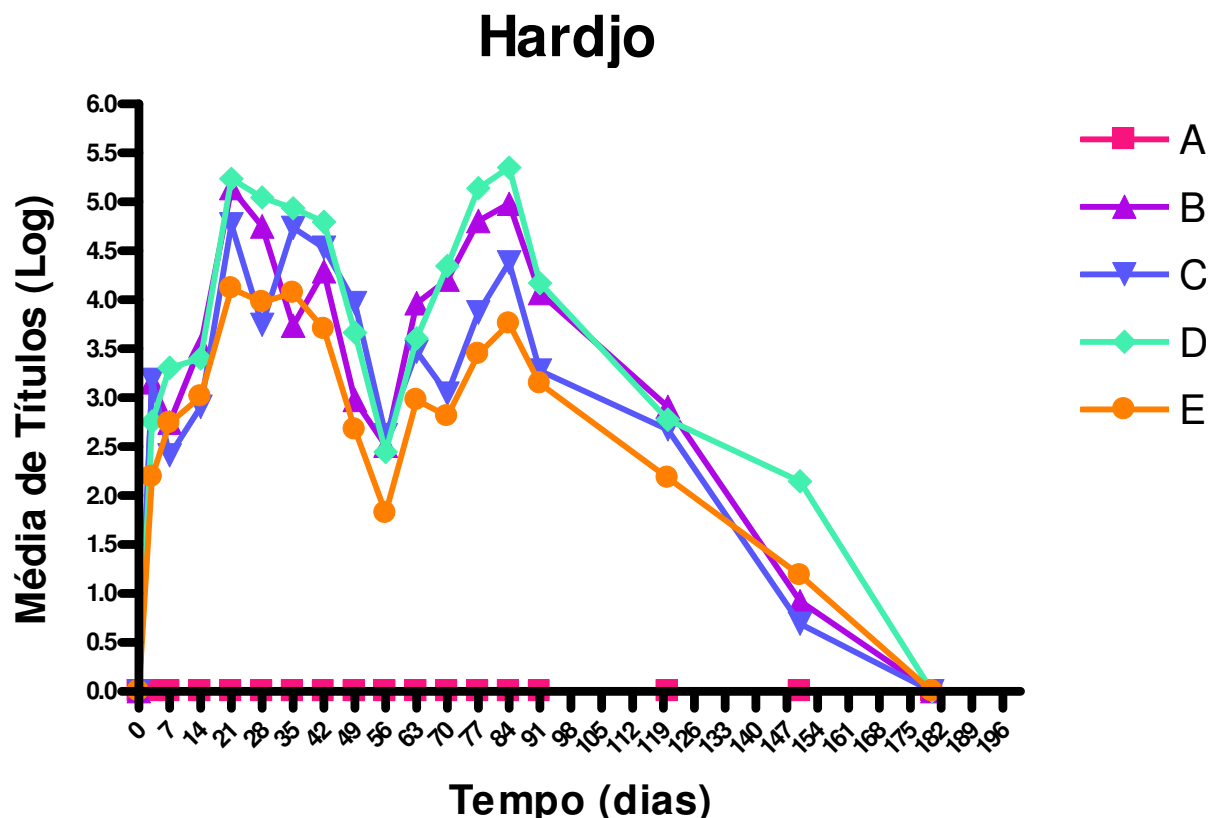


Figura 6. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento aplicado e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

As repostas de anticorpos contra o sorovar *Icterohaemorrhagiae* estão esquematizadas na Figura 7. Todas as vacinas provocaram nos animais uma resposta de anticorpos detectáveis pela SAM, porém de menor magnitude e duração quando comparados com aquela provocada pelo sorovar Hardjo. O tratamento C foi o que induziu nos animais médias de anticorpos por menor tempo, apenas do dia 49 ao 91 pv, sendo a maior média de 1,1538 aos 70 dias pv. O tratamento E iniciou a indução de anticorpos nos animais aos 35 dias pv, atingindo média de títulos de 1,9149, e a partir daí declinando até o completo desaparecimento, no dia 84 pv. Já para o tratamento B somente foram observados títulos a partir do dia 42 pv (1,1538), chegando a 1,9600 no dia 56 pv e declinando até desaparecer, no dia 84 pv. O tratamento D foi o que

provocou nos animais maior indução de anticorpos detectáveis pela SAM, durante maior período de tempo. Houve uma pequena detecção de títulos no dia 14 pv, porém estes não foram significativos ($p>0,05$). Após o dia 35 pv, os animais apresentavam altos valores de títulos de anticorpos (2,9068), e nos dias 49 (3,4821) e 56 (3,8855) as respostas de anticorpos foram significativas quando comparadas às demais vacinas, atingindo o ápice no dia 56 pv (3,8855), declinando lentamente até a não detecção de títulos de anticorpos no dia 120 pv. Todas as vacinas foram capazes, em algum momento, de induzir a produção significativa ($p<0,05$) de anticorpos detectáveis pela SAM contra o sorovar Icterohaemorrhagiae.

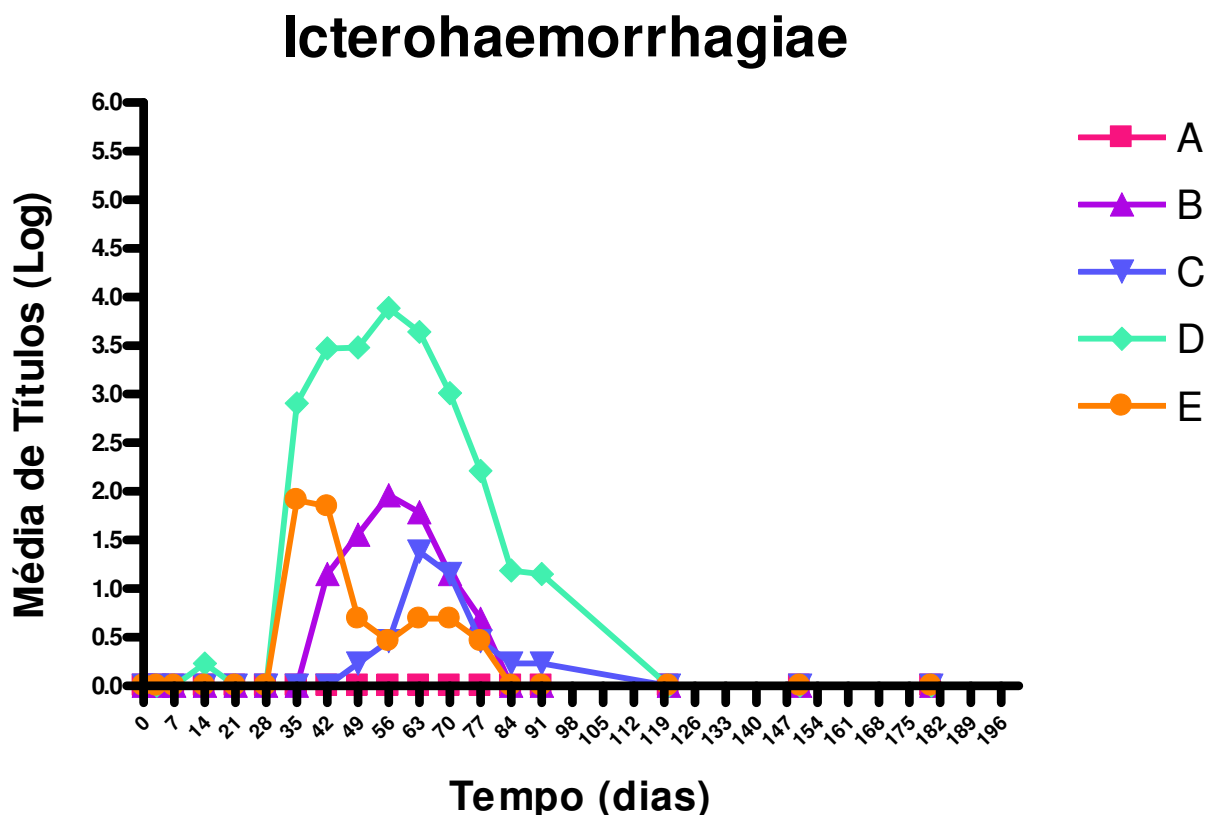


Figura 7. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento aplicado e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

A Figura 8 ilustra a resposta vacinal de anticorpos contra o sorovar Pomona observada nos animais vacinados. O tratamento D foi o que primeiro estimulou nos animais a produção de títulos médios de anticorpos detectáveis pela SAM, porém aos 14 dias pv a média de títulos de anticorpos foi de 0,2308, não sendo significativa

($p>0,05$), declinando para zero aos 21 dias pv e voltando a serem detectados aos 28 dias pv (0,4959), chegando a 2,7105 aos 35 dias pv, apresentando uma pequena queda e atingindo a sua expressão máxima de anticorpos aos 77 dias pv (3,4381). Logo após, diminuiu e não apresentou níveis de anticorpos detectáveis aos 180 dias pv. O tratamento D foi o que demonstrou nos animais a existência de anticorpos circulantes por um maior período de tempo e com significância ($p<0,05$) por maior tempo também. O tratamento B foi o que induziu nos animais maior título médio de anticorpos, 3,6204 aos 56 dias pv, porém o comportamento da curva de anticorpos foi distinto da curva de anticorpos dos animais submetidos ao tratamento D; no dia 35 pv houve o início da detecção de anticorpos (0,2308), porém a quantidade média de anticorpos expressados pelos animais só foi significativa ($p<0,05$) aos 42 dias pv (2,1112), chegando ao maior valor aos 56 dias pv (3,6204), depois declinando gradativamente até não induzir títulos de anticorpos significativos aos 91 dias pv (1,8563) e ausência de títulos aos 180 dias pv.

O tratamento E teve um comportamento semelhante ao do tratamento D, porém de menor amplitude e duração. Para o tratamento C observou-se no dia 35 pv um título médio de 0,7611 nos animais, que atingiu 1,1538 aos 42 dias pv, tendo uma pequena queda para 0,9918 aos 49 dias pv, voltando a aumentar e atingir a sua máxima produção de anticorpos no dia 70 pv (1,1988), não diferindo significativamente ($p>0,05$) do grupo de controle, para então os animais não apresentarem títulos aos 150 dias pv. Já os animais submetidos ao tratamento C somente apresentaram titulação de anticorpos pela SAM em cinco momentos, aos 35 dias pv (0,2308), 42 dias pv (0,2308), voltando a apresentar aos 63 dias pv (0,7955), 70 dias pv (0,8991) e 77 dias pv (0,7955), porém em nenhum momento a identificação do título médio de anticorpos foi significativa ($p>0,05$).

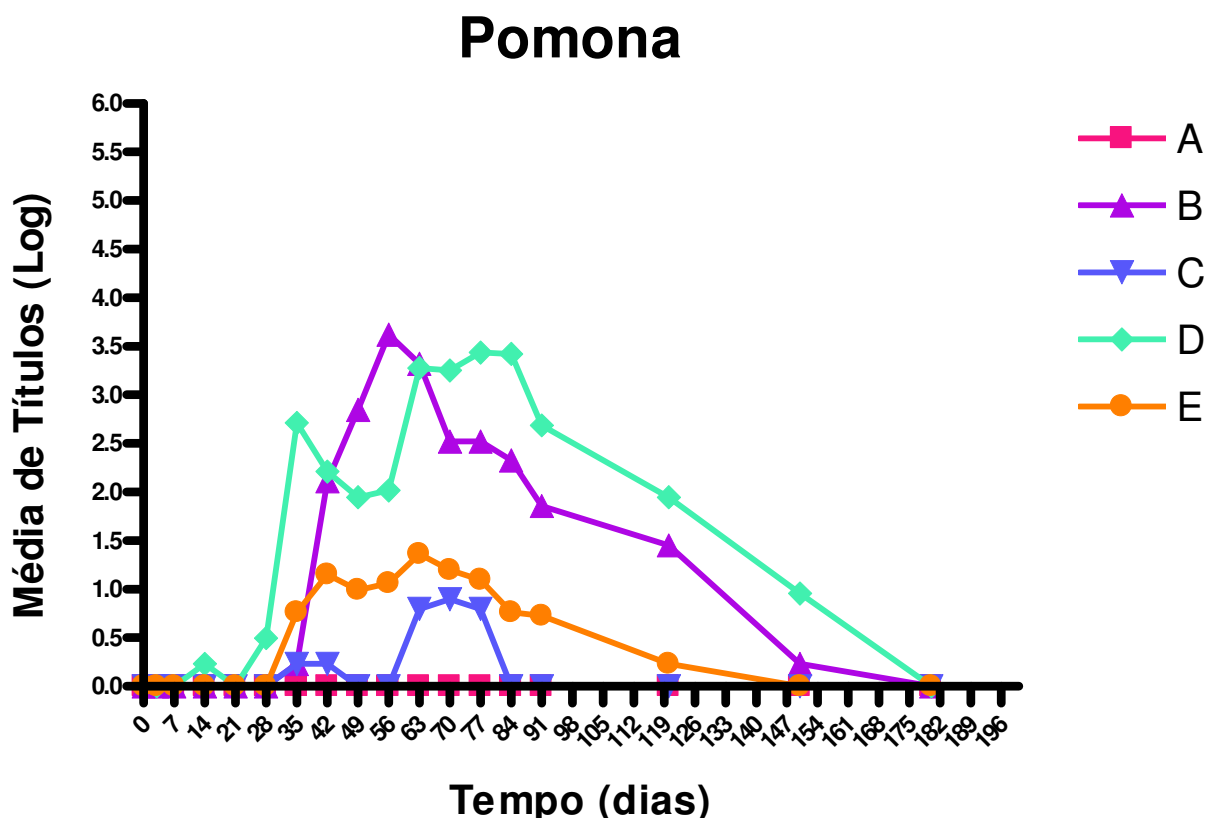


Figura 8. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento aplicado e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

O comportamento da indução de títulos de anticorpos contra o sorovar Wolffi se encontra na Figura 9. Todas as vacinas foram capazes de provocar nos animais uma resposta de anticorpos aglutinantes detectados pela SAM ($p < 0,05$). Com exceção do tratamento B, que apresentou diferença significativa do grupo de controle ($p < 0,05$) aos 3 dias pv (2,9171), as respostas de anticorpos aglutinantes dos animais submetidos às demais vacinas foram todas significantes aos 7 dias pv ($p < 0,05$). O valor máximo de média de títulos de anticorpos pelos animais foi o dos submetidos ao tratamento D aos 21 dias pv (5,3732). O comportamento da dinâmica de títulos de anticorpos foi semelhante ao do sorovar Hardjo, com dois picos de anticorpos, o primeiro no 28º dia e o segundo no 84º dia pv, para depois apresentar um declínio até atingir títulos não detectáveis pela SAM aos 180 dias pv. Porém, com exceção do tratamento D, para o qual os animais ainda apresentavam títulos significativos de anticorpos aos 150 dias pv ($p < 0,05$), nas demais vacinas os títulos de anticorpos aglutinantes detectados pela SAM

somente foram significativos ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo de controle até os 120 dias pv.

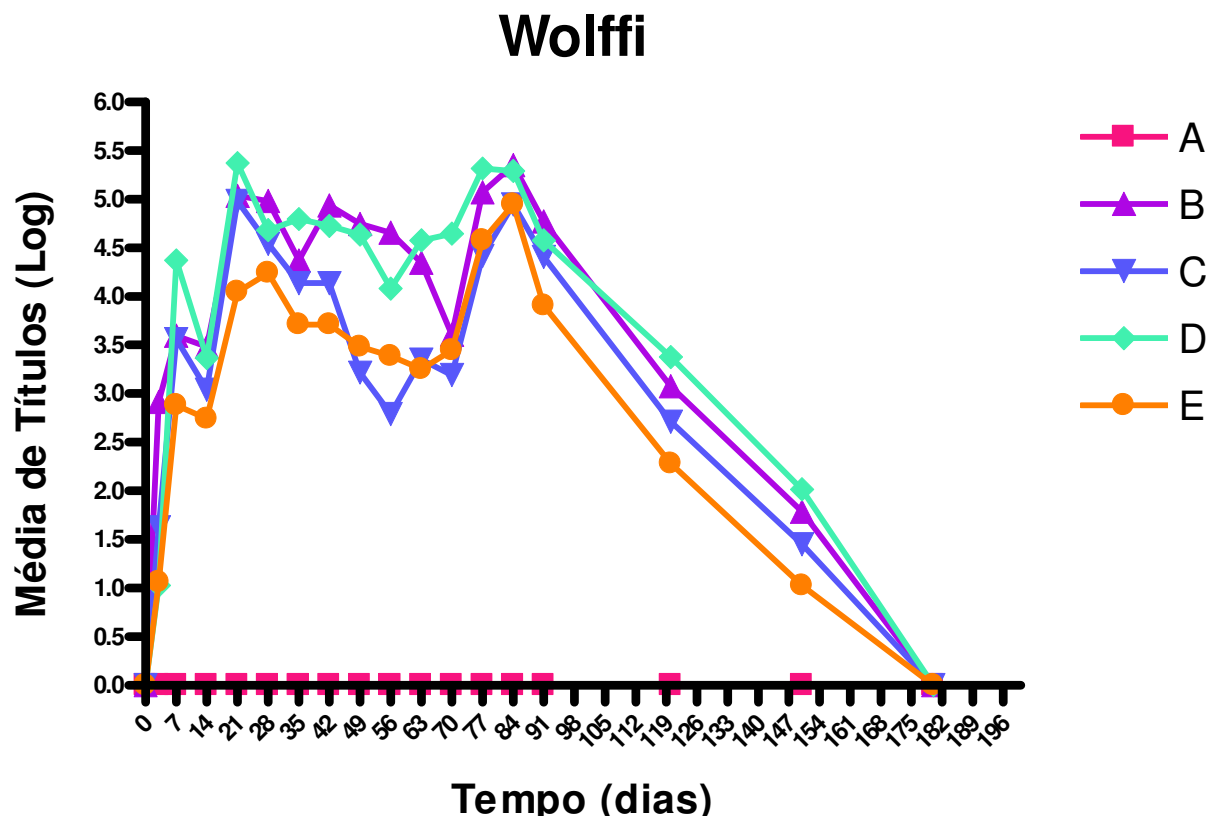


Figura 9. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento aplicado e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

Quando se analisa a resposta de anticorpos aglutinantes, induzidos nos animais pela aplicação das diferentes vacinas, de acordo com os sorovares testados, há uma dinâmica semelhante entre os sorovares Hardjo e Wolffi, o mesmo não ocorrendo com os demais sorovares (Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona).

Para uma análise mais aprofundada das vacinas pode-se recorrer às Tabelas 12, 13, 14, 15 e 16, que representam as respostas em logaritmos das médias de anticorpos produzidos pelos animais obtidos pela SAM, de acordo com os sorovares contidos nas vacinas.

Tabela 12. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento A de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

s*	Tempo (dias)															
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	180
c	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
g	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
h	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
i	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
p	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
w	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a

* Sorovar: C – Canicola; g – Grippotyphosa; h – Hardjo; i – Icterohaemorrhagiae; p – Pomona; w – Wolffi

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

Tabela 13. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento B de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

s*	Tempo (dias)															
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	180
c	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
g	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
h	0,0000a	3,1589b	2,7451b	3,5302b	5,1426b	4,7502b	3,7370b	4,2912c	2,9757b	2,5144b	3,9676b	4,2090b	4,8081c	4,9809c	4,0708bc	2,9067b
i	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	1,1538ab	1,5566ab	1,9600b	1,7873a	1,1538a	0,6923ab	0,0000a	0,0000a	0,0000z
p	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	2,1112b	2,8481b	3,6204bc	3,3204b	2,5249b	2,5249b	2,3287b	1,8563ab	1,4534ab
w	0,0000a	2,9171b	3,5992b	3,4822b	5,0394b	4,9809b	4,3708b	4,9354c	4,7499c	4,6573c	4,3465b	3,6096b	5,0735c	5,3503c	4,7743c	3,0794b

* Sorovar: C – Canicola; g – Grippotyphosa; h – Hardjo; i – Icterohaemorrhagiae; p – Pomona; w – Wolffi

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

Tabela 14. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento C de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

s*	Tempo (dias)														
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
c	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
g	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,2308a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
h	0,0000a	3,1822b	2,4109b	2,9067b	4,7738b	3,7473b	4,7392b	4,5322b	3,9677b	2,6177b	3,4716b	3,0447b	3,8745b	4,3814b	3,2751b
i	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,4615a	1,3845a	1,1538a	0,4615a	0,2308a	0,2308a
p	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,2308a	0,0000a	0,0000a	0,7955a	0,8991a	0,7955a	0,0000a	0,0000a
w	0,0000a	1,6255a	3,5647b	3,0447b	4,9809b	4,5435b	4,1400b	4,1400b	3,2171b	2,7902b	3,3549b	3,1937b	4,4158b	4,9468b	4,4052b

* Sorovar: C – Canicola; g – Grippotyphosa; h – Hardjo; i – Icterohaemorrhagiae; p – Pomona; w – Wolffi

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

Tabela 15. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento D de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

s*	Tempo (dias)														
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
c	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,0000a	0,6923a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
g	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,0000a	0,0000a	0,4959a	0,4615ab	0,4615ab	0,6923ab	1,2226a	1,3261ab	1,8908ab	2,0289bc	1,8563ab
h	0,0000a	2,7553b	3,3098b	3,4029b	5,2355b	5,0496b	4,9358c	4,7975d	3,6678cd	2,4453bcd	3,6092b	4,3470c	5,1425c	5,3501d	4,1743c
i	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,0000a	0,0000a	2,9068b	3,4716cd	3,4821cd	3,8855cd	3,6439b	3,0103bc	2,2144b	1,1882ab	1,1538ab
p	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,2308a	0,0000a	0,4959a	2,7105b	2,2144bc	1,9494bc	2,0183bc	3,2753b	3,2515c	3,4381bc	3,4242d	2,6865bc
w	0,0000a	1,0264ab	4,3705b	3,3683b	5,3732b	4,6812b	4,7979bc	4,7288d	4,6358d	4,0817d	4,5776b	4,6466c	5,3155c	5,2924cd	4,5779c

* Sorovar: C – Canicola; g – Grippotyphosa; h – Hardjo; i – Icterohaemorrhagiae; p – Pomona; w – Wolffi

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

Tabela 16. Médias dos logaritmos dos títulos obtidos para o tratamento E de acordo com o sorovar testado e tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, SP. 2003.

	Tempo (dias)														
	0	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
s*	0	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
c	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
g	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a
h	0,0000a	2,1908b	2,7450b	3,0101b	4,1161b	3,9783b	4,0711c	3,7023b	2,6760b	1,8220ab	2,9757b	2,8140bc	3,4477b	3,7588b	3,1481b
i	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	1,9149b	1,8460ab	0,6923a	0,4615a	0,6923a	0,6923a	0,4615a	0,0000a	0,0000a
p	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,0000a	0,7611ab	1,1538a	0,9918ab	1,0609a	1,3604ab	1,1988ab	1,0952a	0,7612a	0,7267a
w	0,0000a	1,0608ab	2,8828b	2,7450b	4,0474b	4,2438b	3,7131bc	3,7129b	3,4822b	3,3899b	3,2516b	3,4479c	4,5780b	4,9473b	3,9095b

* Sorovar: C – Canicola; g – Grippotyphosa; h – Hardjo; i – Icterohaemorrhagiae; p – Pomona; w – Wolffi

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

No grupo de controle (tratamento A), Tabela 12, que continha somente placebo (solução fisiológica), nenhum animal apresentou títulos de anticorpos detectáveis pela SAM. A representação gráfica está descrita na Figura 10.

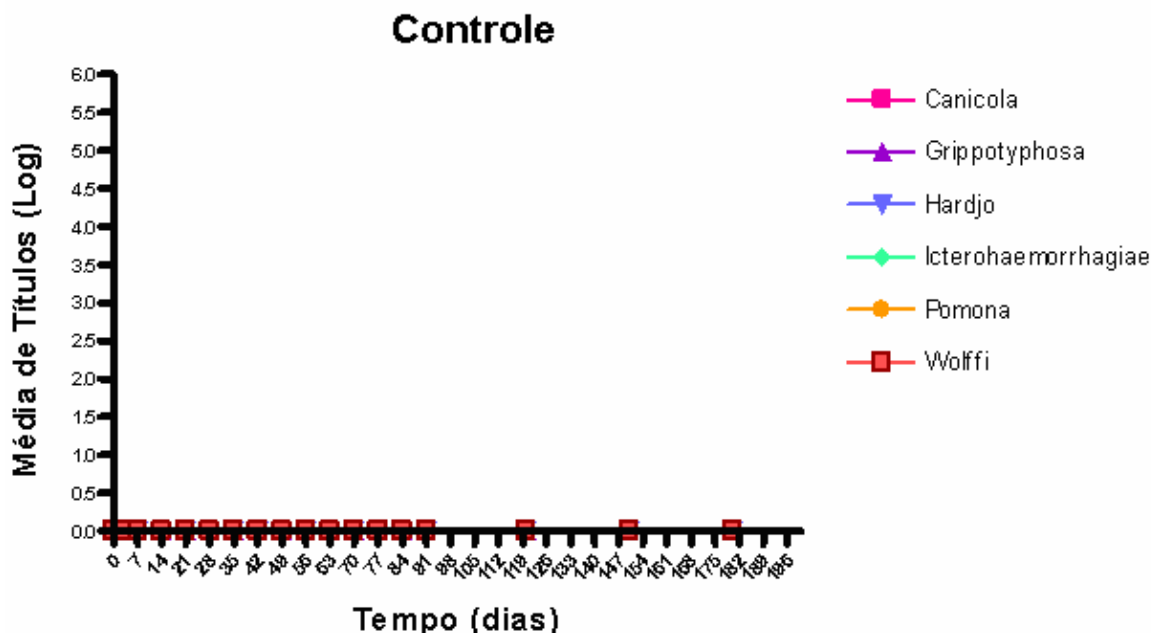


Figura 10. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para o tratamento A (Controle) de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

Observando-se a Figura 11 e a Tabela 13, que correspondem aos resultados obtidos após a aplicação do tratamento B, verificou-se que os sorovares Canicola e Grippotyphosa não foram capazes de induzir nos animais uma resposta de anticorpos detectável pela SAM em nenhum dos tempos em que foram colhidas as amostras. Entretanto, no terceiro dia pv houve detecção de títulos contra os sorovares Hardjo (3,1589) e Wolffi (2,9171), que diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos demais, porém não diferindo ($p > 0,05$) entre si. O mesmo ocorrendo aos sete dias pv, porém houve uma pequena queda na média de títulos de anticorpos contra o sorovar *Hardjo* (2,7451) e um sutil acréscimo contra o sorovar Wolffi (3,5992). Um primeiro pico de produção de anticorpos pelos animais pôde ser observado aos 21 dias pv, sendo detectados títulos médios de anticorpos de 5,1426 e 5,0394 contra os sorovares Hardjo e Wolffi, respectivamente. Os títulos

observados contra o sorovar Hardjo declinaram suavemente a partir do 21^o dia pv até chegar a 2,5144 no dia 56 pv, voltando a subir até atingir um segundo pico no 77^o dia pv (4,8081), voltando a declinar até não haver títulos detectáveis pela SAM aos 180 dias pv. Cabe ressaltar que aos 150 dias pv o sorovar Hardjo, apesar de atingir títulos médios de 0,9230, não diferiu significativamente ($p>0,05$) dos demais sorovares.

O sorovar Wolffi apresentou uma dinâmica de produção de anticorpos nos animais semelhante ao sorovar Hardjo, também declinando os níveis dos títulos até o dia 70 pv e voltando a subir, com a média de títulos atingindo seu maior valor, durante todo o estudo, aos 84 dias pv (5,3503). Houve uma queda progressiva da titulação de anticorpos até os 180 dias pv. Da mesma maneira como para o sorovar Hardjo, contra o sorovar Wolffi embora houvesse títulos detectáveis de anticorpos aos 150 dias pv estes não foram significativos ($p>0,05$) contra os demais sorovares.

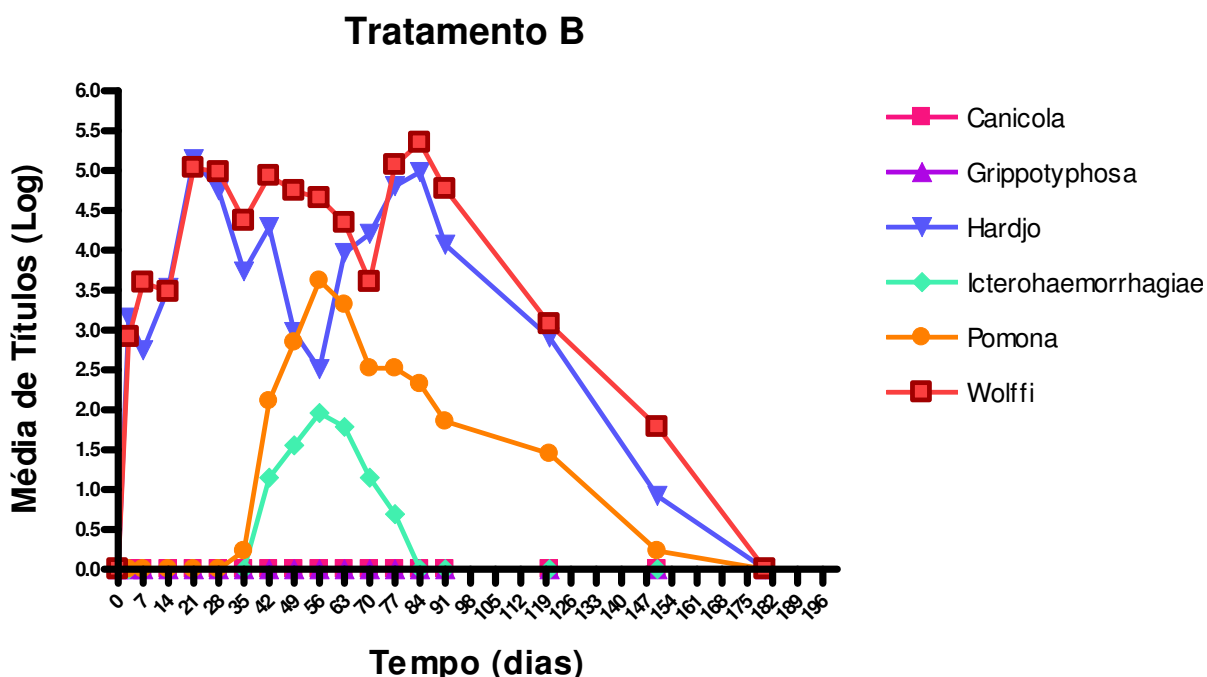


Figura 11. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para o tratamento B de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

Os sorovares Pomona e Icterohaemorrhagiae só foram capazes de induzir nos animais uma resposta a partir dos dias 35 (0,2308) e 42 pv (1,1538),

respectivamente. O sorovar Pomona induziu nos animais uma curva de títulos de anticorpos ascendente até o dia 56 pv (3,6204), para depois os animais apresentarem queda dos títulos chegando a não se verificar títulos detectáveis pela SAM no dia 180 pv. O sorovar Icterohaemorrhagiae foi capaz de induzir a produção de anticorpos em menor proporção e duração, sendo o seu pico máximo de 1,9600 (56 dias pv), não se observando mais títulos contra este sorovar a partir do dia 84 pv.

O tratamento C (Figura 12 e Tabela 14) induziu nos animais um comportamento semelhante na produção de anticorpos aglutinantes quando comparado ao tratamento B. Os dois sorovares que induziram maiores títulos de anticorpos foram o Hardjo e o Wolffi. No 3º dia pv, apesar de ambos os sorovares induzirem títulos de anticorpos, o Hardjo 3,1822 e o Wolffi 1,6255, somente o primeiro sorovar diferiu significativamente dos demais ($p < 0,05$). O primeiro pico de anticorpos produzidos pelos animais foi observado no dia 21 pv, com médias de títulos observados de 4,7738 e 4,9809 contra os sorovares Hardjo e Wolffi, respectivamente, porém neste tratamento esse pico foi o que apresentou as maiores médias observadas durante o estudo. Houve um declínio progressivo que durou até o dia 56 pv, voltando a aumentar os títulos expressados pelos animais até atingir outro pico aos 84 dias pv, com médias de 4,3814 e 4,9468 (Hardjo e Wolffi), voltando a declinar a zero no dia 180 pv, porém no dia 150 pv os títulos não se diferenciaram dos demais ($p > 0,05$). Cabe ressaltar que somente os sorovares Hardjo e Wolffi foram capazes de induzir nos animais títulos significativos ($p < 0,05$) de anticorpos quando comparados aos demais sorovares do tratamento C.

Da mesma forma como no tratamento B, o sorovar Canicola do tratamento C não foi capaz de induzir nos animais a produção de anticorpos detectáveis pela SAM durante todo o período do presente estudo. Contra o sorovar Grippotyphosa somente foram detectados títulos nos dias 35 e 42, tendo títulos médios de 0,2308 em ambas as colheitas, mesmo assim estes não diferiram significativamente dos demais sorovares. O sorovar Pomona teve um comportamento exatamente igual ao do sorovar Grippotyphosa até o dia 56 pv; nos dias 63, 70 e 77 pv voltou a

apresentar títulos não significativos ($p>0,05$) à prova de SAM, sendo estes de 0,7955, 0,8991 e 0,7995, respectivamente. Já o sorovar *Icterohaemorrhagiae* induziu um comportamento completamente diferente, no 49º dia pv foi possível pela primeira vez detectar títulos de anticorpos (0,2308) nos animais, mesmo sendo não significativos, aumentando gradativamente até 1,1538 (70º dia pv) e regredindo até o completo desaparecimento no dia 84 pv.

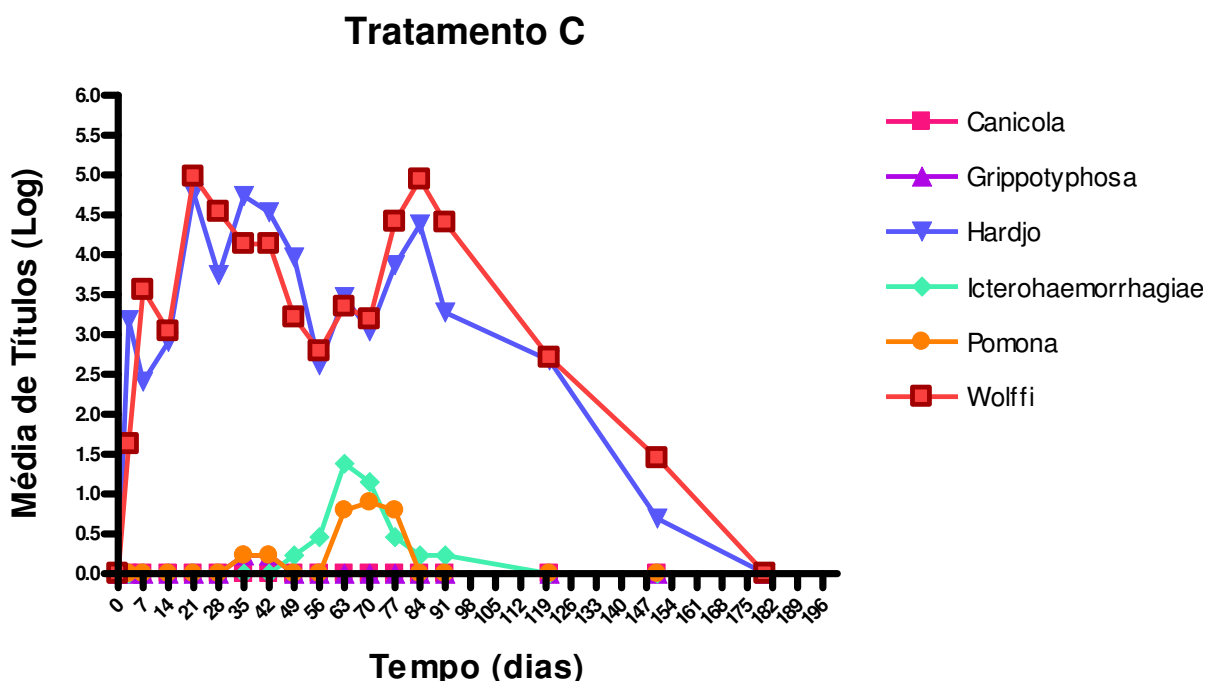


Figura 12. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para o tratamento C de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

Observando a Tabela 15 e a Figura 13, referente aos logaritmos dos títulos de anticorpos aglutinantes obtidos pela SAM dos animais submetidos ao tratamento D, verifica-se que já no terceiro dia pv os animais apresentaram títulos de 2,7553 contra o sorovar Hardjo e de 1,0264 contra o sorovar Wolffi. Os títulos de anticorpos expressados pelos animais contra o sorovar Hardjo diferiram significativamente ($p<0,05$) dos demais, não diferindo ($p>0,05$) do sorovar Wolffi. Os títulos médios de anticorpos contra estes dois sorovares aumentaram em magnitude para 3,3098 e 4,3705 no 7º dia pv contra o sorovar Hardjo e Wolffi, respectivamente, diferindo significativamente ($p<0,05$) dos demais e não diferindo ($p>0,05$) entre si.

Aos 14 dias pv todos os animais apresentaram reação ao tratamento aplicado (D) contra todos os sorovares nele contidos, e os maiores valores foram contra os sorovares Hardjo (3,4029) e Wolffi (3,3683), diferindo significativamente ($p<0,05$) dos demais e não entre si. No dia 21 pv os sorovares Canicola, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona não apresentavam títulos detectáveis pela SAM, enquanto os outros dois sorovares ainda apresentavam um aumento acentuado dos títulos, 5,2355 (Hardjo) e 5,3732 (Wolffi), diferindo ($p<0,05$) dos demais.

Os sorovares Canicola e Pomona voltaram a induzir títulos de anticorpos aglutinantes de 0,6923 e 0,4959, respectivamente, no dia 28 pv. Os sorovares Hardjo (5,0496) e Wolffi (4,6812) apresentaram uma pequena queda nos títulos detectados pela SAM nesta mesma data.

O sorovar Canicola somente induziu nos animais títulos de anticorpos detectáveis pela SAM nos dias 14 (0,2308) e 28 pv (0,6923), não diferindo significativamente dos demais em nenhum momento.

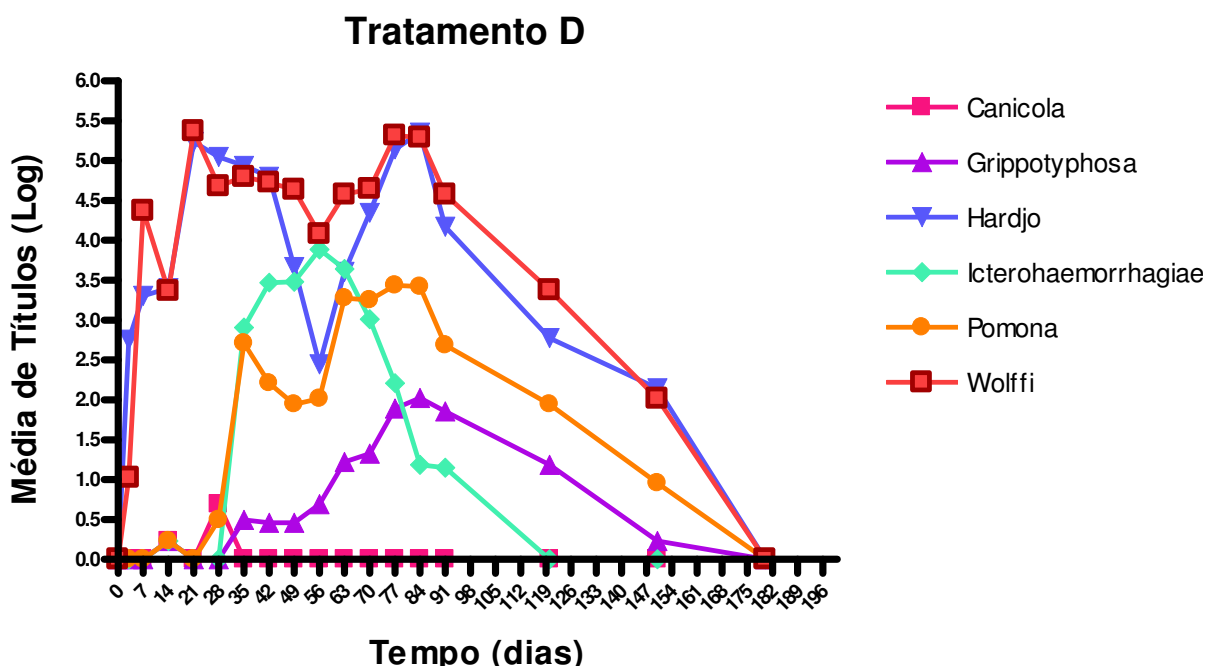


Figura 13. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para o tratamento D de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

Aos 35 dias pv o sorovar *Grippytyphosa* induziu título médio de 0,4959 nos animais, não diferindo significativamente ($p>0,05$) do sorovar *Canicola*. Os títulos apresentados contra os sorovares *Icterohaemorrhagiae* (2,9068), *Pomona* (2,7105) e *Wolffi* (4,7979) não diferiram ($p>0,05$) entre si, porém o sorovar *Wolffi* não diferiu ($p>0,05$) do *Hardjo* (5,0496). No dia 42 pv todos os sorovares apresentaram um pequeno declínio nos títulos de anticorpos detectáveis pela SAM, porém tendendo à estabilidade. O mesmo ocorreu no dia 49 pv, com os títulos de anticorpos declinando ainda mais, mas de forma gradativa. A tendência de queda persistiu no dia 56 pv, este foi o dia de maior aumento de títulos de anticorpos contra o sorovar *Icterohaemorrhagiae* (3,8855), superando a média de títulos contra o sorovar *Hardjo* (2,4453). Aos 63 dias pv iniciou-se uma nova ascensão dos títulos detectáveis de anticorpos contra todos os sorovares, com exceção do *Icterohaemorrhagiae*, que apresentou gradativa queda dos títulos de aglutininas, que não foram mais detectadas aos 120 dias pv. Um segundo pico de anticorpos foi observado aos 77 dias pv contra o sorovar *Hardjo* (5,1425) e contra o *Wolffi* (5,3155), diferindo significativamente ($p<0,05$) dos demais sorovares, logo após iniciando uma diminuição dos títulos até não ocorrer mais reação aos 180 dias pv. O sorovar *Grippytyphosa* atingiu pico expressivo de anticorpos aglutinantes aos 84 dias pv (2,0289) para depois declinar até não serem detectáveis aos 180 dias pv.

O comportamento da indução de títulos expressados pelos animais contra os sorovares *Hardjo* e *Wolffi* foi semelhante, apresentando um primeiro pico de aglutininas por volta dos dias 21 a 49 pv, declinando até o 56º dia pv, voltando a se elevar até atingir um segundo pico aos 70 e 77 dias pv e diminuindo até chegar ao mínimo aos 180 dias pv. O sorovar *Pomona* também descreveu uma dinâmica com dois picos de títulos, porém se apresentando mais tardiamente e com menor amplitude quando comparados aos dos sorovares *Hardjo* e *Wolffi*. Contra os sorovares *Grippytyphosa* e *Icterohaemorrhagiae* a dinâmica dos títulos de anticorpos detectáveis pela SAM foi um pouco diferente, descrevendo apenas uma curva com um único pico; contra o sorovar *Icterohaemorrhagiae* este foi aos 56 dias pv (3,8855), e contra o *Grippytyphosa*, aos 84 dias pv (2,0289).

Nenhum dos animais apresentava títulos de anticorpos detectáveis pela SAM aos 150 dias pv contra os seis sorovares utilizados como antígeno.

Cabe aqui ressaltar que este tratamento (D) não possuía o sorovar Wolffi em sua composição antigênica.

Para uma melhor compreensão da resposta de anticorpos aglutinantes obtidos pela inoculação do tratamento E deve-se recorrer à Tabela 15 e à Figura 14.

O sorovar Canicola não foi capaz de estimular a produção de títulos de anticorpos detectáveis pela SAM nos animais durante todo o período do presente estudo.

Resultados encontrados com o sorovar Grippotyphosa demonstram que houve indução de anticorpos nos animais aos 49 (0,2308), 56 (0,2652) e 63 (0,2308) dias pv, porém as médias de títulos observados não diferiu significativamente das demais ($p>0,05$).

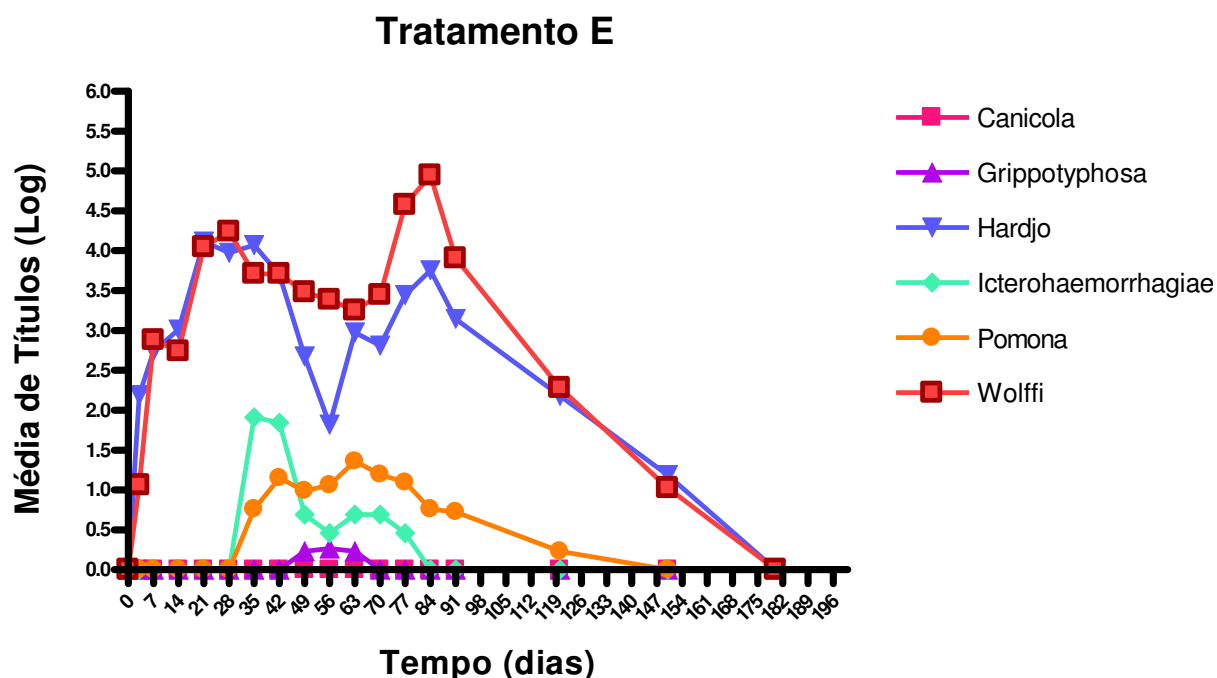


Figura 14. Médias dos logaritmos dos títulos detectados pela SAM para a vacina D de acordo com os sorovares testados e a data de colheita da amostra. Jaboticabal-SP. 2003.

O sorovar Hardjo induziu um comportamento distinto dos demais sorovares, sendo semelhante somente ao do Wolffi. No início, aos três dias pv, foi possível detectar títulos de anticorpos produzidos pelos animais por meio da SAM (2,1908) de modo significativo ($p < 0,05$), descrevendo uma curva ascendente, que apresentou seu máximo aos 21 dias pv (4,1161), continuando a diferir dos demais ($p < 0,05$) e mantendo uma estabilidade até o 28^o dia pv. Houve uma diminuição dos níveis de anticorpos até o dia 56 pv (1,8220), tempo esse que não diferiu significativamente dos demais sorovares ($p > 0,05$), para depois voltar a aumentar, atingindo um novo pico aos 84 dias pv (3,7588). A partir desse dia os animais apresentaram uma diminuição acentuada de títulos de anticorpos aglutinantes, os quais foram significantes ($p < 0,05$), até a não detecção aos 180 dias pv.

Quando observadas as respostas de anticorpos detectáveis pela SAM nos animais contra o sorovar Icterohaemorrhagiae só houve títulos aos 35 dias pv (1,9149), mantendo uma estabilidade até o 42^o dia pv (1,8460), para depois declinarem gradativamente até o 77^o dia pv (0,4615), e a partir daí não foram verificados mais títulos de anticorpos detectáveis. Somente foram observados títulos significativos de anticorpos ($p < 0,05$) no 35^o dia pv.

O sorovar Pomona manteve a indução de títulos por mais tempo, quando comparado aos sorovares Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae, iniciando a detecção de anticorpos pela SAM aos 35 dias pv (0,7611), não diferindo significativamente dos demais ($p > 0,05$). Manteve um patamar até o 91^o dia pv (0,7267), quando declinou para título médio de 0,2308 aos 120 dias pv, não mais induzindo a produção de anticorpos aos 150 dias pv. O sorovar Pomona não foi capaz de diferir significativamente dos demais sorovares em nenhum período do presente estudo ($p > 0,05$).

Como citado anteriormente, o sorovar Wolffi induziu uma dinâmica de produção de anticorpos semelhante à do sorovar Hardjo. No 3^o dia pv os animais já apresentavam títulos de anticorpos detectáveis pela SAM (1,0608), porém não eram estatisticamente significativos ($p > 0,05$), passando a ser no 7^o dia pv (2,8828), atingindo um primeiro pico de anticorpos no dia 28 pv (4,2438), mantendo-se nesse

patamar até o 84^o dia pv (4,9473), quando atingiu seu título máximo, para depois lentamente declinar, até não ser significativo no dia 150 pv (1,02663) e desaparecer aos 180 dias.

6. DISCUSSÃO

Utilizou-se a prova de soroaglutinação microscópica (SAM), como preconiza COLE et al. (1973), para avaliar a resposta humoral contra os sorovares contidos nas quatro vacinas, comparar os desempenhos das mesmas e a duração dos títulos de anticorpos detectáveis.

O Quadro 1 descreve os tratamentos utilizados, suas composições e recomendações de aplicação. Segundo SIDDIQUE & SHAH (1990), as vacinas polivalentes contendo leptospiras inativadas são as mais utilizadas rotineiramente. FAINE et al. (1999) citam que nos EUA as vacinas aprovadas para uso em rebanhos domésticos são constituídas por cinco sorovares de leptospira (Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Pomona), sendo assim denominadas pentavalentes. As vacinas utilizadas neste estudo, em sua maioria, foram hexavalentes, contendo os sorovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi. Exceção feita à vacina D, que é pentavalente, não sendo adicionado o sorovar Wolffi, porém quando se observam a Figura 13 e a Tabela 15 verifica-se que os animais foram capazes de produzir anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM contra este sorovar de forma significativa. BRENNER et al. (1999) explicam que os agrupamentos baseados na antigenicidade (sorogrupos e sorovares) não correspondem aos grupos taxonômicos, baseados nas relações genômicas; a maioria dos sorogrupos contém muitos sorovares ou contém mais de uma espécie (ou genótipo), e a maioria dos grupos de espécies têm sorogrupos representativos e múltiplos, como é o caso dos sorovares Hardjo e Wolffi. TABATA (2002) confirmou essa descrição quando trabalhou determinando a proteção cruzada entre os sorovares Wolffi, Hardjo e Guaricura em hamsters (*Mesocricetus auratus*). NARDI JÚNIOR et al. (2003) também observaram a reação cruzada entre os sorovares Hardjo e Wolffi quando trabalharam com uma vacina que não continha o sorovar Wolffi em sua composição.

Os anticorpos contra leptospira podem ser detectados no soro sangüíneo dos animais no início das infecções e mais tardiamente no caso das vacinações. A concentração dos anticorpos aumenta à medida que a infecção evolui ou ainda no desenvolvimento da resposta induzida pelos antígenos vacinais (FRANCIS et al., 1983; THEVENON et al., 1987; TIZARD, 1998).

Os animais não apresentaram uma mesma magnitude de resposta em anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM contra os sorovares utilizados como antígenos, quando considerados os logaritmos dos títulos de anticorpos. SIDDIQUE & SHAH (1990) afirmam que as vacinas não induzem uma mesma resposta sorológica contra todos os sorovares nelas contidos, podendo isso ocorrer devido a uma diferença na concentração antigênica final, ou pela supressão da resposta antigênica causada por um sorovar sobre um outro presente na vacina. TABATA (2002) também cita que há variações no poder imunogênico segundo a estirpe de leptospira empregada para a produção das bacterinas.

Entre os fatores que podem influenciar a eficácia das vacinas pode-se destacar a influência dos esquemas de vacinação empregados, a qualidade e a quantidade de microrganismos imunizantes (VAN BEKKUM, 1966; MC CULLOUGH et al., 1992; PANDEY, 1994), o grau de similaridade entre os antígenos que compõem a bacterina (RWEYEMAMU et al., 1977), o tipo de adjuvante utilizado e a temperatura de conservação e transporte da vacina até a propriedade. FAVERO et al. (1997) reforçaram em seus estudos a idéia de que a concentração antigênica da vacina exerce grande influência na produção de aglutininas pós-vacinais.

De maneira geral, aos 14 dias pv todos os animais foram capazes de produzir títulos de anticorpos detectáveis pela SAM contra os sorovares contidos nas bacterinas; somente os sorovares Hardjo e Wolffi induziram nos animais títulos de anticorpos aglutinantes aos três dias pv.

RAO & KESHAVAMURTHY (1985), ao utilizarem a prova de soroaglutinação microscópica e o teste de inibição de crescimento de leptospiras "*in vivo*" para analisar a resposta sorológica de bezerros bubalinos, vacinados com uma bacterina pentavalente preparada com os sorovares Pomona, Canicola, Hebdomadis,

Tarassovi e Shermani, obtiveram a soroconversão contra todos os componentes da vacina no 15^o dia pós-vacinação.

FRANÇOIS et al. (1995), quando testaram três vacinas comerciais normalmente utilizadas para controle da leptospirose suína, observaram que 96% dos animais não produziram anticorpos aglutinantes, detectáveis no ponto de corte adotado (1:100) para a SAM 15 dias após a primeira vacinação.

THEVENON et al. (1987) e TIZARD (1998) citam que os anticorpos contra leptospira podem ser detectados no soro sangüíneo dos animais no início das infecções e mais tardiamente no caso das vacinações, e que a concentração dos anticorpos aumenta à medida que a infecção evolui ou ainda no desenvolvimento da resposta induzida pelos antígenos vacinais. As classes de anticorpos que inicialmente são detectadas são IgM e IgA, que em média nos bovinos chegam a concentrações mais elevadas em cerca de sete dias. A classe IgG pode ser detectada por volta de dois dias após o surgimento das anteriores, atingindo a sua magnitude por volta de duas semanas e perdurando por tempo mais prolongado.

Somente o tratamento D foi capaz de induzir a produção de anticorpos aglutinantes contra o sorovar Canicola, porém a expressão de anticorpos foi de baixa amplitude e de curta duração, sendo estas no 14^o e no 28^o dias pv.

Os tratamentos C, D e E foram capazes de induzir uma resposta de anticorpos detectáveis contra o sorovar Grippotyphosa, porém cabe ressaltar que somente o tratamento D foi capaz de provocar uma resposta estatisticamente significativa ($p < 0,05$), que se manteve por maior tempo, até 120 dias pv. FAVERO et al. (1997) citam que contra esse sorovar verificou-se um comportamento irregular na curva de anticorpos.

Contrariando as observações de FAVERO et al. (1997), aos 14 dias pv o tratamento D foi capaz de induzir resposta de anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM, porém todas as vacinas, com exceção do grupo de controle (tratamento A), foram capazes de induzir a produção de anticorpos aglutinantes detectáveis até o 77^o dia pv pelo menos. Da mesma forma observada no trabalho de FAVERO et al. (1997), os títulos de anticorpos mais elevados foram contra os sorovares Hardjo e Wolffi.

Quando a reação de SAM é empregada para o diagnóstico da leptospirose animal adotando-se a diluição inicial dos soros sangüíneos de 1/50, espera-se que dos 60 aos 90 dias após a vacinação os animais comportem-se como não reatores (FAINE, 1994; HANSON, 1997). No entanto, esses critérios não estão totalmente esclarecidos (BRIHUEGA & HUTTER, 1995), e é possível que exposições a antígenos homólogos ou heterólogos antes da vacinação ocasionem interferências na resposta vacinal. Todavia, as vacinas estimulam a produção de baixos títulos detectáveis pela SAM, que surgem rapidamente e declinam após várias semanas, e a proteção contra a enfermidade e a infecção renal têm sido demonstradas por pelo menos 12 meses em bovinos (BLOOD & RADOSTITS, 1989).

Neste estudo, o emprego da SAM demonstrou haver títulos de anticorpos já aos três dias pv contra os sorovares Hardjo e Wolffi de pelo menos 100, e esses perduraram até o 150^o dia pv contra ambos os sorovares, enquanto contra os demais sorovares a expressão de anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM se deu por menor tempo.

Quando se observam as respostas de anticorpos contra os sorovares Hardjo e Wolffi pode-se perceber um padrão de expressão de anticorpos aglutinantes. No terceiro dia pv há o início dos títulos, que aumentam até o dia 21 pv, produzindo um primeiro pico de anticorpos, depois havendo uma pequena queda por volta do 56^o dia pv, para voltar a aumentar em magnitude até o dia 84 pv. NARDI JÚNIOR et al. (2003) observaram picos de anticorpos contra a maioria dos sorovares ao redor do 45^o e 60^o dias pv, coincidindo com os dias 15 e 30 pv, quando trabalharam com búfalas. Depois os títulos de anticorpos declinaram até a não-detecção pela SAM aos 180 dias pv. Essa queda de anticorpos aglutinantes contra os sorovares Hardjo e Wolffi, após a vacinação (reforço), pode ser devida ao fato de haver uma neutralização dos anticorpos séricos existentes nos animais previamente vacinados (TIZARD, 1998). Essa observação também foi verificada por FAVERO et al. (1997) em bovinos. O conjunto de resultados revelou que a presença de aglutininas pré-vacinais (reforço) exerceu uma pequena influência no perfil de aglutininas pós-vacinais, obtidas com as variantes Hardjo, Wolffi e Icterohaemorrhagiae, havendo

uma redução significativa dos níveis de aglutininas pós-vacinais contra o sorovar Pomona.

Como já era esperado, o controle não induziu a produção de anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM, pois se tratou do grupo de controle que recebeu apenas a inoculação de solução fisiológica.

O tratamento B foi capaz de induzir reposta de anticorpos contra os sorovares Hardjo, Wolffi, Pomona e Icterohaemorrhagiae, nessa ordem, porém não induziu títulos contra o sorovar Canicola em nenhum momento do presente estudo.

Uma marcante resposta detectada pela SAM foi verificada contra os sorovares Hardjo e Wolffi quando se analisou o resultado do tratamento C, porém os títulos contra os sorovares Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona foram de baixa amplitude e efêmeros. Os animais não apresentaram reação contra o sorovar Canicola.

A melhor resposta em títulos de anticorpos observada foi para o tratamento D, que foi capaz de induzir nos animais a produção de anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM contra todos os sorovares testados, inclusive contra o sorovar Wolffi. Conforme demonstrado pelo trabalho de TABATA (2002), os sorovares Hardjo e Wolffi produzem imunidade cruzada entre si por pertencerem ao mesmo sorogrupo, explicando a reação contra o sorovar Wolffi, mesmo não estando contido na vacina D.

Os animais submetidos ao tratamento E se comportaram de maneira semelhante ao B, porém quando se observa a Tabela 5 a média dos logaritmos dos títulos é de menor amplitude.

O fato de não se observar uma mesma resposta sorológica contra todos os sorovares foi relatado por SIDDIQUE & SHAH (1990), e isso pode ocorrer devido a uma diferença na concentração antigênica final da vacina ou pela supressão da resposta antigênica causada pela predominância de um sorovar sobre um outro presente na vacina.

Mesmo a vacina D apresentando maiores médias de títulos de anticorpos durante toda a condução deste trabalho, não se pode afirmar que esta é superior às demais, pois quando efetuada a análise estatística e confrontadas as variáveis

tempo, vacina e sorovar houve interação entre elas, ou seja, não houve uma variável que sozinha fosse responsável pela resposta em títulos de anticorpos.

Com relação à comparação das vacinas, provavelmente a vacina D é a que deve possuir antígenos de melhor qualidade ou em maior quantidade, o que lhe conferiu uma maior indução de anticorpos aglutinantes nos animais a ela submetidos, sendo capaz de provocar respostas contra todos os antígenos nela contidos, mesmo que contra o sorovar Canicola tenha sido de baixa intensidade. No caso da vacina B, que também demonstrou uma dinâmica de anticorpos com títulos médios superiores quando comparada com as demais vacinas, os animais não apresentaram reação contra os sorovares Grippytyphosa e Canicola.

Deve-se ainda levar em consideração o que GUIMARÃES et al. (1982/83) descrevem, que as vacinas contra leptospirose bovina disponíveis no mercado protegem contra as manifestações clínicas da doença, porém não asseguram garantias contra a excreção de leptospiros através das vias urinárias. BOLIN et al. (1989a) relatam que a vacinação diminui a ocorrência de infecção e transtornos reprodutivos causados pelo sorovar Hardjo sob condições de campo, mesmo não induzindo níveis significativos de anticorpos aglutinantes.

As vacinas contra leptospirose têm sido testadas em bovinos por vários anos, e os relatos sobre sua eficácia são conflitantes. FAINE et al. (1999) relatam que resultados de triagens em bovinos têm diferido desde o completo sucesso, significando que todos os animais vacinados estavam protegidos e os controles não, até a completa falência, com diferença não significativa entre os grupos de controle e experimental. Autores como BOLIN et al. (1989a), FAVERO et al. (1997) e SAMINA et al. (1997) encontraram quase nenhuma resposta sorológica após a vacinação com bacterinas comerciais. Porém destacam-se os resultados obtidos por DEL FAVA et al. (2004) quando trabalharam com bovinos da raça Nelore manejados extensivamente. Esses autores observaram que a soropositividade para leptospira não interferiu no coeficiente de prenhez, coeficiente de parição, de natimortalidade e características de desempenho de matrizes reagentes e não reagentes, sendo o escore corporal dos bovinos a variável responsável pela diferença dos índices de produtividade observados. Ou seja, bovinos de corte

sororreagentes contra *Leptospira* spp. e não vacinados contra leptospirose, sob manejo zootécnico extensivo, apresentaram bons coeficientes de prenhez, parição e natalidade, independentemente de raça, grupo genético e faixa etária.

O modo de preparação empregado pela indústria na fabricação das vacinas interfere nos títulos de anticorpos induzidos e na sua duração, conforme demonstraram NARDI JUNIOR et al. (2003). Esses autores compararam os títulos de anticorpos detectados pela SAM induzidos por uma bacterina (bactéria total inativada acrescida de adjuvante) e uma vacina fabricada com a membrana externa da leptospira em bubalinos. Embora as duas vacinas tenham sido capazes de induzir uma resposta sorológica detectável, a de membrana externa foi superior à bacterina com relação à magnitude de títulos de anticorpos e sua duração.

Uma vez que a maioria das vacinas contra leptospirose disponíveis no mercado brasileiro são bacterinas, há a necessidade de maiores estudos no que diz respeito à melhoria do poder imunogênico dos sorovares utilizados como sementes e da duração dos anticorpos induzidos por elas nos animais submetidos à vacinação. Já estão disponíveis algumas vacinas produzidas com a membrana externa, porém estas estão sempre associadas a enfermidades da esfera reprodutiva, e o custo de suas doses é muito elevado quando comparado ao das bacterinas, chegando a ser 10 vezes superior.

7. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos nas condições em que foi realizado o presente estudo pôde-se concluir que:

1. As quatro vacinas comerciais administradas aos animais com dose de reforço foram capazes de induzir uma resposta estatisticamente significativa de anticorpos aglutinantes;
2. Houve influência do tempo decorrido após a aplicação das vacinas, do tipo de vacina e do sorovar contido em cada vacina na resposta de títulos de anticorpos aglutinantes detectados pela SAM;
3. Os animais não apresentaram uma mesma magnitude de resposta em anticorpos aglutinantes detectáveis pela SAM contra os sorovares utilizados como antígenos, quando considerados os logaritmos dos títulos de anticorpos;
4. Os sorovares Hardjo e Wolffi foram os que induziram melhores respostas, tanto em magnitude quanto em duração contra todas as vacinas;
5. A pior resposta foi contra o sorovar Canicola, que foi capaz somente de induzir nos animais uma baixa resposta contra a vacina D;
6. A detecção de anticorpos pela SAM teve seu início aos 3 dias pv contra os sorovares Hardjo e Wolffi e mais tardiamente contra os demais;
7. Houve detecção de títulos de anticorpos pela SAM até o dia 120 pv, não necessariamente contra todos os sorovares;
8. Os sorovares Hardjo e Wolffi apresentaram resultados satisfatórios na indução de títulos de anticorpos aglutinantes e reação cruzada entre eles.
9. Há a necessidade de melhoria no poder imunogênico dos sorovares utilizados nas vacinas polivalentes disponíveis no mercado brasileiro, com vistas a produzir uma maior indução de anticorpos aglutinantes nos animais.

8. REFERÊNCIAS¹

ABUCHAIM, D. M.; DUTRA, N. F. L. Prevalência da leptospirose em bovinos da bacia leiteira de Porto Alegre, RS. **Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. RS**, Porto Alegre, v. 13, p. 55-60, 1985.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986, p. 112-120.

ADLER, B.; COUSINS, D. V.; FAINE, S.; ROBERTSON, G. M. Bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo as measured by enzyme immunoassay. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.7, p.577-585. 1982.

ADLER, B.; FAINE, S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona. **Infect. Immun.**, Washington, v. 14, p. 703-708, 1976.

ADLER, B.; FAINE, S. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. **Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 11, p. 387-400, 1978.

ADLER, B.; FAINE, S.; MULLER, H. K.; GREEN, D. E. Maturation of humoral immune response determines the susceptibility of guinea-pigs to leptospirosis. **Pathology**, Chinchester, v. 12, p. 529-538, 1980.

ALEXANDER, A. D. Immunity to leptospirosis. In: JOHNSON, B. **Biology of the parasitic spirochetes**. New York: Academic Press, 1976. p. 339-350.

ALLEN, J. D.; MENEY, C. L.; WILKS, C. R. Evaluation of a Hardjo-Pomona vaccine to prevent leptospirosis in cattle exposed to a natural challenge with *Leptospira* serovar Hardjo. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, p. 58-93, 1982.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle**. Cambridge: Blackwell Science. 1996. p. 569-571.

¹ Segundo normas da ABNT NBR 6023

ARDUINO, G. G. C. **Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* sp. em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial:** avaliação do perfil sorológico frente a dois esquemas de vacinação. Jaboticabal, 2002. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

ARDUINO, G. G. C.; GIRIO, R. J. S.; FREIRE, M. M.; MARCHIORI FILHO, M. Anticorpos contra *Leptospira* spp em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial. Perfil sorológico frente a dois esquemas de vacinação. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 865-871, 2004.

BALLARD, S.A.; ADLER, B.; FAINE, S. Analysis of leptospiral lipopolysaccharide epitopes by monoclonal antibodies. **Austr. Microbiol.**, Sydney, v. 7, p. 190, 1986.

BARRINGER, L. S.; ROSENBERG, J. B. Better Colostrum: vaccination of dairy cows in the seventh month of gestation can benefit calves. **Large Anim. Vet.**, Guelph, v. 50, n. 6, p. 22-23, 1995.

BENEDICTO, T. K.; MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S. MURAKAMI, T. O; MATHIAS, L. A; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de aglutininas para leptospirose bovina em dois municípios da Região Nordeste do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29, 2002, Gramado – RS. **Anais...** Gramado: Sovergs, 2002. 1 CD-ROM.

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

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

BEY, R. F.; JOHNSON, R. C. Immunogenicity and humoral and cell-mediated immune responses to leptospiral wholecell, outer envelope, and protoplasmatic cylinder vaccines in hamsters and dogs. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 43, p. 835-840, 1982.

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

BLAHA, T. **Epidemiologia especial veterinária**. São Paulo: Acribia, 1995. p. 128-136.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Veterinary medicine**. 7th. ed. London: Baillière Tindall. 1989. p. 758-769.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. **Bov. Pract.**, Stillwater, v. 33, n. 1, p. 50-55, 1999.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 62, n. 7, p. 995-1000, 2001.

BOLIN, C. A.; PHIL, J. A. C.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. 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.**, Schaumburg, v. 52, n. 10, p. 1639-1643, 1991.

BOLIN, C. A.; THIERMANN, A. B.; HANDSAKER, A. L.; FOLEY, J. W. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* type *Hardjo-bovis* infection on pregnant cattle. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 50, n. 1, p. 161-165, 1989a.

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.**, Schaumburg, v. 50, n. 12, p. 2004-2008, 1989b.

BRAMEL, R. G.; SCHEIDY, S. F. The effect of revaccination of horses and cattle with *Leptospira Pomona* bacteria. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Schaumburg, v. 128, p. 399-440, 1956.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de controle de zoonoses e animais peçonhentos. **Manual de Leptospirose**. 2. ed. Brasília, 1995. 98p.

- BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nova and four new *Leptospira* genomospecies. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 49, p. 839-858, 1999.
- BRIHUEGA, B.; HUTTER, E. Efficacy of *Leptospira* vaccine in dogs. **Vet. Arg.**, Buenos Aires, v. 12, p. 118-192, 1995.
- BROOM, J. C. The protective value of leptospiral vaccines in hamsters. **Vet. Rec.**, London, v. 11, p. 127-130, 1949.
- BROUGHTON, E. S.; MARSHALL, R. B.; LITTLE, T. W. A.; HATHAWAY, S. C.; MACKINTOSH, G. C.; HELLSTROM, J. S. *Leptospira interrogans* serovar hardjo vaccines in cattle: immunogenicity of vaccines prepared from cultures grown in a protein-free medium. **Prev. Vet. Med.**, Amsterdam, v. 2, p. 423-433, 1984.
- BROWN, A. L.; JENSEN, J. H.; CREAMER, A. A.; SCHEIDY, S. F. Evaluation of a *Leptospira* bacterin prepared in culture medium. **Vet. Med.**, Prague, v. 50, p. 167-171, 1955.
- BRUNNER, K. T.; MEYER, K. F. Immunization of hamsters and dogs against experimental leptospirosis. **J. Immun.**, Washington, v. 64, p. 365-372, 1950.
- BURNSTEIN, T.; BRAMEL, R. G.; JENSEN, J. Vaccination of swine with a *Leptospira pomona* bacterin. **Vet. Med.**, Prague, v. 52, p. 58-61, 1957.
- CALDAS, E. M.; VIEGAS, E. A.; VIEGAS, S. A. R. A.; REIS, R. S. Aglutininas anti-leptospira em hemossoro de animais domésticos no Estado da Bahia, 1994/1996 – II. **Arq. Esc. Méd. Vet. Univ. Fed. BA**, Salvador, v. 18, n. 1, p. 268-280, 1995/1996.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Manual de Métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis**. Washington, 1985. 46 p. (Nota Técnica, 30).
- CHAPMAN, A. J.; ADLER, B.; FAINE, S. Antigens recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo*. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 25, p. 269-278, 1988.

CHAPMAN, A. J.; ADLER, B.; FAINE, S. Immunoblot analysis of antibody responses of vaccinated or naturally infected humans to leptospiral antigens. **Aust. Microbiol.**, Sydney, v. 8, p. 161, 1987.

CHAPMAN, A. J.; FAINE, S.; ADLER, B. Antigens recognized by the human immune response to vaccination with bivalent Hardjo/Pomona leptospiral vaccine. **FED (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Immunol.**, Amsterdam, v. 64, p. 111-118, 1990.

CHAUDHARY, R. K.; FISH, N. A.; BARNUM, D. A. Protection of piglets from immunized sows via colostrums against experimental *L. pomona* infection. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v. 7, p. 121-127, 1966.

CHEN, T. Z. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. **Ann. Immunol. Hung.**, Budapest, v. 26, p. 125-151, 1986.

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

COLEMAN, T. J. The Public Health Laboratory Service (PHLS) and its role in the control of zoonotic disease. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 71-75, 2000.

CRAWFORD, R. P. Identificaton of the immunoglobulins in serums of guinea pigs infected with serogroup Pomona leptospiras. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 33, p. 2289-2298, 1972b.

CRAWFORD, R. P. Molecular characteristics of antibody detected by the microscopic agglutination test in serum of guinea pig with leptospirosis. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 33, p. 1507-1512, 1972a.

DEL FAVA, C.; VASCONCELLOS, S. A.; D'ANGELINO, J. L.; MORAIS, Z. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G.; OLIVEIRA, J. V.; REICHERT, R. H. Coeficientes reprodutivos e soropositividade para *Leptospira* spp. em um rebanho bovino de corte no Estado de São Paulo, Brasil. **ARS Vet.**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 52-61, 2004.

- 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 lipídio A como adjuvantes.**: 2004. 117 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS, W. A. Effect of vaccination against *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* on milk production and fertility in dairy cattle. **Vet. Rec.**, London, v. 138, n. 14, p. 334-335, 1996.
- DIAS, C. T. S. **Estatística básica através do SAS para windows.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1997. 133 p.
- DOBSON, K. J.; DAVOS, D. E. Leptospiral titers in pigs after vaccination. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v. 51, p. 443-444, 1975.
- ELLIS, W. A.; MONTCOMERI, J. M.; MCPARLAND, P. J. An experimental study with a *Lepstopira interrogans* serovar *bratislava* vaccine. **Vet. Rec.**, London, v. 125, p. 319-321, 1989.
- EYS, G. J. J. M.; GRAVENKAMP, C.; GERRITSEN, M. J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M. T. E.; SCHEGGET, J. T.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospires in urine by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 27, n. 10, p. 2258-2262, 1989.
- FAINE, S. **Leptospira and Leptospirosis.** Melbourne: CRC Press, 1994. 353 p.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis.** 2nd. ed. Melbourne: MedSci, 1999. 272 p.
- FAINE, S.; ADLER, B.; RUTA, G. A mechanism of immunity to leptospirosis. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, Adelaide, v. 52, p. 301-310, 1974.

- FAVERO, A. C. M. **Estudo retrospectivo dos exames sorológicos realizados pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no período de 1984 a 1997.** 2000. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- FAVERO, A. C. M.; MIYAKI, C. M.; MANGERONA, A. C. S.; ALESSI, L. J.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELOS, S. A. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra leptospirose. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 45-55, 1997.
- FENNESTAD, K.; BORG-PETERSEN, C. Antibody and plasma cells in bovine fetuses infected with *Leptospira saxkoebing*. **J. Infec. Dis.**, Chicago, v. 110, p. 63-69, 1962.
- FRANCIS, M. J.; OULDRIDGE, E. J.; BLACK, L. The antibody response in bovine pharyngeal fluid following foot-and-mouth disease vaccination and exposure to live virus. **Res. Vet. Sci.**, London, v. 35, p. 206-210, 1983.
- FRANÇOIS, S.; GUALTIERI, C.; CARAB, S.; CREIXELL, B. CAPELLETTI, G.; ANTHONY, L. Estudio serologico posterior a la vacunación contra leptospirosis en porcinos. **Vet. Arg.**, Buenos Aires, v. 12, n. 118, p. 530-533, 1995.
- GERRITSEN, M. J.; KOOPMANS, M. K.; DEKKER, T. C. E. M.; DE JONG, M. C. M. MOERMAN, A.; OLYHOEK, T. Effective treatment with dihydroestreptomycin of naturally infected cow shedding *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* subtype *Hardjobovis*. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 55, n. 3, p. 657-662, 1994.
- GILLESPIE, R. W. H.; KENZY, S. G. Immunization of cattle against leptospirosis. II. Further observations on duration of immunity induced by vaccination. **Vet. Med.**, Prague, v. 53, p. 611-617, 1958.
- GILLESPIE, R. W. H.; KENZY, S. G.: Immunization of cattle against leptospirosis. I. Comparative evaluation of *Leptospira pomona* bacterins. **Vet. Med.**, Prague, v. 53, p. 401-408, 1950.
- GIORGI, W. Leptospirose. In: **Zoonoses**. Campinas: CATI, 1995. p. 81-88. (Manual, 31).

- GIRIO, R. J. S.; HERREIRA, R. C. P.; PEREIRA, F. J. G.; MATHIAS, L. A. Pesquisa de infecção por *Leptospira interrogans* em animais da região de Nhecolândia, no Pantanal do Mato Grosso do Sul. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 65, suplemento, p. 87, 1998.
- 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.**, London, v. 14, p. 337-344, 1986.
- GRAVES, S.; FAINE, S. Antileptospiral agglutinins produced in rabbits. **Bull. W. H. O.**, Geneva, v. 43 p. 579-587, 1970.
- GUIMARÃES, M. A.; CORTÊS, J. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e seu controle terapêutico. **Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo**, São Paulo, v. 6, n. 7, p. 21-34, 1982/83.
- GUITIAN, J.; THURMOND, M. C.; HIETALA, S. K. Infertility and abortion among first-lactation dairy cows seropositive or seronegative for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Schaumburg, v. 215, n. 4, p. 515-518, 1999.
- HANSON, L. E. Immunologic problems in bovine leptospirosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 163, p. 919-921, 1973.
- HANSON, L. E. Immunology of bacterial diseases, with special reference to leptospirosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 170, n. 9, p. 991-994, 1997.
- HANSON, L. E.; TRIPATY, D. N.; KILLINGER, A. H. Current status of leptospirosis immunization in swine cattle. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Schaumburg, v. 161, p. 1235-1243, 1972.
- HEATH, K. R.; BOX, P. G. Immunity to leptospirosis: antibodies in vaccinated and infected dogs. **J. Comp. Pathol.**, London, v. 75, p. 125-136, 1975.
- HOAG, W. G.; BELL, W. B. An immunogenic agent for the protection of cattle against *Leptospira pomona*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 6, p. 381-385, 1955.
- HOCKER, N.D.; BAUER, D.C. The nature of antibodies synthesized during the immune response to *Leptospira biflexa*. **J. Immun.**, Washington, v. 95, p. 887-894, 1965.

- HODGES, R. T.; DAY, A. M. Bovine leptospirosis: the effects of vaccination on serological responses as determined by complement fixation or microscopic agglutination tests. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v. 35, p. 61-64, 1987.
- HUHN, R. G.; HANSON, L. E.; KILLINGER, A. H.; CARDELLA, M. A. Immunity to leptospirosis: *Leptospira interrogans* serotype Pomona bacterins in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 36, p. 59-65, 1975.
- INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R.; ITO, H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica). **J. Exp. Med.**, New York, v. 23, p. 377-402, 1916.
- ISOGAI, E.; ISIGAI, H.; FUJII, N.; OGUMA, K. Biological effects of leptospiral lipopolysaccharide to mouse, B, T and NK cells. **Jpn. J. Vet. Sci**, Tokyo, v. 52, n. 5, p. 923-930, 1990.
- JOST, B. H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pig against leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 22, p. 269-275, 1986.
- KENEMES, F. Cross-immunity studies on virulent strains of leptospires belonging to different serotypes. **Z. Immunitaetsforsch Exp. Ther.**, Stuttgart, v. 127, p. 209-229, 1964.
- KIESEL, G. K.; DACRES, W. G. A study of *Leptospira pomona* bacterin in cattle. **Cornell Vet.**, Cornell, v. 49, p. 332-343, 1959.
- KILLINGER, A. H.; HANSEN, L. E.; MANSFIELD, M. E. Vaccination of cattle with leptospiral bacterins. I. Serologic and cultural results of challenge. **Proc. US Anim. Hlth.**, Washington, v. A, n. 74, p. 165-177, 1970.
- KILLINGER, A. H.; TAYLOR, P. L.; HUHN, R. G.; HANSEN, L. E.; MANSFIELD, M. E. Immunity to leptospirosis: renal changes in vaccinated cattle given challenge inoculum. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 37, p. 93-94, 1976.
- KINGSCOTE, B. F.; PROULX, J. The successful management of *Leptospira hardjo* infection in a beef herd in Northern Ontario. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v. 27, p. 435-439, 1986.
- KOLBL, S.; TSCHABRUN, S.; SCHULLER, W.; MULLER, M. Investigations on the humoral immune response in puppies after first immunization with different

combined vaccines. IV. Leptospirosis. **Kleintier Praxis**, Schaper, v. 40, p. 929-933, 1995.

KONRAD, P. A.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; RODRIGUES, R. O.; DIAS, J. C.; PAZ, S. F.; LEITE, R. Identificação sorológica de agentes infecciosos que afetam a reprodução em bovinos de leite no Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29, 2002, Gramado – RS. **Anais...** Gramado: Sovergs, 2002. 1 CD-ROM.

LANGONI, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Rev. Educ. Cont. CRMV-SP**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 52-58, 1999.

LILEBAUM, W.; SANTOS, M. R. C.; BABOSA, A. V. Leptospirose em reprodução animal: II Bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1995.

LITTLE, T. W. A.; HATHAWAY, S. C.; BOUGHTON, E. S.; SEAWRIGHT, D. Development of a control strategy for *Leptospira hardjo* infection in a closed beef herd. **Vet. Rec.**, London, v. 131, n. 17, p. 383-386, 1992.

LUBASHENKO, S. Y. Vaccine and serum prophylaxis and serum therapy in leptospirosis of animals. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Shaumburg, v. 26, n. 116, p. 62, 1950.

MACHINTOSH, G. G.; MARSHALL, R. B.; BROUGHTON, E. S. The use of a Hardjo-Pomona vaccine to prevent leptospiruria in cattle exposed to a natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v. 28, p. 174-177, 1980.

MARSHALL, R. A. Nationwide experiment to control human leptospirosis by vaccinating dairy cattle. **Isr. J. Vet. Med.**, Tel Aviv, v. 43, p. 271-276, 1987.

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

MASCARO, U. C. P.; SANTOS, E. Controle de roedores (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*) em armazém rural pelo Warfarin 0,025% (4-hidroxi-3(3-Ox 0-1-phenylbutyl) coumarin). **Ars Vet.**, Jaboticabal, v. 6, n. 1, p. 81-87, 1990.

MC CULLOGH, K. C.; SIMONE, F.; BROCCHI, E.; CAPUCCI, L.; CROWTHER, J. R.; KIHLM, U. Protective immune response against foot-and-mouth disease. **J. Virol.**, Washington, v. 66, p. 1835-1840, 1992.

MCDONALD, N. R.; RUDGE, J. M. Prevention of leptospirosis in young calves by vaccinating their dams in cattle pregnancy. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v. 5, p. 83-92, 1957.

MCGRATH, H. C.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. Phagocytosis of virulent and avirulent leptospires by guinea-pig and human polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. **Pathology**, Chichester, v. 16, p. 243-249, 1984.

MOREIRA, E. C.; SILVA, J. S.; VIANA, F. C.; SANTOS, W. L. M.; ANSELMO, F. P.; LEITE, R. C. Leptospirose bovina I. Aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 375-388, 1979.

MOREIRA, E.C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospirose em bovinos leiteiros**. 1994. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

MORRIS, J. A.; HUSSEINI, S. M. Characterization of the antibodies detected by the microscopic agglutination test for bovine leptospirosis. **J. Hyg.**, Cambridge, v. 73 p. 425-432, 1974.

MORSI, H. M.; SHIBLEY, G. P.; STROTHER, H. L. Renal leptospirosis: challenge exposure of vaccinated and nonvaccinated cattle to *Leptospira Icterohaemorrhagiae* and *Leptospira canicola*. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 34, p. 175-179, 1973.

NARDI JUNIOR, G.; GENOVEZ, M. E.; RIBEIRO, M. G.; JORGE, A. M.; CASTRO, V.; CARREIRA, R. C. Níveis de aglutininas anti-leptospira no soro de búfalas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com dois tipos de vacinas comerciais anti-leptospirose: resultados parciais. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 70, supl. 3, p. 1-4, 2003.

NEGRI, S. K.; MYERS, W. L.; SEGRE, D. Antibody response of cattle to *Leptospira pomona*. I. Development of a hemagglutination test to measure IgG and IgM classes of antibodies. **Am. J. Vet. Med. Res.**, Schaumburg, v. 32, p. 1907-1913, 1971a.

- NEGRI, S. K.; MYERS, W. L.; SEGRE, D. Antibody response of cattle to *Leptospira pomona*. II. Response as measured by hemagglutination microscopic agglutination and hamster protection. **Am. J. Vet. Med. Res.**, Schaumburg, v. 32, p. 1915-1920, 1971b.
- NOLAN, P. D. M. A. Titres following one and two infections with *Leptospira hardjo* vaccines in heifers in Ireland. **Ir. Vet. News**, Dublin, v. 12, p. 15-17, 1990.
- O'KEEFE, V.S. A brief review on the laboratory diagnosis of leptospirosis. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v. 5, n. 1, p. 9-13, 2002.
- OIE. Leptospirosis. In: **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines**. Paris: Office International Epizooties, 1996. p 198-206.
- OLITZKI, L.; STUEZYNSKI, L. A.; HALEVI, C.; BERNHKOPF, H. Immunologic studies on bovine leptospirosis. **J. Infec. Dis.**, Chicago, v. 84, p. 15-20, 1953.
- OLIVEIRA, J. C. F. **Isolamento de *Leptospira santarosai* sorovar guaicuris em búfalos (*Bubalus bubalis*) do vale do Ribeira / SP.: efeito de dois esquemas de controle da leptospirose sobre o desempenho reprodutivo das búfalas**. 2000. 63 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- PALECHEK, N. T. *Leptospira* abortion in cattle [in British Columbia]. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v. 28, n. 3, p. 108, 1987.
- PALIT, A.; ALEXANDER, A. M.; SLACEK, B.; TAYLOR, C. The efficacy of a *Leptospira interrogans* serovars *pomona* and *copenhageni* and *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* vaccine in cattle. **N. Z. Vet. J.**, Wellington, v. 44, n. 2, p. 64-66, 1996.
- PANDEY, R. **Microbiologia veterinária: perspectivas clínicas e moleculares**. São Paulo: Roca, 1994. p. 170-193.
- PEARSON, J. K. L.; MACKIE, D. P.; ELLIS, W. A. Milk drop syndrome resulting from *Leptospira hardjo*. **Vet. Rec.**, London, v. 107, n. 2, p. 135-136, 1980.
- PHILLIPS, C. E. Leptospiral vaccine evaluation. **Vet. Med.**, Prague, v. 53, p. 301-307, 1958.

- PIKE, R. M. Antibody heterogeneity and serologic reactions. **Bacteriol. Rev.**, Washington, v. 31, p. 157-174, 1967.
- PIKE, R. M.; MCBRAYER, H. L.; SCHULZE, M. L.; CHANDLER, C. H. Chromatographic analysis and sulfhydryl sensitivity of anti-*Leptospira* agglutinins in rabbit and human sera. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Baltimore, v. 120, p. 787-789, 1965.
- PINTO, C. M. **Utilização do papel de filtro para o transporte de amostras destinadas à reação de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona.** 1997. 39 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes Infect.**, Paris, v. 2, p. 1265-1276, 2000.
- PLASSE, D.; FOSSI, H.; HOOGESTEIJN, R. Mortality in Venezuelan beef cattle. **World Anim. Rev.**, Rome, n. 90, p. 28-38, 1998.
- PLESKO, I.; HLAVATA, Z. Cross immunity studies with lipase negative strains of leptospirae. **Biolegia (Bratislava)**, Slovakia, v. 26, p. 689-693, 1971.
- PLESKO, I.; LATAS-TE-DOROLLE, C. Intertype immunity relations of leptospira strains belonging to the “Australis” serogroup. **Biolegia (Bratislava)**, Slovakia, v. 25, p. 403-411, 1970.
- QUINLAN, J. F.; MCNICKOLL, V. J. Agalactia and infertility due to *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* infection in a vaccinated dairy herd. **Ir. Vet. J.**, Dublin, v. 46, n. 3, p. 97-98, 1993.
- RAO, A. S.; KESHAVAMURTHY, B. S. Study of the immune response of buffalo calves to heat-killed pentavalent leptospiral vaccine. **Indian Vet. J.**, Madras, v. 62, p. 357-361, 1985.
- RIBEIRO, S. C. A.; SILVA, P. C.; BARBOSA, F. C.; GOUVEIA, M. A. V.; OLIVEIRA, P. R.; MAMEDE, D. O. Levantamento sorológico em dois surtos de leptospirose bovina, em Uberlândia, Triângulo Mineiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 40, n. 6, p. 415-423, 1983.

- RODRIGUES, C. F. M. Mortalidade embrionária/fetal em programas de TE (MOET). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 64-68, 2003.
- RWEYEMAMU, M. M.; PAY, T. W. F.; PARKER, M. J. Serological differentiation of foot-and-mouth disease virus strains in relation to selection of suitable vaccine virus. **Dev. Biol. Stand.**, Basel, v. 35, p. 205-214, 1977.
- SAMINA, I.; BRENNER, J.; MOALEM, U.; BERENSTEIN, M.; COHEN, A.; PELEG, B. A. Enhanced antibody response in cattle against *Leptospira hardjo* by intradermal vaccination. **Vaccine**, London, v. 15, n. 12-13, p. 1434-1436, 1997.
- SAMPAIO, D. G.; BADKE, M. R. T.; GONÇALVES, A. P.; SALDANHA, G. B.; SILVA, M. M. C. Frequência de leptospirose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29, 2002, Gramado – RS. **Anais...** Gramado: Sovergs, 2002. 1 CD-ROM.
- SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 97-109, 1970.
- SANTA ROSA, C. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; SILVA, A. S.; TERUYA, J. M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 29/30, p. 19-27, 1969/70.
- SCHLOTZAUER, S. D.; LITTELL, R. C. **SAS system for elementary statistical analysis**. 2 nd. ed. Cary: SAS Institute, 1997. 438 p.
- SEMSKOV, M. V. To the materials on etiology of infectious yellow fever of cattle. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Oxford, v. 7, p. 71-95, 1940.
- SHIBLEY, G. P.; MOISI, H. M.; STROTHER, H. L.; CLARK, M. Renal leptospirosis: exposure of vaccinated and nonvaccinated swine to *Leptospira canicola*. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 34, p. 1171-1173, 1973.
- SHOTTS, E. B. **Laboratory diagnosis of leptospirosis**. In: Johnson, Biology of the parasitic spirochetes. New York: Academic Press, p.209-223, 1976.
- SIDDIQUE, I. H.; SHAH, S. M. Evaluation of polyvalent leptospiral vaccine in hamsters. **Indian Vet. J.**, Madras, v. 67, p. 1006-1010, 1990.
- SMITH, B.P. **Large animal internal medicine**. St. Louis: Mosby, 1996. 2040 p.

SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; ROVÖEN-CLOUET, N.; GANIÈRE, J. P., ANDRÉ-FONTAINE, G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, London v. 71, p. 86-94, 2001.

STAVITSKY, A. B. Characteristics of pathogenic spirochetes, with special reference to the mechanism of host resistance. **Bacteriol. Rev.**, Washington, v. 12, p. 203-255, 1948.

STAVITSKY, A. B. Studies on the mechanism of host resistance in experimental leptospirosis icterohaemorrhagica. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 51, p. 397-419, 1945.

STOENNER, H. G. Application of serologic findings to the diagnosis of leptospirosis. In: ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 1972, Washington, **Proceedings...** v.76, p.622-634.

STRINGFELLOW, D. A.; BROWN, R. R.; HANSEN, L. E.; SCHUNURRENBURG, P. R.; JOHNSON, J. Can antibody response in cattle vaccinated with a multivalent leptospiral bacterin interfere with serologic diagnosis of disease? **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Schaumburg, v. 182. p. 165-167, 1983.

SULLIVAN, N. D. Leptospirosis in animals and man. **Austr. Vet. J.**, Brunswick, v. 50, n. 5, p. 216-223, 1974.

SULZER, C. R.; JONES, W. L. **Leptospirosis**: method in laboratory diagnosis. Atlanta: Center for Diseases Control, U.S., Dept. Health Education and Welfare, 1980. 40 p.

SZYFRES, B. Leptospirosis as an animal and public health problem in Latin America and the Caribbean Area. **Pan. Am. Health Org. Bull.**, Washington, v. 10, p. 110-125, 1976.

TABATA, R. **Proteção cruzada entre bacterinas antileptospirose produzidas com três representantes do sorogrupo Sejroe. Ensaio experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*)**. 2002, 70 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2002.

TERSKICK, V. Etiology of infectious yellow fever of cattle. **Mikrobiol. Immunol.**, Belgrade, v. 20, p. 66-69, 1940a.

TERSKICK, V. To the etiology of infectious yellow fever of cattle. **Sovetskaya Vet.**, Irkutsk, v. 6, p. 21-22, 1940b.

THEVENON, J.; MORLET, B.; COSTA, R.; LAMBERT, C. Kinetics of leptospirosis and antibody rates. A study conducted on cattle at the Port Laguerre Livestock Research Centre. **Rev. Elev. Med. Vet. Nouv.**, Caledone, n. 10, p. 7-12, 1987.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Schaumburg, v. 184, n. 6, p. 722-725, 1984.

THORNTON, R. Bovine abortion diagnosis in 1995. **Survey**, Wellington, v. 23, n. 4, p. 21-22, 1993.

THURMOND; M. C.; PICASO, J. P.; HIETALA, S. K. Prospective serology and analisys in diagnosis of Dairy Cow Abortion. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Washington, v. 2, n. 4, p. 274-282, 1990.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 5 ed. São Paulo: Roca, 1998. cap. 21, p. 273-293.

TRIFUNOVIC, Z.; MARKOVIC, R.; PUSIC, R. Results of investigations on the immunogenicity of a commercial and experimental vaccine against leptospirosis in cattle. **Vet. Glas.**, Belgrade, v. 43, p. 896-874, 1989.

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

UHLENHUTH, P.; FROMME, W. Untersuchungen über die Aetiologie, Immunität und spezifische Behandlung der Weilschen Krankheit (Icterus infectious). **Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie**. I. Originale. v. 25, p. 317-483, 1916.

VAN BEKKUM, J. G. The influence of foot-and-mouth disease vaccination of the mother on the level of neutralizing antibody in her young. **Bull. Off. Int. Epizzot.**, Paris, n. 65, p. 439-442, 1966.

VASCONCELLOS, S.A. Leptospirose animal. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 3., 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** p. 62-66.

- VASCONCELOS, S. A.; BARBARINI JUNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; PINEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A. C. M.; FERREIRA NETO, J. S. 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. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 7-15, 1997.
- VENKATARAMAN, K. S.; NEDUNCHELLIYAN, S.; RAMADASS, P.; RAMKRISHNA, J. Immune response in dogs with experimental leptospirosis. **Indian J. Comp. Microbiol. Imm. Inf. Dis.**, New Delhi, v. 15, n. 1-2, p. 21-25, 1994.
- VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: *in vitro* and *in vivo* studies. **Pathology**, Chinchester, v. 14, p. 463-468, 1982.
- WUNDER JR, E. A.; COBELLINI, L. G.; FRAUTZ, F.; PESCADOR, C. A.; CORREA, A.; DRIEMEIER, D.; PIRES NETO, J. A.; MOREIRA, K. A. Leptospirose bovina: lesões macroscópicas, histopatologia, imunofluorescência, sorologia e isolamento em um feto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29, 2002, Gramado – RS. **Anais...** Gramado: Sovergs, 2002. 1 CD-ROM.
- YORK, C. J.; BACKER, J. A. A vaccination for bovine leptospirosis. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 14, p. 5-8, 1953.

ANEXO 1. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 2. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal															
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 3. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 4. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaborticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																			
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

0 não reagentes para a diluição 1/100
 100 Reação positiva à diluição 1/100
 200 Reação positiva à diluição 1/200
 400 Reação positiva à diluição 1/400
 800 Reação positiva à diluição 1/800
 1600 Reação positiva à diluição 1/1600
 3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 5. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100
 100 Reação positiva à diluição 1/100
 200 Reação positiva à diluição 1/200
 400 Reação positiva à diluição 1/400
 800 Reação positiva à diluição 1/800
 1600 Reação positiva à diluição 1/1600
 3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 6. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento A (grupo de controle) e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 7. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 8. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippothyphosa de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 9. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
1	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	100	100
2	0	0	200	0	100	400	800	400	200	200	100	200	400	400	400
3	0	0	400	100	100	100	400	200	100	0	0	100	200	200	400
4	0	0	0	100	100	200	400	100	100	100	0	100	200	400	400
5	0	0	400	100	0	400	0	0	0	0	0	100	100	200	400
6	0	0	0	0	100	400	400	0	100	200	400	100	0	200	400
7	0	0	100	100	200	100	400	100	100	100	100	100	100	100	100
8	0	0	0	0	0	400	400	0	100	200	400	400	400	400	400
9	0	0	100	400	200	100	100	100	100	0	0	200	400	400	400
10	0	0	800	100	100	400	400	100	100	100	100	200	400	400	400
11	0	0	0	0	100	400	100	0	100	100	100	100	100	200	400
12	0	0	400	400	100	400	400	400	200	100	0	0	100	200	400
13	0	0	0	0	0	100	400	100	100	0	0	100	200	100	100
14	0	0	400	400	100	100	0	100	100	0	0	0	100	100	100
15	0	0	0	100	100	400	100	100	100	100	100	100	100	200	400
16	0	0	0	100	100	400	400	100	100	0	0	200	400	200	100
17	0	0	400	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0
18	0	0	400	0	100	400	100	100	100	0	0	0	0	100	100
19	0	0	0	0	0	200	200	400	200	200	100	100	100	0	0
20	0	0	400	0	100	100	400	200	200	400	400	400	400	400	400

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 10. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	100	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	100	100	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	100	100	0

0 não reagentes para a diluição 1/100
100 Reação positiva à diluição 1/100
200 Reação positiva à diluição 1/200
400 Reação positiva à diluição 1/400
800 Reação positiva à diluição 1/800
1600 Reação positiva à diluição 1/1600
3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 11. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	400	400	400	400	200	100	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	100	100	200	400	400	400	400	400	200	100	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	200	400	800	400	200	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	0	100	100	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	200	400	800	800	400	400	400	200	200	100	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	0	100	200	100	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	200	400	400	400	400	200	100	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	400	400	400	400	200	100	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 12. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento B e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
1	0	0	0	100	400	100	400	0	100	200	400	400	400	400	400
2	0	0	200	100	200	800	1600	400	400	400	400	200	100	800	3200
3	0	0	200	100	0	400	400	400	400	400	400	200	100	200	400
4	0	0	0	100	100	200	100	100	200	400	400	400	400	400	400
5	0	0	400	100	100	200	100	200	200	400	400	200	100	200	400
6	0	0	200	100	400	400	400	100	200	400	400	200	100	200	400
7	0	0	0	0	200	100	200	0	100	200	400	200	0	0	0
8	0	0	0	0	0	100	400	100	200	400	400	200	200	200	400
9	0	0	100	400	400	100	100	100	200	200	400	200	100	100	200
10	0	0	200	100	0	200	400	100	100	200	400	200	200	200	100
11	0	0	0	0	200	800	0	200	200	400	400	200	100	200	200
12	0	0	400	100	100	400	400	100	100	100	100	100	0	200	400
13	0	0	0	100	200	100	200	100	200	400	400	400	400	200	100
14	0	0	0	400	100	100	100	100	100	0	0	0	0	100	100
15	0	0	0	100	0	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
16	0	0	0	100	0	100	200	400	200	100	0	100	100	100	100
17	0	0	200	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	100
18	0	0	200	100	400	100	200	100	100	0	0	0	0	100	100
19	0	0	100	100	0	100	100	200	100	0	0	0	0	100	100
20	0	0	200	0	400	400	400	400	400	400	400	400	200	800	3200

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 13. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 14. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 15. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	200	0	0	200	100	400	400	400	400	200	100	200	400	200	100	0	0
2	0	0	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	100	400	0	400	200	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
4	0	0	200	0	0	200	0	200	200	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	100	100	200	100	0	0	100	100	100	0	100	100	0	0	0	0
6	0	0	400	0	100	400	400	200	200	400	400	200	100	200	400	100	100	0	0
7	0	0	0	100	0	400	400	400	200	100	0	200	400	200	100	100	0	0	0
8	0	0	0	0	0	100	200	200	200	100	0	0	0	100	100	0	0	0	0
9	0	0	0	0	200	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	200	100	0	0	0	0	0	0	0	100	200	100	100	0	0
11	0	0	200	100	200	400	0	100	100	200	200	200	400	400	400	200	200	100	0
12	0	0	200	100	100	400	200	100	100	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
13	0	0	0	100	100	400	400	200	200	400	400	200	200	200	400	200	100	0	0
14	0	0	100	200	100	100	200	400	200	100	0	100	100	200	400	200	200	0	0
15	0	0	400	100	0	100	100	200	100	100	0	0	0	100	100	100	0	0	0
16	0	0	200	0	100	100	200	100	100	0	0	100	200	200	400	200	100	0	0
17	0	0	200	0	0	100	400	400	200	100	0	0	0	100	200	100	100	0	0
18	0	0	200	400	200	400	0	200	100	100	100	100	100	200	400	200	100	0	0
19	0	0	200	0	0	200	400	100	100	200	400	400	400	400	400	200	200	100	0
20	0	0	0	100	100	100	200	200	200	100	100	100	100	200	400	200	200	100	0

0 não reagentes para a diluição 1/100
 100 Reação positiva à diluição 1/100
 200 Reação positiva à diluição 1/200
 400 Reação positiva à diluição 1/400
 800 Reação positiva à diluição 1/800
 1600 Reação positiva à diluição 1/1600
 3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 16. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 17. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	400	200	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	400	200	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	200	400	200	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 18. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento C e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
1	0	0	0	100	0	400	400	400	400	400	400	200	100	200	400
2	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	100	200	0	200	100	100	100	100	0	0	0
4	0	0	200	100	100	200	100	0	0	0	0	0	0	100	100
5	0	0	0	100	200	100	100	100	100	0	0	0	0	0	100
6	0	0	200	100	100	400	400	400	400	400	400	200	100	200	400
7	0	0	0	100	100	400	100	200	200	100	0	200	400	200	100
8	0	0	0	100	0	200	200	100	100	0	0	0	0	0	100
9	0	0	0	0	400	0	400	0	0	0	0	200	400	200	100
10	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	200	400
11	0	0	0	200	100	400	400	100	100	200	400	200	100	200	400
12	0	0	0	100	400	400	0	0	0	100	100	0	0	100	100
13	0	0	0	100	0	400	100	400	400	400	400	400	400	400	400
14	0	0	400	100	0	100	400	100	200	100	0	200	400	400	200
15	0	0	200	100	100	100	100	200	100	100	100	0	0	200	400
16	0	0	0	100	0	800	400	400	400	400	400	1600	3200	3200	3200
17	0	0	200	0	100	400	1600	100	100	0	0	0	0	200	400
18	0	0	200	400	400	400	100	100	100	0	0	200	400	200	100
19	0	0	0	100	200	400	200	400	400	400	400	400	400	400	400
20	0	0	0	100	0	100	100	100	200	400	400	400	400	200	200

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 19. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 20. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	200	400	200	100	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	200	400	200	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	200	400	200	100	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	400	400	400	200	100	0
9	0	0	0	0	0	0	0	200	100	0	0	100	200	200	400	200	100	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	200	400	400	400	200	100	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 21. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaborticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	800	0	0	100	400	100	200	100	0	100	200	400	400	200	100	0	0
2	0	0	200	200	200	200	400	100	100	0	0	0	100	100	200	100	0	0	0
3	0	0	0	0	100	100	400	100	100	200	200	400	400	200	100	0	0	0	0
4	0	0	0	400	100	400	100	100	100	100	100	200	400	400	400	200	200	100	0
5	0	0	200	200	100	400	400	400	400	200	100	200	400	400	400	200	100	100	100
6	0	0	400	100	0	400	200	200	200	100	0	200	400	200	100	100	0	0	0
7	0	0	200	200	0	400	400	100	100	0	0	0	0	100	200	100	100	0	0
8	0	0	200	100	100	100	400	400	200	100	0	200	400	800	3200	400	200	100	0
9	0	0	0	200	100	100	100	400	200	200	100	0	0	100	100	100	0	0	0
10	0	0	0	0	400	400	0	400	200	100	0	200	400	400	400	400	200	100	0
11	0	0	0	0	0	100	400	100	100	0	0	0	100	200	400	200	100	100	0
12	0	0	0	0	0	100	0	100	100	200	400	200	100	400	800	400	400	200	0
13	0	0	0	100	100	100	100	100	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0
14	0	0	200	0	100	100	400	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	200	100	400	400	0	100	100	100	100	100	100	200	100	0	0	0
16	0	0	200	100	100	400	400	400	200	100	0	200	400	200	100	0	0	0	0
17	0	0	200	100	0	200	200	200	200	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
18	0	0	0	0	400	100	200	400	200	200	100	200	400	400	400	200	100	100	0
19	0	0	200	100	100	400	200	100	100	100	100	100	0	200	400	200	200	100	0
20	0	0	0	400	100	100	400	400	400	200	200	200	400	400	800	400	200	200	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 22. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)															
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
1	0	0	0	0	0	0	0	100	100	200	400	400	400	200	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
5	0	0	0	0	100	0	0	400	400	400	400	200	100	100	100	100
6	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	100	100	200	400	200	100	100	100	100
8	0	0	0	0	0	0	0	0	200	400	800	400	400	200	200	100
9	0	0	0	0	0	0	0	100	200	200	400	400	400	200	100	100
10	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	400	200	200	200	100	100
11	0	0	0	0	0	0	0	100	100	200	200	100	100	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	200	200	400	400	200	100	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	100	100	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	200	200	200	100	100	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	200	200	100	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 23. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	200	200	100	100	200	400	400	400	200	100	100	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	200	400	200	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	400	200	100	100	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
5	0	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100	200	20	400	200	100	100	0
6	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	200	100	0	0	100	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	100	200	400	200	100	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	400	400	400	400	400	400	200	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	400	400	400	400	200	100	0	0
10	0	0	0	0	0	0	100	400	200	100	100	200	400	800	1600	800	400	200	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	200	200	100	100	100	0	200	400	200	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	400	200	100	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	200	100	0	0	0	100	200	200	200	100	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 24. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento D e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	200	100	400	400	100	100	0	0	0	100	200	400	200	100	100	0
2	0	0	100	200	100	100	100	400	200	100	0	100	200	100	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	200	200	100	100	100	100	100	200	400	200	100	100	0	0	0
4	0	0	0	200	0	100	0	100	100	200	200	400	400	200	200	100	100	0	0
5	0	0	0	200	100	400	200	400	400	400	400	400	400	400	400	200	200	100	0
6	0	0	100	200	0	100	200	0	0	100	100	200	200	100	100	0	0	0	0
7	0	0	400	100	100	400	400	400	200	100	0	0	0	100	200	100	0	0	0
8	0	0	0	400	0	400	400	100	100	200	400	400	800	1600	3200	800	400	200	0
9	0	0	0	100	100	200	200	100	100	200	200	100	0	100	100	100	0	0	0
10	0	0	0	200	0	100	400	200	200	400	400	400	400	400	400	200	200	100	0
11	0	0	0	200	0	400	400	100	100	200	400	200	100	200	400	200	100	0	0
12	0	0	0	0	0	400	400	400	400	400	400	400	400	1600	3200	800	400	400	0
13	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
14	0	0	0	100	400	200	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	100	100	400	100	100	200	200	400	400	400	400	400	400	200	100	0
16	0	0	200	100	100	400	400	200	100	100	0	100	100	200	400	200	200	100	0
17	0	0	0	400	100	100	0	100	100	100	100	100	200	200	100	100	100	0	0
18	0	0	0	100	100	400	800	400	400	400	400	400	200	400	400	200	100	0	0
19	0	0	0	0	200	100	0	100	100	100	100	100	100	200	400	200	100	0	0
20	0	0	0	400	100	200	400	100	100	200	400	400	400	1600	3200	1600	800	400	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 25. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Canicola de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 26. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Grippotyphosa de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																		
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	400	200	100	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	100	0	200	400	200	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	100	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	400	400	400	200	100	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	200	400	200	100	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	400	400	200	100	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 27. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Hardjo de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título		Tempo (dias)																	
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180
1	0	0	0	0	200	100	100	0	0	100	100	200	400	200	100	0	0	0	0
2	0	0	100	400	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
3	0	0	200	100	0	400	400	100	100	0	0	0	0	100	200	100	100	0	0
4	0	0	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	100	100	100	200	200	100	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	200	100	100	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0
7	0	0	0	100	200	400	400	100	200	200	400	200	200	400	800	400	100	0	0
8	0	0	200	100	0	200	400	400	100	100	0	100	100	200	400	200	100	0	0
9	0	0	0	100	100	400	100	400	200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	200	0	100	200	400	100	200	200	400	200	100	200	400	200	200	100	0
11	0	0	0	100	200	400	100	200	200	100	100	100	100	200	400	100	100	100	0
12	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	200	100	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	400	0	100	0	0	200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	100	400	400	400	400	400	200	200	400	400	800	3200	800	400	200	0
16	0	0	0	200	100	400	400	400	200	100	0	100	100	200	800	400	100	100	0
17	0	0	100	400	200	100	100	100	100	0	0	100	200	100	100	100	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	200	0	200	400	400	200	100	100	0	200	400	400	400	200	100	100	0
20	0	0	1600	100	0	400	0	100	100	0	0	100	100	200	400	200	100	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100
 100 Reação positiva à diluição 1/100
 200 Reação positiva à diluição 1/200
 400 Reação positiva à diluição 1/400
 800 Reação positiva à diluição 1/800
 1600 Reação positiva à diluição 1/1600
 3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 28. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
1	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	100	100	0
3	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	200	100	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	200	100	100	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 29. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Pomona de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	200	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	200	400	400	200
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	400	200	0
8	0	0	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	200	100	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	100	200	400	400	400	200	100
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	200	100	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	200	400	200	100
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200

ANEXO 30. Resultados dos títulos obtidos contra o sorovar Wolffi de acordo com o tratamento E e o tempo de colheita da amostra. Jaboticabal, 2003.

Título	Tempo (dias)																			
Animal	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	120	150	180	
1	0	0	0	200	0	200	100	0	0	100	100	100	200	200	100	100	100	0	0	0
2	0	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0
3	0	0	0	200	0	400	200	100	100	200	400	200	100	200	400	200	200	100	0	0
4	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0	0	0
5	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0
6	0	0	0	0	400	200	200	200	200	200	200	100	100	100	100	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	400	400	400	400	800	1600	800	400	800	1600	400	200	200	0	0
8	0	0	0	100	200	400	400	400	400	200	100	200	400	800	1600	800	400	200	0	0
9	0	0	0	200	100	100	400	100	100	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0
10	0	0	0	0	100	400	400	400	400	400	400	200	100	200	400	200	100	0	0	0
11	0	0	0	200	0	100	100	400	400	400	400	400	400	400	400	400	200	100	0	0
12	0	0	100	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0
13	0	0	0	0	100	100	100	400	200	100	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0
14	0	0	200	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	100	400	1600	400	400	400	400	800	400	400	1600	3200	800	400	200	0	0
16	0	0	0	400	100	100	1600	100	200	200	400	400	400	400	400	200	100	0	0	0
17	0	0	200	400	100	200	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	100	0	100	100	100	100	200	400	400	400	200	200	100	100	0	0	0
20	0	0	400	400	0	400	100	200	200	100	100	100	100	200	200	100	0	0	0	0

0 não reagentes para a diluição 1/100

100 Reação positiva à diluição 1/100

200 Reação positiva à diluição 1/200

400 Reação positiva à diluição 1/400

800 Reação positiva à diluição 1/800

1600 Reação positiva à diluição 1/1600

3200 Reação positiva à diluição 1/3200