

## Anticorpos contra *leptospira* spp em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial. Perfil sorológico frente a dois esquemas de vacinação

Antibodies against *leptospira* spp in dairy cattle vaccinated with a commercial pentavalent bacterin. Serological profile using two schemes of vaccination.

Gabriela de Godoy Cravo Arduino<sup>1</sup> Raul José Silva Girio<sup>2</sup>  
Melissa Muniz Freire<sup>3</sup> Moacir Marchiori Filho<sup>4</sup>

### RESUMO

Mediante a utilização da prova de soroaglutinação microscópica (SAM), foi pesquisada a indução de anticorpos contra leptospira em bovinos vacinados com uma bacterina polivalente comercial. Procurou-se avaliar a resposta sorológica homóloga frente a dois esquemas de vacinação. Os animais utilizados foram fêmeas adultas em produção leiteira oriundas de seis propriedades da região noroeste do Estado de São Paulo. Vinte animais de cada propriedade foram escolhidos após três exames sorológicos com 24 sorovares de leptospirosas com intervalo de 20 dias, através de triagem sorológica com 24 antígenos de leptospirosas. Os grupos foram constituídos de animais não reagentes (I, II e III) e animais reagentes (IV, V e VI). Posteriormente os animais foram subdivididos em grupos controle (I e IV), os que receberam somente uma dose de vacina (II e V) e que receberam duas doses de vacina com e dose de reforço após 30 dias (III e VI). Os animais foram monitorados por meio da SAM nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 após a primeira aplicação da vacina. Os resultados obtidos revelaram que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os animais vacinados e não vacinados. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nas respostas de títulos vacinais com relação ao perfil sorológico apresentados pelos animais. A vacinação com reforço apresentou melhor desempenho e a indução produção de aglutininas somente ocorreu contra os sorovares hardjo, wolffii, icterohaemorrhagiae e pomona. Há a necessidade de maiores estudos sobre o poder imunogênico da vacina utilizada no experimento.

**Palavras-chave:** leptospirose, bovinos, vacinação.

### ABSTRACT

Using the microscopic agglutination test (MAT), the induction of antibodies against *Leptospira* sp. p was conducted in vaccinated cattle with a commercial polyvalent vaccine. The homologous serological response was determined by MAT using two vaccinations schemes. The animals used were adult milking cows from six properties in the Northwest Region of the São Paulo State, Brazil. From each herd 20 animals were used, selected after three consecutive tests with 20-day intervals, based on a serological screening with 24 antigens serovars of *Leptospira* spp. The experimental groups were constituted by non-reagent animals (groups I, II and III), and reagent animals (groups IV, V and VI). Later the animals were subdivided into control groups (I and IV), groups that received one dosis of vaccine (II and IV) and groups that received one dosis with booster 30 day after the first injection (III and VI). The MAT test was conducted evaluating the animals at the days 0, 15, 30, 45 and 60 from the first injection of the vaccine. The results have shown no significant titre difference ( $p > 0.05$ ) between vaccinated and non-vaccinated animals. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) in the responses of vaccine titres related to the serological profile of the animals. The vaccination with booster presented the best response inducing the production of agglutinins only for the hardjo, wolffii, icterohaemorrhagiae and pomona serovars. Additional trials and validation of immunogenic power of the vaccine used in this research is necessary.

**Key words:** leptospirosis, bovine, vaccination.

<sup>1</sup>Médico Veterinário, MSc, Pós-graduando do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Jaboticabal. E-mail: cocaarduino@asbyte.com.br

<sup>2</sup>Professor Assistente, Doutor, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp, 14870-000, Jaboticabal, SP.

<sup>3</sup>Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, FCAV, Unesp, Campus de Jaboticabal.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, MSc, Pós-graduando do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal.

## INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma enfermidade amplamente difundida em nosso país, acarretando elevados prejuízos econômicos para a pecuária nacional (PANDEY, 1994). Seu diagnóstico clínico é difícil, por não apresentar sinais patognômicos, exigindo usualmente a confirmação laboratorial (PINTO, 1997).

Nos bovinos, as perdas econômicas produzidas pela leptospirose estão direta ou indiretamente relacionadas ao aborto, queda na produção de leite, falhas reprodutivas e custos relacionados à assistência veterinária, medicamentos, vacinas e testes laboratoriais para o diagnóstico (BLOOD & RADOSTITS, 1989; QUINLAN & McNICKOLL 1993; FAINE, 1994, FAINE et al., 1999).

O controle da leptospirose, nos animais domésticos depende de um correto diagnóstico, tratamento apropriado e da implantação de medidas de manejo juntamente com o controle de roedores sinantrópicos (KINGSCOTE & PROULX, 1986; HODGES & DAY, 1987; LEONARD et al., 1994; BOLIN & ALT, 1999).

As leptospirosas possuem grande número de variantes sorológicas, as quais não apresentam especificidade de hospedeiro (QUINN et al., 1994; FAINE, 1994; SMITH, 1996), sendo que FAVERO (2000) identificou as variantes sorológicas hardjo e wolffi como as mais frequentes em bovinos e bubalinos no Brasil; SZYFRES (1976) também relatou a ocorrência dos sorovares pomona, wolffi, hardjo, canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, tarassovi, bratislava, australis, ballum e serjoe. conforme relatou SZYFRES (1976).

Segundo FAINE et al. (1999) a identificação da variante sorológica da leptospira tem importância uma vez que a imunidade é específica para a mesma, não havendo imunidade cruzada. Portanto, quando um ou mais sorovares infectam os animais é necessária a utilização de vacinas polivalentes, sendo a combinação de variantes sorológicas wolffi e hardjo largamente utilizada em bovinos.

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; BRIHUEGA & HUTTER, 1995 e KOLBL et al., 1995). A leptospirosas spp. é um antígeno pobre, induzindo respostas imunológicas baixas e por um curto período de tempo (SIDDIQUE & SHAH, 1990; BOLIN et al., 1991; VENKATARAMAN et al., 1994; RWEYEMAMU et al., 1997), sendo a resposta humoral a mais importante, associada a anticorpos contra dos componentes lipopolisacárides (ISOGAI et al., 1990). Os títulos de anticorpos

detectados pela SAM propiciam um bom significado presuntivo da imunidade sem a necessidade de experimentos de desafio (FAINE et al., 1999). Todas as vacinas devem ser administradas parenteralmente em duas doses, com intervalo de cerca de um mês, necessitando ser repetida ou reforçada anualmente (NOLAN, 1990). O fato de a resposta imunológica ser baixa e específica para cada sorovar, faz das vacinas comerciais uma medida profilática muitas vezes ineficiente (HANSON, 1997; FAINE et al., 1999).

Os anticorpos contra leptospira podem ser detectados no soro sanguíneo dos animais no início das infecções e mais tardiamente no caso das vacinações (PANDEY, 1994). A concentração dos anticorpos aumenta à medida que a infecção evolui ou ainda no desenvolvimento da resposta produzida pelos antígenos vacinais (PANDEY, 1994; TIZARD, 2002). BOLIN et al. (1991) descreveram que o sorovar hardjo é um antígeno de baixa imunogenicidade, com isso produz uma baixa resposta de anticorpos após as vacinações, e a proteção é por um curto período.

Em uma criação extensiva de bovinos, LITTLE et al. (1992) constataram que a leptospirose em sua forma endêmica era causada pelo sorovar hardjo, e que a utilização da vacinação anual por um período de cinco anos, associada ao tratamento dos animais infectados com dihidroestreptomicina, foi suficiente para controlar e erradicar a doença. Procedimento semelhante foi realizado por KINGSCOTE & PROULX (1986) com o uso da dihidroestreptomicina associado à vacinação semestral do rebanho. Segundo BLOOD & RADOSTITS (1989) e GERRITSEN et al. (1994), o tratamento é importante, pois elimina o portador renal, diminuindo a fonte de infecção e conseqüentemente a exposição de animais não infectados ao agente.

Duas bacterinas comerciais monovalentes com o sorovar hardjo foram testadas por SAMINA et al. (1997), sendo 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 a qual foi duas vezes maior nos animais que foram vacinados pela via intradérmica quando comparada com o grupo inoculado por via subcutânea.

Ao descrever as vacinas que são utilizadas nos animais, FAINE et al. (1999) citaram que estas são utilizadas com dois propósitos para proteger os animais e para proteger o ser humano que pode contrair a leptospirose a partir destes animais. As vacinas para bovinos e suínos têm sido testadas por vários anos e seus resultados conflitam nos relatos de sua eficácia.

Os autores relatam exemplos de baixa ou quase nenhuma resposta sorológica, após a vacinação com vacinas comerciais.

## MATERIAL E MÉTODOS

A população estudada foi composta de bovinos oriundos de propriedades do Noroeste noroeste do Estado de São Paulo. Os animais utilizados foram fêmeas da espécie bovina (*Bos taurus*) adultas lactantes, mestiças da raça holandesa. Sendo Foram utilizados 20 animais de cada propriedade, que foram escolhidos após três exames sorológicos com intervalos de 20 dias, para enquadrá-los a um dos grupos experimentais. As amostras sanguíneas foram obtidas por punção venosa a partir da veia caudal mediana com o auxílio de frasco esterilizado tipo Vacutainer. Após a obtenção do soro, as amostras foram armazenadas a uma temperatura de -20°C até o momento de se proceder aos exames sorológicos.

A seleção dos animais para os grupos experimentais foi efetuada após a triagem sorológica dos mesmos por meio da prova de SAM, segundo o critério recomendado pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1985), utilizando-se como antígenos 24 variantes sorológicas de leptospira. Foram considerados como animais não reagentes aqueles cujos exames sorológicos apresentaram títulos inferiores a 100 frente aos 24 antígenos sorovares utilizados. Já para o grupo de animais reagentes foram considerados pertencentes os bovinos que apresentaram no soro sanguíneo aglutininas (título  $\geq 100$ ) contra pelo menos um dos seis sorovares contidos na vacina (canicola, grippotyphosa, hardjo, icterohaemorrhagia, pomona e wolffi). Para a confirmação da positividade ou não dos animais, foi efetuada colheita de sangue no momento da aplicação da vacina. Foi considerado como dia zero para todos os tratamentos o momento da aplicação da primeira dose de vacina para se ter certeza de que os animais eram ou não reagentes, procedendo a amostragem dos animais aos 15, 30, 45 e 60 dias pós-vacinação para o monitoramento com a SAM.

Os animais foram divididos em dois grupos amplos, o dos animais não-reagentes (Grupos I, II e III) e o dos animais reagentes (Grupos IV, V e VI); posteriormente os animais foram subdivididos em grupos controle, que não receberam dose alguma de vacina (Grupos I e IV), grupos experimentais que receberam somente uma dose de vacina (Grupos II e V) e que receberam duas doses de vacina (Grupos III e VI), sendo a segunda dose denominada de reforço, aplicada 30 dias após a primeira. O esquema de

vacinação dos grupos que receberam duas doses de vacina constituiu-se de uma dose de primo-vacinação e uma segunda dose, denominada de reforço, 30 dias após a primeira vacinação.

O total de animais incluídos nos grupos experimentais foi de 120, distribuídos em igual número (20 animais) nos seis grupos. Para tanto, foram testados em média 30 animais de cada propriedade durante o processo de triagem.

A vacina utilizada constituiu-se de uma bacterina disponível no mercado que foi obtida diretamente de seu fabricante, sendo uma bacterina polivalente que contém os sorovares wolffi, hardjo, grippotyphosa, pomona, icterohaemorrhagiae e canicola, acrescida de adjuvante, hidróxido de alumínio, na proporção de 50% de seu volume. A vacinação foi realizada por meio de aplicação de formava subcutânea, na tábua do pescoço, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. A dosagem utilizada foi de três mililitros, conforme recomendação do fabricante.

A distribuição dos grupos experimentais foi feita segundo a forma de dados pareados categoricamente. Foram testadas as hipóteses e confrontadas as médias dos tratamentos através do teste de MacNemar's com 1% e 5% de confiabilidade, conforme descrito por RAO (1997) e ZAR (1999). A tabulação e o tratamento dos dados foram efetuados com o auxílio de um pacote estatístico denominado SAS System, conforme preconizam DIAS (1997) e SCHLOTZHAUER & LITTELL (1997).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a realização da triagem sorológica para a composição dos grupos experimentais, verificou-se, nos animais reagentes, que os sorovares hardjo e wolffi foram os mais frequentes, seguidos pelos sorovares pomona, icterohaemorrhagiae, australis, bratislava, autumnalis, castelonis e pyrogenes. Esses resultados estão de acordo com dados de inquéritos sorológicos realizados em bovinos por SZYFRES (1976), KINGSCOTE & PROULX (1986), QUINLAN & McNICKOLL (1993), LEONARD et al. (1994), QUINN et al. (1994), FAINE (1994), SMITH (1996) e FAVERO et al. (1997). Não foi encontrado nenhum animal reagente para os sorovares canicola e gryppotyphosagrippotyphosa, apesar de SMITH (1996) ter verificado nos EUA que os sorovares hardjo, pomona e grippotyphosa foram os mais comumente encontrados em bovinos naturalmente infectados. Vale ressaltar que, no Brasil, FAVERO et al. (1997) encontraram bovinos naturalmente infectados para

com o sorovar grippotyphosa quando da realização de testes com vacinas contra a leptospirose.

No grupo I, de bovinos não reagentes e não vacinados, os exames sorológicos revelaram que, nos 20 animais examinados, não houve reagentes para a diluição de 1/100 contra os seis sorovares contidos na vacina durante o tempo da realização do experimento.

No grupo II, de bovinos não reagentes e vacinados com dose única (Tabela 1), alguns animais apresentaram títulos para os sorovares hardjo, pomona e wolffi aos 15 dias após a vacinação, sendo que para o sorovar hardjo pôde ser observado um incremento no número de animais reagentes (15%) a partir do 30º dia pós-vacinação, o qual se manteve até o 60º dia. Para os sorovares pomona e wolffi, observou-se que no 30º dia pós-vacinação não havia mais animais reagentes. Não houve qualquer resposta para os sorovares grippotyphosa, icterohaemorrhagiae e canicola. Tais resultados diferem dos observados por FAVERO et al. (1997), que observaram uma indução da resposta sorológica que atingiu seu pico no 7º dia pós-vacinação e depois persistiam até o 90º dia, sem apresentar diminuição significativa dos títulos sorológicos. Entretanto, BOLIN et al. (1989a) verificaram em bovinos não infectados, vacinados com dose única de bacterina pentavalente, que os títulos foram iguais ou superiores a 40 após três semanas da inoculação. SAMINA et al. (1997) também obtiveram respostas muito baixas de anticorpos ( $\leq 80$ ) quando testaram as vias intradérmica e subcutânea para a aplicação de vacinas acrescidas ou não de adjuvante.

Quando a reação de SAM é empregada para o diagnóstico da leptospirose animal adotando-se a diluição inicial dos soros sanguíneos 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 antes da vacinação a antígenos homólogos ou heterólogos 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 (BLOOD & RADOSTITS, 1989).

No grupo III, de bovinos não reagentes e vacinados com dose de reforço 30 dias após a primeira vacinação (Tabela 1), verificou-se uma indução de resposta humoral no 15º dia pós-vacinação, em dois animais para os sorovares hardjo e pomona. Esses animais, aos 30 dias pós-vacinação, não apresentaram reatividade à SAM, da mesma forma que o restante dos animais submetidos a esse tratamento, que coincidiu com a aplicação da dose de reforço da

bacterina. Aos 45 dias após a vacinação, observou-se que os dois animais voltaram a apresentar títulos sorológicos para os sorovares citados anteriormente e também passaram a apresentar títulos para o sorovar wolffi, que persistiram até o 60º dia pós-vacinação. Outros três animais, que não foram reagentes até o 30º dia pós-vacinação, passaram a apresentar título sorológico após a aplicação da segunda dose da vacina, mantendo os títulos até o 60º dia pós-vacinação. Entre os animais não reagentes, os vacinados com dose de reforço foram os que apresentaram melhores resultados, embora na análise estatística não tenham diferido estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

No grupo IV, de bovinos reagentes e não vacinados (Tabela 1), foi possível encontrar 20 animais reagentes contra somente três sorovares (wolffi, hardjo e icterohaemorrhagiae). Dos 20 animais reagentes utilizados no grupo, 15 foram para o sorovar hardjo, 10 para o wolffi e cinco para o icterohaemorrhagiae. Todos esses animais apresentaram títulos sorológicos de 100 desde o dia 0 até o 60º dia da duração do experimento.

No grupo V, de bovinos reagentes vacinados com dose única (Tabela 1), no início do trabalho foram encontrados animais reagentes contra os sorovares hardjo (100%), pomona (15%) e wolffi (60%). Após 15 dias da aplicação da vacina, houve uma queda no número de animais reagentes para o sorovar hardjo (45%) aos 15 dias pós-vacinação, e aos 30 dias verificou-se um aumento no número de animais reatores (70%). Essa queda de animais reagentes para o sorovar hardjo, após a vacinação, pode ser devida ao fato de ter ocorrido uma neutralização dos anticorpos séricos existentes nos animais infectados (TIZARD, 2002), sendo essa observação também verificada por FAVERO et al. (1997). Pôde-se observar que a aplicação de uma única dose de vacina fez com que inicialmente houvesse um aumento no número de animais reagentes aos 15 dias pós-vacinação, nos animais naturalmente infectados, sendo que no 30º dia este número tendeu a diminuir e estabilizar-se. Cabe ressaltar que o sorovar hardjo se comportou de maneira distinta dos demais sorovares.

Os animais reagentes vacinados com dose de reforço (Grupo VI, Tabela 1), inicialmente apresentaram 85% e 65% dos animais com titulação para os sorovares hardjo e wolffi, respectivamente, demonstraram que para os sorovares hardjo e wolffi, que os quais inicialmente apresentaram 85% e 65% de animais reagentes no 15º dia pós-vacinação, houve uma queda no número de animais reagentes para 25% e 30%, respectivamente. Aos 30 dias pós-vacinação foi observado um novo aumento no número de animais

Tabela 1 - Número de animais e percentagens de reagentes com 0, 15, 30, 45 e 60 dias após os diversos tratamentos utilizando-se a vacina polivalente para a leptospirose segundo os grupos experimentais, Região Noroeste do Estado de São Paulo, 2000.

Sorovar	Animais Examinados	Dias									
		0		15		30		45		60	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Grupo II (animais não reagentes vacinados com dose única)											
canicola	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
grippotyphosa	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hardjo	20	0	0	2	10	3	15	3	15	3	15
icterohaemorrhagiae	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pomona	20	0	0	2	10	0	0	0	0	0	0
wolffi	20	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0
Grupo III (animais não reagentes vacinados com duas doses)											
canicola	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
grippotyphosa	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hardjo	20	0	0	2	10	0	0	5	25	5	25
icterohaemorrhagiae	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pomona	20	0	0	2	10	0	0	2	10	2	10
wolffi	20	0	0	0	0	0	0	2	10	2	10
Grupo IV (animais reagentes não vacinados)											
canicola	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
grippotyphosa	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hardjo	20	15	75	15	75	15	75	15	75	15	75
icterohaemorrhagiae	20	5	25	5	25	5	25	5	25	5	25
pomona	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
wolffi	20	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50
Grupo V (animais reagentes vacinados com dose única)											
canicola	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
grippotyphosa	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hardjo	20	20	100	9	45	14	70	14	70	14	70
icterohaemorrhagiae	20	0	0	4	20	2	10	2	10	2	10
pomona	20	3	15	8	40	3	15	3	15	3	15
wolffi	20	12	60	14	70	11	55	11	55	11	55
Grupo VI (animais reagentes vacinados com duas doses)											
canicola	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
grippotyphosa	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hardjo	20	17	85	5	25	12	60	20	100	20	100
icterohaemorrhagiae	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pomona	20	0	0	2	10	0	0	3	15	3	15
wolffi	20	13	65	6	30	8	40	9	45	9	45

reagentes (60% e 40%), que se mostrou ainda maior aos 45 dias pós-vacinação (100% e 45%) persistindo até o 60º dia. No entanto, para o sorovar pomona, os animais não apresentaram títulos sorológicos na primeira vacinação, passando a apresentar 10% de animais com títulos de 100 e 800 no 15º dia pós-vacinação, com queda de título no 30º dia. Após a aplicação da dose de reforço, três animais (15%) passaram a apresentar títulos sorológicos de 100 e 200, que persistiram até o 60º dia.

Os sorovares grippotyphosa e canicola foram os únicos que não apresentaram qualquer título sorológico em bovinos naturalmente infectados e também não conseguiram induzir anticorpos homólogos após a vacinação no decorrer do experimento.

Apesar dos tratamentos não terem apresentado diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre eles, vale ressaltar que a vacinação em

alguns animais, embora poucos, apresentou títulos de anticorpos que persistiram por pelo menos 60 dias. BOLIN et al. (1989a) relatam que a vacinação contra a leptospirose diminui a ocorrência da infecção e transtornos reprodutivos causados pelo sorovar hardjo sob condições de campo, mesmo não apresentando níveis significativos de anticorpos aglutinantes.

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

O fato de não se observar uma mesma resposta sorológica contra todos os sorovares 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 (SIDDIQUE & SHAH, 1990). BOLIN et al. (1991) não obtiveram diferença significativa da resposta sorológica, quando testaram duas bacterinas monovalentes, contendo o sorovar hardjo amostra hardjo-bovis, com diferentes concentrações antigênicas.

## CONCLUSÃO

Através da análise dos dados apresentados e discutidos, podemos dizer que o melhor esquema de vacinação neste estudo foi o de aplicação de duas doses da vacina com intervalo de 30 dias entre elas. Sendo que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os animais vacinados e não vacinados, e nas respostas de títulos vacinais com relação ao perfil sorológico apresentado pelos mesmos.

Dos sorovares contidos na vacina que induziram a produção de títulos de aglutininas (hardjo, icterohaemorrhagiae, pomona e wolffi), o sorovar hardjo foi o que apresentou uma melhor resposta após a vacinação; havendo necessidade de maiores estudos sobre o poder imunogênico desta vacina, com a finalidade de se buscar verificar se a mesma induz títulos de anticorpos mais duradouros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. *Veterinary medicine*. 7.ed. London : Baillière Tindall, 1989. 1121p.

BOLIN, C.A. et al. 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.

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

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.

BRIHUEGA, B.; HUTTER, E. Efficacy of *Leptospira* vaccine in dogs. *Vet Arg*, Buenos Aires, v.12, p.118-192, 1995.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. *Manual de Métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis*. Washington, 1985. 46p. (Nota Técnica, 30).

DIAS, C.T.S. *Estatística básica através do SAS para windows*. Piracicaba : Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1997. 133p.

ELLIS, W.A.; MONTCOMERI, J.M.; MCPARLAND, P.J. An experimental study with a *Leptospira interrogans* serovar bratislava vaccine. *Vet Rec*, London, v.125, p.319-321, 1989.

FAINE, S. *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne : CRC, 1994. 353p.

FAINE, S. et al. *Leptospira and leptospirosis*. 2.ed. Melbourne : MedSci, 1999. 272p.

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. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

FAVERO, A.C.M. et al. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra leptospirose. *Arq Inst Biol*, São Paulo, v.64, n.2, p.45-55, 1997.

GERRITSEN, M.J, et al. Effective treatment with dihydrostreptomycin of naturally infected cow shedding *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis. *Am J Vet Res*, Schaumburg, v.55, n.3, p.18-23, 1994.

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.

HODGES, R.T.; DAY, A.M. Bovine leptospirosis: the effects on vaccination os serological responses as determined by complement fixation on microscopic agglutination tests. *N Z Vet J*, Wellington, v.35, p.61-64, 1987.

- ISOGAI, E. et al. 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.
- 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. et al. 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.
- LEONARD, F. et al. Antibodies in the vaginal mucus of heifers experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. **Ir Vet J**, v.47, n.3, p.123-126, 1994.
- LITTLE, T.W.A. et al. 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.
- 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.
- PANDEY, R. **Microbiologia veterinária: perspectivas clínicas e moleculares**. São Paulo : Roca. 1994. 214p.
- PINTO, C.M. **Utilização do papel de filtro para o transporte de amostras destinadas à reação de soroglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona***. 1997. 39f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 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.
- QUINN, P.J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. Madri: Grafos, 1994. 648 p.
- RAO, P.V. **Statistical research methods in the life sciences**. Pacific Grove : Duxbury, 1997. 549p.
- 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. et al. Enhanced antibody response in cattle against *Leptospira hardjo* by intradermal vaccination. **Vaccine**, London, v.15, n.12-13, p.1434-1436, 1997.
- SCHLOTZAUER, S.D.; LITTELL, R.C. **SAS system for elementary statistical analysis**. 2.ed. Cary : SAS Institute, 1997. 438p.
- 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. 2040p.
- SZYFRES, B. Leptospirosis as na animal and public health problem in Latin America and the Caribbean Area. **Pan Am Health Org Bull**, Washington, v.10, p.110-125, 1976.
- TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária**. 6 ed. São Paulo : Roca, 2002. Cap.21, 532p.
- VENKATARAMAN, K.S. et al. Immune response in dogs with experimental leptospirosis. **Indian J Comp Microbiol Imm Inf Dis**, v.15, n.1-2, p.21-25, 1994.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4.ed. New Jersey : Prentice Hall, 1999. 662p.