

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. e resposta vacinal contra *Leptospira* spp. em rebanho ovino no município de Uberlândia, MG

Rafael Quirino Moreira
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Outubro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. e resposta vacinal contra *Leptospira* spp. em rebanho ovino no município de Uberlândia, MG

Rafael Quirino Moreira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anna M. C. Lima-Ribeiro

Co-orientadora: Prof.^a Dr^a. Deise Aparecida O. Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Junho de 2009

Dedico este trabalho aos meus pais que
sempre fomentaram meus estudos sem medir esforços

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	06
Referências.....	09
CAPÍTULO 2.....	13
1. Introdução.....	13
2. Material e Métodos.....	15
2.1. Local.....	15
2.2. Colheitas de sangue.....	16
2.3. Testes sorológicos.....	17
3. Resultados e Discussão.....	18
4. Conclusão.....	22
Referências.....	22
CAPÍTULO 3.....	28
1. Introdução	28
2. Material e Métodos.....	30
2.1. Local.....	30
2.2. Colheitas de sangue de ovinos.....	30
2.3. Animais.....	30
2.4. Exames sorológicos.....	31
3. Resultados e Discussão.....	31
4. Conclusão.....	34
Referências.....	35
CAPÍTULO 4.....	39
1. Introdução	40
2. Material e Métodos.....	41
2.1. Local.....	41
2.2. Títulos de anticorpos aglutinantes.....	41
2.3. Triagens dos ovinos frente ao SAM.....	42
2.4. Bacterinas.....	44
2.5. Vacinação.....	44
2.6. Colheitas de sangue.....	45
2.7. Análise estatística.....	45
3. Resultados e Discussão.....	45
4. Conclusão.....	53

Referências.....53

Soroprevalência para *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. e resposta vacinal para *Leptospira* spp. em rebanho ovino no município de Uberlândia, MG

RESUMO - Os objetivos do presente trabalho foram: verificar a soroprevalência de *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp; monitorar a prevalência para *Leptospira* spp. num intervalo de 10 meses; e aferir o perfil de aglutininas induzido pela soroconversão de duas bacterinas polivalentes em rebanho ovino com relatos contra perdas reprodutivas no município de Uberlândia, MG. Foram colhidas amostras de sangue de 98 ovinos. As amostras foram testadas frente ao ELISA para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e pelo método de soroaglutinação microscópica (SAM) para *Leptospira* spp. Após dez meses foi realizada uma segunda colheita em 101 ovinos, as amostras de soro foram submetidas ao SAM para monitorar a prevalência de *Leptospira* spp. no rebanho. Cinquenta e nove ovinos foram divididos em seis grupos experimentais: de positivos ao SAM imunizados com vacina comercial (grupo I) e autógena (grupo III), negativos ao SAM e imunizados com vacina comercial (grupo II) e autógena (grupo IV), um grupo de animais positivos aos SAM e não vacinados (V) e outro de negativos ao SAM e não vacinados (grupo VI). Os níveis de aglutininas foram avaliados e os títulos de anticorpos alcançados em série de diluições na razão de dois. Atestaram-se consideráveis prevalências de 30,60%, 63,30% e 23,46% para *N. caninum*, *T. gondii* e *Leptospira* spp., respectivamente. A maior prevalência para *Leptospira* spp. ocorreu à época do aparecimento dos surtos reprodutivos (23,00%) tendendo a queda dez meses após a primeira colheita (13,86%). A resposta vacinal obtida mostrou-se heterogênea na proporção de animais reagentes e níveis de anticorpos aglutinantes frente aos sorovares incluídos na formulação das vacinas. Títulos maiores alcançados foram contra Harjo e Wollfi em diluições de 1:200. A faixa de melhor soroconversão ocorreu entre os 30 e 120 dias pós primo vacinação.

Palavras-chave: aborto, imunização, leptospirose, neosporose, toxoplasmose

Seroprevalence for *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. and vaccine response to *Leptospira* spp. In sheep flock of the city of Uberlândia, MG

ABSTRACT - The objectives were: to determine the seroprevalence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp; monitor the prevalence of *Leptospira* spp. within 10 months and assess the profile of agglutinins induced seroconversion of two multi-purpose bacterins in sheep flock with reported reproductive losses in Uberlândia, MG. We collected blood samples from 98 sheep. The samples were tested against the ELISA for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* and the method of microscopic agglutination test (MAT) for *Leptospira* spp. After ten months was held a second crop of 101 sheep, serum samples were subjected to SAM to monitor the prevalence of *Leptospira* spp. the herd. Fifty nine animals were divided into six experimental groups: positive for the SAM immunized with commercial vaccine (group I) and autologous (group III), and negative immunized with commercial vaccine (group II) and autologous (group IV), and a group of positive animal for SAM not vaccinated (V) and negative sheep for the SAM unvaccinated (group VI). The levels of agglutinins were evaluated and the antibody titers achieved in series of dilutions in the ratio of two (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200). Considerable prevalence of 30.6%, 63.3% and 23.46% for *N. caninum*, *T. gondii* and *Leptospira* spp., respectively, was attested. The greater prevalence of *Leptospira* spp. occurred at the time of onset of reproductive bouts (23%) tend to fall ten months after the first harvest (13.86%). The vaccine response obtained was heterogeneous in the proportion of reacting animals and levels of agglutinating antibodies against the serovars included in the formulation of vaccines. Titers achieved were for Harjo and Wollf at dilutions of 1:200. The range of best seroconversion occurred between 30 and 120 days after vaccination cousin.

Key words: abortion, immunization, leptospirosis, neosporosis, toxoplasmosis

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A ovinocultura no Brasil tem se desenvolvido de maneira bastante acentuada (VASCONCELOS, VIEIRA, 2002). Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2007) o país possui aproximadamente 16.200.000 animais, a região Sudeste em torno de 660.000 animais, o estado de Minas Gerais com quase 243.000, e a cidade de Uberlândia com 4.600 animais.

De acordo com o Instituto Mineiro de Agropecuária (2009), a ovinocultura mineira tem predominância de sistema extensivo de criação (totalmente a pasto), composto basicamente por animais de raças de corte objetivando produção de carne e com média de 80 ovinos por propriedade.

Neospora caninum, *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. são considerados importantes agentes infecciosos que afetam a reprodução de ovinos (DUBEY, LINDSAY, 1996; HOMEM, HEINEMANN, MORAES, 2001; COSTA et al., 2001) podendo resultar em aborto ou nascimento de bezerros fracos (BIELSA, ROMERO, HEUER, 2004).

Neosporose é causada por um parasito coccídeo, formador de cistos denominado *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1996). O cão é o hospedeiro definitivo e elimina oocistos após ingestão de tecido ou órgão de hospedeiros intermediários, representados pelos bovinos, contendo cistos do agente (ALMEIDA, 2004).

A infecção por *N. caninum* não produz sinais clínicos nos ruminantes, exceto pelos abortos. Animais de qualquer idade e a qualquer momento da gestação podem abortar (PATITUCCI et al., 1999). Pesquisas realizadas no Brasil diagnosticando o agente por imunohistoquímica e reação em cadeia por polimerase (PCR) demonstraram tal fato. O diagnóstico para este coccídeo deve ser incluído na rotina como mais um dos possíveis causadores de aborto (GENNARI, 2004), já que neosporose é considerada a principal causa de perdas reprodutivas em países onde a brucelose foi controlada (PATITUCCI et al., 2000).

Outro agente importante em infecções reprodutivas é o *Toxoplasma gondii* que pertence ao Filo *Apicomplexa* e Família *Sarcocystidae*, como o *Neospora*

caninum. É um coccídeo intestinal do gato (hospedeiro definitivo) e com uma série de hospedeiros intermediários (FORTES, 1997). A toxoplasmose é a enfermidade causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, ocorre freqüentemente em humanos e animais, portanto é uma zoonose. Segundo Silva et al. (2003), desde 1954 o parasito é descrito como causador de abortos em ovinos, sendo considerado como a maior causa de problemas reprodutivos nesta espécie. A doença clínica ocorre na forma de problemas perinatais como abortos, natimortos e cordeiros recém nascidos fracos.

Durante muito tempo a espécie *Leptospira interrogans* era considerada a única que causava leptospirose. Atualmente a família *Leptospiraceae* está dividida em 13 espécies patogênicas, com mais de 260 sorovares (ADLER, DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2009). A classificação dos sorovares é baseada na expressão dos epítomos superficiais em um mosaico de antígenos lipopolissacarídeos (LPS), enquanto a especificidade dos epítomos depende da sua composição e conformação dos açúcares. De acordo com Faine et al. (1900) as leptospiros não são hospedeiro-específicas, porém, alguns sorovares parecem apresentar afinidade a algumas espécies de hospedeiro.

A infecção do homem e outros seres vivos se fazem pelo contato com água e alimentos contaminados com a urina de indivíduos doentes ou portadores sadios (LARSSON, 1981). Esta é uma zoonose que apresenta alta prevalência em países tropicais, devido às altas precipitações pluviométricas e solo neutro a alcalino. A presença e sobrevivência do agente no ambiente são favorecidas, sobretudo, pela umidade e pH neutro (HOMEM; HEINEMANN; MORAES, 2001).

De acordo com a Organização Mundial de Sanidade Animal (2004), a leptospirose está classificada como uma enfermidade da lista B, grupo ao qual pertencem as doenças transmissíveis de grande importância do ponto de vista socioeconômico e/ou sanitário, cuja repercussão no comércio internacional de animais e produtos de origem animal é considerável (BLAHA, 1989).

Os ovinos são os animais domésticos considerados menos susceptíveis à leptospirose, porém sofrem a infecção das leptospiros patogênicas e, em muitos casos, a evolução é assintomática, podendo, às vezes, ocorrerem surtos da doença com casos de abortos e morte de cordeiros. A leptospirose pode manifestar-se de

forma aguda, subaguda e crônica, caracterizando-se por quadros clínicos de septicemia, hemorragia, nefrite, seguida por icterícia, hemoglobinúria, mastite sanguinolenta, repetição de cio, aborto nas ovelhas e anemia hemolítica nos cordeiros com morte na primeira semana de vida (CICERONI et al., 2000). Quando a leptospirose é diagnosticada prematuramente, muitas perdas por aborto podem ser evitadas (SAGLAM et al., 2007).

Na prática, os métodos sorológicos são os mais usados para realização do diagnóstico de leptospirose. O método de reação de soroaglutinação microscópica é o recomendado pela Organização Mundial da Saúde tanto para diagnóstico em homens quanto para animais, já que leptospirose é uma zoonose (FUNASA, 1995).

O controle da leptospirose nos animais domésticos depende de um correto diagnóstico, tratamento apropriado, da implantação de medidas de manejo, controle de roedores sinantrópicos (KINGSCOTE, PROULX, 1986; HODGES, DAY, 1987; BOLIN, ALT, 1999), eliminação do excesso de água estagnada no ambiente, e a imunização sistemática do rebanho (GUIMARÃES, CÔRTEZ, VASCONCELOS, 1982/1983; MOREIRA, 1994).

Animais de produção precisam ser submetidos à aplicação de bacterinas com mais de cinco sorovares devido a variações das condições epidemiológicas e consequentemente dos sorovares de cada região (STRINGFELLOW et al., 1983). 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. Salientando, assim, a importância do desenvolvimento de bacterinas que contemplem os sorovares endêmicos de cada região, levando a uma imunização mais eficaz.

Embasado nesses aspectos, na relevância da neosporose, toxoplasmose e leptospirose, nos contextos econômicos e de saúde pública e na escassez de estudos destas doenças em ovinos, justifica-se este trabalho. Os objetivos, portanto, foram: Identificar a soroprevalência de *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. em rebanho ovino com relatos de perdas reprodutivas de uma propriedade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil; Acompanhar a sororreatividade destes animais contra leptospirose em um intervalo de 10 meses; Averiguar e

comparar a eficácia da resposta vacinal de uma bacterina polivalente comercial e outra autógena frente aos sorovares mais freqüentes neste rebanho.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.A.O. Epidemiologia de *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p.34-40, 2004.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A., *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012, 2009.

BIELSA, J.M.; ROMERO, J.J.; HEUER, C. Controle de neosporose em bovinos com Bovilis® Neoguard: A experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p.34-37, 2004.

BLAHA, T. **Applied veterinary epidemiology**. Elsevier, Amsterdam, p.95-103, 1989.

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

COSTA, G.H.M.; CABRAL, D.D.; VARADAS, N.P.; SOBRAL, E.A.; BORGES, F.A.; CASTAGNOLLI, K.L. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina**, Londrina, v.22, p.57-62, 2001.

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

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.192, p.01-59, 1996.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.67, p.1-59, 1996.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2.ed. Melbourne : MedSci, 1999. 272p.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3ª ed. São Paulo, Ícone, 1997.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de Leptospirose**, 2ª ed. Brasília, 1995. 98p.

GENNARI, S.M. *Neospora caninum* no Brasil: Situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p.23-28, 2004.

GUIMARÃES, M.C.; CÔRTEZ, J.A.; VASCONCELLOS, S.A. Epidemiologia e controle de leptospirose em bovinos. Papel do portador e seu controle terapêutico. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. USP**, v.6/7, p. 21- 34, 1982/1983.

HODGES, R.T.; DAY, A.M. Bovine leptospirosis: the effects on vaccination on serological responses as determined by complement fixation on microscopic agglutination tests. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v.35, p.61-64, 1987.

HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; MORAES, Z.M. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia Oriental Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.02, p.173-180, 2001.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA – IMA. **Ovinocultura em Minas Gerais**. IMA: Belo Horizonte, 2009. 14p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Efetivos dos rebanhos cabeças**. 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 01 set. 2009.

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

LARSSON, C.E. **Estudo epidemiológico da leptospirose felina**. 1981. 75f. Tese (Doutorado) São Paulo - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1981.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SANIDADE ANIMAL. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00043,00069and00071.Htm>. Acesso em: 23 jul. 2004.

PATITUCCI, A.N.; PEREZ, M.J.; ISRAEL, K.S.; ROZAS, M.A. Prevalencia de anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en dos rebaños lecheros de la IX Región de Chile. **Archivo de Medicina Veterinária**, v.32, n.2, p.209-214, 2000.

PATITUCCI, A.N.; PEREZ, M.J.; LUDERS, C.F.; RATTO, M.H.; DUMONT, A.G. Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en rebaños lecheros del Sur de Chile. **Archivo Medicina Veterinária**, v.31, n.2, p.215-218, 1999.

SAGLAM, Y. S.; YENER, Z.; TEMUR, A.; YALCIN, E. Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. **Small Ruminant Research**. Res. doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.04.006, 2007.

SILVA, A. V. da.; CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, p.115-119, fevereiro, 2003.

STRINGFELLOW, D. A.; BROWN, R. R.; HANSON, L. E.; SCHURRENBERGER, P. R.; JOHNSON, J. Can antibody responses in cattle vaccinated with a multivalent leptospiral bacterin interfere with serologic diagnosis of disease? **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.182, p.165 – 167, 1983.

VASCONCELOS, V.; VIEIRA, L.S. A evolução da caprino-ovinocultura brasileira. **Revista O Berro**, Uberaba, n.52, p. 77-78, set-out, 2002.

CAPÍTULO 2

Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. em Rebanho Ovino com Relatos de Perdas Reprodutivas em uma Propriedade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

RESUMO – O objetivo foi verificar a soroprevalência de *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. em uma propriedade de ovinos com relato de perdas reprodutivas no município de Uberlândia, Minas Gerais. Foram colhidas amostras de sangue por punção intravenosa de 98 ovinos com mais de 120 dias de idade. As amostras de soro sanguíneo foram testadas frente ao ELISA para *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e pelo método de soroaglutinação microscópica para *Leptospira* spp. Observaram-se as consideráveis prevalências de 30,6%, 63,3% e 23,46% para *N. caninum*, *T. gondii* e *Leptospira* spp., respectivamente. Desta forma ficou evidenciada a importância epidemiológica dessas doenças, e da combinação das mesmas como causadoras de distúrbios reprodutivos em ovinos.

Palavras-chave: aborto, ELISA, leptospirose, neosporose, soroaglutinação microscópica, toxoplasmose

1. Introdução

Neospora caninum, *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. são considerados importantes agentes infecciosos que afetam a reprodução de ovinos (DUBEY, LINDSAY, 1996; HOMEM, HEINEMANN, MORAES, 2001; COSTA et al., 2001) podendo resultar em aborto ou nascimento de bezerros fracos (BIELSA, ROMERO, HEUER, 2004).

A neosporose é causada por um parasito coccídeo, formador de cistos denominado *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1996). Os cães são os hospedeiros definitivos, eliminam oocistos após ingestão de tecidos ou órgãos de hospedeiros intermediários, representados pelos ruminantes, contendo os cistos do agente (ALMEIDA, 2004).

A infecção por *N. caninum* não produz sinais clínicos nos ruminantes, exceto pelos abortos observados. Animais de qualquer idade e a qualquer momento da gestação podem abortar (PATITUCCI et al., 1999). Sabe-se que a neosporose ocorre menos freqüentemente em ovinos, e está associada a abortos e nascimentos de cordeiros fracos (KOBAYASHI et al., 2001). No entanto, em propriedades em que são criados juntamente com bovinos, os ovinos podem eventualmente participar da epidemiologia da infecção (VOGEL, ARENHART, BAUERMANN, 2006). O diagnóstico para este coccídeo deve ser incluído em rotina como mais um dos possíveis causadores de aborto (GENNARI, 2004).

O *Toxoplasma gondii* pertence ao Filo *Apicomplexa* e Família *Sarcocystidae*, como o *Neospora caninum*. É um coccídeo intestinal do gato (hospedeiro definitivo) e com uma série de hospedeiros intermediários (FORTES, 1997). A toxoplasmose é a enfermidade causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, muito comum em humanos e animais. Segundo Silva et al. (2003), desde 1954 o parasito é descrito como causador de abortamento em ovinos, sendo considerado como a maior causa de problemas reprodutivos nesta espécie. A doença clínica ocorre na forma de problemas perinatais como abortos, natimortos e cordeiros recém nascidos fracos.

Durante muito tempo a espécie *Leptospira interrogans* era considerada a única que causava leptospirose. Atualmente a família *Leptospiraceae* está dividida em 13 espécies patogênicas, com mais de 260 sorovares (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2009). A classificação dos sorovares é baseada na expressão dos epítomos superficiais em um mosaico de antígenos lipopolissacarídeos (LPS), enquanto a especificidade dos epítomos depende da sua composição e conformação dos açúcares. De acordo com Krieg (1996) as leptospiros não são hospedeiro-específicas, porém, alguns sorovares parecem apresentar afinidade a algumas espécies de hospedeiro.

Os ovinos são os animais domésticos considerados menos susceptíveis a leptospirose, porém sofrem a infecção das leptospiros patogênicas e, em muitos casos, a evolução é assintomática. Às vezes ocorrerem surtos da doença com casos de abortos e morte de cordeiros. A leptospirose pode manifestar-se de forma aguda, subaguda e crônica, caracterizando-se por quadros clínicos de septicemia, hemorragia, nefrite, seguida por icterícia, hemoglobinúria, mastite sanguinolenta, retorno ao cio, aborto nas ovelhas e anemia hemolítica nos cordeiros com morte na primeira semana de vida (CICERONI et al., 2000).

Justifica-se este trabalho pela importância econômica e epidemiológica da neosporose, toxoplasmose e leptospirose em animais de produção. Vislumbrando contribuir com dados epidemiológicos para elucidar a influência destas em rebanho ovino, com problemas reprodutivos, o objetivo deste trabalho foi: verificar a soroprevalência de *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. em uma propriedade de ovinos com relato de perdas reprodutivas no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, e associar as prevalências encontradas aos prejuízos reprodutivos.

2. Material e Métodos

2.1 – Local

Este estudo foi realizado em propriedade rural inserida no Bioma Cerrado, numa região de Clima Tropical com duas estações bem definidas: verão quente e chuvoso, e inverno seco, localizada no Município de Uberlândia, Minas Gerais. Apresenta pluviosidade média anual de 1500 mm e temperatura média de 22° C (BRITO, PRUDENTE, 2005).

A propriedade tem diversificação da produção pecuária, entre elas bovinocultura de corte e leite, ovinocultura e caprinocultura de corte. Todas as atividades eram realizadas em conjunto e em sistema extensivo de produção. Também coabitavam na propriedade eqüinos para manejo rotineiro da fazenda, e

existiam aproximadamente 50 cães de caça. O rebanho ovino era o maior dentre as espécies ali existentes, sendo relatados eventos de prejuízos reprodutivos, como aborto e repetição de cio.

2.2 – Colheitas de sangue

As colheitas de sangue nos ovinos foram executadas por venopunção asséptica da veia jugular de todos os animais com idade superior a 120 dias de vida, buscando evitar aqueles que possivelmente ainda apresentassem anticorpos colostrais em sua circulação sanguínea, pelo método de amostragem não probabilística por julgamento especializado (GRESSLER, 2004), totalizando 98 ovinos. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos de 10 mL, identificados e sem anticoagulante. O material coletado foi transportado sob refrigeração até o laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde foi extraído o soro sanguíneo de cada amostra, dividindo-as em duas frações. Foram feitas as devidas identificações e posterior armazenamento a uma temperatura de -20°C até o momento das análises.

Uma das frações foi encaminhada ao Laboratório de Parasitologia (UFU) para a realização dos testes sorológicos para diagnóstico de neosporose e toxoplasmose, a outra foi utilizada para o diagnóstico de leptospirose no próprio Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas.

2.3 – Testes sorológicos

2.3.1 – Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*N. caninum* e IgG anti-*T. gondii* em amostras de soros de ovinos, seguindo o protocolo descrito por Silva et al. (2007), com algumas modificações.

Placas de poliestireno de alta afinidade com 96 poços (Corning Incorporated Costar®, Nova York, EUA) foram sensibilizadas (50 µL/poço) com antígeno solúvel de *N. caninum* ou *T. gondii*, na concentração de 10 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS adicionado de 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e os sítios ativos das placas foram bloqueados (100 µL/poço) com 5% de leite em pó desnatado em PBS-T (PBS-TM) por 1 hora em temperatura ambiente. Após novas lavagens, as amostras de soros foram adicionadas (50 µL/poço), em duplicata, na diluição de 1:50 (*N. caninum*) ou 1:64 (*T. gondii*) em PBS-TM. Após incubação por uma hora a 37°C, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e, em seguida, foi adicionado (50 µL/poço) o anticorpo secundário IgG de coelho anti-IgG de carneiro marcado com biotina na diluição de 1:250 (*N. caninum*) ou 1:250 (*T. gondii*) em PBS-TM e incubado por uma hora a 37°C. Após novo ciclo de seis lavagens com PBS-T, foi adicionado (50 µL/poço) o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição 1:1000 em PBS-TM e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após um ciclo final de lavagens, as placas foram reveladas pela adição do substrato enzimático H₂O₂ a 0,03% em tampão cromógeno consistindo de 0,01M 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (ABTS; Sigma Chemical Co.) em tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2).

Após incubação por 20-30 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405 nm. Três soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O *cut off* (limite de positividade) foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos arbitrariamente em Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$ como anteriormente descrito (SILVA et al., 2007). Valores de IE > 1,3 foram considerados positivos.

2.3.2 – Soroaglutinação microscópica (SAM)

Foi utilizado o método de Soroaglutinação Microscópica, padronizando-se positivo maior ou igual a 50% de aglutinação de antígenos por campo a uma diluição de 1:100 do soro sangüíneo (FUNASA, 1995; COLE, SULZER, PULSSELY, 1973).

Realizados com a finalidade de detectar anticorpos anti-*Leptospira* spp. para os sorovares Australis, Autumnalis, Bratislava, Djasiman, Hardjo, Tarasovi, Bataviae, Butembo, Copenhageni, Cynopteri, Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Sentot, Grippotyphosa, Panama, Pomona, Canicola, Patoc e Pyrogenes.

3 – Resultados e Discussão

Para *N. caninum*, observou-se uma prevalência de 19,4% de animais reagentes ao ELISA e, deste total, nenhum dos animais foram sororreagentes apenas para neosporose. Considerando *T. gondii*, 63,3% dos animais do rebanho estudado foram sororreagentes ao teste de ELISA, e deste total 51,6% eram positivos apenas para toxoplasmose (Tabelas 1 e 3).

Tabela 1: Incidência de neosporose, toxoplasmose e leptospirose em rebanho ovino com problemas reprodutivos, Uberlândia – MG, 2007

	Neosporose	Toxoplasmose	Leptospirose	Total
Animais	19	62	23	98
%	19,4	63,3	23,46	100

West et al (2006) ao pesquisarem rebanhos ovinos com histórico de abortos em ovelhas menores de um ano, detectaram que em dois destes rebanhos as ovelhas que sofreram aborto apresentaram-se significativamente mais prevalentes para *N. caninum* se comparadas àquelas que não abortaram. Hässig et al. (2003) em estudo realizado numa propriedade onde neosporose e toxoplasmose existiam concomitantemente, verificaram que os abortos causados por *N. caninum* aconteciam justamente em ovelhas que também reagiram sorologicamente contra *T. gondii*, mesmo a prevalência para toxoplasmose (97%) sendo maior que a

encontrada para neosporose (12,8%). Os dados relatados por estes autores demonstram a importância clínica da associação entre neosporose e toxoplasmose em ovelhas, como o encontrado neste trabalho.

Em levantamentos sorológicos mais recentes, feitos em ovinos no Brasil para detecção da neosporose, utilizando o método de Reação de Imunofluorescência Indireta, encontrou-se uma prevalência de 9,2% no oeste do estado de São Paulo (FIGLIUOLO et al., 2004), 9,5% no estado do Paraná (ROMANELLI et al., 2007), 7,4% no estado da Bahia (OTERO et al., 2003) e 3,2% no estado do Rio Grande do Sul (VOGEL, ARENHART, BAUERMANN, 2006). Helmick et al. (2002) em investigação sorológica para neosporose em ovelhas com histórico de aborto, encontraram apenas 4,24% dos animais reativos ao teste de ELISA.

A presença de cães, hospedeiros intermediários do *N. caninum*, é referida como fator de risco na prevalência deste agente nos rebanhos (ROMANELLI et al., 2007). Na propriedade onde se realizou este estudo foi verificada a presença de mais de 50 cães de caça, o que pode justificar a considerável prevalência de neosporose em ovinos.

No que se refere à prevalência de *T. gondii*, observou-se um maior número de ovinos sororreagentes neste trabalho (63,3%) quando comparado à inquéritos sorológicos já executados no Brasil. Mesmo que esta taxa varie em relação ao teste sorológico utilizado, à região e idade dos animais estudados (DUBEY, 1990), e considerando que estes levantamentos soroepidemiológicos não foram executados em propriedades com surtos reprodutivos. Larsson et al. (1980) encontraram 39,0% de positividade em ovinos abatidos no Rio Grande do Sul, já Pita Gondim et al. (1999) observaram 18,75% de ovinos positivos no estado da Bahia.

Figliuolo et al. (2004) no estado de São Paulo, e Romanelli et al. (2007) no estado do Paraná, ambos pelo método da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), encontraram as prevalências de 34,7%, 51,4%, respectivamente. E mesmo Clementino, Souza e Andrade Neto (2007) encontraram 29,41% de ovinos no estado do Rio Grande do Norte positivos para toxoplasmose no teste de ELISA, valor também menor que o encontrado neste estudo.

Helmick et al. (2002), ao analisarem 660 ovelhas com problemas de aborto no Reino Unido, encontraram apenas 3 (0,45%) animais positivos para *N. caninum* pelo

método da RIFI, e 167 (39,5%) para *T. gondii* pelo método de aglutinação em látex. As prevalências encontradas neste trabalho, para *N. caninum* e *T. gondii* foram notoriamente superiores àquelas relatadas por outros autores.

Tabela 2: Frequência de sorovares de *Leptospira* spp. detectados pelo SAM em rebanho ovino com problemas reprodutivos, Uberlândia – MG, 2007

Sorovares	Frequência	%
Australis	01	4,34
Bratislava	12	53,17
Djasiman	01	4,34
Grippotyphosa	06	26,08
Hardjo	02	8,69
Icterohaemorrhagiae	01	4,34
Panama	01	4,34
Wolffi	02	8,69

Após triagem dos 98 ovinos para *Leptospira* spp., 23 (23,46%) foram sororreagentes para oito diferentes sorovares: Australis, Bratislava, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Panama e Wolffi. As prevalências dentre os positivos para cada sorovar citado acima foram, respectivamente: 4,34%, 53,17%, 4,34%, 26,08%, 8,69%, 4,34%, 4,34% e 8,69% (Tabela 2). Dentre os que sororreagiram ao SAM, sete animais foram positivos apenas para leptospirose.

Considerando a proporção de animais sororreagentes para leptospirose, o valor encontrado neste estudo foi mais elevado que o descrito por Fávero et al. (2002) de 0,7% dos ovinos de diversos estados brasileiros, e menor que a prevalência, de 36,26% identificada em ovinos do Rio Grande do Sul, por Herrmann et al. (2004). Mesmo esses dois estudos sendo executados em propriedades sem relatos prévios de perdas reprodutivas, notou-se uma variação muito grande entre as suas prevalências. Isso evidencia o diferenciado comportamento da leptospirose em cada região estudada ou mesmo a resposta que as diferentes metodologias de amostragem possam induzir.

As altas incidências para os sorovares Bratislava e Grippotyphosa encontradas neste estudo não são usualmente relatadas por outros autores. Vasconcellos (1997) identificou o sorovar Hardjo como o mais freqüente no Brasil,

enquanto Herrmann et al. (2004) encontraram Hardjo como o sorovar mais prevalente em ovinos no estado do Rio Grande do Sul.

Em inquérito sorológico executado por Fávero et al. (2002), em diversos estados brasileiros, os sorovares *Icterohaemorrhagiae*, Butembo, Castellonis e Hebdomadis foram os mais prevalentes em ovinos. Porém, referindo-se aos sorovares mais comumente isolados em ovinos, tem-se *Grippytyphosa* (ELLIS, 1983), segundo mais freqüente no presente trabalho, juntamente a Hardjo e Pomona. A alta prevalência de Bratislava pode ser explicada pelo convívio próximo destes ovinos com outras espécies animais na propriedade, como cães, bovinos, caprinos e eqüinos.

De todo rebanho estudado, 5 ovinos (5,1%) foram sororreagentes aos 3 agentes etiológicos. Quando considerada a resposta para dois agentes tem-se: 11,22% para leptospirose associada a toxoplasmose, 14,28% para toxoplasmose e neosporose e nenhum para leptospirose e neosporose (Tabela 3). Tais combinações de animais reagentes para mais de um agente etiológico discordam do que Howe et al. (2008) relataram. Estes autores não encontram nenhum animal sorologicamente positivo ao mesmo tempo para neosporose, toxoplasmose e leptospirose, sendo que dos 67 ovinos estudados, 19 foram positivos somente ao teste sorológico de neosporose.

Tabela 3: Ocorrência de animais soropositivos para dois ou mais agentes etiológicos em rebanho ovino com problemas reprodutivos, Uberlândia – MG, 2007

Combinação	<i>Leptospira</i> spp. %	<i>T. gondii</i> %	<i>N. caninum</i> %	Total %
<i>Leptospira</i> spp./ <i>T. gondii</i>	47,82	17,74	--	11,22
<i>Leptospira</i> spp. / <i>N. caninum</i>	00	--	00	00
<i>T. gondii</i> / <i>N. caninum</i>	--	22,58	73,68	14,28
<i>Leptospira</i> spp. / <i>N. caninum</i> / <i>T. gondii</i>	21,74	08,06	26,31	5,1

A soroprevalência para *T. gondii* foi a maior em todo rebanho e, dentre os animais que responderam sorologicamente a esse agente, 17,74% também eram positivos ao teste de SAM para leptospirose e 22,58% reagiram ao teste-diagnóstico de neosporose, o que totaliza 14 dos 19 animais positivos para *N. caninum* (Tabela 3). Romanelli et al (2007) encontraram apenas 5,2% dos ovinos estudados positivos

tanto para *N. caninum* quanto para *T. gondii*, dado que é superado pela ocorrência encontrada neste estudo para os dois coccídeos (14,28%).

Sabendo-se das baixas prevalências anteriormente relatadas em ovinos para neosporose (HELMICK et al., 2002; FIGLIUOLO et al., 2004; ROMANELLI et al., 2007), do fato desse pequeno ruminante ser menos susceptível à Leptospirose (CICERONI et al., 2000), e do pequeno número de animais, dentre os expostos ao *T. gondii*, que realmente apresentam sintomas de aborto (WATSON, BEVERLEY, 1971; WALDELAND, 1977). Pode-se afirmar que o expressivo número de animais sororreagentes a mais de um agente infeccioso, e da combinação entre os mesmos, justifica os relatos de perdas reprodutivas nos ovinos da propriedade estudada. Sugere-se que, diante de um rebanho ovino com problemas reprodutivos (aborto, repetição de cio, retenção de placenta, nascimento de cordeiros fracos e natimortos), a ocorrência de neosporose, toxoplasmose e leptospirose devem ser investigadas.

4 – Conclusão

Neste rebanho ovino com problemas reprodutivos no município de Uberlândia, MG, Brasil, atestou-se as consideráveis prevalências de 30,6%, 63,3% e 23,46% para *N. caninum*, *T. gondii* e *Leptospira* spp., respectivamente. Desta forma ficou evidenciada a importância epidemiológica dessas doenças, e da combinação das mesmas como causadoras de distúrbios reprodutivos em ovinos.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A., *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012, 2009.
- ALMEIDA, M.A.O. Epidemiologia de *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p.34-40, 2004.

BIELSA, J.M.; ROMERO, J.J.; HEUER, C. Controle de neosporose em bovinos com Bovilis® Neoguard: A experiência de campo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p.34-37, 2004.

BRITO, J.L.S.; PRUDENTE, T.D. Mapeamento do uso de terra e cobertura vegetal do município de Uberlândia – MG, utilizando imagens ccd/cbers 2. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v.13, n.15, p.144-153, 2005.

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

CLEMENTINO, M.M.; SOUZA, M.F.; ANDRADE NETO, V.F. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.199–203, 2007.

COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PULSSELY, P.R. Improved Microtechnique for de Leptospiral Microscopic Agglutination. **Applied Microbiology**, v.25, n.06, p.976-980, 1973.

COSTA, G.H.M.; CABRAL, D.D.; VARADAS, N.P.; SOBRAL, E.A.; BORGES, F.A.; CASTAGNOLLI, K.L. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina**, Londrina, v.22, p.57-62, 2001.

DUBEY, J.P. Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.196, p.259–262, 1990.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.192, p.01-59, 1996.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.67, p.1-59, 1996.

ELLIS, W.A.; BRYSON, D.G.; NEILL, S.D.; MCPARLAND, P.J.; MALONE, F.E. Possible involvement of leptospirases in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. **Veterinary Record**, v.112, p.291–293, 1983.

FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, F.; FERREIRA NETO, J. S. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.613-619, 2002.

FIGLIUOLO, L.P.C.; KASAI, N.; RAGOZO, A.M.A.; DE PAULA, V.S.O.; DIAS, R.A.; SOUZA, S.L.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.161–166, 2004.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3ª ed. São Paulo: Ícone, 1997.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de Leptospirose**. 2ª ed. Brasília, 1995. 98p.

GENNARI, S.M. *Neospora caninum* no Brasil: Situação atual da pesquisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p.23-28, 2004.

HÄSSIG, M.; SAGER, H.; REITT, K.; ZIEGLER, D.; STRABEL, D.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. **Veterinary Parasitology**, v.107, p.213-220, 2003.

HELMICK, B.; OTTER, A.; MCGARRY, J.; BUXTON, D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. **Research in Veterinary Science**, v.73, p.187–189, 2002.

HERRMANN, G.H.; LAGE, A.P.; MOREIRA, C.E.; HADDAD, J.P.A.; RESENDE, J.R.; RODRIGUES, R.O.; LEITE, R.C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira spp.* em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p. 443-448, 2004.

HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; MORAES, Z.M. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia Oriental Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.02, p.173-180, 2001.

HOWE, L.; WEST, D.M.; COLLET, M.G.; TATTERSFIELD, G.; PATTISON, R.S.; POMROY, W.E.; KENYON, P.R.; MORRIS, S.T.; WILLIAMSON, N.B. The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.75, p.115-122, 2008.

KOBAYASHI, Y.; YAMADA, M.; OMATA, Y.; KOYAMA, T.; SAITO, A.; MATSUDA, T.; OKUYAMA, K.; FUJIMOTO, S.; FURUOKA, H.; MATSUI, T. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in na adult sheep and her twin fetuses. **Journal Parasitology**, v.87, p.434–4336, 2001.

KRIEG, N. R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 62-67, 1986.

LARSSON, C.E.; JAMRA, L.M.F.; GUIMARÃES, E.C.; PATTOLI, D.B.G.; SILVA, H.L.L. Prevalência de toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais Uruguaianas, RS, Brasil. **Revista Saúde Pública** v.14, p.582–588, 1980.

OTERO, A.R.S.; UZÊDA, R.S.; JUNQUILLO, A.B.; SALES, T.S.; JESUS, E.E.V.; SILVA, V.M.G.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O. Antígenos de taquizoítos da cepa NC-Bahia de *Neospora caninum* reconhecidos por anticorpos IgG de ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 5, 2003, Salvador, BA. **Anais. Salvador: Associação Brasileira de Buiatria**, p.58, 2003.

PATITUCCI, A.N.; PEREZ, M.J.; LUDERS, C.F.; RATTO, M.H.; DUMONT, A.G. Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en rebaños lecheros del Sur de Chile. **Archivo Medicina Veterinária**, v.31, n.2, p.215-218, 1999.

PITA GONDIM, L.F.; BARBOSA JR., H.V.; RIBEIRO FILHO, C.H.A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.273–276, 1999.

ROMANELLI, P.R.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M.; OGAWA, L.; DE PAULA, V.S.O.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 202–207, 2007.

SILVA, A. V. da.; CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, p.115-119, fevereiro, 2003.

SILVA, D.A.; LOBATO, J.; MINEO T.W.; MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**. v.143, p.234-44, 2007.

VASCONCELLOS S.A. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de

janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. Período de Janeiro a Abril de 1996. **Arquivos do Instituto biológico de São Paulo**, São Paulo, v.64, n.2, p.7-15, 1997.

VOGEL, F.S.; ARENHART, S.; BAUERMANN, F.V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1948-1951, nov-dez, 2006.

WALDELAND, H. Toxoplasmosis in sheep, long-term epidemiological studies in four breeding flocks. **Acta Veterinary Scandinavian**. v.18, p.227– 236, 1977.

WATSON, W.; BEVERLEY, J.K. Ovine abortion due to experimental toxoplasmosis. **Veterinary Record** , v.88, p.42–45, 1971.

WEST, D.M.; POMROY, W.E.; COLLET, M.G.; HILL, F.I.; RIDLER, A.L.; KENYON, P.R.; MORRIS, S.T.; PATTISON, R.S. A possible role for *Neospora caninum* in ovine abortion in New Zealand. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.62, p.135-138, 2006.

CAPÍTULO 3

Monitoramento Soroepidemiológico de Leptospirose em Rebanho Ovino com Relatos de Perdas Reprodutivas do Município de Uberlândia, MG, Brasil

RESUMO - Objetivou-se monitorar a soroprevalência para *Leptospira* spp. e seus sorovares num rebanho ovino com perdas reprodutivas de uma propriedade no município de Uberlândia, MG, entre outubro de 2007 e agosto de 2008. As colheitas de sangue de ovinos foram realizadas num intervalo de 10 meses, totalizando 98 animais na primeira e 101 na segunda colheita. As amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao teste de Soroaglutinação Microscópica para detectar anticorpos anti-*Leptospira* spp. A maior prevalência para *Leptospira* spp. ocorreu à época do aparecimento dos surtos reprodutivos (23,00%) tendendo a queda dez meses após a primeira colheita (13,86%). Os sorovares mais prevalentes foram Bratislava e Grippotyphosa, Australis e Wolffi na primeira e segunda colheita, respectivamente. Acredita-se que os ovinos são importantes mantenedores de *Leptospira* spp. no ambiente.

Palavras-chave: aborto, *Leptospira* spp, prevalência, soroaglutinação microscópica, sorovares

1 – Introdução

Os ovinos são os animais domésticos considerados menos susceptíveis à leptospirose, porém sofrem a infecção das leptospiros patogênicas e, em muitos casos, a evolução é assintomática. Às vezes ocorrerem surtos da doença com casos de abortos e morte de cordeiros. A leptospirose pode manifestar-se de forma aguda, subaguda e crônica, caracterizando-se por quadros clínicos de septicemia,

hemorragia, nefrite, seguida por icterícia, hemoglobinúria, mastite sanguinolenta, retorno ao cio, aborto nas ovelhas e anemia hemolítica nos cordeiros com morte na primeira semana de vida (CICERONI et al., 2000). Quando a leptospirose é diagnosticada de forma precoce, muitas perdas por aborto podem ser evitadas (SAGLAM et al., 2007).

Ovinos podem adquirir a doença pela urina contaminada de roedores, bovinos, ou outras espécies animais de exploração pecuária. O isolamento de *L. interrogans* sorovar Hardjo (BAHAMAN et al., 1980, ELLIS et al. 1983; COUSINS et al., 1989; GERRITSEN et al., 1994), e *L. borgpetersenii* sorovar Javanica (NATARAJASEENIVASAN, RATNAM, 1999), indica que essa espécie hospedeira pode atuar como um importante reservatório disseminando leptospirosas para outras espécies e para os seres humanos. Os sorovares Pomona, Hardjo e Grippotyphosa foram os mais comumente isolados em ovinos (ELLIS et al., 1983; BULU et al., 1990; MAXIE, 1993).

Hardjo é a sorovariedade mais freqüente em todo o mundo, portanto a maior causadora de problemas reprodutivos em ovelhas e de morte de cordeiros. Além dessa sorovariedade, também têm sido descritos outros sorovares, porém com menor freqüência, podendo ser destacada a presença dos sorovares Pomona, Ballum, Bratislava, e Grippotyphosa (ELLIS, 1983). Viegas (1985) identificou também a predominância dos sorovares Autumnalis e Javanica, e Fávero et al. (2002) elucidaram a importância das sorovariedades Icterohaemorrhagiae, Butembo, Castellonis e Hebdomadis.

Objetivou-se monitorar a soroprevalência para *Leptospira* spp., e seus sorovares, num rebanho ovino com perdas reprodutivas de uma propriedade no município de Uberlândia, MG, entre outubro de 2007 e agosto de 2008.

2. Material e Métodos

2.1 – Local

Este estudo foi realizado em propriedade rural inserida no Bioma Cerrado, numa região de Clima Tropical com duas estações bem definidas: verão quente e chuvoso, e inverno seco, localizada no Município de Uberlândia, Minas Gerais. Apresenta pluviosidade média anual de 1500 mm e temperatura média de 22° C (BRITO, PRUDENTE, 2005).

A propriedade tem diversificação da produção pecuária, entre elas bovinocultura de corte e leite, ovinocultura e caprinocultura de corte. Todas as atividades eram realizadas em conjunto e em sistema extensivo de produção. Também coabitavam na propriedade eqüinos para manejo rotineiro da fazenda, e existiam aproximadamente 50 cães de caça. O rebanho ovino era o maior dentre as espécies ali existentes, sendo relatados eventos de prejuízos reprodutivos, como aborto e repetição de cio.

2.2 – Colheitas de sangue de ovinos

As colheitas de sangue foram executadas por venopunção asséptica da veia jugular. Realizaram-se duas colheitas num intervalo de 10 meses entre as mesmas. A primeira na fase crítica dos relatos de perdas reprodutivas, no mês de outubro de 2007, e a segunda no mês de agosto do ano de 2008.

2.3 – Animais

O rebanho estudado era composto de ovinos da raça Santa Inês e mestiços desta raça com indeterminado grau de sangue. Buscou-se utilizar animais acima dos 120 dias de idade, para evitar os que ainda apresentavam anticorpos colostrais

circulantes, pelo método de amostragem não probabilística por julgamento especializado (GRESSLER, 2004), e que fossem fêmeas de reposição, matrizes e reprodutores. Totalizaram 98 e 101 animais na primeira e segunda colheita, respectivamente.

2.4 – Exames Sorológicos

Foram realizados com a finalidade de detectar anticorpos anti-*Leptospira* spp. para os sorovares Australis, Autumnalis, Bratislava, Djasiman, Tarasovi, Bataviae, Butembo, Copenhageni, Cynopteri, Wolffii, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Sentot, Grippotyphosa, Panama, Pomona, Canicola, Patoc e Pyrogenes. Foi utilizado o método de Soroaglutinação Microscópica, padronizou-se positivo maior ou igual a 50% de aglutinação de antígenos por campo a uma diluição de 1:100 do soro sangüíneo (FUNASA, 1995; COLE, SULZER, PULSSELY, 1973).

3 – Resultados e Discussão

Na primeira triagem, realizada no mês de outubro de 2007, dos 98 animais analisados, 23 foram sororreagentes para *Leptospira* spp. Os sorovares detectados, em ordem decrescente de prevalência, foram: Bratislava (53,17%), Grippotyphosa (26,08%), Hardjo (8,69%), Wolffii (8,69%), Australis (4,34%), Djasiman (4,34%), Icterohaemorrhagiae (4,34%) e Panama (4,34%).

Na colheita do mês de agosto de 2008, dos 101 ovinos examinados, 14 foram sororreagentes para *Leptospira* spp. Os sorovares detectados foram apenas três, Australis (71,43%), Wolffii (21,43%) e Bratislava (12,5%) (Tabela 01).

Tabela 01: Prevalência para *Leptospira* spp. em rebanho ovino com relatos de perdas reprodutivas, Uberlândia, MG, outubro de 2007

Colheitas	Animais positivos	%	Total
10/2007	23	23,46	98
08/2007	14	13,86	101

Tendo em vista a persistência e a continuidade, num período de dez meses, de resultados sorológicos positivos para leptospirose dentro de um mesmo rebanho ovino, pode-se acreditar que a manutenção da *Leptospira* spp. no ambiente se deve a presença desses animais reagentes, mesmo não sendo realizada a identificação do agente, seja por PCR ou isolamento (JORI et al., 2008). Assim sendo, os ovinos positivos ao SAM representam risco de contaminação para outras espécies animais e o homem.

Sabe-se que a maioria dos abates de ovinos na região do triângulo mineiro, no estado de Minas Gerais, se dá de forma artesanal, devido ao fato da cadeia produtiva da ovinocultura ainda não estar completamente organizada. Isso torna os ovinos uma espécie de importante papel epidemiológico na leptospirose humana. Principalmente por que a infecção também pode ocorrer pelo contato com sangue e tecidos de animais infectados durante o processamento artesanal da carne e até mesmo no manejo diário pelos tratadores, criadores e médicos veterinários (LEAL-CASTELLANOS et al., 2003; SLACK et al., 2006).

Considerando a proporção de animais sororreagentes para leptospirose, os valores encontrados nas duas colheitas foram mais elevados que os descritos por Fávero et al. (2002), que foi de 0,7% em ovinos de diversos estados brasileiros. E foi menor que a prevalência identificada em ovinos do Rio Grande do Sul, de 36,26%, por Herrmann et al. (2004). Mesmo esses dois estudos sendo executados em propriedades sem relatos prévios de perdas reprodutivas, notou-se uma grande variação entre as prevalências dos mesmos. Isso evidencia o comportamento da leptospirose em cada região, ou a diferença entre metodologias de amostragem empregadas.

As altas prevalências para os sorovares Bratislava e Grippotyphosa registradas em outubro de 2007, e Australis e Wolffi em agosto de 2008, não foram relatadas por outros autores. Vasconcellos (1997) identificou o sorovar Hardjo como o mais freqüente nos diversos animais de produção no Brasil. Fávero et al. (2002) detectaram os sorovares Icterohaemorrhagiae, Butembo, Castellonis e Hebdomadis em ovinos, porém Herrmann et al. (2004) encontraram Hardjo como sorovar mais prevalente.

Quando comparados os resultados das duas colheitas observou-se: na segunda triagem que oito novos ovinos se tornaram sororreagentes à *Leptospira* spp.; dos 23 animais positivos na primeira triagem, somente seis repetiram a soropositividade, cinco morreram de causas indeterminadas, e 11 passaram a não ser mais sororreagentes ao SAM. A prevalência dos sorovares Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Panama reduziu-se a zero na coleta de agosto de 2008, enquanto a de Bratislava decresceu de 53,17% para 12,5%, e Australis e Wolffi apresentaram uma elevação em suas prevalências, com 71,43% e 21,43%, respectivamente (Tabela 02).

Tabela 02: Prevalência de sorovares de *Leptospira* spp. em ovinos com relatos de perdas reprodutivas, nas diferentes coletas, Uberlândia, MG, 2007-2008

Colheitas	Sorovares* (%)							
	B	G	W	H	I	P	D	A
10/2007	53,17	26,08	8,7	8,69	4,34	4,34	4,34	4,34
08/2009	12,5	0,00	21,4	0,00	0,00	0,00	0,00	71,43

* B= Bratislava, G = Grippotyphosa, W = Wolffi, H = Hardjo, I = Icterohaemorrhagiae, P = Panama, D = Djasiman, A = Australis,

Jori et al. (2008) monitorando a soroprevalência de leptospirose em queixadas (*Tayassu tajacu*) num intervalo de 27 meses, similarmente ao encontrado neste estudo, identificaram uma queda na porcentagem de animais positivos na segunda colheita em relação à primeira, e uma queda de seis (Iquitos, Australis, Hebdomadis, Autumnalis, Tarassovi e Ballum) para cinco sorovares (Cynoptery, Iquitos, Icterohaemorrhagiae, Australis e Tarassovi) encontrados no rebanho. Identificou também uma elevação na prevalência de dois sorovares, assim como o aferido no presente estudo para os sorovares Australis e Wolffi.

Dos seis ovinos que reagiram positivamente ao SAM tanto na primeira quanto na segunda colheita, apenas dois continuaram persistindo na resposta para o mesmo sorovar. Um para o sorovar Wolffi, e outro que era positivo apenas para Bratislava na primeira triagem e se tornou sororreagente também para Australis na segunda triagem. Os demais indivíduos reagiram para novos sorovares. Três ovinos, anteriormente positivos para Bratislava, se tornaram sororreagentes para Australis; e

um, que reagia na colheita de outubro de 2007 para os sorovares Hardjo e Wolffi, passou a reagir somente para Australis na segunda triagem.

Anticorpos contra *Leptospira* spp. aparecem poucos dias após o contato do hospedeiro com o agente, persistem por semanas ou meses, e desaparecem se não houver mais o contato com o antígeno (OIE, 2000), sendo que a imunidade adquirida para leptospirose é de curta duração (BOQVIST, HO THI, MAGNUSSON, 2005), tais fatos explicam a variação das prevalências entre os sorovares nas duas colheitas, principalmente para animais que passaram a não mais reagir ao SAM.

A persistência de animais reagentes ao mesmo sorovar indica que houve contato contínuo do agente com os ovinos, ou que o portador renal, logo que apresentou níveis decrescentes de anticorpos circulantes, possibilitou uma nova bacteremia e conseqüente aumento nos níveis de anticorpos (ANDRÉ FONTAINE, GARNIERE, 1990; ELLIS, 1994).

O aparecimento de novos animais sororreagentes, e o incremento das porcentagens de prevalência para os sorovares Australis e Wolffi, indicam a exposição freqüente dos ovinos aos sorovares circulantes no ambiente, mantidos possivelmente por outras espécies animais, como os caprinos, bovinos, cães, eqüinos existentes na propriedade estudada (MOREIRA et al., 2009).

O monitoramento da soroprevalência para *Leptospira* spp. em um rebanho ovino com distúrbios reprodutivos desse estudo demonstrou claramente que esta bactéria, quando presente em um rebanho ovino, apresenta-se com mais de um sorovar. Ainda é possível verificar que estes sorovares se mantêm quando há o convívio com outros animais.

4 - Conclusão

Os ovinos de uma propriedade com problemas reprodutivos no município de Uberlândia, MG, Brasil, estavam infectados por *Leptospira* spp. A maior prevalência para *Leptospira* spp. ocorreu à época do aparecimento dos surtos reprodutivos (23%) tendendo a queda dez meses após a primeira colheita (13,86%). Os sorovares mais detectados foram Bratislava e Grippotyphosa, Australis e Wolffi na

primeira e segunda colheita, respectivamente. Acredita-se que os ovinos são importantes mantenedores de *Leptospira* spp. no ambiente.

REFERÊNCIAS

ANDRÉ FONTAINE, G.; GANIÉRE, J.P. New topics on leptospirosis. **Comparative Immunology Microbiology of Infectious Diseases**. v.13, n.3, p.163-168, 1990.

BAHAMAN, A.R.; MARSHALL, R.B.; BLACKMORE, D.K.; HATHAWAY, S.W. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar hardjo from sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 28, p. 78-63, 1980.

BOQVIST, S.; HO THI, V.T.; MAGNUSSON, U. Annual variations in *Leptospira* seroprevalence among sows in Southern Vietnam. **Tropical Animal Health and Production**, v.37, p.443–449, 2005.

BRITO, J.L.S.; PRUDENTE, T.D. Mapeamento do uso de terra e cobertura vegetal do município de Uberlândia – MG, utilizando imagens ccd/cbers 2. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v.13, n.15, p.144-153, 2005.

BULU, A.A.; DORTERLER, R.; OZKAN, O.; HASTURK, F. The studies on the spreading and serotype of leptospirosis occurrences in cattle and sheep in some cities of the East Anatolia (Kars, Artvin, Gümüşhane, Erzurum). **Journal Etlik Veterinary Microbioly**. v.6, p.49–60, 1990.

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

COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PULSSELY, P.R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. **Applied Microbiology**, v.25, n.06, p.976-980, 1973.

COUSINS, D.V.; ELLIS, T.M.; PARKINSON, J.; MCGLASHAN, C.H. Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Veterinary Record**, v.124, p.123–124, 1989.

ELLIS, W.A.; BRYSON, D.G.; NEILL, S.D.; MCPARLAND, P.J.; MALONE, F.E. Possible involvement of leptospire in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. **Veterinary Record**, v.112, p.291–293, 1983.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n.3, p.463-478, 1994.

FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, F.; FERREIRA NETO, J. S. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.613-619, 2002.

FUNASA (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE). **Manual de Leptospirose**. 2^a ed. Brasília, 1995. 98p.

GERRITSEN, M.J.; KOOPMANS, M.J.; PETERSE, D.; OLYHOEK, T. Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, p.1232–1237, 1984.

GRESSLER, L.A. **Introdução a pesquisa: projetos e relatórios**. Loyola, São Paulo, 295p., 2004.

HERRMANN, G.H.; LAGE, A.P.; MOREIRA, C.E.; HADDAD, J.P.A.; RESENDE, J.R.; RODRIGUES, R.O.; LEITE, R.C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira spp.* em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p. 443-448, 2004.

JORI, F.; GALVEZ, H.; MENDOZA, P.; CESPEDES, M.; MAYOR, P. Monitoring of leptospirosis seroprevalence in a colony of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) from the Peruvian Amazon. **Research in Veterinary Science**. doi:10.1016/j.rvsc.2008.09.009, 2008.

LEAL-CASTELLANOS, C.B.; GARCIA-SUAREZ, R.; GONZALEZ-FIGUEROA, E.; FUENTES-ALLEN, J.L.; ESCOBEDO-DE LA PENA, J. Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. **Epidemiology and Infection**, v.131, p.1149–1156, 2003.

MAXIE, M.G., 1993. The urinary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. (Eds.), *Pathology of Domestic Animals*, , **Academic Press**, San Diego, v. 2, ed.4, 1993.

MOREIRA, R.Q.; SOUZA, M.A.; CASTRO, J.R.; SALABERRY, S.S.R.; SANTOS, F.A.A.; NAVES, J.H.F.F.; CARREON, S.S.; PRUDENCIO, C.R.; CARDOSO, R.; GOULART FILHO, L.R.; LIMA-RIBEIRO, A.M.C. Intertransmission of leptospirosis in bovine, canine, goats, horses and sheep in one farm with losses in reproductive efficiency. In: Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine, 10, 2009, Lübeck, Alemanha. **Anais. Lübeck: Sociedade de Medicina Veterinária Tropical**, p.109, 2009.

NATARAJASEENIVASAN, K.; RATNAM, S. Isolation of *Leptospira Javanica* from sheep. **Indian Journal Animal Science**, v.69, p.759–761, 1999.

OIE, 2000. Leptospirosis. In: *OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. Office International des Epizooties, Paris, p. 265–275.

SAGLAM, Y. S.; YENER, Z.; TEMUR, A.; YALCIN, E. Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. **Small Ruminant Research**. Res. doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.04.006, 2007.

SLACK, A.T.; SYMONDS, M.L.; DOHNT, M.F.; SMYTHE, L.D. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar arborea in Queensland, Australia, 1998–2004. **Epidemiology and Infection**, v.134, p, 1217–1225, 2006.

VASCONCELLOS S.A. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. Período de Janeiro a Abril de 1996. **Arquivos do Instituto biológico de São Paulo**, v.64, n.2, p.7-15, 1997.

VIEGAS, E. A. **Estudo de novos sorotipos de leptospiros apatogênicas na prova de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose caprina e ovina**. São Paulo, 1985. 63p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1985.

CAPÍTULO 4

Perfil de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos vacinados com bacterinas comercial e autógena

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi aferir o perfil de aglutininas induzidos pela soroconversão de duas bacterinas polivalentes, sendo uma comercial e outra autógena, frente aos sorovares mais freqüentes em ovinos de um rebanho com relatos de perdas reprodutivas no município de Uberlândia, Minas Gerais. Cinquenta e nove ovinos foram divididos em seis grupos experimentais, sendo eles: positivos ao teste de soroaglutinação microscópica (SAM) imunizados com vacina comercial (grupo I) e autógena (grupo III), negativos ao SAM e imunizados com vacina comercial (grupo II) e autógena (grupo IV), um grupo de animais positivos aos SAM e não vacinados (V) e outro de negativos ao SAM e não vacinados (grupo VI). Os níveis de aglutininas foram avaliados utilizando SAM com antígenos vivos, e os títulos de anticorpos foram alcançados com uma série de diluições na razão de dois (1:100; 1:200; 1:400; 1:800, 1:1600; 1:3200). A resposta vacinal obtida com a utilização das duas bacterinas mostrou-se heterogênea na proporção de animais reagentes e níveis de anticorpos aglutinantes frente aos sorovares incluídos na formulação das vacinas. Títulos maiores alcançados foram contra Harjo e Wollfi em diluições de 1:200. A faixa de melhor soroconversão ocorreu entre os 30 e 120 dias pós primo vacinação. O sorovar Icterohaemorrhagiae apresentou-se com melhor soroconversão em animais positivos não vacinados, o que indica reinfecção dos mesmos para este sorovar.

Palavras-chave: imunização, resposta vacinal, soroconversão, sorovares, títulos de anticorpos

1 – Introdução

Dentre os sorovares, Hardjo é o mais freqüente em todo o mundo, portanto a maior causadora de problemas reprodutivos em ovelhas e de morte de cordeiros. Além dessa sorovariedade, também têm sido descritos outros sorovares, porém com menor freqüência, podendo ser destacada a presença dos sorovares Pomona, Ballum, Bratislava, e Grippotyphosa (ELLIS et al., 1983). Viegas (1985) identificou também a predominância dos sorovares Autumnalis e Javanica, e Fávero et al (2002) elucidou a importância das sorovariedades Icterohaemorrhagiae, Butembo, Castellonis e Hebdomadis.

No Brasil, inquéritos sorológicos feitos por Viegas (1980); Ellis (1994); Viegas et al. (1994) e Caldas et al. (1997/98) em ovinos e Vasconcellos et al. (1997) em bovinos, demonstraram a distribuição de *Leptospira* spp. em vários estados brasileiros. No Estado do Rio Grande do Sul, onde a criação de bovinos e ovinos é comum nos mesmos pastos e aguadas, a infecção por *Leptospira* spp. provavelmente está estabelecida nos rebanhos (HERRMANN et al., 2004).

O controle da leptospirose, nos animais domésticos depende de um correto diagnóstico, tratamento apropriado, da implantação de medidas de manejo, controle de roedores sinantrópicos (KINGSCOTE, PROULX, 1986; HODGES, DAY, 1987; BOLIN, ALT, 1999), eliminação do excesso de água estagnada no ambiente, e a imunização sistemática do rebanho (GUIMARÃES, CÔRTEZ, VASCONCELOS, 1982/1983; MOREIRA, 1994).

As vacinas comumente disponíveis no comércio para a profilaxia da leptospirose são produzidas a partir de culturas bacterianas totais inativadas (bacterinas) (LANGONI, DEL FAVA, CABRAL, 1999), cuja eficácia aumenta com a incorporação de substâncias adjuvantes ao antígeno (HANSON, 1997). Em geral, o uso de vacinas contra leptospirose reduz a ocorrência da infecção, a severidade dos sinais clínicos, os problemas reprodutivos (BOLIN, THIERMANN, HANDSAKER, 1989) e o impacto econômico da doença (SULLIVAN, 1974).

Animais de produção precisam ser submetidos à aplicação de bacterinas com mais de cinco sorovares devido a variações das condições epidemiológicas e consequentemente dos sorovares de cada região (STRINGFELLOW et al., 1983).

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. Salientando assim, a importância do desenvolvimento de bacterinas que contemplem os sorovares endêmicos de cada região, levando a uma imunização mais eficaz.

Tendo em vista esse aspecto, a relevância da leptospirose nos contextos econômicos e de saúde pública e a escassez de estudos desta doença em ovinos é que se fundamenta este trabalho. O objetivo desta pesquisa foi, portanto, de aferir o perfil de aglutininas induzidos pela soroconversão de duas bacterinas polivalentes, sendo uma comercial e outra autógena, frente aos sorovares mais freqüentes em ovinos de um rebanho com relatos de perdas reprodutivas no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

2 – Material e Métodos

2.1 – Local

Este estudo foi realizado em propriedade rural inserida no Bioma Cerrado, numa região de Clima Tropical com duas estações bem definidas: verão quente e chuvoso, e inverno seco, localizada no Município de Uberlândia, Minas Gerais. Apresenta pluviosidade média anual de 1500 mm e temperatura média de 22° C (BRITO, PRUDENTE, 2005).

2.2 - Títulos de anticorpos aglutinantes

Os níveis de aglutininas anti-*Leptospira* spp. foram avaliados utilizando-se a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos, conforme critério recomendado pela Fundação Nacional de Saúde - Brasil (1995), para os seguintes sorovares: Australis, Autumnalis, Bratislava, Djasiman, Tarassovi,

Bataviae, Butembo, Copenhageni, Cynopteri, Wolffii, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Sentot, Grippotyphosa, Panama, Pomona, Canicola, Patoc e Pyrogenes. Foram considerados reagentes os animais que apresentaram títulos $\geq 1:100$, os quais sofreram uma série de diluições geométricas de razão dois (1:200; 1:400; 1:800, 1:1600; 1:3200) (FUNASA, 1995; COLE, SULZER, PULSSELY, 1973).

2.3 – Triagem dos ovinos frente ao teste de soroaglutinação microscópica

Foram realizadas duas triagens na propriedade, uma primeira com a finalidade de identificar os sorovares endêmicos, possibilitando a elaboração da bacterina autógena (Figura 1); e uma segunda, anterior ao esquema de vacinação, buscando identificar quais animais eram sororreagentes para *Leptospira* spp. (Figura 2). Assim foi possível dividir os ovinos em grupos experimentais.

Na primeira colheita 23 ovinos foram sororreagentes contra *Leptospira* spp. Os sorovares encontrados, em ordem decrescente de prevalência, foram: Bratislava (53,17%), Grippotyphosa (26,08%), Hardjo (8,69%), Wolffii (8,69%), Australis (4,34%), Djasiman (4,34%), Icterohaemorrhagiae (4,34%) e Panama (4,34%).

Na segunda triagem observou-se uma prevalência de 13,86% (14 ovinos) de um total de 101 ovinos, apresentando os seguintes sorovares em ordem decrescente de frequência: Australis (71,43%), Wolffii (21,43%) e Bratislava (12,5%). Do total de soropositivos, os ovinos foram escolhidos aleatoriamente, sendo cinco para o grupo I, cinco para o grupo III e quatro para o grupo V. Para os demais grupos (II, IV, VI) escolheu-se também aleatoriamente 15 animais negativos ao SAM tanto na primeira quanto na segunda triagem (Figura 2).

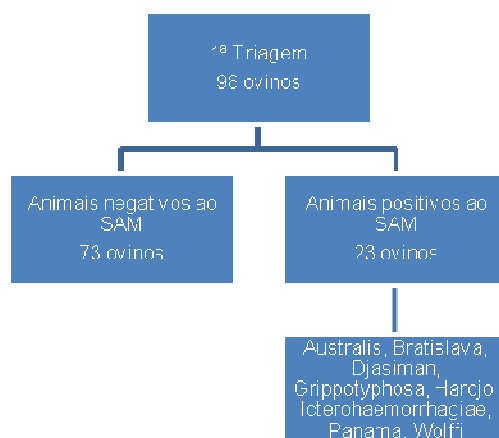


Figura 1: Esquematisação da primeira triagem de ovinos e identificação dos sorovares prevalentes no rebanho

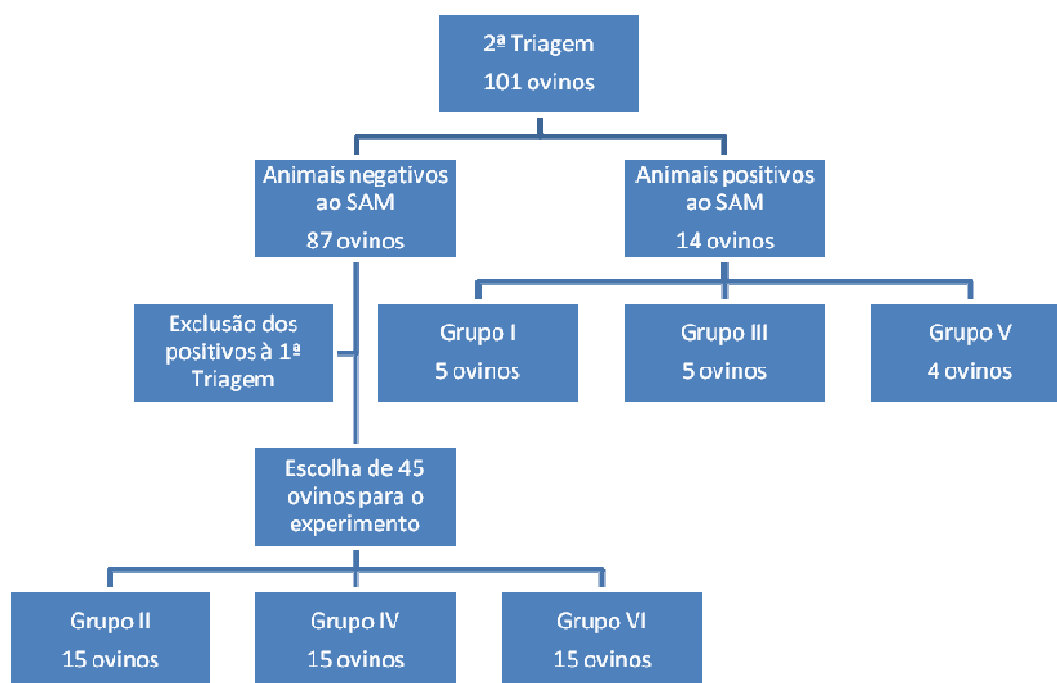


Figura 2: Esquematisação da segunda triagem de ovinos (dia 0) para divisão do rebanho em grupos experimentais

2.4 – Bacterinas

Foram utilizadas duas bacterinas polivalentes de bactérias mortas e completas, uma comercial e outra autógena. A primeira foi uma bacterina facilmente encontrada no comércio e adquirida diretamente de seu distribuidor na cidade de Uberlândia, MG. Nela estava presente os sorovares Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Grippotyphosa e Wolffi.

A bacterina autógena, produzida em laboratório particular, era composta por sorovares detectados no rebanho, por exame sorológico, em uma primeira triagem. Os sorovares foram Australis, Bratislava, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Panama e Wolffi. Foi necessário solicitar ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorização para fabricação desta, uma vez que está proibida no Brasil.

2.5 – Vacinação

Os grupos I e II foram imunizados com bacterina comercial, os grupos III e IV com bacterina autógena, e os grupos V e VI aplicou-se soro fisiológico, ambos num volume de 3 mL por animal, em duas etapas, por via subcutânea. A primeira dose, ou primo-vacinação, aplicada no dia 0, e uma segunda dose 30 dias após a primo-vacinação (Figura 3). A primeira imunização foi realizada no mês de setembro de 2008, sendo a segunda dose aplicada 30 dias depois.

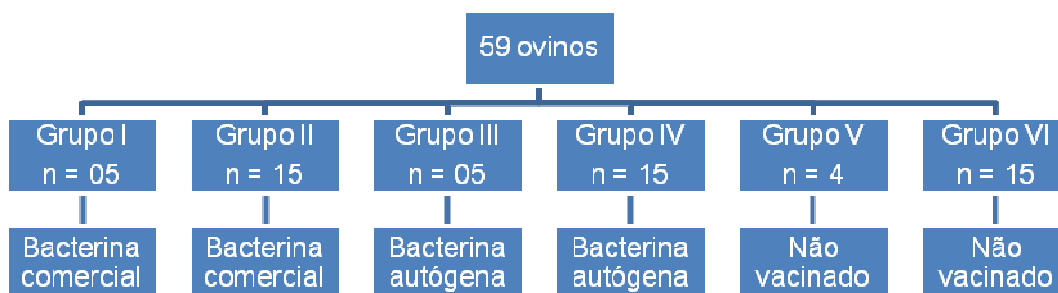


Figura 3: Esquema dos grupos experimentais

2.6 – Colheitas de sangue

As colheitas do sangue empregado nas avaliações sorológicas foram efetuadas assepticamente na veia jugular, concomitantemente à aplicação da segunda dose das bacterinas e sucessivamente a intervalos de 30 dias nos cinco meses subseqüentes à aplicação da segunda dose, entre os meses de outubro de 2008 e março de 2009. Foram respeitadas a legislação e as normas de condutas éticas na contensão e manipulação dos animais.

2.7 – Análise estatística

Os resultados obtidos com os exames efetuados em amostras de sangue dos ovinos foram analisados por comparação das proporções de animais reagentes (NARDI JÚNIOR et al., 2007).

A comparação das proporções de animais reagentes foi efetuada pelos testes não paramétricos de Kruskal Wallis para verificar a existência de diferenças significativas, a um nível de significância de 0,05. Utilizou-se o teste de U de Mann-Whitney (SIEGEL, 1975; SOTO, 2006), para variáveis independentes. E o teste de Friedman e Wilcoxon (SIEGEL, 1975), para variáveis dependentes. O nível de significância foi de 5% em uma prova bicaudal.

3 – Resultados e Discussão

Os dados sobre animais reagentes, sorovares mais freqüentes, e as freqüências no decorrer dos meses estão sumarizados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 01: Número de animais reagentes ao teste de SAM de cada grupo vacinal por colheita, Uberlândia – MG, 2009

Grupos	Total	Dias pós vacinação					
		30	60	90	120	150	180
I	05	02	05*	02	03	00	00
II	15	05*	10*	07	07*	03	02
III	05	01	01	00	02	01	00
IV	15	03	06	01	07	07	04*
V	04	01	01	02	03	02	02
VI	15	03	05	01	05	06	02

* Presença de títulos 1:200

Tabela 02: Sorovares detectados no teste de SAM de cada grupo vacinal por colheita, Uberlândia – MG, 2009

Grupos	Dias pós vacinação						
	0	30	60	90	120	150	180
I	AB	HW	ABH*IW*	HW	BHW	--	--
II	--	GHIW*	ABGHIW*	HIW	ABGH*IW	ABI	GI
III	AW	I	BHW	--	H	W	--
IV	--	BGI	ABGHIW	G	BGHIW	DI	H*IW*
V	ABW	IW	I	HIW	HIW	DI	HIW
VI	--	BI	BG	G	GHI	HIW	GHW

A: AUSTRALIS; B: BRATISLAVA; D: DJASIMAN; G: GRIPPOTYPHOSA; H: HARDJO; I: ICTEROHAEMORRHAGIAE; W: WOLFFI

* Presença de títulos 1:200

A vacinação em ovinos não tem sido um procedimento comum, logo não há registros sobre a soroconversão vacinal contra *Leptospira* spp. nesta espécie. Por isso optou-se por comparar com resultados recentes de resposta vacinal em outras espécies de ruminantes como: bovinos, bubalinos e camelídeos.

Os maiores títulos alcançados apresentaram-se aos 30, 60, 120 e 180 dias após a primo-vacinação, não excedendo a diluição de 1:200, e somente para os sorovares Hardjo e Wolffi. Arduino et al. (2009) e Favero et al (1997) trabalhando com bovinos, também encontraram os maiores títulos contra estes dois sorovares,

porém chegando a títulos bem superiores a 1:200. A maior concentração de ovinos com títulos de 1:200 se deu aos 60 dias, concordando com o encontrado por Nardi Júnior et al. (2006) em bezerras búfalas, porém Arduino et al (2009) encontraram maiores títulos aos 84 dias pós vacinação.

Segundo Arduino et al. (2004) dentre os sorovares Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Wolffi, o sorovar Hardjo foi o que apresentou uma melhor resposta na indução da produção de aglutininas após a vacinação. Sendo que o melhor esquema de vacinação é a aplicação de duas doses da vacina com intervalo de 30 dias entre elas. A instituição de protocolos vacinais que contemplem revacinações sucessivas, no intuito de alcançar melhores índices de proteção vacinal, principalmente para o sorovar Hardjo, deve ser feita (NARDI JÚNIOR et al., 2006).

Observou-se a uma melhor soroconversão até os 120 dias, em que, tanto as porcentagens de animais que apresentavam títulos de anticorpos anti-*Leptospira* spp., quanto o número de sorovares que induziram resposta foram maiores, concordando com Pugh, Wright, Rowe (1995) em lhamas, e com Arduino et al. (2009) em bovinos.

Pode-se notar que aos 90 dias após a primo-vacinação houve uma queda nos títulos de anticorpos em todos os seis grupos experimentais, isso pode ser justificado por uma deterioração nas condições gerais de sanidade do rebanho, levada pela alta pluviosidade deste período (dezembro de 2008), agravando os casos de verminose, e consequentemente levando a imunossupressão dos ovinos.

Nos grupos I e III, de animais reagentes e vacinados com vacina comercial e autógena respectivamente, nota-se uma queda na taxa de soroconversão dos mesmos aos 30 dias pós primo-vacinação contra os sorovares Australis e Bratislava. Aos 60 dias há um incremento na frequência de animais reagentes ao SAM e nos títulos de anticorpos (1:200) do grupo I, seguido de queda a partir dos 90 dias até se tornarem nulos aos 150 dias. Já no grupo III, vacinados com bacterina autógena, esse incremento não é observado se tornando estável até uma redução da prevalência a zero nos 180 dias pós primo-vacinação.

O grupo controle (V), de animais positivos não vacinados, comportou-se de modo semelhante ao grupo III, apresentando queda em seus valores percentuais de

reagentes ao SAM na primeira coleta e se mantendo estável por todo período de coletas, porém não houve nulidade na prevalência de seus animais.

A queda da porcentagem de ovinos que sofreram soroconversão para os sorovares Australis e Bratislava, observada do dia 0 para o dia 30, nos animais dos grupos I, III e V pode ser explicada pela proteção conferida pelos anticorpos produzidos após infecção, levando a evasão das leptospiros para os túbulos renais buscando se proteger do ataque imunológico do hospedeiro (QUINN et al., 2005). Assim que o animal se torna portador renal, os níveis de anticorpos circulantes tendem a queda, deixando de reagir ao teste de SAM (ANDRÉ FONTAINE, GARNIERE, 1990; ELLIS, 1994).

Só foram identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os níveis de aglutininas quando se comparou os diferentes grupos vacinais levando em consideração cada sorovar, e para o sorovar Icterohaemorrhagiae (Tabela 3). Observou-se uma superioridade da produção de aglutininas do grupo V, de animais positivos e não vacinados, quando comparado com os grupos de animais também positivos e vacinados com as bacterinas comercial e autógena (I e III, respectivamente), e o grupo IV (ovinos negativos vacinados com bacterina autógena). Isso evidencia a continuidade da produção de anticorpos pela infecção natural do sorovar Icterohaemorrhagiae no grupo V, principalmente a partir do 120º dia após primo-vacinação, e a possibilidade de infecção dos demais grupos.

Para o sorovar Australis houve um pico no perfil de aglutininas aos 60 dias, apresentando soroconversão em 40% dos ovinos do grupo I, seguido pelos grupos II e IV com 21,4% e 15,4% respectivamente.

O grupo II, de animais negativos e vacinados com bacterina comercial, apresentou anticorpos para o sorovar Australis mesmo ele não compondo essa bacterina. Como o grupo controle (VI), de ovinos negativos para leptospirose e não vacinados, não apresentou títulos de anticorpos para o sorovar Australis, pode-se aventar a possibilidade de reação cruzada entre Australis e Hardjo pela semelhança antigênica existente entre os dois (EMMET, SHOTTS, 1976). Os eventos de coaglutinações observados neste grupo experimental envolvendo as duas sorovariedades reforçam essa teoria.

Tabela 3: Porcentagens de ovinos reagentes com 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após imunização utilizando-se duas bacterinas polivalentes (comercial e autógena) nos respectivos grupos experimentais, Uberlândia, MG, 2009

Sorovares	Dias						
	00	30	60	90	120	150	180
	%	%	%	%	%	%	%
Grupo I (ovinos positivos imunizados com bacterina comercial)							
Australis	80	00	40	00	00	00	00
Bratislava	20	00	20	00	20	00	00
Djasiman	00	00	00	00	00	00	00
Grippotyphosa	00	00	00	00	00	00	00
Hardjo	00	40	60	40	20	00	00
Icterohaemorrhagiae ^c	00	00	20	00	00	00	00
Panama	00	00	00	00	00	00	00
Wolffi	00	40	80	40	20	00	00
Grupo II (ovinos negativos imunizados com bacterina comercial)							
Australis	00	00	21,4	00	7,7	7,7	00
Bratislava	00	00	14,3	00	7,7	7,7	00
Djasiman	00	00	00	00	00	00	00
Grippotyphosa	00	7,1	7,1	00	7,7	00	00
Hardjo	00	7,7	35,7	15,4	30,8	00	00
Icterohaemorrhagiae ^{ab}	00	35,7	14,3	38,5	7,7	16,6	8,3
Panama	00	00	00	00	00	00	00
Wolffi	00	14,3	57,1	23	7,7	00	00
Grupo III (ovinos positivos imunizados com bacterina autógena)							
Australis	60	00	00	00	00	00	00
Bratislava	00	00	20	00	00	00	00
Djasiman	00	00	00	00	00	00	00
Grippotyphosa	00	00	00	00	00	00	00
Hardjo	00	00	20	00	50	00	00
Icterohaemorrhagiae ^c	00	25	00	00	00	00	00
Panama	00	00	00	00	00	00	00
Wolffi	40	00	20	00	00	25	00
Grupo IV (ovinos negativos imunizados com bacterina autógena)							
Australis	00	00	15,4	00	00	00	00
Bratislava	00	7,1	15,4	00	30,8	00	00
Djasiman	00	00	00	00	00	8,3	00
Grippotyphosa	00	7,1	15,4	7,7	23	00	00
Hardjo	00	00	23	00	46,1	00	7,7
Icterohaemorrhagiae ^{bc}	00	7,1	7,7	00	23	54,4	23
Panama	00	00	00	00	00	00	00
Wolffi	00	00	23	00	7,7	00	7,7
Grupo V (ovinos positivos não imunizados)							
Australis	50	00	00	00	00	00	00
Bratislava	25	00	00	00	00	00	00
Djasiman	00	00	00	00	00	33,3	00
Grippotyphosa	00	00	00	00	00	00	00
Hardjo	00	00	00	25	75	00	25
Icterohaemorrhagiae ^a	00	25	25	25	50	33,3	25
Panama	00	00	00	00	00	00	00
Wolffi	25	25	00	25	25	00	25
Grupo VI (ovinos negativos não imunizados)							
Australis	00	00	00	00	00	00	00
Bratislava	00	07	20	00	00	00	00
Djasiman	00	00	00	00	00	00	00
Grippotyphosa	00	00	13,3	7,1	7,1	00	7,1
Hardjo	00	00	00	00	7,1	14,2	7,1
Icterohaemorrhagiae ^{abc}	00	21,4	00	00	21,4	28,6	00
Panama	00	00	00	00	00	00	00
Wolffi	00	00	00	00	00	28,6	7,1

*p < 0,05

Para o sorovar Bratislava percebem-se dois picos de produção de aglutininas, aos 60 e 120 dias após a primeira dose vacinal, porém com baixas porcentagens. Os resultados obtidos com os animais do grupo VI, de ovinos negativos não vacinados, demonstra a possibilidade da produção de anticorpos pela infecção natural no rebanho na primeira e segunda coletas (30 e 60 dias). No segundo pico, aos 120 dias pós primo-vacinação, observa-se soroconversão nos grupos I, II e IV com os valores de 20,0%, 7,7% e 30,8%, respectivamente.

O sorovar *Grippytyphosa* apresentou-se em ovinos com títulos máximos de 1:100 no decorrer do experimento, e apenas nos grupos II, IV e VI, porém com baixas porcentagens. O grupo IV obteve seu pico aos 120 dias pós primo-vacinação com apenas 23% dos seus ovinos reativos ao SAM. O grupo II comportou-se semelhantemente ao controle não vacinado (VI), com prevalências em torno dos 7%. Favero et al. (1997) indicaram um comportamento irregular no perfil de aglutininas e Arduino et al. (2009) identificaram soroconversão para este sorovar até os 120 dias. Arduino et al. (2004) avaliando anticorpos vacinais em bovinos, encontraram 0% de soroconversão para *Grippytyphosa*, porém seu grupo controle de animais não vacinados não se apresentou reagente a este sorovar, o que indica a ausência de desafio naquele rebanho.

Considerando o sorovar Hardjo, pode-se afirmar que induziu uma razoável soroconversão nos ovinos alcançando títulos de 1:200 aos 60, 120 e 180 dias após a primeira dose vacinal nos grupos I, II e IV, respectivamente. O grupo dos animais positivos vacinados com bacterina comercial (I) alcançaram um único pico no perfil de aglutininas aos 60 dias pós primo-vacinação, deixando de apresentar animais reagentes ao SAM aos 150 dias após aplicação da primeira dose vacinal.

Os grupos II, III e IV apresentaram dois picos vacinais, o primeiro aos 60 dias, e um segundo aos 120 dias. Arduino et al. (2009) também encontraram dois picos vacinais contra o sorovar Hardjo, porém aos 21 e 84 dias. O grupo de animais negativos vacinados com bacterina comercial (II) teve sua maior porcentagem de animais reagentes aos 60 dias, alcançando 35,7% dos animais, já o grupo IV, de animais negativos vacinados com bacterina autógena, obteve maior porcentagem aos 120 dias com 46,1%. Esses valores são baixos se comparados às respostas de

lhamas, que quando negativas ao SAM apresentaram até 80% de animais com aglutininas detectáveis (PUGH, WRIGHT, ROWE, 1995).

Os grupos V e VI, de controles não vacinados, apresentaram uma elevação na prevalência para Hardjo a partir dos 90 dias para o primeiro, e 120 dias para o segundo grupo. Essa elevação pode estar vinculada a infecção dos animais dos dois grupos logo após o período de queda nas condições sanitárias do rebanho devida a alta pluviosidade e à infestação parasitária que os ovinos sofreram em meados de dezembro de 2008.

Para o sorovar Wolffi observou-se que cada bacterina induziu um diferente perfil de aglutininas, independente da positividade ou não dos animais ao dia zero. Os grupos I e II obtiveram uma melhor soroconversão para este sorovar, alcançando um único pico aos 60 dias após primo-vacinação com 80% e 57,1% respectivamente, tornando-se nulos aos 150 dias após a inoculação da primeira dose vacinal. Títulos de 1:200 foram alcançados nos dois grupos, aos 60 dias para o primeiro, e aos 30 e 60 dias no segundo grupo experimental.

O grupo III, de animais positivos vacinados com bacterina autógena, demonstrou-se com menor número de ovinos que responderam à vacinação, apresentando pouca persistência na soroconversão. Pode-se observar que 30 dias após a vacinação reduziu-se a zero o número de animais reagentes ao SAM, mas aos 60 dias houve um acréscimo na porcentagem de ovinos que apresentavam aglutininas. Nota-se que houve uma neutralização dos anticorpos séricos existentes nos animais anteriormente vacinação (FAINE et al., 1999). Outros autores também relataram sobre este aspecto, Favero et al. (1997) em bovinos para o sorovar Hardjo; Arduino et al. (2009) em bovinos para Hardjo e Wolffi; Pugh, Wright, Rowe (1995) em lhamas para Hardjo; e Hill, Wyeth (1991) para o sorovar Hardjo em alpacas.

O grupo IV também se comportou de forma pouco persistente e com baixas taxas de soroconversão. O grupo V, de animais positivos não vacinados, demonstrou semelhantes taxas de sororreatividade ao SAM. E o grupo dos ovinos negativos não imunizados apresentou ocorrência de animais reagentes somente a partir do 150º dia.

Aos 90 dias pós primo-vacinação as prevalências dos grupos de ovinos negativos e vacinados (II e IV), que notoriamente tendiam a queda para o sorovar *Icterohaemorrhagiae*, começaram a acompanhar o aumento da prevalência dos grupos controle V e VI. Isso se deve à pouca capacidade imunogênica, que a estirpe utilizada deste sorovar nas bacterinas estudadas, possivelmente apresentava (TABATA, 2002). Este mesmo fato não ocorreu para Hardjo e Wolffi, o que indica uma boa proteção para esses sorovares até os 180 dias pós-vacinais. A vacinação contra leptospirose diminui a ocorrência de infecção e transtornos reprodutivos causados pelo sorovar Hardjo em condições de campo, mesmo não apresentando níveis significativos de anticorpos aglutinantes (BOLIN et al., 1999). E mesmo Wolffi não induzindo uma boa resposta vacinal para o grupo IV, sabe-se que este sorovar apresenta proteção cruzada com Hardjo (TABATA, 2002).

O sorovar Panama não conseguiu induzir a produção de anticorpos após a vacinação. Djasiman apresentou produção de aglutininas somente em um animal do grupo dos negativos vacinados com bacterina autógena, a qual continha este sorovar, e só aos 150 dias pós primo-vacinação. Porém um animal do grupo dos positivos não vacinados, neste mesmo período, tornou-se reagente, o que pode classificar os anticorpos deste ovino do grupo IV como advindos de infecção natural.

As bacterinas podem não ter induzido uma resposta sorológica contra todos os sorovares nela contidos devido a uma diferença na concentração antigênica final de cada sorovar, ou mesmo pela supressão da resposta antigênica causada por um sorovar em detrimento do outro (SIDDIQUE, SHAH, 1990) além de que se pode ter variações no poder imunogênico conforme a estirpe de leptospira utilizada na produção das bacterinas (TABATA, 2002).

Em média, os animais que apresentaram soroconversão efetiva com títulos acima de 1:100 foram poucos e não ultrapassaram a diluição de 1:200, apresentando baixa persistência dos anticorpos anti-*Leptospira* spp. A leptospira é um antígeno pobre, induzindo respostas imunológicas baixas e por um curto período de tempo (SIDDIQUE, SHAH, 1990; BOLIN et al., 1991), sendo a resposta humoral a mais importante associada a anticorpos contra dos componentes lipopolisacárides (ISOGAI et al., 1990). Em algumas ocasiões os animais vacinados adquirem proteção contra a doença, mas não contra a infecção e podem eliminar leptospiras

via urina (ELLIS, CASSELS, DOYLE, 1986). Por isso o tratamento de animais infectados torna-se importante, pois elimina o portador renal, evitando a manutenção das leptospiros no ambiente (BLOOD, RADOSTITS, 1989).

As baixas persistência e porcentagem de animais que sofreram soroconversão, e os baixos títulos alcançados por eles indicam que ovinos respondem fracamente aos antígenos encontrados nas bacterinas utilizadas. Porém é sabido que em geral o uso de vacinas contra leptospirose reduz a ocorrência da infecção, a severidade dos sintomas clínicos (BOLIN, THIERMAN, HANDSAKER, 1989) e consequentemente o impacto econômico da doença (SULLIVAN, 1974).

4. Conclusão

Houve contato e infecção dos ovinos durante o experimento para o sorovar icterohaemorrhagiae. Ovinos apresentaram níveis de anticorpos vacinais pouco persistentes e em baixos títulos, concentrando a fase de soroconversão até os 120 dias após primeira dose vacinal. Hardjo e Wolffi foram os sorovares que alcançaram maiores títulos de anticorpos, na diluição 1:200.

A resposta vacinal obtida com a utilização das duas bacterinas mostrou-se heterogênea na proporção de animais reagentes e níveis de anticorpos aglutinantes frente aos sorovares incluídos na formulação das vacinas.

REFERÊNCIAS

- ANDRÉ FONTAINE, G.; GANIÉRE, J.P. New topics on leptospirosis. **Comparative Immunology Microbiology of Infectious Diseases**. v.13, n.3, p.163-168, 1990.
- 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. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.865-871, mai-jun, 2004.

ARDUINO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S.; MAGAJEVSKI, F.S.; PEREIRA, G.T.P. Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Jaboticabal, v.29, p. 575-582, 2009.

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

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

BOLIN, C.A.; CASSELIS, J.A.; ZUERNER, R.L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis vaccine on type Hardjo-bovis infection on cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.52, n.10, p.1639-1643, 1991.

BOLIN, C.A.; THIERMANN, A. B.; HANDSAKER, A. L. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis infection on pregnant cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.50, n.1, p.161-165, 1989a.

BRITO, J.L.S.; PRUDENTE, T.D. Mapeamento do uso de terra e cobertura vegetal do município de Uberlândia – MG, utilizando imagens ccd/cbers 2. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v.13, n.15, p.144-153, 2005.

CALDAS, E.M.; SILVA, E.D.; REIS, R.S.; VIEGAS, S.A.R.A.; VASCONCELLOS, S.A. Estudo comparativo entre o teste da macroaglutinação e a soroaglutinação microscópica, utilizando antígenos de *L. interrogans* e *L. biflexa* no diagnóstico rápido da leptospirose em animais. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, Salvador, v. 19, n.1, p. 155-176, 1997/1998

ELLIS, W.A.; BRYSON, D.G.; NEILL, S.D.; MCPARLAND, P.J.; MALONE, F.E. Possible involvement of leptospires in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. **Veterinary Record**, v.112, p.291–293, 1983.

ELLIS, W.A.; CASSELLS, J.A.; DOYLE, J. Genital leptospirosis in bull. **Veterinary Record**, v. 118, p. 333, 1986.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n.3, p.463-478, 1994.

EMMET, B.; SHOTTS, J.R. Laboratory diagnosis of leptospirosis. In: JOHNSON, R.C. **The Biology of Parasitic Spirochets**. Academic Press, New York, 1976.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.A.; PEROLA, T. **Leptospira and Leptospirosis**. 2 ed. Melbourne, MediSci, 1999, 272 p.

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 bactéria tetravalente contra leptospirose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.64(2), p. 45-55, 1997.

FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, F.; FERREIRA NETO, J. S. Sorovares de leptospiros predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.613-619, 2002.

FUNASA (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE). **Manual de Leptospirose**. 2ª ed. Brasília, 1995. 98p.

GUIMARÃES, M.C.; CÔRTEZ, J.A.; VASCONCELLOS, S.A. Epidemiologia e controle de leptospirose em bovinos. Papel do portador e seu controle terapêutico.

Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. USP, São Paulo, v.6/7, p. 21- 34, 1982/1983.

HANSON, L.E. Immunology of bacterial diseases, with special reference to leptospirosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.170, n.9, p.991-994, 1977.

HERRMANN, G.H.; LAGE, A.P.; MOREIRA, C.E.; HADDAD, J.P.A.; RESENDE, J.R.; RODRIGUES, R.O.; LEITE, R.C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira spp.* em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p. 443-448, 2004.

HILL, F.I.; WYETH, T.K. Serological reactions against *Leptospira interrogans* serovars in alpacas after vaccination. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v.39, p.1442-1444, 1991.

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

ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; FUJII, N.; OGUMA, K. Biological effects of leptospiral lipopolysaccharide to mouse, B, T and NK cells. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v.52, n.52, p.923-930, 1990.

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

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

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

NARDI JÚNIOR, G.; GENOVEZI, M.E.; RIBEIRO, M.G.; CASTRO, V.; JORGE, A.M. Interference of vaccinal antibodies on serological diagnosis of leptospirosis in vaccinated buffalo using two types of commercial vaccines. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, p.363-368, 2007.

NARDI JÚNIOR, G.; RIBEIRO, M. G.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; JORGE, A. M.; GERONUTTI, L.; MORAIS, Z. M. Perfil de aglutininas anti-*leptospira* em bezerras búfalas vacinadas com bacterina pentavalente comercial contra leptospirose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n. 3, p. 299 – 304, 2006.

PUGH, D.G.; WRIGHT, J.; ROWE, S. Serologic response of llamas to a commercially prepared leptospirosis vaccine. **Small Ruminat Research**, Amsterdam, v.17, p. 193-196, 1995.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Tradução de Lúcia Helena Niederauer Weiss e Rita Denise Niederauer Weiss. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica, para as ciências do comportamento.** Trad. Alfredo Alves de Farias. Ed. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo, 1975. 350 p.

SOTO, F.R.M. **Imunidade ativa e passiva em suínos vacinados contra a leptospirose. Emprego de vacina experimental de subunidade e duas**

bacterinas comerciais de bactérias completas. 2006. 114f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

STRINGFELLOW, D. A.; BROWN, R. R.; HANSON, L. E.; SCHURRENBERGER, P. R.; JOHNSON, J. Can antibody responses in cattle vaccinated with a multivalent leptospiral bacterin interfere with serologic diagnosis of disease? **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.182, p.165 – 167, 1983.

SULLIVAN, N.D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal,** v.50, p.216-223, 1974.

TABATA, R. **Proteção cruzada entre bacterinas anti-leptospirose produzidas com três representantes do sorogrupo sejroe. Ensaio experimental em hamsters (*Mesocricetus auratus*).** 2002. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

VASCONCELLOS, S.A.; BARBARINI JÚNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z.M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, 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. **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 64, n.2, p.7-15, 1997.

VIEGAS, E. A. **Estudo de novos sorotipos de leptospiros apatogênicas na prova de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose caprina e ovina.** 1985. 63f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

VIEGAS, E.A. Aglutininas anti-Leptospira em hemossoro de caprinos e ovinos, no Estado da Bahia. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia,** Salvador, v.5, n.1, p.20-34, 1980.

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