

Cinética da resposta imune humoral de cães jovens imunizados contra *Leptospira interrogans*¹

Jacqueline R. Castro^{2*}, Mariana A. Souza², Sandra R.S. Salaberry², Ednaldo C. Guimarães³ e Anna M.C. Lima-Ribeiro²

ABSTRACT.- Castro J.R., Souza M.A., Salaberry S.R.S., Guimarães E.C. & Lima-Ribeiro A.M.C. 2011. [Kinetics of the humoral immune response of dogs young immunized with *Leptospira interrogans*.] Cinética da resposta imune humoral de cães jovens imunizados contra *Leptospira interrogans*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(11):1000-1005. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Ceará s/n, Bloco 2D, Sala 33, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil. E-mail: jack_ufu@yahoo.com.br

The objective was to analyze the humoral immune response against *Leptospira interrogans* using the microscopic agglutination test (MAT) in 26 young dogs, and 17 mixed breed (Group A) and nine mixed breed (Group B) of both sexes, pertaining to kennels and home environments in Uberlândia, Minas Gerais. Dogs were vaccinated with commercial inactivated polyvalent bacterin with Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Pomona serovars. The immunization schedule was based on three immunizations. The first vaccination was performed at forty-five days of age, considered day zero, and after two boosters at intervals of thirty days each. Seven blood samples from each dog were made from time zero up to 180 days post-vaccination, at intervals of thirty days each. Titles have not been detected pre-vaccination against serovars Canicola, and Icterohaemorrhagiae Grippotyphosa on day zero. Only one dog in group A was reactive with a titer of 1:100 against Pomona in the first harvest. There was no statistical difference between the agglutinating titers between Groups A and B ($p>0.05$) induced by commercial vaccine used, except at harvest II ($p<0.05$), in which the group B presented evidence to serovar Autumnalis in all dogs evaluated, whereas in group A, 64.7% of dogs were not reactive to any serovar tested. There were on the 30th title to serovar Autumnalis that persisted until 180 days post-vaccination in both groups, varying only the intensity of immune response without significant statistical difference. To assess the efficiency of vaccine culture anti-*Leptospira* this research to warn the risks infection that dogs are vaccinated annually submitted.

INDEX TERMS: Leptospirosis, vaccination, dogs.

RESUMO.- Objetivou-se analisar a resposta imune humoral contra *Leptospira interrogans* mediante a utilização da prova de soroaglutinação microscópica (SAM) em 26 cães jovens, sendo 17 de raça definida (Grupo A) e nove sem raça (Grupo B), de ambos os sexos, pertencentes a canis e ambientes domiciliares em Uberlândia, Minas Gerais. Os cães foram

vacinados com bacterina inativada comercial polivalente com os sorovares Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona. O esquema vacinal baseou-se em três imunizações. A primovacinação foi realizada aos quarenta e cinco dias de idade, considerado dia zero, e após dois reforços com intervalos de trinta dias cada. Sete colheitas sanguíneas de cada cão foram efetuadas do dia zero até aos 180 dias pós-vacinais, com intervalos de trinta dias cada. Não foram detectados títulos pré-vacinais para os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa no dia zero. Apenas um cão do grupo A foi reagente com título 1:100 contra o sorovar Pomona na primeira colheita. Não houve diferença estatística entre os títulos de anticorpos aglutinantes entre os Grupos A e B ($p>0,05$), induzidos pela bacterina comercial utilizada, exceto na colheita II ($p<0,05$), na qual o grupo B

¹ Recebido em 27 de agosto de 2010.

Aceito para publicação em 10 de janeiro de 2011.

Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora. Bolsista CAPES.

¹ Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Ceará s/n, Bloco 2D, Sala 33, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil. *Autor para correspondência: jack_ufu@yahoo.com.br

² Faculdade de Matemática, Universidade Federal de Uberlândia, Av. João Naves de Ávila 2160, Campus Santa Mônica, Uberlândia, MG 38408100.

apresentou títulos para o sorovar Autumnalis em todos os cães avaliados, enquanto que, no grupo A, 64,7% dos cães não foram reagentes a nenhum sorovar testado. No dia 30, títulos para o sorovar Autumnalis que persistiram até os 180 dias pós-vacinais, em ambos os grupos, variando apenas a intensidade da resposta imunológica sem diferença estatística significativa. Para avaliação da eficiência vacinal da bacterina anti-*Leptospira*, a presente pesquisa alerta para os ricos à infecção que os cães vacinados anualmente estão submetidos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leptospirose, vacinação, caninos.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença cosmopolita de ocorrência enzootica no Brasil (Boechat & Machado 2004) e que se caracteriza por incluir-se nas doenças de notificação compulsória (Brasil 1995). A epidemiologia e a incidência desta zoonose urbana se favorecem pelas condições encontradas em grandes centros, os quais apresentam elevadas populações caninas e de roedores, além de estar cercados por bolsões periurbanos de pobreza, o que favorece a disseminação e a manutenção do agente infeccioso de maneira permanente (Jaszczerski 2005).

É uma zoonose de elevada prevalência entre os animais domésticos, silvestres e nos humanos. As diferentes espécies podem ser hospedeiros de manutenção ou hospedeiros acidentais e liberarem a espiroqueta no ambiente por meio da leptospiúria permanente ou transitória (Langoni et al. 2002).

O cão destaca-se na transmissão da leptospirose por estabelecer estreito contato com ser humano e manter a bactéria durante longo período nos rins, podendo eliminá-la na urina sem apresentar sinais clínicos ou após obter melhora clínica (Faine et al. 1999).

Monteiro (2003) afirmou que a imunidade na leptospirose é predominantemente humoral e que as imunoglobulinas são produzidas de dois a dez dias pós-infecção dependendo da espécie, imunidade do hospedeiro e sorovar infectante. A resposta imune humoral frente à exposição ao agente é demonstrada por testes sorológicos com uma maior atividade de anticorpos da classe IgG e IgM, após infecção natural ou imunização (Marinho 2008).

Para cães, as bacterinas antileptospíricas devem conter os principais sorovares que acometem esta espécie, numa dada região geográfica. Para Langoni et al. (2002) as bacterinas induzem a proteção contra a doença clínica e, nem sempre, protegem do estado de portador renal, com imunidade menos efetiva em comparação a obtida por agentes virais. Três a quatro doses com intervalo de duas a três semanas, seriam necessários para conferir proteção por seis a oito meses apenas. Para Schreiber et al. (2005) a vacinação protege apenas contra a sintomatologia clínica e o estado de portador renal. Minke et al. (2009) ressaltaram a prevenção da transmissão da zoonose para o ser humano.

As frações da leptospira nas bacterinas para cães comercializadas no Brasil, geralmente são preparadas a partir de componentes de membrana externa, por meio da tecnologia OMC (*Outer Membrane Complex*), na qual são extraídos antígenos imunogênicos da membrana externa da bactéria. Fundamentado no fato que as bactérias são as principais

responsáveis pelas reações pós-vacinais, as bacterinas atuais ao invés de utilizarem todo microrganismo, usam apenas as proteínas imunogênicas do envoltório, conferindo maior segurança (Ribeiro et al. 2003).

Os principais sorovares encontrados nas vacinas comerciais são *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola*. Em cães, os sinais clínicos da leptospirose atribuem-se a infecções comumente causadas pelos sorovares *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Pomona* e *Bratislava*. O sorovar *Autumnalis* vem sendo associado a novos casos clínicos da doença canina (Greene et al. 2006).

Faine et al. (1999) descreveram a importância da identificação da variante sorológica da leptospira, uma vez que, a imunidade conferida é sorovar específica, não havendo imunidade cruzada. A dose protetora vacinal tem forte correlação com o título de anticorpos gerados pela imunização (Brasil 1995) e que há efetividade com títulos a partir de 1:100 (Almeida et al. 1994).

Gueguen et al. (2000) e Klaasen et al. (2003) afirmaram que os cães imunizados apresentam-se reagentes com resposta duradoura de um ano frente a desafios pós-vacinais. Outros pesquisadores acreditam que cães recém vacinados apresentam títulos sorológicos de até 1:400 (Ávila et al. 1998). Maele et al. (2008) encontraram cães com títulos de até 1:800, por um período pós-vacinal de até quatro meses. Por outro lado, há registros de pesquisadores que se contrapõem essas afirmativas, e relataram que cães após serem imunizados podem não ser reagentes ao teste de soroaglutinação microscópica (SAM) (Barr et al. 2005, Teixeira et al. 2008).

A leptospirose é uma doença complexa e, embora as vacinas sejam amplamente disponíveis, há controvérsias quanto à eficácia da proteção conferida em cães (André-Fontaine 2006). Por ser uma doença zoonótica endêmica no Brasil, e haver uma diversidade de sorovares e resposta imune, estudos sobre imunoprofilaxia desta doença nos cães se tornam necessários.

Esse estudo foi proposto com o objetivo de avaliar a cinética da resposta imune humoral pós-vacinal em cães jovens de diferentes raças, pela detecção de títulos de anticorpos contra *Leptospira*, após imunizações com uma bacterina comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no período de 2008 a 2009, em cães pertencentes a canis e ambientes domiciliares de Uberlândia, Minas Gerais. O experimento foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética na Utilização de animais (022/08) e prévia autorização dos proprietários dos cães incluídos na pesquisa.

Foram avaliados 26 filhotes de cães, selecionados aleatoriamente, com data de nascimento e previsão de acompanhamento durante o período da pesquisa. Os cães selecionados foram cadastrados em fichas de identificação com informações referentes ao proprietário, animal e ambiente em que viviam. Os cães foram identificados por características individuais e acompanhados até o final do experimento.

O manejo nutricional e sanitário não sofreu padronização preservando-o em particular a cada criador, uma vez que, a pesquisa foi realizada *in situ*. Os cães foram avaliados em situação natural, recebendo diretamente as variações do ambiente.

Os cães foram acompanhados dos 45 aos 225 dias de idade, por visitas mensais e avaliação clínica certificando-se que os mesmos apresentavam-se hígidos durante todo o experimento.

Para a pesquisa, os cães de ambos os sexos foram divididos em Grupos A e B, sendo 17 com raça definida (Grupo A) e nove sem raça definida (Grupo B). O Grupo A foi composto por quatro Rottweilers, cinco Cockers, dois Beagles, um Teckel e cinco Pit Bulls.

Foi utilizado como imunógeno uma bacterina inativada comercial contendo os sorovares Canicola, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona, liofilizada, contendo adjuvante e cepas virais atenuadas contra hepatite infecciosa canina, adenovírus canino tipo 2, cinomose, parinfluenza, parvovirose e coronavirose.

O protocolo vacinal foi composto por três imunizações, no dia zero (aos 45 dias de idade), no dia trinta (75 dias de idade) e no dia sessenta (aos 105 dias de idade). No dia da imunização cada cão recebeu uma dose de 1 mL por via subcutânea, asépticamente conforme as recomendações do fabricante. As vacinas foram acondicionadas e mantidas sob refrigeração (2-8°C) até o momento da aplicação.

Sete colheitas de sangue de cada cão foram efetuadas, sendo as três primeiras previamente a cada imunização. Este procedimento foi realizado nos dias 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180, conforme Figura 1.

Para colheita de sangue, a veia de escolha variou de acordo com a idade e massa corporal dos cães. Nos filhotes, na primeira e segunda colheitas, e nas raças de pequeno porte, a venopunção foi procedida na veia jugular, enquanto que, a partir da terceira colheita e nas raças de médio e grande porte, foi utilizada a veia cefálica acessória. A venopunção foi realizada por meio de seringas descartáveis e agulhas calibre 25x7, em volume de 5mL de sangue de cada cão, em tubos estéreis a vácuo com gel separador de soro, após antissepsia com álcool.

As amostras foram mantidas refrigeradas (2 a 8°C) em caixa isotérmica. O material foi transportado ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (Famev-UFU) e centrifugado a 2.500 rpm, durante cinco minutos. Em seguida, as amostras de soro foram acondicionadas em microtubos de polietileno de fundo cônico e congeladas a -20°C até a realização do exame.

As análises sorológicas para leptospirose foram processadas conforme Brasil (1995) e Magalhães et al. (2006) e, por meio do SAM em campo escuro padronizado pelo Ministério da Saúde. Foi utilizada uma coleção de 11 antígenos vivos que incluíram os sorovares Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Grippytyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi e Wolffi. Os antígenos foram preparados a partir de matrizes mantidas no laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFU, repicadas semanalmente em meio de cultura EMJH⁴, enriquecido com 10% de soro de coelho, mantido em estufa a 30°C e utilizados próximo ao terceiro dia de incubação, livre de contaminação e de auto-aglutinação.

Durante a leitura avaliou-se o grau de aglutinação, segundo o Centro Panamericano de Zoonoses (1985) e o Ministério da Saúde do Brasil (Brasil 1995). Foram consideradas reagentes as amostras de soro sanguíneo que aglutinaram pelo menos 50% das leptospiros na diluição de 1:100. Em seguida as amostras reagentes foram tituladas até 1:6400, diluídas na proporção geométrica de razão dois. Foi considerada como título final a maior diluição que apresentou pelo menos 50% de leptospiros aglutinadas no campo microscópico.

Nesta pesquisa foi utilizada a análise estatística não paramétrica com a execução do programa Bioestat 6.0⁵.

A avaliação dos títulos sorológicos e comparação entre os grupos A e B foi feita pelo teste de Mann-Whitney para amostras

independentes, e pelo teste de Friedman a comparação das respostas vacinais entre cães de um mesmo grupo ($\alpha=0,05$).

As demais correlações dos cães reagentes, que apresentaram títulos somente contra os sorovares contidos na vacina, com as variáveis sexo, raça, tipo de alimentação, vacinação dos pais, presença de contactantes, roedores e acesso a rua empregou-se o teste *Odds ratio*, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os títulos de anticorpos produzidos pelos cães dos Grupos A (Fig.2) e B (Fig.3) após imunização foram expressos em

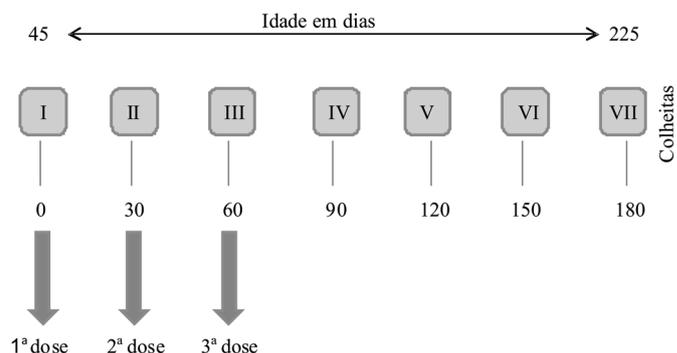


Fig.1. Protocolo vacinal contra leptospirose e colheita de sangue em cães jovens.

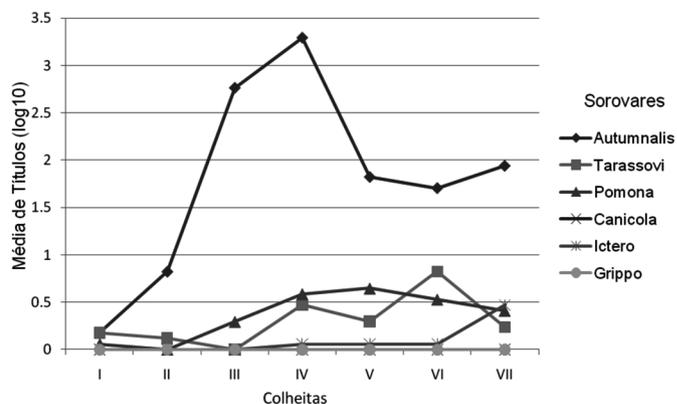


Fig.2. Médias dos logaritmos dos títulos de anticorpos detectados pela SAM para diferentes sorovares, em cães filhotes do Grupo A (com raça definida) vacinados contra *Leptospira interrogans* sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa e Pomona.

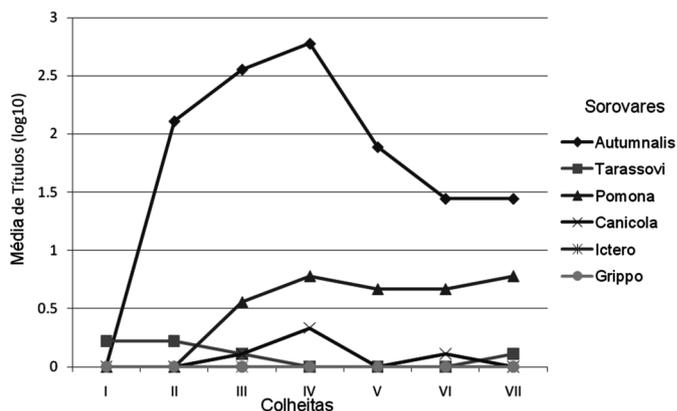


Fig.3. Médias dos logaritmos dos títulos de anticorpos detectados pela SAM para diferentes sorovares, em cães filhotes do Grupo B (sem raça definida) vacinados contra *Leptospira interrogans* sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa e Pomona.

⁴ Difco®, Difco Ltda, Rua Emir Macedo Nogueira 179, Jardim Portinari, Diadema, SP.

⁵ Bioestat 6.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências-biomédicas.

Quadro 1. Proporção de cães vacinados reagentes a *Leptospira* spp. sorovares Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona, independente da colheita, de acordo com os fatores de risco analisados no inquérito epidemiológico, no município de Uberlândia, MG, 2009

Variável	Cães		OR ^a	IC ^b 95%	P
	Total	Reagente			
Sexo					
Macho	12	9	0,60	0,11-3,29	0,86
Fêmea	14	9			
Raça					
Rottweiler	4	2			
Cocker	5	2			
Beagle	2	2	0,68	0,10-4,52	0,94
Teckel	1	1			
Pit Bull	5	5			
SRD	9	7			
Alimentação					
Ração Ração+outros*	215	163	2,13	0,27-16,6	0,86
Vacinação dos pais					
Sim	17	12	0,68	0,10-4,52	0,94
Não	9	7			
Contactantes					
Sim	17	11	0,22	0,02-2,29	0,39
Não	9	8			
Presença de roedores					
Sim	12	9	1,20	0,20-6,88	0,81
Não	14	10			
Acesso à rua					
Sim	5	3	2,13	0,27-16,6	0,86
Não	21	16			

^aOdds Ratio, ^b Intervalo de confiança. Se $p < 0,05$ existe diferença significativa.

* Incluiu comida caseira e derivados do leite.

logaritmo na base 10, assim como nas pesquisas de Marinho et al. (2003), Barr et al. (2005) e Arduino et al. (2009). As variáveis sexo, raça, tipo de alimentação, vacinação dos pais, presença de contactantes, roedores e acesso a rua não foram significativas na relação com os títulos vacinais nos cães avaliados (Quadro 1).

DISCUSSÃO

Um dos principais inconvenientes da vacinação de neonatos é a presença de anticorpos neutralizantes maternos que impedem uma melhor resposta imune efetiva. Desta forma, os cães receberam a primeira vacinação aos 45 dias de vida, período este em que ocorre um decréscimo dos níveis de anticorpos maternos recebidos (Day 2007, Horzinek 2010). Neste estudo, 100% dos filhotes ingeriram colostro, por esta razão ingestão de colostro não foi considerada variável de comparação estatística.

Nas pesquisas sobre eficácia de vacinas geralmente utilizam em suas respectivas metodologias grupos controlados quanto à alimentação e ao manejo, fixando o máximo de variáveis possíveis. No entanto, acredita-se que estas podem não estar correlacionando com o verdadeiro desafio vacinal e natural que os cães sofrem *in situ*, nos locais em que vivem, com manejo e alimentação variadas. Em proposta de novas metodologias de pesquisa científica, Lovatto et al. (2007) discutiram a importância de se considerar a heterogeneidade entre os estudos, a melhor representatividade da aplicação prática do tratamento e que em muitas vezes, os cuidados experimentais distanciam a amostra experimental da realidade do conjunto da população.

Nenhum cão da pesquisa apresentou títulos (≥ 100) contra o sorovar Grippotyphosa durante toda pesquisa, assim como no estudo de Langoni et al. (2002) os quais não obtiveram valores importantes na resposta imune dos cães avaliados para este sorovar contido na bacterina utilizada. Não há relatos que justifique ausência de título pós-vacinal, por esta razão aventa-se a possibilidade do sorovar Grippotyphosa não ser um bom imunógeno.

Não foram detectados títulos pré-vacinais (≥ 100) para os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa no dia zero, durante a primeira colheita em ambos os grupos. Isso confirmou que 82,35% não foram reagentes para nenhum sorovar inicialmente. Entretanto, no Grupo A um cão (5,88%) apresentou títulos pré-vacinais contra os sorovares Autumnalis (1:400) e Pomona (1:100) e outros dois cães (11,77%) apresentaram anticorpos contra o sorovar Tarassovi (1:100 e 1:200).

No dia zero, durante a primeira colheita no Grupo B não foram detectados títulos pré-vacinais (≥ 100) em 77,77% dos cães contra os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Pomona e Autumnalis. No entanto, dois cães (22,23%) se mostraram reagentes (1:100) frente ao sorovar Tarassovi na primeira colheita. Autumnalis e Tarassovi não são constituintes de nenhuma bacterina comercial disponível para cães (Greene et al. 2006), por não serem historicamente sorovares comuns para esta espécie. O fato de alguns cães em ambos os grupos já apresentarem títulos a alguns sorovares no dia zero podem estar relacionados com anticorpos maternos advindos do colostro que nesta fase já deveriam ter declinado completamente caracterizando a janela imunológica que o filhote passa antes da primo-vacinação, ou ainda, poderiam estar relacionados a exposição prévia ao agente e possível infecção pelos sorovares em questão. A detecção precoce de IgG e IgM de acordo com Abdulkader et al. (2002) é indicador geral de reinfecção de várias doenças infecciosas, assim como a leptospirose.

Em pesquisa semelhante em que foi avaliado a cinética da resposta imune humoral de beagles adultos frente a um esquema vacinal de duas doses contra os mesmos sorovares aqui utilizados, Jaszczerski (2005) identificou títulos pré-vacinais variando entre 1:25 e 1:100 contra o sorovar Copenhageni e a partir de dados referentes a imunizações anteriores comprovou que os cães nunca foram imunizados contra este sorovar e que possivelmente estes indivíduos sofreram infecção subclínica prévia.

O contato prévio com o sorovares Tarassovi e Autumnalis detectado pelos títulos pré-vacinais observados no dia 0, segundo Jaszczerski (2005) pode ter induzido a formação de um clone de memória para proteínas de membrana celular reconhecidas como proteínas comuns.

Nas diferentes colheitas nenhum cão do Grupo A apresentou títulos contra o sorovar Canicola e apenas três cães apresentaram títulos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae (1:100, 1:200 e 1:3200) presentes na vacina. O cão que apresentou título de 1:3200 provavelmente foi exposto ao agente, pois era um animal de canil que convivia com vários cães e possível contato com ratos. Por esta razão não houve títulos detectáveis durante as seis primeiras colheitas e apenas na sétima apresentou títulos elevados para este sorovar. O que pode

ser justificado por Schreiber et al. (2005) quando afirmaram que a vacinação pode conferir uma proteção e minimização dos sinais clínicos com rápida elevação dos títulos de anticorpos quando o animal é colocado em contato com o agente.

Diferentemente do Grupo A, no grupo B não houve cães reagentes ao sorovar *Icterohaemorrhagiae*, e quatro cães apresentaram títulos de 1:100 contra o sorovar *Canicola* durante a colheita III e IV.

Não houve diferença estatística significativa entre os títulos de anticorpos nas diferentes colheitas dos Grupos A e B ($p>0,05$), induzidos pela bactéria comercial utilizada. Exceto no dia 30 (colheita II) ($p<0,05$), na qual o Grupo B apresentou títulos para o sorovar *Autumnalis* em todos os cães avaliados, o que diferiu do Grupo A em que 35,29% (6/17) dos cães foram reagentes na SAM.

Ao comparar as respostas vacinais entre cães de um mesmo grupo, principalmente em busca de resposta imune distinta quanto às diferentes raças no Grupo A, observou-se que não houve diferença significativa entre cães de um mesmo grupo ($p>0,05$).

Em ambos os grupos a resposta vacinal na SAM contra o sorovar *Autumnalis* excedeu a resposta aos sorovares contidos nas vacinas, não só do número de cães que apresentaram anticorpos anti-*Leptospira interrogans* sorovar *Autumnalis*, mas também na magnitude e manutenção desta resposta quando comparados aos demais sorovares presentes na vacina. Fato que também foi identificado na resposta contra o sorovar *Tarassovi*, porém, com menor titulação, o que enfatiza a possibilidade da ocorrência concomitante de uma infecção natural por estes sorovares.

O aumento de títulos SAM para o sorovar *Autumnalis* em ambos os grupos de cães após a vacinação contra os sorovares *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* e *Grippytyphosa* são contrários às conclusões sobre respostas vacinais frente à bacterinas comerciais em que afirmam ser sorovar específica (Faine et al. 1999). Este resultado se aproxima do estudo de Barr et al. (2005) em que também relataram altos títulos de sorovar *Autumnalis* mesmo não estando presente na vacina administrada.

No dia 30 verificaram-se títulos para o sorovar *Autumnalis* que persistiram até os 180 dias pós-vacinais, em ambos os grupos, variando apenas a intensidade da resposta imunológica sem diferença estatística significativa. Barr et al. (2005) afirmaram que subunidades da vacina contra os sorovares *Pomona* e *Grippytyphosa* podem induzir títulos na SAM não só contra antígenos homólogos, mas também contra o sorovar *Autumnalis*.

Para Tabata et al. (2002) e Jaszczerski (2005) reações cruzadas podem ocorrer entre sorovares de um mesmo sorogrupo, que compartilhem antígenos em comum, com uma reativação da resposta imune direcionada a sorovares que não estejam presentes na vacina. Não é o caso do presente experimento, pois os sorovares *Autumnalis* e *Tarassovi* não pertencem a nenhum sorogrupo dos sorovares da vacina utilizada.

Gueguen et al. (2000) pesquisaram filhotes de Beagles e a resposta sorológica após a vacinação se mostrou transitória entre quatro e cinco meses com queda acentuada nos títulos, sendo que o sorovar *Canicola* manteve-se com maiores títulos quando comparados ao *Icterohaemorrhagiae* após a

segunda dose. No entanto, ao contrário dos cães não vacinados (Grupo controle), os cães vacinados resistiram a desafio um ano após a utilização do protocolo de vacinação-padrão, sem qualquer reforço.

Vale ressaltar que Gueguen et al. (2000) afirmaram que títulos de anticorpos IgM podem não estar relacionados ao nível de proteção de imunidade. Langoni et al. (2002) destacaram que o exame de SAM detecta principalmente anticorpos aglutinantes essencialmente representados pela classe IgM. Fato que talvez possa explicar a baixa resposta imune dos cães da presente pesquisa apresentar títulos abaixo do considerado protetor para cães após a vacinação.

Barr et al. (2005) e Teixeira et al. (2008) concluíram que, em alguns casos a magnitude da SAM pode não corresponder a presença de infecção por determinado sorovar, embora seja esperada uma relação direta entre agente infectante e a reação na SAM.

Os picos de anticorpos podem não ter sido identificados devido ao intervalo padronizado entre as colheitas e imunizações. Apesar de interessante, um período de colheita inferior a trinta dias não seria possível, devido à mistificação dos efeitos deletérios que os proprietários consideraram frente às colheitas de sangue.

Os títulos sorológicos vacinais contra *Leptospira* em cães, no estudo de Maele et al. (2008) estavam abaixo de 1:800. No entanto, Greene et al. (2006) afirmaram que os títulos vacinais contra os sorovares *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* podem exceder 1:800, no entanto não persistem por mais de três meses. Por outro lado Klaasen et al. (2003) e Minke et al. (2009) concluíram que a duração da imunidade induzida por uma vacina comercial bivalente contra os sorovares *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* perdura por um ano e protegem os cães do estado de portador renal e da sintomatologia clínica da doença. Destaca-se a preocupação quanto ao período de proteção pós-vacinal, que não pode ser padronizado em diferentes situações.

Pesquisadores cogitam a possibilidade de haver reações cruzadas e imunidade entre sorovares distintos, o que seria uma possível explicação para a resposta a sorovares não contidos na vacina da presente pesquisa. Sonrier et al. (2001) verificaram que frações comuns de LPS induziram completa proteção contra sorovares homólogos de um mesmo sorogrupo e proteção parcial contra desafio de sorovares heterólogos em modelos experimentais de roedores, com proteção cruzada entre os sorovares *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* e *Autumnalis*. Isso foi ratificado por Branger et al. (2005) que utilizaram vacina de DNA com os sorovares *Autumnalis* ou *Grippytyphosa* e demonstraram proteção cruzada contra o sorovar *Canicola* em desafio modelos experimentais.

De acordo com Jaszczerski (2005) os títulos aglutinantes obtidos com a vacina comercial contra a leptospirose em cães, independentemente do sorovar, tornam-se indetectáveis pela técnica de SAM, a partir dos 90 dias pós-vacinais. No entanto, Langoni et al. (2002) afirmaram que apesar dos baixos títulos e da curta duração da resposta imune vacinal, a exposição de cães vacinados a leptospirosas vivas resulta em rápida elevação de títulos de anticorpos protetores sugerindo uma boa memória imunológica.

As variáveis sexo, raça, tipo de alimentação, vacinação dos

pais, presença de contactantes, roedores e acesso a rua não foram significativas na relação com os títulos vacinais nos cães avaliados (Quadro 1), diferentemente do estudo realizado por Simón et al. (2009) que determinaram os fatores que poderiam interferir na resposta de cães frente à vacina polivalente. Esses autores observaram que cães adultos apresentaram maiores títulos pós-vacinais contra *Leptospira* quando comparados aos filhotes, as fêmeas apresentaram média de títulos de anticorpos superiores aos machos e as raças avaliadas demonstraram respostas vacinais diferenciadas, sendo os cães da raça Montanha dos Pirinéus apresentaram títulos de anticorpos inferiores contra *Leptospira* quando comparadas as raças Golden Retriever e Labrador Retriever.

Langoni et al. (2002) observaram que não houve diferença significativa nos valores medianos dos títulos de anticorpos entre machos e fêmeas nos dias 1, 8, 29, 36, 50 e 60 do experimento, o mesmo foi notado na presente pesquisa. Entretanto, nos demais dias avaliados os machos apresentaram maiores títulos em relação às fêmeas.

CONCLUSÕES

Não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos induzidos pela bacterina comercial anti-*Leptospira* utilizada em cães de diferentes raças.

Cães vacinados não reagem necessariamente aos testes de diagnóstico como o SAM. Apenas o sorovar Pomona demonstrou títulos.

Em ambos os grupos as respostas vacinais na SAM contra o sorovar Autumnalis e Tarassovi excederam os títulos dos sorovares contidos na vacina.

Agradecimentos.- À CAPES pelo apoio financeiro e aos técnicos do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFU, os quais possibilitaram a execução desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Abdulkader R.C.R.M., Daher E.F, Camargo E.D, Spinosa C. & Silva M.V. 2002. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of Humoral immune response. *Revta Inst. Med. Trop. São Paulo* 44:79-83.
- Almeida L.P, Martins L.F.S., Brod C.S. & Germano P.M.L. 1994. Levantamento soropidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. *Revta Saúde Pública* 28:76-81.
- André-Fontaine G. 2006. Canine leptospirosis: Do we have a problem? *Vet. Microbiol.* 117:19-24.
- Arduino G.G.C., Giro R.J.S., Magajevski F.S. & Pereira G.T. 2009. Títulos de anticorpos aglutinantes por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 29:575-582.
- Ávila M.O., Furtado L.R.I., Teixeira M.M., Rosado R.L.L., Martins L.F.S. & Brod C.S. 1998. Aglutininas Anti-Leptospíricas em cães na área de influência do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil no Ano de 1995. *Ciência Rural* 28:107-110.
- Barr S.C., McDonough P.L., Scipioni-Ball R.L. & Starr J.K. 2005. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar Pomona and *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa. *Am. J. Vet. Res.* 66:1780-1784.
- Boechat J.U.D. & Machado J.P. 2004. Prevalência da leptospirose canina no Brasil. *Revta Vet. Ser.* 1:40-47.
- Branger C., Chatervet B., Gauvrit A. & Aviat F. 2005. Protection against *L. interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with gene encoding Hap1. *Infect. Immun.* 73:4062-4069.
- Brasil. 1995. Manual de Leptospirosis. 2ª ed. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos, Centro Nacional de Epidemiologia, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília. 8p.
- Centro Panamericano de Zoonosis 1985. Manual de métodos para el diagnóstico laboratório de la Leptospirosis. Nota Técnica 30, Washington, DC., p.15-25.
- Day M.J. 2007. Immune system development in the dog and cat. *J. Comp. Pathol.* 137:10-15.
- Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2ª ed. MedSci, Melbourne. 272p.
- Greene C.E., Sykes J.E., Brown C.A. & Hartmann K. 2006. Leptospirosis, p.402-417. In: Greene C.E. (Ed.), *Infections Diseases of the Dog and Cat*. 3ª ed. Saunders Elsevier, St Louis.
- Gueguen S., Malh P., Leucoutre C. & Aubert A. 2000. Duration of immunity and clinical protection against canine leptospirosis with a multivalent vaccine. *Anais Anclivepa Congress, Rio de Janeiro*, p.1-16. (Abstract).
- Horzinek M.C. 2010. Vaccination protocols for companion animals: The veterinarian is perspective. *J. Comp. Pathol.* 142:129-132.
- Jaszczerski D.C.F.C. 2005. Cinética da resposta imune humoral em cães imunizados com *Leptospira interrogans* sorovares icterohaemorrhagiae, canicola, pomona e grippotyphosa. Dissertação de Mestrado em Patologia, Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 82p.
- Klaasen H.L.B.M., Molkenboer M.J.C.H., Vrijenhoek M.P. & Kaashoek M.J. 2003. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.* 95:121-132.
- Langoni H., Pimentel V.L., Silva A.V., Lucheis S.B. & Denardi M.B. 2002. Avaliação da dinâmica de anticorpos pós-vacinais contra *Leptospira* spp. em cães vacinados pela prova de SAM. *Ars Vet.* 18:54-61.
- Lovatto P.A., Lehnen C.R., Andretta, I., Carvalho A.D. & Hauschild L. 2007. Meta-análise em pesquisas científicas-enfoque em metodologias. *Revta Bras. Zootec.* 36:285-294.
- Maele I.V., Claus A., Haesebrouck F. & Daminet S. 2008. Leptospirosis in dogs: A review with emphasis on clinical aspects. *Vet. Rec.* 163:409-413.
- Magalhães D.F., Silva J.A., Moreira E.C., Wilke V.M.L., Haddad J.P.A. & Meneses J.N.C. 2006. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58:167-174.
- Marinho M., Langoni H., Oliveira S.L., Carreira R., Perri S.H.V. & Luvizoto M.C. 2003. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e balb/c, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. *Pesq. Vet. Bras.* 23:5-12.
- Marinho M. 2008. Leptospirose: Fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. *Vet. Zootec.* 15:428-434.
- Minke J.M., Bey R., Tronel J.P., Latour S., Colombert G., Yvoret J., Cariou C., Guiot A.L., Cozette V. & Guigal P.M. 2009. Onset and duration of protection immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided bi-valent inactivated Leptospirosis vaccine. *Vet. Microbiol.* 137:137-145.
- Monteiro G.R.G. 2003. Efetividade da doxiciclina na profilaxia contra Leptospirose. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN. 61p.
- Ribeiro M.G., Beloni S.N., Langoni H. & Silva A.V. 2003. Leptospirose canina. *Boletim Técnico, Departamento Técnico Fort Dodge Saúde Animal (S.I., s.n.)*.
- Schreiber P., Martin V., Najbar W., Sanquer A., Gueguen S. & Lebreux B. 2005. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. *Vet. Microbiol.* 108:113-118.
- Simón V.M.C., Rodriguez C. & Martinez A.J.L. 2009. Estado imune humoral frente al vírus Del Moquillo canino, el Parvovirus canino y Leptospiras em um criadero. *Revta Eletron. Vet.* 10:4.
- Sonrier C., Branger C., Michel V., Ruvoen-Clouet N., Ganière J.P. & André-Fontaine G. 2001. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 19:86-94.
- Tabata R., Scanavani Neto H., Zuanaze M.A.F., Oliveira E.M.D., Dias R.A., Moraes Z.M., Ito F.H. & Vasconcelos S.A. 2002. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup serjoe. *Braz. J. Microbiol.* 33:265-268.
- Teixeira M.A., Gonçalves M.L.L., Riediger I.N., Prosser C.S, Silva S.F.C., Biesdorf S.M., Mosko P.R.E., Moraes H.A. & Biondo A.W. 2008. Sorologia negativa e PCR positiva: a importância da biologia molecular para o diagnóstico de leptospirose aguda em um cão. *Clin. Vet.* 8:44-48.