

POLISSACARÍDEOS DE MEMBRANA DE *BRUCELLA ABORTUS* 1119-3, NA PROVA DE IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR, NO DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE EM BEZERRAS VACINADAS (B19)

M.G. Ribeiro¹, J.V.B. Agottani, N. Spago, V. Laganaro Filho, J. Megid

¹Depto de Higiene Veterinária e Saúde Pública – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/ Campus de Botucatu. Cidade Universitária, CP 560, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brasil.

RESUMO

Avaliou-se o perfil sorológico de 33 fêmeas bovinas vacinadas com a amostra padrão de *Brucella abortus* (B19), através da prova de imunodifusão em gel de ágar, comparativamente aos testes de soroaglutinação rápida em placa (SAR), soroaglutinação lenta em tubos (SAT), antígeno acidificado (ATA) e 2-mercaptoetanol (2-ME), durante 24 meses pós-vacinais. Para a realização da prova de imunodifusão foi utilizado extrato polissacarídico (POLI O) obtido da amostra de *B. abortus* 1119-3. Somente um animal (3,0%) apresentou reação precipitante na imunodifusão, no 14^o dia pós-vacinal. No 28^o dia após a vacinação, 15 (45,4%) animais apresentaram reatividade na imunodifusão, com igual quantidade no 42^o dia pós-vacinal. No 56^o dia após a vacinação, verificou-se três animais (9,1%) positivos na imunodifusão e um (3,0%) com reação precipitante fraco-positiva, que se manteve detectável no 91^o e 119^o dia pós-vacinal; embora os demais animais demonstrassem negatividade na prova a partir do 91^o dia após a imunização. Nos testes de SAR, SAT e 2-ME, os animais apresentaram títulos máximos entre o 14^o e 42^o dias após a vacinação, com declínio regular e contínuo após este período, e juntamente com o do ATA, foram considerados negativos ao redor de 10 meses pós-vacinais. Dentre as provas utilizadas, a imunodifusão em gel de ágar contendo antígenos polissacarídeos, foi a que apresentou maior precocidade na ausência de reações positivas (5 meses pós-vacinais).

PALAVRAS-CHAVE: Brucelose bovina, imunodifusão, antígeno polissacarídico, soroaglutinação, B19.

ABSTRACT

MEMBRANE POLYSACCHARIDES OF *BRUCELLA ABORTUS* 1119-3, IN AGAR GEL IMMUNODIFFUSION TEST, IN DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS ON VACCINATED HEIFERS (B19). The serological profiles of 33 female bovines, vaccinated at three to eight months of age with the B19 standard strain of *Brucella abortus*, were evaluated by agar gel immunodiffusion test, comparatively to plate agglutination, tube agglutination, rose bengal plate and mercaptoethanol tests, over a period of 24 months. For the immunodiffusion test, polysaccharide extract obtained from the sample *B. abortus* 1119-3, was used as antigen. Only one (3.0%) animal presented precipitate reaction in the immunodiffusion test on the 14th day after vaccination. On the 28th day after immunization, 15 (45.4%) animals revealed reaction in the immunodiffusion, with the same amount on the 42nd experimental day. On the 56th day after vaccination, three (9.1%) animals were observed positive in the immunodiffusion and one (3.0%) with weak-positive reaction, that stayed detectable on the 91th and 119th days after vaccination; although the other animals were negative since the 91th day after the immunization. Maximum levels of antibodies detected reached by the plate agglutination, tube agglutination and mercaptoethanol tests were found between the 14th and the 42nd day, with regular and continuous decline after this period, and together with rose bengal plate test, were considered negative around ten months after vaccination. Among the tests used, the agar gel immunodiffusion assay containing polysaccharide antigens presented greater precocity in the absence of positive reactions (five months after vaccination).

KEY WORDS: Bovine brucellosis, immunodiffusion test, polysaccharide antigen, agglutination tests, B19.

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma enfermidade causada principalmente pela *Brucella abortus*, de distribuição mundial, que acarreta prejuízos de ordem sanitária e econômica (WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO, 1986; CORBEL, 1997).

Em 1933, WILSON & MILES sugeriram a diferenciação antigênica de estirpes lisas das espécies de *B. abortus* e *B. melitensis* pela existência de dois antígenos comuns, denominados A e M, que variavam quantitativamente para cada uma das espécies, com predomínio do antígeno A em *B. abortus* e M em *B. melitensis* (WILSON & MILES *apud* SÁ, 1989).

MILES & PIRIE (1939) procuraram individualizar os antígenos A e M e obtiveram uma substância solúvel específica, constituída bioquimicamente por um complexo fosfolipídico, proteínas e um derivado amino-polihidroxílico (polipeptídeo); que recebeu a denominação inicial de antígeno nativo, conhecido atualmente como hapteno nativo (MILES & PIRIE, 1939 *apud* SÁ, 1989).

OLITZIKI & SULITZEANU (1957) descrevem outros antígenos de *Brucella* sp, tanto para cepas lisas como para as naturalmente rugosas (*Brucella ovis* e *Brucella canis*).

READFERN (1960) aplicou o modelo de extração de lipopolissacarídeos da parede celular de enterobactérias, em amostras do gênero *Brucella*, obtendo sete frações distintas. O estudo bioquímico e imunológico da fração cinco (F5), através da técnica de imunodifusão em gel de ágar, revelou a presença de dois componentes, um dos quais contendo os antígenos A e M.

A análise dos antígenos A e M da F5 de *Brucella*, mediante as técnicas de imunoeletroforese (HINS DILL & BERMAN, 1967) e por colorações seletivas, demonstraram que este componente era constituído por um lipopolissacarídeo (LPS), localizado na superfície do microrganismo em fase lisa. A caracterização bioquímica do LPS revelou sua complexidade estrutural, composta por uma macromolécula constituída principalmente por lipídios, carboidratos e ácidos, termo-estável e com atividade endotóxica (LEONG *et al.*, 1970).

DIAZ *et al.* (1976) e DIAZ *et al.* (1980), concluíram que o LPS da F5 de *Brucella* sp estava intimamente relacionado com reações antigênicas de super-

fície, utilizadas no sorodiagnóstico do agente através de técnicas baseadas na utilização de suspensões íntegras e inativadas de *Brucella* sp, como as provas de Coombs, rosa bengala e soroaglutinação lenta.

DIAZ *et al.* (1981) investigando a composição química do segundo componente da F5 do gênero *Brucella*, descrito inicialmente por READFERN (1960), determinaram a sua natureza polissacarídica, denominando o composto como polissacarídeo B (POLI B).

O POLI B foi descrito tanto no citoplasma de cepa rugosa de *B. melitensis* - 155 (DIAZ *et al.*, 1979), como na parede celular de amostras lisas de *B. abortus* e *B. melitensis* (DIAZ *et al.*, 1968; DIAZ *et al.*, 1981). Ao contrário do LPS, o POLI B não possui atividade endotóxica e comporta-se como hapteno, ou seja não estimula a síntese de imunoglobulinas (Ig) frente à imunização com células íntegras intactas, lisas ou rugosas de *Brucella* sp (DIAZ *et al.*, 1968).

DIAZ *et al.* (1979) referiram completa identidade em técnicas de imunodifusão entre polissacarídeos extraídos de cepas lisas e rugosas de *Brucella* sp. Por outro lado, MORENO *et al.* (1981) empregando técnicas imunoenzimáticas (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), revelaram a presença de determinantes antigênicos distintos entre os polissacarídeos; sugerindo a denominação de POLI B para o composto extraído de amostras rugosas de *B. melitensis*, reservando a designação de hapteno nativo para polissacarídeos obtidos de amostras em fase lisa.

MORIYON & DIAZ (1985) assumem a coexistência do LPS e estruturas de natureza polissacarídica na parede celular de *Brucella*, admitindo que estas estruturas sejam imunologicamente relacionadas, embora estruturalmente distintas.

Até o momento não estão completamente esclarecidos os fatores que permitem que estes polissacarídeos de *Brucella* sp. atuem como haptenos, ou seja, não induzam à formação de Ig frente a antígenos vacinais, detectáveis em testes sorológicos convencionais. Entretanto, em animais infectados com *Brucella* sp., podem ser identificadas Ig anti-polissacarídeos de membrana; sugerindo que a síntese destas Ig estaria dependente de alguma condição particular relacionada à infecção natural pelo microrganismo (DIAZ *et al.*, 1979; JONES *et al.*, 1980; MORIYON & DIAZ, 1985). Desta forma, animais vacinados contra brucelose não apresentariam Ig específicas para polissacarídeos de *Brucella*, ao contrário de animais infectados.

O emprego de técnicas diagnósticas que detectassem Ig anti-polissacarídeos de membrana da bactéria, permitiria a diferenciação de anticorpos sintetizados em animais infectados dos induzidos pelo processo vacinal. Este fato motivou o estudo de diferentes protocolos de extração de polissacarídeos de membrana de *Brucella* sp. e sua aplicação à técnica de imunodifusão em gel de ágar no sorodiagnóstico da brucelose em animais (MORENO *et al.*, 1987; ZYGMUNT & DUBRAY, 1987; BRUNDLE *et al.*, 1988; DIAZ-APARICIO *et al.*, 1993).

DIAZ *et al.* (1979) investigando a aplicação do POLI B, extraído de *B. melitensis* (amostra 115), na prova de imunodifusão em gel de ágar, não observaram reações de precipitação nos soros de bezerras, colhidos em 20 animais de 1 a 2 meses, 19 de 3 a 4 meses e 24 de 5 a 6 meses de idade, vacinados com a amostra B19.

SÁ (1989) compararam a prova de imunodifusão em gel de ágar, utilizando o hapteno nativo extraído de *B. melitensis* (16M), frente às provas de soroaglutinação em tubo, rosa bengala, 2-mercaptoetanol, prova de Coombs e fixação de complemento, em bezerras vacinadas com a amostra B19, observando que a prova de imunodifusão detectou Ig vacinais em três animais (21%) no 20º dia pós-vacinal, negatizando totalmente aos 3 meses pós-vacinais; período considerando bastante precoce em relação às demais provas testadas, que resultaram negativas entre o 6º e 12º meses pós-vacinais.

Utilizando método de extração de polissacarídeos, baseado na obtenção não diferenciada (POLI B ou hapteno nativo) do composto da membrana de amostras de *B. abortus* (1119-3), denominado de polissacarídeo O (POLI O), CHERWONOGRODZKY & NIELSEN (1988) avaliaram o emprego deste extrato, obtidos de cepas em fase lisa de *B. abortus* na prova de imunodifusão em gel de ágar, comparativamente a outras provas sorodiagnósticas convencionais, em amostras de soro de bovinos vacinados (B19) e infectados. Em 24 soros examinados de animais vacinados não foram observadas reações de precipitação na prova de imunodifusão, enquanto em 24 animais considerados infectados através das provas de soroaglutinação em tubo, fixação de complemento e ELISA, constatou-se reações de precipitação em 18 animais.

PINOCHET *et al.* (1990) verificaram ausência de reação precipitante em 265 soros de animais vacinados (B19), utilizando o POLI O (obtido por extração

alcoólica) na prova de imunodifusão em gel de ágar, a despeito da positividade em 237 destes soros na prova de soroaglutinação em tubo e 248 na de rosa bengala.

LORD & CHERWONOGRODZKY (1992) avaliando a prova de imunodifusão com polissacarídeos obtidos de amostras de *B. melitensis*-115 (POLI B) e de *B. abortus* 1119-3 (POLI O), além de provas convencionais de soroaglutinação (soroaglutinação rápida em placa, soroaglutinação lenta em tubo, 2-mercaptoetanol, fixação de complemento e card test), em 54 soros de bezerras vacinadas com amostra B19, examinadas mensalmente do 30º ao 210º dias pós-vacinais; não observaram nenhuma reação precipitante na prova de imunodifusão com os dois antígenos polissacarídicos, enquanto nas outras provas, todos os animais ainda apresentavam resultados positivos aos 210 dias pós-vacinais.

DIAZ-APARICIO *et al.* (1993) não observaram reações de precipitação na prova de imunodifusão em 40 soros de bezerras vacinadas com a amostra B19, utilizando como antígeno, polissacarídios extraídos de *B. melitensis* (hapteno nativo) e *B. abortus* 2308 (POLI O).

As dificuldades na diferenciação de reações oriundas de infecção das de origem vacinal, através de métodos sorológicos convencionais (MACMILLAN, 1990; NICOLETTI & TANYA, 1993; SARAVI *et al.*, 1995; NIELSEN *et al.*, 1996; WEYNANTS *et al.*, 1996), decorrentes, principalmente, da persistência de Ig induzidas em animais vacinados com a amostra B19, são consideradas um dos maiores problemas no controle da brucelose, em países que adotam vacinas atenuadas aglutinogênicas (PLACKETT *et al.*, 1980; WHO, 1986).

Em função dos títulos pós-vacinais em animais adultos (WHO, 1986), o exame sorológico de fêmeas bovinas vacinadas com a amostra B19, conforme a normatização do Ministério da Agricultura do Brasil (BRASIL, 1979), deve ser realizado em idade igual ou superior a 30 meses, com interpretação diferenciada para animais vacinados e não vacinados.

Considerando a dificuldade de diferenciação de Ig induzidas em animais infectados por *Brucella* sp, das sintetizadas em animais vacinados com a amostra de *B. abortus* (B19); objetivou-se com o presente estudo, avaliar a utilização do extrato polissacarídico (POLI O), obtido da amostra *B. abortus* 1119-3, aplicado à prova de imunodifusão em gel de ágar, comparativamente a provas sorodiagnósticas convencionais para brucelose em bezerras vacinadas com a B19.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda-Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu, localizada no município de São Manoel, SP, utilizando-se 33 fêmeas bovinas da raça Nelore, entre 3 e 8 meses de idade.

A vacina empregada constituiu-se de produto comercial, contendo a amostra atenuada e liofilizada de *B. abortus* (B19). O produto foi testado quanto à concentração bacteriana e esterilidade antes do emprego nos animais experimentais; encontrando-se dentro dos padrões preconizados pela WHO (1986) para o número de unidades bacterianas viáveis, aferido pelo método de contagem viável (BIER, 1985) e com resultado negativo no teste de esterilidade para outros microrganismos.

Procedeu-se à vacinação de todos os animais, conforme a normatização do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária do Brasil, que preconiza para bovinos, a utilização da dose padrão da vacina B19 (*B. abortus*), em uma única dose, via subcutânea, nas fêmeas entre três a oito meses de idade (BRASIL, 1979).

Antes da vacinação, foi realizada colheita de sangue da totalidade dos animais, constituindo-se no dia zero do experimento. As primeiras quatro colheitas foram realizadas com intervalos de 14 dias, perfazendo o 14^o, 28^o, 42^o e 56^o dias pós-vacinais. As amostras subsequentes foram obtidas no 91^o, 119^o, 154^o, 182^o, 210^o, 245^o, 273^o, 308^o, 368^o, 548^o e 728^o dias após a vacinação, totalizando 16 colheitas.

Todos os animais foram testados pela técnica de imunodifusão em gel de ágar (MANCINI *et al.*, 1965; FAHEY & MCKELVEY, 1965), utilizando-se como antígeno, extrato polissacarídico (POLI O) obtido da amostra de *Brucella abortus* 1119-3 no Instituto de Tecnologia do Paraná-TECPAR, de acordo com a técnica descrita por CHERWONOGRODZKY & NIELSEN (1988), com interpretação das reações de precipitação (formação de linhas), baseadas em leituras com 24, 48 e 72h.

Adicionalmente, todos os soros foram testados indistintamente nas provas de soroaglutinação rápida em placa (SAR), soroaglutinação lenta em tubos (SAT) e 2-mecaptoetanol, segundo ALTON *et al.* (1976), e aglutinação rápida em placa com antígeno acidificado tamponado, corado com rosa bengala (ATA), conforme ALTON *et al.* (1975); utilizando antígenos produzidos e

gentilmente cedidos pelo TECPAR. Todas as provas sorodiagnostics foram realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada do Depto de Higiene Veterinária e Saúde Pública-FMVZ-UNESP/Campus de Botucatu.

Em virtude da obrigatoriedade da vacinação no rebanho estudado, não foi estabelecido grupo-controle não vacinado com a amostra B19.

RESULTADOS

Os 33 animais estudados foram negativos nas cinco provas realizadas, na amostragem obtida no dia da vacinação (dia zero).

Na prova de imunodifusão, somente um (3,0%) animal apresentou reação precipitante no 14^o dia após a vacinação. Nas amostras obtidas nas duas colheitas subsequentes, verificou-se 15 (45,4%) animais positivos no 28^o pós-vacinal e igual quantidade no 42^o dia.

Aos 56 dias após a vacinação, três (9,1%) animais foram positivos e um (3,0%) com reação precipitante fraco-positiva na imunodifusão. Esta reação fraco-positiva, manteve-se neste animal nas duas colheitas subsequentes (91^o e 119^o dias), embora os demais animais demonstrassem ausência de reações precipitantes a partir do 91^o dia pós-vacinal.

Ao final do 154^o dia após a vacinação, não foi observada nenhuma reação precipitante na prova de imunodifusão nos animais experimentais (Fig. 1).

No 14^o dia após a vacinação, todos os animais reagiram com títulos iguais ou superiores a 25 nas provas de SAR, SAT e 2-ME, e demonstraram soroconversão no do ATA.

Os títulos máximos na SAR e SAT foram constatados entre o 14^o e 42^o dias após a vacinação, e no 2-ME, entre o 28^o e 42^o dias pós-vacinais, verificando-se o declínio regular e contínuo do título nas três provas após os referidos picos.

No 245^o e 273^o dias pós-vacinais, todos os animais foram considerados negativos nas provas de SAT e SAR (Fig. 1), respectivamente, segundo a normatização do Ministério da Agricultura do Brasil (BRASIL, 1979), embora ao final do 728^o dia após o uso da vacina, três animais ainda apresentassem títulos entre 25 e 50 na SAR e SAT.

No 2-ME e ATA, os animais apresentaram ausência de reações aglutinantes no 308^o dia experimental (Fig. 1).

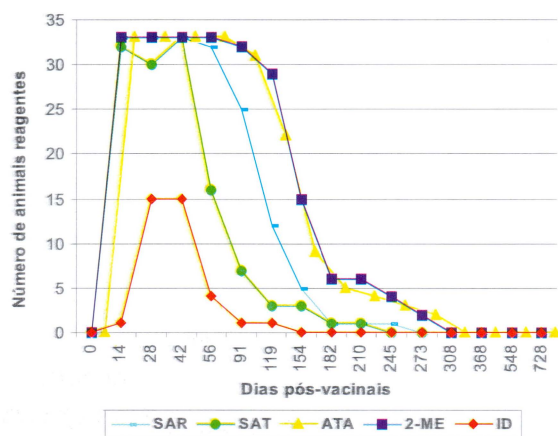


Fig. 1 - Número de fêmeas bovinas vacinadas com a B19, positivas nas provas de imunodifusão com antígenos polissacarídicos (ID), soroaglutinação rápida (SAR), soroaglutinação lenta (SAT), antígeno acidificado (ATA) e 2-mercaptoetanol (2-ME).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados verificados para os títulos máximos nos animais experimentais na SAR e SAT, entre o 14º e 42º dias pós-vacinais, e entre 28º e 42º dias no 2-ME, são similares aos intervalos referidos por SUTHERLAND (1980) e WHO (1986) para bezerras vacinadas com a B19 na idade recomendada. Estes títulos encontram justificativa na maior capacidade da SAR e SAT na detecção de Ig da classe IgM (MAC MILLAN, 1990) e do 2-ME, em relação à IgG (CASAS OLASCOAGA, 1976).

A negatividade da SAR e SAT, observada aos nove e oito meses, respectivamente, nos animais estudados, segundo as normas de interpretação de animais vacinados do Ministério da Agricultura do Brasil (BRASIL, 1979), foi mais tardia que os resultados descritos por ORNELLAS-SANTOS *et al.* (1975), que referem negatividade nestas provas aos 6 meses pós-vacinais.

Foram observados resultados negativos no 2-ME e ATA nos animais experimentais, ao redor dos dez meses pós-vacinais, contrariando os dados obtidos por SÁ (1989), que refere a negatividade nestas provas a partir dos 6 meses pós-vacinais, em bezerras imunizadas com a B19. No entanto, MAC MILLAN (1990) menciona a persistência de reações positivas no ATA em animais vacinados, em detrimento da negatividade nas provas de SAR, SAT e 2-ME.

A ausência precoce de reações aglutinantes no 2-ME e ATA, provavelmente decorre da maior especificidade destas técnicas na detecção de Ig da classe IgG, que se caracteriza pela persistência em animais doentes, com tendência ao desaparecimento em animais vacinados (SUTHERLAND, 1980; MAC MILLAN, 1990).

A persistência de animais com títulos residuais após 12 meses pós-vacinais nas provas de SAR e SAT, concorda com as citações da WHO (1986). Estes títulos residuais podem ser justificados pela maior habilidade destes testes em detectar Ig da classe IgM (MAC MILLAN, 1990), que tendem a predominar em animais vacinados com a B19 (SUTHERLAND, 1980).

Não encontra-se completamente esclarecido na literatura porque estes extratos polissacarídicos obtidos de amostras de *Brucella* sp., atuam como haptenos na prova de imunodifusão para brucelose, e não induzem Ig precipitantes em animais vacinados com a B19, ao contrário de animais infectados; embora estas Ig possam ser identificadas em animais vacinados com a B19, através de métodos imuno-enzimáticos, como o teste de ELISA (ALONSO-URMENETA *et al.*, 1988).

DIAZ *et al.* (1979), JONES *et al.* (1980) e MORIYON & DIAZ (1985) citam que a síntese destas Ig anti-polissacarídias de natureza precipitante em animais infectados, provavelmente necessita de alguma condição particular relacionada ao processo infeccioso, que se encontra ausente ou em menor intensidade em animais vacinados com a B19. CHERWONOGRODZKY & NIELSEN (1988) sugerem que haveria diferenças quantitativas e qualitativas (afinidade) na produção destes anticorpos precipitantes em animais vacinados e infectados.

No presente estudo, no 14º dia pós-vacinal, apenas um (3,0%) animal apresentou positividade na prova de imunodifusão. SÁ (1989) investigando Ig anti-hapteno nativo extraído de *B. melitensis*, aplicado à prova de imunodifusão, encontrou valores superiores, obtendo três (21,4%) animais positivos, em 14 estudados, no 14º dia após a vacinação com a B19. Ao contrário, ZYGMUNT & DUBRAY (1987) pesquisando anticorpos precipitantes através do teste de imunodifusão em bezerras vacinadas com a B19, utilizando como antígeno o hapteno nativo extraído de *B. abortus*, não observaram nenhum animal reagente após a vacinação. Da mesma forma, DIAZ

et al. (1979), utilizando o POLI B como antígeno, e CHERWONOGRODZKY & NIELSEN (1988), PINOCHET *et al.* (1990), LORD & CHERWONOGRODZKY (1992), empregando o POLI O, também não observaram reações precipitantes na prova de imunodifusão em fêmeas bovinas vacinadas com a B19.

Estas divergências observadas na persistência ou ausência de reações precipitantes na prova de imunodifusão em gel de ágar, em animais vacinados com a B19, empregando diferentes frações polisacarídicas extraídas de amostras do gênero *Brucella*, pode decorrer dos distintos protocolos de extração adotados, não permitindo a separação total da fração polissacarídica da lipopolissacarídica, resultando em resíduos de LPS que poderiam reagir com Ig de origem vacinal (ZYGMENT & DUBRAY, 1987), principalmente nos períodos de picos destas Ig após a vacinação com a B19, notadamente entre o 14^o e 42^o dias pós-vacinais (SUTHERLAND, 1980).

Adicionalmente, a despeito das relevantes diferenças de determinantes antigênicos entre o LPS e polissacarídeos de membrana de *Brucella* sp (BRUNDLE *et al.*, 1987; MORENO *et al.*, 1987), a precipitação do LPS no soro de animais vacinados na prova de imunodifusão, ao contrário da fração polissacarídica, poderia ocorrer em virtude dos diferentes estados físicos de agregação do LPS, sob a forma de micélios, e dos polissacarídios, como moléculas dispersas (SHANDS, 1971), que poderiam afetar a capacidade precipitante de cada uma das frações (ALONSO-URMENETA *et al.*, 1988).

No 91^o dia pós-vacinal, foi observado somente um (3,0%) animal com reação precipitante na prova de imunodifusão nos animais experimentais. Dados similares também foram evidenciados em bezerras vacinadas com a amostra B19, referindo que estes animais raramente desenvolvem, ou mesmo não apresentam anticorpos precipitantes a partir de três meses pós-vacinais, detectáveis através da prova de imunodifusão em gel de ágar, utilizando antígenos polissacarídicos de *Brucella* sp. obtidos por diferentes métodos de extração (PANIZO *et al.*, 1978; DIAZ *et al.*, 1979; BERMAN & JONES, 1980; DIAZ *et al.*, 1980; DIAZ *et al.*, 1981; JONES *et al.*, 1980; DIAZ *et al.*, 1984; CHERWONOGRODZKY & NIELSEN, 1988; SÁ, 1989; PINOCHET *et al.*, 1990; LORD & CHERWONOGRODZKY, 1992; DIAZ-APARICIO *et al.*, 1993).

Perante os resultados obtidos, observou-se que as bezerras entre 3 e 8 meses, vacinadas com a amostra B19, apresentaram resposta sorológica assentada nas provas de SAR, SAT, ATA e 2-ME, com declínio regular e contínuo de reatividade após os referidos picos, consideradas negativas ao redor de 10 meses pós-vacinais, enquanto a prova de imunodifusão apresentou alta precocidade na ausência de reações precipitantes (5 meses pós-vacinais); sugerindo que esta prova poderia ser aplicada como teste complementar alternativo no diagnóstico de brucelose em bezerras vacinadas com a amostra B19, em virtude do seu baixo custo, praticidade e especificidade para animais testados em idade inferior a recomendada pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gilberto Pedroso da Rocha, do Departamento de Produção e Exploração Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP/Campus de Botucatu, pela concessão dos animais para o experimento;

Ao Zootecnista João Ratti Júnior, da Fazenda-Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP/Campus de Botucatu, pelo auxílio na colheita de material.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO-URMENETA, B.; MORIYON, I.; DÍAZ, R.; BLASCO, J.M. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polysaccharide and smooth lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, n.12, p.2642-2646, 1988.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. *Las técnicas de laboratorio en la brucelosis*. Genebra: OMS, 1976. p.55-133 (Ser. Monogr., 55).
- ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A. Serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. *Aust. Vet. J.*, v.51, p.57-63, 1975.
- BERMAN, D.T. & JONES, M. Radial immunodiffusion: a confirmatory test for bovine

- brucellosis. In: ANNUAL MEETING OF THE U.S. ANIMAL HEALTH, 83., 1980, San Diego, California. *Proceedings*. p.118-127.
- BIER, O. *Microbiologia e Imunologia*. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. *Manual de procedimentos: movimento interestadual de animais e produtos*. 2.ed. Brasília: MA, Secretaria de Defesa Sanitária Animal, 1979.
- BRUNDLE, D.R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; CAROFF, M.; PERRY, M.B. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, v. 138, p.92-98, 1987.
- BRUNDLE, D.R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; PERRY, M.B. Characterization of *Brucella* polysaccharide B. *Inf. Immun.*, v.56, n.5, p.1101-1106, 1988.
- CASAS OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. *Zoonosis, Comite*, v.18, p.107-141, 1976.
- CHERWONOGRODZKY, J.W. & NIELSEN, K.H. *Brucella abortus* 1119-3 O-chain polysaccharide to differentiate sera from *B. abortus* S-19-vaccinated and field-strain-infected cattle by agar gel immunodiffusion. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, n.6, p.1120-1123, 1988.
- CORBEL, M.J. Recent advances in brucellosis. *J. Med. Microbiol.*, v.46, p.101-103, 1997.
- DIAZ, R.; GARATEA, P.; JONES, L.M.; MORIYON, I. Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin. Microbiol.*, v.10, n.1, p.37-41, 1979.
- DIAZ, R.; JONES, L.M.; LEONG, D.; WILSON, J.B. Surface antigens of smooth brucellae. *J. Bacteriol.*, v.96, n.4, p.893-901, 1968.
- DIAZ, R.; MARAVI, P.; RIVIERO, A. Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *Bull. W.H.O.*, v.53, p.417-424, 1976.
- DIAZ, R.; SALVO, M.D.; LAGO, L.F.; ZORRAQUINO, M. Diagnóstico serológico de la brucelose bovina. Estudio comparativo de la prueba de inmunodifusión radial con la reacción de fijación de complemento. *Rev. Diag. Biol.*, v.29, p.433-438, 1980.
- DIAZ, R.; TOYOS, J.; SALVO, M.D.; FERNÁNDEZ-LAGO, L.; ALONSO, B.; MORIYÓN, I.; DORRONSORO, I. Studies on the polysaccharide B and native haptens of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype 9. *Dev. Biol. Stand.*, v.56, p.213-220, 1984.
- DIAZ, R.; TOYOS, J.; SALVO, M.D.; PARDO, M.L. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. *Ann. Rech. Vet.*, v.12, n.1, p.35-39, 1981.
- DIAZ-APARICIO, E.; ARAGÓN, V.; MARÍN, C.; ALONSO, B.; FONT, M.; MORENO, E.; PÉREZ-ORTIZ, S.; BLASCO, J.M.; DÍAZ, R.; MORIYON, I. Comparative analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep and goats. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.12, p.3136-3141, 1993.
- FAHEY, J.L. & MCKELVEY, E.M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.*, v.94, p.84-90, 1965.
- HINSDILL, R.D. & BERMAN, T. Antigens of *Brucella abortus*. I. Chemical and immunoelectrophoretic characterization. *J. Bacteriol.*, v.2, p.307-316, 1967.
- JONES, L.M.; BERMAN, D.T.; MORENO, E.; DEYOE, B.L.; MICHAEL, J.; HUBER, J.D.; NICOLETTI, P. Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.12, n.6, p.753-760, 1980.
- LEONG, D.; DIAZ, R.; MILNER, K.; RUDBACH, J.; WILSON, J.B. Structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. *Infect. Immun.*, v.1, p.174-182, 1970.
- LORD, V.R. & CHERWONOGRODZKY, J.W. Evaluation of polysaccharide, lipopolysaccharide and β -glucan antigens in gel immunodiffusion tests for brucellosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, n.3, p.389-391, 1992.
- MAC MILLAN, A. A conventional serologic tests. In: NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.155-300.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HERMANS,

- F.J. Immunochemical quantitation of antigens by a single radial immunodiffusion. *Immunochemical*, v.2, p.235-254, 1965.
- MORENO, E.; MAYER, H.; MORIYON, I. Characterization of a native polysaccharide hapten from *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.*, v.55, p.2850-2853, 1987.
- MORENO, E.; SPETH, S.L.; JONES, L.M.; BERMAN, D.T. Immunochemical charaterisation of *Brucella* lipopolisaccharides and polysaccharides. *Infect. Immun.*, v.31, n.1, p.214-222, 1981.
- MORIYON, I. & DIAZ, R. Polissacarideos hapténicos de brucella. In: CONGRESSO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA, 9., 1985, Valadolid, Spain. *Proceedings*. p.349-351.
- NICOLETTI, P. & TANYA, V. Comparison of enzyme-labeled immunosorbent assay and particle concentration fluorescence immunoassay with standard serologic methods and bacteriologic culture for detection of *Brucella* sp. infected cows in herds with brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.202, n.12, p.1975-1977, 1993.
- NIELSEN, K.H.; KELLY, L.; GALL, D.; BALSEVICIUS, S.; BOSSE, J.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Prev. Vet. Med.*, v.26, p.17-32, 1996.
- OLITZIKI, A.L. & SULITZEANU, D. The antigenic structure in the genus *Brucella*. *Bull. Res. Counc. Israel*, v.6, p.112-114, 1957.
- ORNELLAS-SANTOS, P.P.; ARAÚJO, R.F.; REIS, R. Brucelose bovina: Persistência da aglutinação pós-vacinal em bezerras de raças zebuínas vacinadas com a amostra B-19. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, v.27, p.363-373, 1975.
- PANIZO, A.; ORTIGOSA, J.; DIAZ, R. Presencia en sueros bovinos de precipitinas frente al antígeno A + M, polisacárido B y proteínas del genero *Brucella*. *Rev. Sanid. Hig. Pública*, v.52, p.1-12, 1978.
- PINOCHET, L.V.; ÁBALOS, P.P.; STEPHENS, L.K.; DURÁN, M.N. Normalización de un antígeno soluble para descartar respuesta postvacunal a *Brucella abortus* cepa 19. *Av. Cienc. Vet.*, v.5, n.2, p.119-123, 1990.
- PLACKET, P.; ALTON, G.G.; CARTER, P.D. et al. Failure of a single dose of *Brucella abortus* strain vaccine to protect cattle when given early in calfhoo. *Austr. Vet. J.*, v.56, p.409-412, 1980.
- READFERN, M.S. *An immunochemical study of antigens of brucella extracted by the westpal technique*. Madison, 1960. [Tese (PhD)-Univ. Wisconsin].
- SÁ, M.I.V.C.C. Avaliação da prova de imunodifusão radial com o antígeno hapteno nativo (HN) no diagnóstico serológico da brucelose em animais infectados e vacinados. Estudo comparativo com outras provas serológicas. *Rep. Trab. Lab. Nac. Investig. Vet.*, v.21, p.11-44, 1989.
- SARAVI, M.A.; WRIGHT, P.F.; GREGORET, R.J.; GALL, D.E.J. Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.47, p.93-99, 1995.
- SHANDS, J.W. The physical structure of bacterial lipopolysaccharide. In: WEINBAUM, G.; KADIS, S.; AJL, S. *Microbial toxins*. New York: Academic Press, 1971. p.127-144.
- SUTHERLAND, S.S. Immunology of bovine brucellosis. *Vet. Bull.*, v.50, p.359-368, 1980.
- WEYNANTS, V.; TIBOR, A.; DENOEL, P.A.; SAEGERMAN, C.; GODFROID, J.; THIANGE, P.; LETESSON, J. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *Vet. Microbiol.*, v.48, p.101-112, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Expert Commite on Brucellosis*. Genebra: FAO/WHO, 1986. 132p. (Technical Report, 740).
- ZYGMUNT, M.S. & DUBRAY, G. Preparation by ultrafiltration and control by high-performance liquid chromatography of the native hapten of *Brucella abortus* for use in radial immunodiffusion diagnostic test. *J. Clin. Microbiol.*, v.25, n.10, p.1860-1863, 1987.

Recebido para publicação em 13/5/98