

RESPOSTAS SOROLÓGICAS DE BOVINOS À VACINA EXPERIMENTAL CONTRA COLIBACIOSE E SALMONELOSE*

L.F.F. Margatho¹ & F.A. Ávila²

¹Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bauru, Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico Centro Oeste, APTA, Av. Rodrigues Alves, 40-40, CEP 17030-000, Bauru, SP, Brasil.

RESUMO

Foi avaliada a resposta imune de uma vacina experimental em 46 vacas prenhes, em final de gestação, cerca de 6 semanas antes do parto. Estimulados por uma ou duas doses, de vacina mista anti-*Escherichia coli* e *Salmonella* Dublin (VES) ora sem adjuvante, ora em veículo aquoso, ora em veículo oleoso. O título de anticorpos anti-K99⁺ de *Escherichia coli*, anti-H (AHS) e anti-O (AOS) de *Salmonella* Dublin, foi determinado pelo método de soroaglutinação em tubos, em amostras de soro colhidas na pré-vacinação, aos 21 dias, 42 dias e pós-parto, após início das vacinações; dos bezerros na 1^a, 2^a, 4^a semana, ou até se verificar a ausência de título; e colostro após parto. Para as aglutininas anti-K 99 da *Escherichia coli*, após a vacinação com VES o título geométrico médio (TGM) apresentou uma taxa média de aumento de 283%, na 1^a dose, e 320% na 2^a dose. Para as aglutininas anti-H da *Salmonella* Dublin, após a vacinação com VES o TGM apresentou uma taxa média de aumento de 260%, na 1^a dose, e 348% na 2^a dose. Para as aglutininas anti-O da *Salmonella* Dublin, após a vacinação com VES o TGM apresentou uma taxa média de aumento de 59,2%, na 1^a dose, e 259% na 2^a dose. A vacina mista VES, independentemente da presença ou do tipo de adjuvante, induziu a produção de aglutininas nas vacas vacinadas, que foram transferidas para os bezerros através do colostro. A vacina em veículo aquoso ou oleoso, aplicada com dose de reforço, mostrou ser mais eficiente no controle da colibacilose e salmonelose bovina.

PALAVRAS-CHAVE: Vacinação, diarreia bovina, *Escherichia coli*, *Salmonella* Dublin.

ABSTRACT

SEROLOGICAL RESPONSES OF BOVINE TO EXPERIMENTAL VACCINES AGAINST BOVINE COLIBACIOSE AND SALMONELOSE. The immunity response of experimental vaccines was evaluated in 46 pregnant cows, in late gestation, about 6 weeks before calving. This was done through the titers of antibodies from the serum and the colostrum of cows and from the serum of calves, natural and/or stimulated by one or two doses of a mixed vaccine anti-*Escherichia coli* and *Salmonella* Dublin (ESV), with and/or without adjuvant, in aqueous or oily vehicle. The titer of antibodies anti-K99⁺ of *Escherichia coli*, anti-H (A.H.S.) and anti-O (A.H.O.) of *Salmonella* Dublin was determined through the method of agglutination in tube, in serum samples collected before vaccination, at the 21st. and the 42nd days, and at the post-parturition, right after the vaccinations had started. In the case of the calves this happened at the 1st, 2nd and 4th weeks, or until the title absence was noticed; and colostrum after calving. For the anti-K 99 agglutinins of the *Escherichia coli*, after the vaccination with ESV the geometric mean titre (GTM) was on average increased by 283% in the 1st dose, 320% in the 2nd dose. For the agglutinins anti-H of the *Salmonella* Dublin, after the vaccination with ESV the GMT was on average increased by 260% in the 1st dose, 348% in the 2nd dose. For the agglutinins anti-O of the *Salmonella* Dublin, after the vaccination with ESV, the GTM was on average increased by 59.2% in the 1st dose, 259% in the 2nd dose. The vaccine mixed ESV, independently of the presence or of the adjuvant type, induced the agglutinin production in the vaccinated cows, which were transferred to the calves through the colostrum. The vaccine in aqueous or oily vehicle, applied with booster doses, showed to be more efficient in the control of the bovine colibacilose and salmonelose.

KEY WORDS: Vaccination, bovine diarrhea, *Escherichia coli*, *Salmonella* Dublin.

*Part of PhG thesis, presented in 2002, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal- UNESP.

²Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

A salmonelose e a colibacilose são enfermidades bacterianas infecto-contagiosas ocasionadas por estirpes patogênicas de *Salmonella* Dublin (SD) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) que afetam os bovinos lactantes, ocasionando elevados prejuízos econômicos (WITTUM *et al.*, 1993). A *Escherichia coli* enterotoxigênica ETEC causa diarreia em bezerros com menos de duas semanas de idade e a SD acima de duas semanas. Os animais que sobrevivem a essas doenças não apresentam o mesmo desenvolvimento quando comparados àqueles que se mantiveram livres destas infecções. (LIBERAL, 1989; MAGALHÃES *et al.*, 1991).

O conjunto de dados disponíveis sobre a epidemiologia das infecções por *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Tiphymurium e ETEC, nos países desenvolvidos e no Brasil, permite inferir que estes agentes estão entre as principais infecções bacterianas graves e constituem uma das principais causas de mortalidade em bezerros (ACRES, 1985; BRITO *et al.*, 1986; ÁVILA *et al.*, 1988; LIBERAL, 1989).

Estratégias para reduzir a incidência e severidade da diarreia pela SD e ETEC no rebanho bovino têm sido consideradas prioridades para minimizar as grandes perdas econômicas ocasionadas. As vacinas têm tido um maior impacto na prevenção e controle, mas as medidas estratégicas que se utilizam de melhorias sanitárias, do uso de antibióticos e da administração de colostro aos neonatos também são de grande importância, e devem ser consideradas parte integral nos programas de saúde animal (WRAY & MORRIS, 1985; PADOLA *et al.*, 1998).

O antígeno "O", constituído pelo lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de *Salmonella* sp. é um importante fator de virulência por influenciar as interações com macrófagos, ativar o sistema complemento e funcionar como uma endotoxina (DESIDERIO & CAMPBELL, 1985). Segundo ROBERTSON *et al.* (1982) quanto maior a quantidade de LPS, na parede celular bacteriana, maior a proteção da célula à ação de anticorpos anti-O, complemento e dos efeitos líticos das enzimas lisossomais quando introduzida dentro do fagolisossomo. A *Escherichia coli* é o microrganismo mais abundante da microbiota intestinal dos bezerros; e como anaeróbico facultativo, desempenha um importante papel na manutenção das funções fisiológicas normais de seus hospedeiros. No entanto, é também um importante patógeno e algumas cepas desenvolveram a capacidade de colonizar, invadir e produzir toxinas (ACRES, 1985).

A ETEC age fundamentalmente no intestino delgado pelos mecanismos de aderência, colonização e produção de toxina, que são os fatores essenciais para instalação do desequilíbrio hidro-eletrolítico e gera-

ção de diarreia. A fixação da bactéria nas células das vilosidades intestinais ocorre através de suas fimbrias (NAVEL *et al.*, 1984). A patogênese da diarreia causada pela ETEC é similar a da cólera, pois a bactéria uma vez aderida ao epitélio intestinal, produz toxina e estimula a secreção local de eletrólitos e água para luz intestinal (MOON & BUNN, 1993).

A proteção contra doenças entéricas só tem lugar quando os anticorpos, principalmente das classes IgA e IgG₁ colostrais, são ingeridos pelos bezerros recém-nascidos. Vacas prenhes no final de gestação, ao receberem a vacinação, transmitem aos bezerros uma proteção inicial através do colostro (MYERS, 1980).

A vacinação de fêmeas prenhes, usando células mortas de *Salmonella* sp. adsorvidas em diferentes adjuvantes, tem demonstrado que estas produzem anticorpos anti-O e anti-H (MORTOLA *et al.*, 1992). Duas doses de bacterina de SD, por via subcutânea, nos últimos meses de gestação de fêmeas e uma dose em bezerros entre 15 e 30 dias de vida, foram eficientes para redução da taxa de mortalidade. Os poucos casos de salmonelose que persistiram foram atribuídos às falhas na vacinação, desnutrição ou "status" imunológico dos animais (LIBERAL, 1989).

No caso da *Escherichia coli*, as vacinas podem ser mais específicas, se preparadas com a presença do antígeno K99 (MYERS, 1980; GARCIA *et al.*, 1994). Quando são emulsionadas em óleo mineral ou adsorvidas em hidróxido de alumínio, determinam o aumento na duração da imunidade em vacas e reduzem a mortalidade de bezerros (ANDERSON *et al.*, 1971; COLLINS *et al.*, 1988).

No Brasil, ÁVILA *et al.* (1986) verificaram que estas vacinas induzem à produção de anticorpos nas vacas vacinadas e que estes são transferidos para os bezerros ao amamentarem-se de colostro. Observaram também que após desafio, os bezerros se mostraram imunes, o que permitiu concluir que a vacina é eficiente no controle da diarreia de bezerros causadas pela ETEC.

Diante das considerações acima, procurou-se desenvolver e avaliar uma vacina mista, com as bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* Dublin (VES), tendo o objetivo de comparar os diferentes tipos de adjuvantes e doses da vacina, no controle de diarreias em bezerros causadas por ETEC e SD.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, foram utilizadas quarenta e seis vacas prenhes, em final de gestação, junto ao Laticínio Fazenda Globo, propriedade leiteira, localizado na região Noroeste do Estado de São Paulo, divididas em sete grupos e submetidas a diferentes tratamentos O

grupo I (n=9) constituído de vacas não vacinadas que receberam duas doses de placebo, as quais permaneceram como controle. Grupo II (n=6) constituído de vacas que receberam duas doses de vacina experimental anti-*Escherichia coli* K99⁺ e anti-*Salmonella* Dublin com hidróxido de alumínio. Grupo III (n=6) constituído de vacas que receberam uma dose da mesma vacina experimental. Grupo IV (n=7) constituído de vacas que receberam duas doses da vacina experimental com adjuvante oleoso. Grupo V (n=6) constituído de vacas que receberam uma dose da mesma vacina experimental. Grupo VI (n=6) constituído de vacas que receberam duas doses da mesma vacina experimental sem adjuvante. Grupo VII (n=6) constituído de vacas que receberam uma dose da mesma vacina. Nos grupos que receberam uma única dose da vacina, esta foi administrada por volta da 6^a semana antes do parto, e nos grupos que receberam duas imunizações, a segunda foi aplicada num intervalo médio de 21 dias após a primeira dose.

Vacina

A vacina (bacterina) foi preparada utilizando-se uma amostra de *Escherichia coli* enterotoxigênica portadora do pili K99, sorotipo O101:K30:K99, amostra 483, isolada de bezerro com diarreia e uma amostra de *Salmonella* Dublin, estirpe SDJ, também isolada de bezerro com pneumo-enterite. Uma vacina foi adsorvida em emulsão água em óleo do tipo AIF (vacina oleosa) outra com adjuvante à base de hidróxido de alumínio = Al (OH)₃ (vacina aquosa) e outra sem adjuvante (VANSELOW, 1987). Cada dose de 5 ml de vacina continha 5,0 x 10⁹ microorganismo de *Escherichia coli* e 7,5 x 10⁹ microorganismo para *Salmonella* Dublin (COLLINS & CAMPBELL, 1982; ÁVILA *et al.*, 1986; LIBERAL *et al.*, 1989).

Monitoramento Clínico

Todas as vacas foram examinadas clinicamente a fim de se observar alguma reação pós-vacinal, e os bezerros foram avaliados todos os dias em relação à temperatura e à qualidade das fezes (normais, leve diarreia, diarreia aquosa).

Sangue e Colostro

Amostras de sangue foram coletadas de cada animal dois dias antes da vacinação para dosagem de anticorpos pré-vacinais, e a cada vinte uns dias após cada vacinação até o dia do parto. No pós-parto, foram coletadas amostras de colostro antes de se iniciarem as amamentações, e de sangue, anticorpos pós-vacinais. Dos bezerros foram colhidas amostra de sangue na 1^a semana vida.

Pesquisa Sorológica

Anticorpos contra o antígeno K99

Para titulação de anticorpos contra o antígeno de aderência K99 no soro e no colostro, foi utilizada a técnica de soro-aglutinação em tubos, conforme técnica relatada por ÁVILA *et al.* (1986).

Preparo do antígeno K99

Para obtenção do antígeno de aderência K99, uma estirpe enterotoxigênica (Sta+) de *Escherichia coli* sorotipo O9:K35:K99 foi cultivada em meio de MINCA, repicada para o meio CYE, ambas incubadas a 37° C, durante 24 horas. Após a incubação foi realizada centrifugação e lavagem (3 vezes) em solução fisiológica (SF) visando à eliminação da proteína do meio de cultura. A seguir, ajustando a suspensão bacteriana final com SF para corresponder ao grau 3,5 (± 9 X 10⁸ bactérias/mL) da escala de MacFarland. Para cada 10 mL da suspensão bacteriana, foi adicionando 0,5 mL da solução de aldeído fórmico a 10 %.

Pesquisa de anticorpos contra *Salmonella* Dublin

Preparo dos antígenos somáticos "O" e flagelar "H" de SD

Para a produção do antígeno "O", a amostra de *Salmonella* Dublin (SBJ) foi cultivada em garrafa Roux contendo 200 mL de ágar nutriente, à temperatura de 37° C durante 18 horas. A massa bacteriana formada foi colhida da superfície do ágar, mediante sucessivas lavagens com raspagem com bastão de vidro solução salina. A seguir, para a inativação da suspensão antigênica, foi adicionado álcool etílico na proporção de 50% (v/v), homogeneizada e incubada a 38° C por 24 horas. Para a produção do antígeno "H", foram selecionadas bactérias com grande motilidade, através do cultivo da amostra de *Salmonella* Dublin (SBJ) em tubo "U". Um "pool" destas bactérias foi incubado em 500 mL de meio BHI, a 37° C por 18 horas. Após este período de cultivo, era feita a inativação da suspensão bacteriana mediante a adição de 0,5% de formol (formaldeído em solução a 40%) gradativamente, sob agitação constante e, em seguida, mantido em estufa a 37° C durante 24 horas sob agitação constante.

Anticorpos contra os antígenos "O" e "H" de SD

Para pesquisa de anticorpos contra os antígenos "O" e "H" de SD no soro e colostro, foi utilizada a técnica de aglutinação em tubos, seguindo os princípios básicos da clássica reação de WIDAL para diagnóstico da salmonelose humana (BIER, 1984; ARAUJO, 1995).

Análise Estatística

Para análise estatística dos resultados, estabeleceram-se os valores dos títulos geométricos médios utilizando-se a transformação logarítmica em escala log₁₀ dos títulos de anticorpos anti-EPEC e anti-SD. Para a análise das diferenças entre títulos de anticorpos pré e os grupos pós-vacinais foi utilizada a análise de variância. Quando a análise de variância mostrou diferenças consideradas significativas, foi utilizado o teste de Tukey para comparação grupo a grupo, em nível de significância ($p < 0,05$). O coeficiente de correlação (r) foi usado para determinar a relação entre a variável título de anticorpos vacinais de colostro em vacas e soros de bezerros (GOMES, 1987).

RESULTADOS

Os anticorpos naturais foram detectados, embora em baixa concentração, em todos os grupos vacinais, na fase de pré-vacinação para todos os três antígenos pesquisados (Figs. 1, 2 e 3). A análise dos títulos de anticorpos anti-K99 pré-vacinais demonstrou 17 (36,9%) vacas com títulos geométricos médio (TGM) adquiridos naturalmente. Semelhante situação foi observada em 16 (34,8%) vacas para o AHS e para AOS.

O valor do TGM de anticorpos naturais anti-K99 pré-vacinação (PV) foi de 0,53. Aos 21 dias, no período pós-vacinal, o TGM evoluiu para 2,03, um aumento de 283%. Para G_2 e G_4 , a partir da segunda dose de vacina, no 42º dia, respectivamente, observou-se um aumento de 32% e 22% nos níveis do título de anticorpos. A melhor resposta à vacina foi observada no G_4 (Fig. 1).

O valor do TGM de anticorpos anti-H, PV foi de 0,58 e manteve-se inalterado nas diferentes fases do trabalho, no grupo controle. Aos 21 dias, no período pós-vacinação, o TGM evoluiu para 2,60, um aumento de 348%. Para G_2 e G_4 , a partir da segunda dose de vacina, no 42º dia, respectivamente, observou-se um aumento de 17% e 50%, nos níveis do título de anticorpos. A vacinação induziu um aumento significativo do título de anticorpos para os grupos vacinais G_2 , G_3 e G_4 ($p < 0,0001$) aos 42º dias em relação aos demais grupos, com um aumento de título, respectivamente de 309, 550 e 475% ($p < 0,0001$) (Fig. 2).

O valor do TGM de anticorpos PV anti-O foi de 0,27 e também se manteve inalterado nas diversas fases do trabalho, no grupo controle. Os níveis de anticorpos pós-vacinais tenderam a ser mais elevados para as vacinas aquosa e oleosa, quando em duas doses, respectivamente 1,12 e 1,22, porém a diferença em relação aos demais grupos não foi significativa, no 42º dia ($p = 0,194$). Para G_2 e G_4 , a partir da segunda dose de vacina, no 42º dia, respectivamente, observou-se um aumento de 315% e 516%, nos níveis do título de anticorpos, em relação à fase anterior no 21º dia (Fig. 3).

A Tabela 1 demonstra que os níveis de anticorpos anti-K99 e anti-H, nos bezerros filhos de mães imunizadas com duas doses de vacina oleosa (G_2 e G_4), apresentaram na primeira semana de vida, títulos mais elevados quando comparados com os vacinados sem adjuvantes (G_6 e G_7) e controle ($p < 0,0001$).

Na Tabela 2 é apresentado o valor do TGM de anticorpos para os diferentes antígenos pesquisados a partir de colostro das vacas, dos diferentes esquemas de imunização. Para o TGM anti-K99, o melhor resultado obtido foi 2,85 observado no colostro de vacas imunizadas com duas doses de VES, em veículo oleoso, embora não tenham sido encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos vacinais. O TGM anti-H, utilizando duas doses de vacina, em veículo aquoso e oleoso, mostrou os valores de (3,86

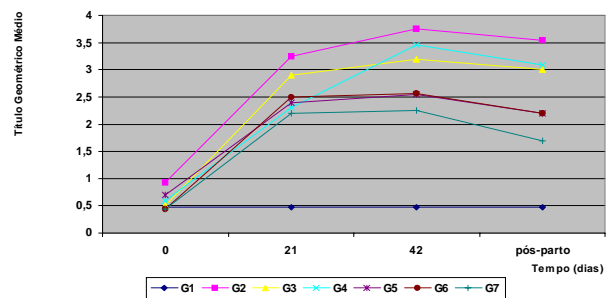


Fig. 1 - Cinética da produção de anticorpos anti-K99 de *Escherichia coli* no soro de vacas imunizadas com VES.

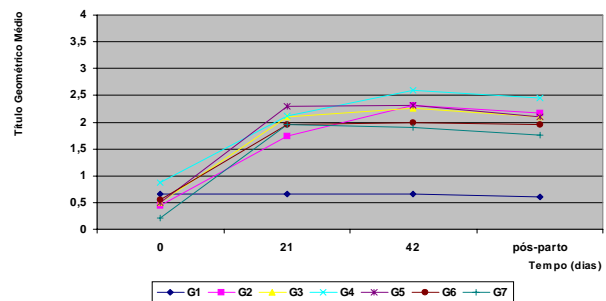


Fig. 2 - Cinética da produção de anticorpos anti-H de *Salmonella* Dublin no soro de vacas imunizadas com VES.

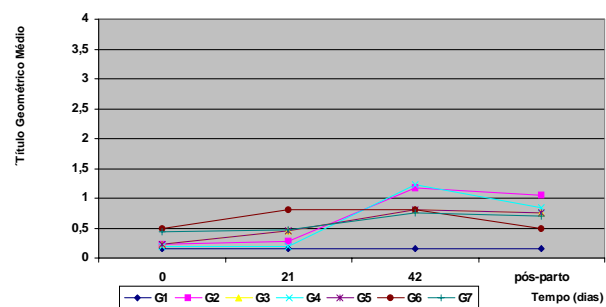


Fig. 3 - Cinética da produção de anticorpos anti-O de *Salmonella* Dublin no soro de vacas imunizadas com VES.

e 3,56) respectivamente; foram os melhores resultados ($p < 0,0001$). Para anti-O, o TGM de anticorpos foi um pouco maior no G_2 (1,27), G_3 (1,17), G_4 (1,05) e G_6 (1,07), porém as diferenças entre os quatro grupos e os demais não são estatisticamente significativas ($p = 0,250$). O nível de anticorpo presente no colostro para os diferentes esquemas de imunização foi sempre mais alto que aquele observado nos soros das vacas e bezerros.

Através do coeficiente de correlação (r) ficou demonstrada forte evidência da transferência de anticorpos anti-K99, anti-O e anti-H: do colostro aos bezerros, independentemente do número de aplicações e da presença ou ausência de adjuvante. Correlação significativa ($p < 0,0001$) foi obtida para transferência de anticorpos anti-H pelo colostro com $r = 0,88$. Para os anticorpos anti-O foi $r = 0,77$ e para os anticorpos anti-K99 foi $r = 0,75$.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, a vacinação com VSE induziu a um aumento significativo dos títulos de anticorpos anti-K99 e anti-SD, que foram transferidos aos bezerros ao se amamentarem de colostro. PORTER *et al.* (1975) trabalhando com uma bactéria mista observaram uma significativa redução na incidência, duração das diarreias, no uso de antibióticos e medicamentos. Observaram ainda que os bezerros apresentaram melhor ganho de peso e melhor apetite para concentrados.

No presente estudo foi detectada a presença de aglutininas na fase pré-vacinal, que possivelmente pode ser explicada pela existência de ambientes contaminados, que favorecem à contínua exposição

dos animais aos microrganismos, ou a vacinações anteriores. Esta hipótese foi confirmada por WRAY *et al.* (1975) que estudaram oito rebanhos leiteiros infectados com sorotipos de *Salmonella* spp. Em todos foram detectados títulos de aglutininas anti-O tanto nos aparentemente infectados, como nos não infectados.

Para WRAY & SOJKA (1977) altos títulos de aglutininas anti-*Salmonellas* são capazes de proteger bezerros quando desafiados com infecção por *Salmonella* Typhimurium. Em nosso estudo, as aglutininas anti-O estiveram presentes no colostro para os diferentes esquemas de imunização, principalmente após a 2ª dose vacinal. E para anti-H, a utilização de dose de reforço vacinal também mostrou melhores resultados.

COLLINS *et al.* (1988) avaliando a eficiência de uma bactéria anti-colibacilose em emulsão de óleo, comparando uma e duas doses, com relação à duração da imunidade, não observaram diferenças no T.G.M.; fato também observado no presente estudo. Consideram ainda, em aspectos práticos da vacinação, que uma só dose é preferível à aplicação de múltiplas doses, pois oferece mesma proteção via anticorpo materno.

Nas amostras de soro de bezerros que se amamentaram do colostro, foi detectada a presença de aglutininas para os antígenos K99 na primeira semana de vida. A maioria dos casos clínicos por ETEC ocorre em bezerros jovens com menos de uma semana de idade, período em que esses animais são sensíveis à colonização pela *Escherichia coli* em nível intestinal. As *Escherichia colis* são as primeiras bactérias a infectar o trato gastrointestinal e já estão presentes no final do primeiro dia de vida por transmissão fecal-oral. Estes fatos, associados ao resultado deste trabalho, indicam que é possível prevenir a diarreia neonatal por

Tabela 1 - Título geométrico médio de anticorpos passivos anti-K99, anti-O e anti-H em soro de bezerros, filhos de mães vacinadas com a VES e grupo controle, na 1ª semana de vida.

Grupo	K99 T.G.M.	H T.G.M.	O T.G.M.
G ₁	0,14	0,14	0,00
G ₂	1,66	3,06	0,70
G ₃	1,29	2,11	0,70
G ₄	1,78	2,29	0,79
G ₅	1,61	1,44	0,44
G ₆	0,8	1,76	0,22
G ₇	0,7	0,90	0,22
	G1# todos grupos	G1 # todos grupos	NS
			F=1,78
	G4> G6 e G7	G4>G 6 e G7	P=0,25
	G2>G7	G2>G6 e G7	
	F=8,94	F=18,95	
	P<0,000	p<0,0001	

Tabela 2 - Título geométrico médio de anticorpos anti-K99, anti-O e anti-H presentes no colostro de vacas vacinadas com a VES e grupo controle.

Grupo	K99	H	O
G ₁	0,81	0,72	0,18
G ₂	2,55	3,86	1,27
G ₃	2,46	3,16	1,17
G ₄	2,85	3,56	1,25
G ₅	2,45	2,46	0,85
G ₆	2,25	2,56	1,07
G ₇	2,06	2,25	0,85
	G1# de todos	G1# de todos	NS
	G2~G3~	G2>G 5,	F=1,35
	G4~G 5~	G6 e G7	P=0,25
	G6~G7	G4>G7	
	F=12,28	F=21,79	
	p<0,0001	p<0,0001	

EPEC, pois corresponde ao período em que os anticorpos protetores estiveram presentes no soro dos bezerros imunizados passivamente.

A utilização de vacinas sem adjuvantes mostrou uma resposta imunológica fraca em relação às vacinas em veículo aquoso e/ou oleoso. BACHMANN *et al.* (1984) encontraram resultados similares ao trabalharem com uma bacterina de *Escherichia coli* com e sem adjuvante oleoso. A suspensão sem adjuvante não foi imunogênica no primeiro mês de vida, enquanto à incorporada em adjuvante oleoso permitiu detectar uma satisfatória resposta humoral.

Durante o decorrer do experimento não foi observado, em nenhuma fêmea vacinada, reação adversa grave que pudesse ser atribuída à vacina. Apenas em dois animais vacinados com a vacina oleosa (5,4%) e um animal (2,7%) em veículo aquoso, observou-se aumento de volume e sensibilidade à palpação no local de injeção, portanto a vacina pode ser considerada segura e pouco reativa. Esta constatação também foi relatada após o término de um trabalho sobre vacinas contra salmonelose e colibacilose bovina por COLLINS *et al.* (1988) e LIBERAL (1989).

Os níveis de anticorpos pós-vacinais tenderam a ser mais elevados tanto para a vacina aquosa, como oleosa, quando aplicada em duas doses. Entretanto, o tipo de adjuvante não revelou diferença no estímulo imunogênico. Em geral, as vacinas de SD e EPEC são administradas separadas e simultaneamente. Porém, uma vacina mista como a que utilizamos constitui uma situação operacionalmente desejável, mostrando-se segura e imunogênica neste experimento. HADLER (1994) também recomenda o uso combinado de antígenos em uma única preparação e administração, com intuito de diminuir o manejo na fazenda.

Concluindo, pelos resultados obtidos, ficou demonstrado o valor prático da vacinação contra a salmonelose e colibacilose, podendo-se evitar assim as grandes perdas econômicas causadas à bovinocultura por estas duas infecções entéricas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. José Roberto P. Lauris, da Faculdade de Odontologia, USP, Campus de Bauru, pelas análises Estatísticas; ao Sr. Tertuliano Aparecido Santos – Gerente Laticínios Fazenda Globo, Agudos, SP, pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos de campo; e à Pesquisadora Científica Dra. Sueli Aparecida Fernandes, Seção de Bacteriologia, Setor de Enterobactérias, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo/SP pela classificação sorológica de amostra de *Salmonella*; ao técnico de laboratório, FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal, João Luiz Quintana, pelo auxílio nas análises de laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACRES, E.D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.229-56, 1985.
- ANDERSON, J.; SMITH, B.P.; ULRICH, J.T. Vaccination of calves with a modified bacteria or oil-in-water emulsion containing alkali-detoxified *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. *Am. J. Vet. Res.*, v.52, p.596-9, 1971.
- ARAUJO, J.I. Infecção natural por *Salmonella typhimurium* em cobaias (*Cavia porcellus*), em um biotério de centro de pesquisa. *Desenvolvimento e avaliação da eficácia de uma vacina específica*. Jaboticabal: 1995. 67p. [Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista].
- ÁVILA, F.A.; ÁVILA, S.H.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; QUITANA, J.L. Evaluation of the immunizing efficiency of a pili K99-Bearing vaccine for the protection of cattle against colibacillosis. *Ars Vet.*, v.2, p.217-220, 1986.
- ÁVILA, F.A.; ÁVILA, S.H.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; LALLIER, R.; QUITANA, J.L. *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in the northern region of State of São Paulo, Brasil. *Ars Vet.*, v.4, p.285-289, 1988.
- BACHMANN, P.A.; BALIER, G.; GMELCH, X.; EICHHORN, W.; PLANK, P. Vaccination of cows with K99 and Rotavirus antigen: potency of K99 antigen combined with different adjuvants in stimulating milk antibody secretion. *Zentralblatt-fur Veterinarmedizin B.*, v.31, p.660-668, 1984.
- BIER, O.G. Microbiologia e imunologia. 23. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984. cap. 32, p.627-635: *Salmonella e Escherichia*.
- BRITO, M.S.M.; NUNES, M.P.; RANGEL, F.B.; LAZARO, N.S. Detecção de enterotoxina termo-estável em amostras de *Salmonella dublin*, isoladas de processos diarreicos de bezerros tipo leiteiro no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Ver. Bras. Med. Vet.*, v.8, p.165-167, 1986.
- COLLINS, F.M. & CAMPBELL, S.G. Immunity to intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.3, p.65-66, 1982.
- COLLINS, N.F.; HALDUR, T.; SCHWENCK, W.H. Duration of immunity and efficacy of an oil emulsion *Escherichia coli* bacterin in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, p.674-677, 1988.
- DESIDERIO, J.V. & CAMPBELL, S.G. Immunization against experimental murine salmonellosis with liposome associated O-antigen. *Infect. Immun.*, v.48, p.658-663, 1985.
- GARCIA, M.; LEITE, D.S.; YANO, T. Evaluation of an oil emulsified vaccine against bovine colibacillosis using semi-purified K99-F41 adhesins. *Braz. J. Res. Anim. Sci.*, v.31, p.225-232, 1994.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 12. ed. Piracicaba: Nobel, 1987. 298p.
- HADLER, S.C. Cost benefit of combining antigens. *Biologicals*, v.22, p.145-148, 1994.
- LIBERAL, M.H.T. Controle da salmonelose em bezerros jovens pela vacinação. Niterói: PESAGRO, 1989. 11p. (documentos, n.17).
- MAGALHÃES, H.; FREITAS, M.A.; GONÇALVES, W.M. Ocorrência, aspectos bacteriológicos e histopatológicos na colibacilose de bezerros. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.29, p.555-564, 1991.

- MOON, H.W. & BUNN, T.O. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animal. *Vaccine*, v.11, p.213-220, 1993.
- MORTOLA, M.E.; PENNIMPEDE, P.E.; ARAUZ, P.M.; LAZOVICH, L.S.; NAUMOVICH, T.D. Calve samonellosis: prophylaxi by maternal immunization. *Av. Cienc. Vet.*, v.7, p.203-208, 1992.
- MYERS, L.L. Passive protection of calves against experimentally induced and naturally occurring enteric colibacillosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, p.1952-1956, 1980.
- NAVEL, M.W.; ZUSMAN, T.; SKUTELSKY, E.; RON, E.Z. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect on pathogenicity. *Avian Dis.*, v.28, p.651-661, 1984.
- PADOLA, N.L.; TIANO, M.; SANZ, M.E.; CIVIT, A. Estudio de la respuesta humorla del bovino a *Escherichia coli* y *Salmonella dublin*. *Rev. Med. Vet.*, v.79, p.371-376, 1998.
- PORTER, P.; KENWORTHY, R.; THOMPSON, I. Oral imunisation and its significance in the prophylactic control of enteritis in the preruminant calf. *Vet. Rec.*, v.97, p.24, 1975.
- ROBERTSON, J.A.; SUENSON, S.B.; LINDBERG, A.A. *Salmonella typhimurium* infection in calves delayed especific skin reactions directed against the O-antigenenic polyscharide chain. *Infect. Immun.*, v.37, p.737-748, 1982.
- VANSELOW. The application of adjuvantes to veterinary medicine. *Veterinary Bulletin*, v.57, n.11, p.881-896, 1987.
- WITTUN, T.E.; SALMAN, M.D.; OODDE, K.G.; MORTIMER, R.G.; KING, M. E. Causes and costs of calf mortality in Colorado beef herds participating the National Animal Health monitoring System. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.203, p.232-235, 1993.
- WRAY, C. & MORRIS, J. A. Aspects of colibacillosis in farm animals. *J. Hyg. Camb.*, v.95, p.577-593. 1985.
- WRAY, C.; MORRIS, J.A.; SOJKA, W.J. A Comparison of indirect haemagglutination test and serum agglutination tests for the serological diagnosis of *Salmonella* Dublin infection in cattle. *Br. Vet. J.*, v.131, p.27-37, 1975.
- WRAY, C. & SOJKA, W.J. Review of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. *J. Dairy Res.*, v.44, p.383-425, 1977.

Recebido em 5/11/02

Aceito em 3/2/03