

T636.083 69
F747u
2001

Cid Bastos Fóscolo

**USO TERAPÊUTICO DA VACINAÇÃO CONTRA A
CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA EM TOUROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Andrey Pereira Lage.

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2001

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

27/01/01

1592901-09

0322-03460

F747u Fóscolo, Cid Bastos, 1970-

2001 Uso terapêutico da vacinação contra a campilobacteriose genital bovina em touros / Cid Bastos Fóscolo. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 2001.

27p.: il.

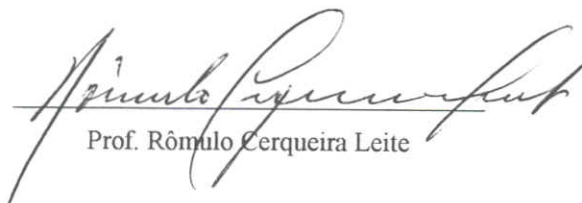
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária


1. Touro - Doenças - Teses. 2. Infecções por *Campylobacter* - Teses. 3. Imunofluorescência - Teses. 4. *Campylobacter* - Vacina - Tese. I. Título.

CDD - 636.089 693 6

Dissertação defendida e aprovada em 19 de março de 2001 pela comissão examinadora constituída por:


Prof. Andrey Pereira Lage
Orientador


Prof. Rômulo Cerqueira Leite


Prof. Francisco Carlos Faria Lobato


Profa. Isabella Bias Fortes Ferraz

*Aos meus amados pais
Margarida e Cid*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Andrey Pereira Lage pela amizade, aprendizagem, força, inesgotável incentivo e admirável orientação ao longo do curso;

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite pela orientação em meu trabalho e seus conselhos que contribuíram na minha carreira profissional;

Ao Prof. Francisco Carlos Faria Lobato pela disposição em ensinar e auxílio na elaboração desse trabalho;

À Dr^a Isabella Bias Fortes Ferraz pelas valiosas sugestões na correção desse trabalho;

À Dr^a Aiesca Oliveira Pellegrin pela amizade, incentivo, alegria e contribuição com suas idéias geniais na realização desse trabalho;

À Josely, Carolina, e João Paulo pela grande contribuição com o tempo e energia na realização desse trabalho;

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos amigos Ana Paula, Ricardo, Karina, Luiz Marcelo, Paulo Emílio, José Renato, Gláucia, Simone, Kika, Nádia, Nelson, Eliane, Amélia, Ana Helena, Giovana, Géder e Cristiano que influenciaram com conselhos, alegria e idéias neste projeto e em minha vida;

À Adryana e Cláudio pela incomensurável amizade, força e carinho nesta etapa da minha vida.

À minha querida Debinha, companheira de todos os momentos e que apareceu no momento certo e me ajudou a persistir nos meus objetivos;

À minha família que eu amo tanto, minha irmã Íris um ser de Luz, meus irmãos Ivan e em especial Rodrigo o pequeno grande caçula que admiro muito e a meus pais Cid e Margarida, por serem minha vida, minha alegria e meus exemplos. A vocês agradeço por tudo que sou.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pelo fornecimento da bolsa de estudo;

À Embrapa Pantanal pela valiosa contribuição na realização deste trabalho.

À Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária – FEP-MVZ Coordenação Preventiva pelo apoio financeiro.

A todos estes maravilhosos amigos meus sinceros e profundos agradecimentos!

“Metade do conhecimento é a pergunta; a outra metade é a resposta”.

Aboù ‘Ostsmân Al-Makki

SUMÁRIO		Pág.
	RESUMO.....	13
	ABSTRACT.....	13
1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	LITERATURA CONSULTADA.....	15
2.1.	Campilobacteriose genital bovina.....	15
2.2.	Distribuição geográfica da campilobacteriose genital bovina.....	16
2.3.	Campilobacteriose genital bovina no Brasil.....	16
2.4.	Diagnóstico da campilobacteriose genital bovina.....	16
2.4.1.	Isolamento e identificação.....	17
2.4.2.	Imunofluorescência direta (IFD).....	17
2.5.	Controle da campilobacteriose genital bovina.....	18
2.5.1.	Manejo reprodutivo.....	18
2.5.2.	Tratamento.....	18
2.5.3.	Vacinação.....	18
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1.	Animais.....	19
3.2.	Coleta do lavado prepucial.....	20
3.3.	Desenho experimental.....	20
3.3.1.	Vacinação.....	20
3.4.	Imunofluorescência direta.....	21
3.4.1.	Produção do soro anti- <i>C. fetus</i> subsp <i>venerealis</i>	21
3.4.2.	Produção do conjugado.....	21
3.4.3.	Imunofluorescência direta.....	21
3.5.	Produção da vacina.....	21
3.5.1.	Teste de esterilidade e inocuidade.....	21
3.6.	Análise estatística.....	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.	CONCLUSÃO.....	24
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito da vacinação contra Campilobacteriose genital bovina em 27 touros infectados.....	22
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cronograma de coletas e vacinação.....	20
---	----

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito terapêutico de uma bacterina produzida com a amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC10354 em 32 touros com idade entre cinco e sete anos. Antes da vacinação, o grupo experimental foi testado pela técnica de imunofluorescência direta (IFD), apresentando 27 touros positivos e cinco touros negativos para *C. fetus*. Os animais receberam duas doses de vacina com um intervalo de 23 dias. Após a primeira vacinação foram identificados 15 animais positivos a IFD para o *C. fetus*, uma queda estatisticamente significativa de 44,45% ($P < 0,05$) na frequência de touros infectados. Após a segunda vacinação foram identificados 12 animais positivos, uma queda estatisticamente significativa de 55,55% ($P < 0,05$) na frequência de touros infectados no início do experimento. Entretanto, não houve diferença significativa no número de touros infectados após a primeira e a segunda vacinação.

Palavras-chave: Campilobacteriose Genital Bovina, Bacterina, vacina, imunofluorescência direta, *Campylobacter fetus*, bovino, imunoprofilaxia.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the therapeutic effect of a bacterin produced *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 on 32 bulls aged 5 to 7 years. Before vaccination, the experimental group was tested by direct fluorescence antibody technique (DFAT); 27 bulls were positive and 5 negative to *C. fetus*. The animals received two doses of vaccine 23 days apart. After the first dose 15 animals were DFAT positive, with a significant reduction of 44,45% ($P < 0,05$) in the frequency of infected bulls. After the second vaccination, 12 bulls were DFAT positive with a significant reduction of 55,5% ($P < 0,05$) in the frequency of infected bulls. However, there was no significant difference between the number of infected bulls after the first and after the second vaccination.

Key words: Bovine Genital Campylobacteriosis, bacterin, vaccine, direct fluorescent antibody test *Campylobacter fetus*, cattle, immunoprophylaxis, therapeutics.

1. INTRODUÇÃO

A Campilobacteriose Genital Bovina é uma doença venérea infecciosa dos bovinos cujo agente etiológico é o *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. As perdas econômicas estão relacionadas com problemas reprodutivos, principalmente a infertilidade temporária, o aumento do intervalo entre partos pela freqüente repetição de cio, a morte embrionária, o custo do descarte e reposição de touros e o aumento da idade à primeira cria, uma vez que as novilhas são as mais acometidas.

Estudos epidemiológicos demonstram que a Campilobacteriose Genital Bovina é prevalente em nosso meio. Isto se deve a grande maioria das propriedades ainda utilizar a monta natural, onde o touro é o principal responsável pela manutenção e disseminação da doença no rebanho.

A presença da Campilobacteriose Genital Bovina é, em grande parte, dependente da porcentagem de touros infectados utilizados na monta e da relação touro/vaca, ou seja, do número de coberturas realizadas. Dessa forma, as características do manejo utilizado em grande parte dos rebanhos brasileiros constituem-se em fatores de risco para a manutenção da doença em níveis endêmicos.

Uma das estratégias de controle da Campilobacteriose Genital Bovina é a vacinação que pode ser empregada como auxiliar na implantação do programa de inseminação artificial. Entretanto, sua maior utilidade se encontra naqueles rebanhos em que não é possível introduzir nenhuma outra estratégia para o controle da doença.

A vacinação tem sido utilizada com sucesso na prevenção e terapia da doença em fêmeas. Vacinas oleosas têm se mostrado bastante eficazes, eliminando sinais clínicos como repetição de cio e aborto em rebanhos com animais infectados pelo *C. fetus*. No entanto, o efeito da vacinação terapêutica em touros é contraditório.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito terapêutico da vacinação contra

Campilobacteriose Genital Bovina em touros infectados pelo *Campylobacter fetus*.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1 Campilobacteriose Genital Bovina

A Campilobacteriose Genital Bovina é uma enfermidade infecciosa causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, cujo habitat natural é o trato genital de bovinos (Stoessel, 1982).

Existem duas subespécies que podem causar problemas reprodutivos: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. O habitat natural do *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* é o trato reprodutivo dos bovinos; no touro ele coloniza a mucosa prepucial e na vaca a mucosa da vagina, cérvix, útero e ovidutos. O *C. fetus* subsp. *fetus* tem seu habitat no intestino e causa abortos esporádicos em bovinos, aborto enzoótico em ovinos e septicemia no homem (Garcia & Brooks, 1993).

A infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* provoca um quadro de infertilidade temporária com repetições de cio e abortamentos, levando a grandes perdas econômicas, sendo que o *C. fetus* subsp. *venerealis* é responsável por mais de 95% dos casos de abortos, enquanto que *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* representa menos que 5% (Dekeyser, 1984).

Sob condições naturais, o *C. fetus* subsp. *venerealis* é transmitido do macho a fêmea e vice-versa pelo coito ou pelo uso de sêmen contaminado, sendo que a transmissão entre machos pode ocorrer por fômites ou por cama contaminada, principalmente em animais de centrais de coleta de sêmen. A transmissão de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* de touros infectados para fêmeas é alta e a infertilidade representada pela repetição de cio, atinge mais comumente as novilhas e vacas susceptíveis, sendo que o aborto, por volta do quinto mês de gestação, ocorre em 10% das fêmeas que se infectam (Garcia & Brooks, 1993).

Nos machos, o *C. fetus* subsp. *venerealis* não causa lesão e pode permanecer no prepúcio por toda vida do animal (Clark & Duffy, 1978), colonizando principalmente, a mucosa das

criptas prepuciais, de uma forma comensal (Samuelson & Winter, 1966). A persistência da infecção no trato genital bovino pode ser devido às variações antigênicas do *C. fetus* subsp. *venerealis* que ocorrem durante a infecção, provocando uma baixa resposta imune (Bier et al., 1977; Corbeil et al., 1975).

Tem sido observado que touros mais velhos são mais susceptíveis à infecção natural ou experimental pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* (Clark, 1971), principalmente pelo fato do aumento da profundidade das criptas prepuciais, com o desenvolvimento da idade dos animais, otimizando as condições de microaerofilia na mucosa prepucial, necessárias à sobrevivência do agente (Samuelson & Winter, 1966). Segundo Vandeplasseche et al. (1963) a maioria dos touros com mais de quatro anos de idade, que não foram tratados mantiveram a infecção pelo *C. fetus* no prepúcio de uma forma crônica.

Entretanto, a susceptibilidade de touros mais velhos à infecção, não foi confirmada por alguns autores (Bier et al., 1977; McCool et al., 1988). Pellegrin et al. (1997) também não confirmaram esta relação, porém na região estudada, os touros mais jovens iniciam a monta com idade superior a quatro anos, quando provavelmente já tenham um grande desenvolvimento das criptas prepuciais.

2.2 Distribuição geográfica da Campilobacteriose Genital Bovina

A Campilobacteriose Genital Bovina foi descrita em 29 países e suspeita-se de sua existência em outros dois dos 157 países informantes do Anuário de Sanidade Animal FAO-OMS-OIE de 1999, o que representa 19,7% dos países informantes (FAO, 1999).

A Campilobacteriose Genital Bovina é importante onde existem grandes rebanhos com manejo reprodutivo por monta natural, apresentando todos os fatores de risco necessários para a manutenção da doença em elevados índices (Pellegrin, 1998).

Na Argentina e Austrália, onde o manejo reprodutivo e o tipo de criação são semelhantes aos encontrados em nossos rebanhos a Campilobacteriose Genital Bovina tem sido bastante estudada. Na Argentina a doença foi

investigada em um período compreendido entre 1975 e 1984, demonstrando índices de rebanhos positivos que variaram de 21% a 43%, com ocorrência de touros portadores entre 15% e 23% (Villar & Spina, 1982; Soto & Di Roco, 1984; Cipolla et al., 1984). Nos rebanhos australianos a doença causa grandes perdas anuais, com uma taxa média de 60% de retorno ao cio e apenas 35% das novilhas cobertas ficam prenhes (McCool et al., 1988).

2.3 Campilobacteriose Genital Bovina no Brasil

No Brasil, a Campilobacteriose Genital Bovina foi detectada pela primeira vez por D'Apice (1956), no Estado de São Paulo, sendo bem investigada até o início da década de 1980 por vários levantamentos epidemiológicos, onde a ocorrência da doença foi de 53,8% no Rio Grande do Sul (Mies Filho, 1963), 14,4% nos Estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais (Castro et al., 1971) e 13% no Rio de Janeiro (Ramos & Guida, 1978).

A frequência de infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* em touros no Brasil foi estudada mais recentemente por Genovez et al. (1986) no Estado de São Paulo, por Jesus et al. (1997) no Estado do Rio de Janeiro, por Lage et al., (1997) no Estado de Minas Gerais e por Pellegrin et al. (1998) no Estado do Mato Grosso do Sul encontrando índices de infecção de 23,9%, 72,3%, 27,9% e 52,3% respectivamente.

2.4 Diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina

As técnicas rotineiramente utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* em touros são o isolamento e identificação baseada em características bioquímicas (Stoessel, 1982) e a imunofluorescência direta (Mellick et al., 1964; Winter et al., 1965). As técnicas sorológicas não são utilizadas no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina por não apresentarem boa sensibilidade e especificidade (Hewson et al., 1985).

Devido às características epidemiológicas da Campilobacteriose Genital Bovina (Stoessel, 1982) e do touro se apresentar como portador assintomático permanente (Dekeyser, 1984),

torna-se mais econômico e prático realizar o diagnóstico preferencialmente nesta categoria animal. Além disso, como o touro tem oportunidade de cobrir todas as fêmeas do rebanho ou lote, um touro infectado no rebanho indica que o rebanho está infectado.

2.4.1 Isolamento e identificação

O isolamento e identificação é o padrão ouro do diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina, permitindo, pela utilização de provas bioquímicas, a identificação do agente causal dos problemas reprodutivos observados (Leite, 1977; Stoessel, 1982; Dekeyser, 1984).

O uso de meios de cultura seletivos, embora apresentando resultados variáveis, favorece o isolamento do agente em reprodutores infectados (Plumer et al 1962; Shepler et al., 1963; Winter et al., 1965; Duffy & McEntee, 1969).

Vários suplementos de antibióticos são comumente utilizados visando tornar mais seletivos os meios de cultura para *C. fetus* (Plastringe et al., 1961; Shepler et al., 1963; Lander, 1990a; Lander, 1990b; Ribeiro et al., 1990).

Para um diagnóstico definitivo, o *C. fetus* subsp. *venerealis* deve ser isolado das amostras de esmegma prepucial de reprodutores suspeitos de infecção. O isolamento desses organismos a partir do esmegma prepucial é dificultado pelo reduzido número de *C. fetus* e pela alta taxa de contaminantes resistentes aos antibióticos presentes no inóculo (Shepler et al., 1963; Duffy, 1967; Winter et al., 1967), sendo que a presença de contaminação massiva impede o diagnóstico, mesmo utilizando-se meios seletivos (Duffy et al., 1969).

São necessários pelo menos três exames sucessivos, para a confirmação de diagnóstico negativo de Campilobacteriose Genital Bovina (Plastringe et al., 1957; Duffy et al., 1969; Gibson et al., 1970).

2.4.2 Imunofluorescência Direta (IFD)

O teste de imunofluorescência direta foi primeiramente introduzido para os problemas de diagnóstico bacteriológico por Moody,

Goldman e Thomason (1956) e em 1964, Mellick et al. desenvolveram sua aplicação para a detecção de *C. fetus*. Reações cruzadas entre *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* ocorrem na IFD, não podendo estas subespécies ser diferenciada pelo teste (Philpott, 1968; Ruckerbauer et al., 1974). Entretanto, a IFD foi considerada um excelente teste para detecção de *C. fetus* em lavado prepucial e sêmen bovino (Taul e Kleckner, 1968), sendo utilizada em vários levantamentos epidemiológicos (Villar & Spina, 1982; Soto & Di Rocco, 1984; Lage et al., 1997; Pellegrin et al., 1998).

Estudos realizados na Argentina utilizando o cultivo e a imunofluorescência direta não demonstraram haver diferença significativa quanto à detecção de animais infectados pelo *C. fetus* (Cipolla et al., 1984). Leite (1977) e El-Jakee et al. (1991) utilizando as técnicas de isolamento e IFD observaram que a IFD apresentou um melhor resultado na detecção de *C. fetus* em touros, sendo, os resultados, muito semelhantes aos do isolamento e identificação, com a vantagem de ser mais simples. Winter et al. (1967) e Ruckerbauer et al. (1974) consideram que tanto o isolamento como a IFD são técnicas satisfatórias para serem empregadas na rotina de detecção de touros portadores, entretanto um teste negativo não pode ser considerado conclusivo, devendo-se repeti-lo mais de uma vez.

O diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina pela IFD, quando comparado com a cultura, é efetuado em menor tempo, a presença de contaminantes não é problema e as condições de coleta e tempo entre a coleta e o diagnóstico não precisam ser tão rígidas (Philpott, 1968). Por isto, o teste de IFD apresentou grandes vantagens permitindo avançar no conhecimento da epidemiologia da Campilobacteriose Genital Bovina.

Segundo Soto e Dick (1983) a IFD é uma técnica que oferece ampla margem de segurança, detectando de 95-98% dos animais portadores sendo necessários mais de dois exames de IFD, com intervalos de coleta entre 8 a 15 dias, para se assegurar um diagnóstico negativo para *C. fetus*. Lage & Leite (2000) recomendam que para se obter uma maior sensibilidade na IFD devem, ser efetuada três coletas repetidas no mesmo animal, em

intervalos quinzenais, estando o animal em repouso sexual prévio.

2.5 Controle da Campilobacteriose Genital Bovina

2.5.1 Manejo reprodutivo

Para o controle da Campilobacteriose Genital Bovina deve-se considerar que a transmissão é venérea, os touros são portadores permanentes e as fêmeas infectadas podem ter imunidade após trêsaios (Pellegrin, 1998).

A mais conhecida e eficiente prática de manejo a ser adotada no controle da Campilobacteriose Genital Bovina é a inseminação artificial (Stoessel, 1982; Dekeyser, 1984). A inseminação artificial pode ser considerada, entretanto, impraticável, na maioria dos grandes rebanhos e em regiões onde é quase impossível o acesso à mão-de-obra especializada ou infraestrutura adequada (Pellegrin, 1999).

Outra estratégia utilizada com a finalidade de eliminar a infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* do rebanho é o repouso sexual das fêmeas por três a quatro ciclos, possibilitando que o sistema imune tenha tempo de produzir imunidade específica (Dekeyser, 1984). Entretanto, a utilização exclusiva dessa prática não é suficiente para o controle da doença, uma vez que algumas fêmeas portadoras podem manter a infecção por vários meses (Dekeyser, 1984; Cipolla, 1994).

A utilização somente de touros jovens e a segregação de touros velhos, colocados em cobertura somente com as vacas, é uma prática que pode ser introduzida no manejo reprodutivo da propriedade, associada à implantação de estação de monta (Stoessel, 1982; Pellegrin et al., 1998).

Sendo a monta natural ainda a prática reprodutiva mais utilizada em 96% do rebanho nacional (Yassu et al., 1998), o reprodutor deve ser testado, pelo menos 3 vezes, 60 dias antes do início da época de coberturas, respeitando-se a necessidade de repouso sexual prévio de 15 dias antes e durante todo o período dos testes, diminuindo a possibilidade de falsos negativos (Pellegrin, 1998; Lage & Leite, 2000).

2.5.2 Tratamento

O tratamento de touros infectados somente é recomendável em animais de alto valor zootécnico sendo antieconômico utilizá-lo em todo o rebanho, embora substâncias antimicrobianas têm sido utilizadas no tratamento de touros, vacas e sêmen contaminado (Jesus et al., 1996; Pellegrin et al., 1998). A dihidroestreptomicina é a substância mais aplicada no controle das infecções causadas pelo *C. fetus*. Seger et al. (1966) recomendaram a aplicação no prepúcio de soluções aquosas de dihidroestreptomicina, concomitante com a aplicação parenteral da mesma droga, no tratamento de touros infectados.

O grande problema do tratamento com substâncias antimicrobianas nos touros em serviço é a reinfecção. Nas fêmeas, o valor do tratamento é altamente questionável, pois dentro de poucas semanas uma resposta imune efetiva pode restaurar a fertilidade (Dekeyser, 1984).

2.5.3 Vacinação

A relação custo-benefício do controle da Campilobacteriose Genital Bovina pela vacinação das fêmeas é positiva, sendo demonstrado por Leite (1977) que o retorno está próximo a 18 vezes os valores investidos na vacinação.

A vacinação contra a Campilobacteriose Genital Bovina tem sido utilizada com sucesso em rebanhos onde a implantação da inseminação artificial é difícil de ser realizada e não é possível introduzir nenhuma outra estratégia para seu controle. Vacinas experimentais oleosas tem se mostrado bastante eficazes, minimizando a repetição de cio e o aborto nos rebanhos com animais positivos para a Campilobacteriose Genital Bovina, devendo ser utilizadas 30 a 45 dias antes da estação de monta, com revacinação anual, em todas as fêmeas em reprodução (Leite, 1977; Leite et al., 1980; Ramos et al., 1986).

Vários autores comprovaram que as fêmeas podem ser efetivamente imunizadas contra infecções pelo *C. fetus* e a vacinação pode ser usada para o controle da Campilobacteriose Genital Bovina em casos onde o nível de infecção é alto (Firehammer et al., 1966; Clark

et al., 1974; Clark et al., 1976; Eaglesome et al., 1986).

Ramos et al. (1986) conseguiram uma imunização contra a doença em 16 novilhas vacinadas com uma bacterina em adjuvante oleoso. Berg et al. (1979) observaram que as fêmeas imunizadas permaneciam com níveis altos de anticorpos sistêmicos e que alguns animais somente eliminaram a infecção após um período de 136 dias depois da segunda vacinação, concluindo que não existia uma correlação entre o tempo de eliminação da infecção e os níveis de anticorpos sistêmicos produzidos.

Segundo Frank et al. (1967), a vacinação melhora a eficiência reprodutiva das fêmeas, mas não protege contra a infecção, quando em contato com touros infectados. Apesar de não ter prevenido a infecção, ocorre um aumento de resistência e uma eficiência reprodutiva satisfatória quando comparado ao grupo controle.

Bryner et al. (1988) compararam a eficácia de 10 vacinas comerciais quanto à prevenção de abortos após exposição ao *C. fetus* e encontraram uma variação de 0 a 89 % de eficiência. Bryner et al. (1988) relataram a deficiência na produção de imunidade de algumas vacinas comerciais, sugerindo que a porcentagem de proteção que uma vacina oferece é diretamente proporcional à massa bacteriana utilizada e que pode ocorrer falha na imunogenicidade das amostras usadas na vacina ou tipo de adjuvantes empregado. Segundo Hum et al. (1993) além da qualidade das vacinas, as alterações nos sorotipos das amostras infectantes podem levar a evasão da resposta imune.

Vasquez et al. (1983) concluíram após falhar na eliminação da infecção em 2 de 10 touros vacinados, que esta prática sozinha não é um bom método para o controle da Campilobacteriose Genital Bovina. Allan et al. (1972) testando a eficiência da vacina no campo concluíram que a vacinação em fêmeas apresenta bons resultados o mesmo não ocorrendo com os touros, recomendando a vacinação somente em fêmeas.

Clark et al. (1968) e Clark et al. (1982) obtiveram altos níveis de imunidade e proteção duradoura com a vacinação usando uma alta concentração de *C. fetus* subsp. *venerealis* (47mg de peso seco de bactéria) em óleo mineral. A imunidade para esta vacina em touros foi de pelo menos 12 meses e de pelo menos 24 meses para vacas, enquanto que uma vacina com 33mg de peso seco com adjuvante de hidróxido de alumínio diminui o tempo de duração da imunidade para 4,5 meses (Clark et al., 1982).

Bouters et al. (1973) concluíram que a vacinação em touros produz um efeito tanto preventivo quanto curativo. Ocorreu cura em 41 touros infectados quando se utilizou uma vacina experimental. Foram aplicadas duas doses com um intervalo de seis semanas, conseguindo-se 30 touros livres após primeira dose e os 11 restantes após a segunda dose. Os touros continuaram em serviço regulamentemente em uma área infectada e permaneceram livres da infecção por mais de um ano. Na mesma área infectada, 288 touros negativos para *C. fetus* receberam uma dose e permaneceram livres da infecção por mais de um ano.

Van Aert et al. (1976) descreveram que a imunização sistêmica em touros contra *C. fetus* tem um efeito preventivo e curativo. Testes de aglutinação do soro e das secreções prepuciais de 13 touros vacinados com uma vacina comercial demonstrou a produção crescente de três classes de imunoglobulinas: IgG, IgM e IgA, sendo que IgA só foi detectada nas secreções prepuciais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 32 touros, da raça Nelore de uma fazenda de gado de corte com criação extensiva localizada na região de Corumbá, Mato Grosso do Sul. Os touros tinham idade entre 5 e 7 anos. O manejo reprodutivo utilizava monta natural com estação de monta estabelecida no período de dezembro a março, sendo que a propriedade já possuía diagnóstico anterior de Campilobacteriose Genital Bovina (Pellegrin et al., 1997).

3.2 Coleta do lavado prepucial

O lavado prepucial de todos os touros foi coletado em 50 ml de salina fosfatada tamponada (PBS, pH 7,2) estéril (Leite et al., 1995). No momento da coleta foram introduzidas duas agulhas de calibre 40 X 20 na tampa de borracha dos frascos e uma delas foi acoplada a um cateter, ficando a outra agulha para entrada de ar. A extremidade livre do cateter foi introduzida no ósteo prepucial do touro sendo este fechado com a mão. O frasco foi elevado para que o líquido fosse vertido na cavidade prepucial e em seguida foram feitas massagens vigorosas no sentido antero-posterior. O frasco foi então abaixado e o lavado coletado por gravidade e armazenado sob refrigeração por no máximo, dois dias, até a realização da IFD.

3.3 Desenho experimental

Foram realizadas sete coletas de lavados prepucial no período entre de 5 de setembro a 13 de dezembro de 2000 (figura 1), nos dias 0, 10, 20, 70, 80, 90 e 97 do experimento.

Os intervalos entre as coletas e o dia da vacinação foram realizados considerando-se: o manejo da propriedade, pois os touros ficavam em pastos imensos e distantes do curral e para trazer todos os animais ao curral era necessário

que todos os funcionários da fazenda ajudassem na capturas destes; o tempo que o material levaria para chegar ao laboratório que era calculado sempre de acordo com o carro que levava suprimentos não atrapalhando assim a rotina de trabalho da fazenda.

Os resultados dos exames das coletas no teste de imunofluorescência direta foram separados em três fases: dias 0, 10 e 20 (antes da primeira vacinação) dias 70 e 80 (após primeira vacinação) e dias 90 e 97 (após segunda vacinação), sendo que em cada fase os touros foram considerados positivos pela presença de bactérias fluorescentes, com morfologia típica do gênero *Campylobacter* em pelo menos um exame.

Os touros iniciaram o repouso sexual aproximadamente seis meses antes do início do experimento, mantendo-se nesta condição durante a realização do experimento.

3.3.1 Vacinação

Foram aplicados 3 ml da vacina experimental (item 3.5) por via subcutânea em todos os 32 touros nos dias 60 e 83 do experimento (figura 1). Os animais foram observados por duas horas após a vacinação para verificar a presença de reações adversas em decorrência da vacinação.

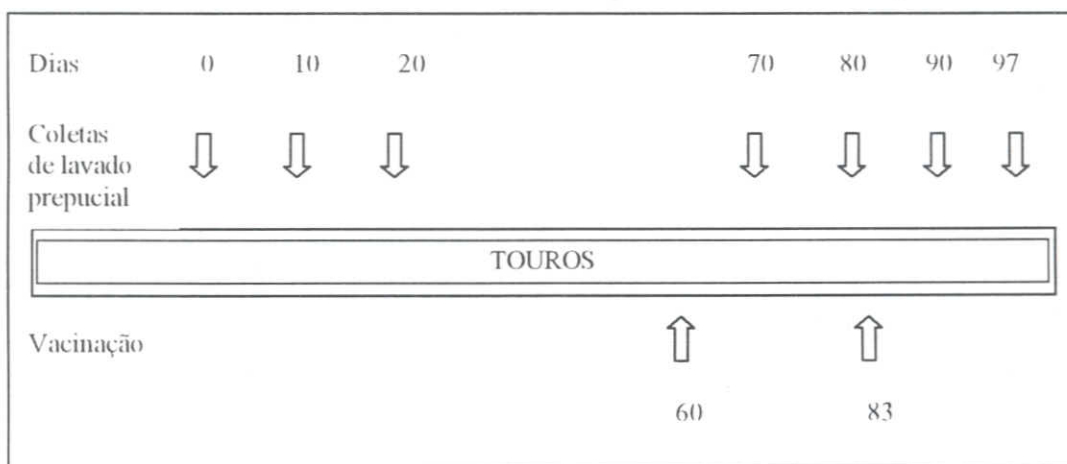


Figura 1- Cronograma de coletas de lavado prepucial e vacinação.

3.4 Imunofluorescência Direta (IFD)

3.4.1 Produção do soro anti-*C. fetus* subsp. *venerealis*

O soro anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* foi produzido em dois coelhos machos, pesando 2,0Kg, segundo Edwards & Ewing (1972) utilizando a amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354*.

3.4.2 Produção do Conjugado

O conjugado foi preparado de acordo com Ruckerbauer et al. (1974) com isotiocianato de fluoresceína (Sigma, USA). O conjugado foi titulado frente a amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis*, em diluições seriadas a partir de 1:25 até 1:200. A diluição ótima do conjugado foi estabelecida em 1:50. O conjugado foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.4.3 Imunofluorescência direta (IFD)

A IFD foi realizada de acordo com Mellick et al. (1964) e Winter et al. (1965). Os lavados prepuciais foram centrifugados a 600 x G por 10 min a 4°C. O sobrenadante (da primeira centrifugação) foi recentrifugado a 10000 x G por 30 min a 4°C. O sedimento da segunda centrifugação foi suspenso em 500 µl de PBS (pH 7,2) e 20 µl desta suspensão foram colocados nas áreas da lâmina para imunofluorescência. As lâminas foram secas na estufa a 37°C e então fixadas em acetona por 30 min a -10°C. As lâminas foram então cobertas com conjugado na diluição 1:50 e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 min. Após esta etapa foram efetuadas três lavagens em PBS (pH 7,2) por 10 min e uma última lavagem com água destilada de forma rápida. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH 9,2) e lamínula, sendo observadas a 40x e 100x em microscópio de epifluorescência (CBA Olympus, Japão). Foram consideradas positivas na IFD as amostras que apresentavam bactérias fluorescentes, com morfologia típica do gênero *Campylobacter*. Em cada lâmina foram realizados controles positivo e negativo, sendo o controle positivo a amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 e o controle negativo a amostra *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6447 (Laboratorium voor Microbiologie – Rijksuniversiteit Gent, Bélgica).

3.5 Produção da vacina

A vacina anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* foi produzida segundo Leite (1977) com algumas modificações, utilizando-se a amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354. A amostra foi cultivada em placas de Petri contendo Ágar BHI (Brain Heart Infusion agar – Difco - USA) acrescido de 10% de sangue equino, incubada à 37°C em atmosfera de microaerofilia (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂) por 48 h. Após o crescimento, as amostras foram recolhidas com auxílio de zaragatoa e inoculadas em balões de 500 ml contendo meio de tioglicolato de Brewer (Difco, USA) e incubadas por 72 h à 37°C. Os crescimentos destes balões foram inoculados em balões contendo 1 litro de meio de tioglicolato de Brewer e cultivados por quatro dias à 37°C. Às culturas puras adicionou-se 0,3% de formaldeído (Labsynth, Brasil) para inativação por 24 h. A suspensão foi então centrifugada a 13000 X G por 30 min a 4°C e o sedimento pesado. A vacina foi preparada na proporção de 6 mg/ml, sendo o sedimento ressuspensionado em salina e acrescentado um adjuvante oleoso (Emulsigen®, MVP Laboratories, Inc., USA) na quantidade de 15% do volume total. O Emulsigen® é uma emulsão de óleo em água que minimiza a formação de abscessos e nódulos no local da injeção por apresentar uma concentração de óleo reduzida sendo menos viscosa do que adjuvantes de água em óleo. A mistura foi agitada a 100 rpm por 12 horas a temperatura de 37°C. A vacina, após enfrascada, foi submetida a testes de esterilidade e inocuidade. A dose de vacina utilizada foi de 3 ml.

3.5.1 Testes de esterilidade e inocuidade

Para o teste de esterilidade foram semeados 1ml da vacina enfrascada por placa de ágar BHI acrescido de 10% de sangue equino. Duas placas semeadas mais uma placa controle sem inoculação foram incubadas à 37°C em estufa por 72h e duas placas semeadas mais uma placa controle sem inoculação foram incubadas à 37°C em estufa em atmosfera de microaerofilia (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂) por 72 h. (OIE, 1996).

Para o teste de inocuidade, foi inoculada três vezes a dose da vacina recomendada para bovinos por via subcutânea, em três coelhos. Os

coelhos foram observados durante um período de 3 dias para verificação da presença de reações adversas. (OIE, 1996).

3.6 Análise estatística

A frequência de animais infectados antes das vacinações e após a primeira e a segunda dose da vacina foram realizadas pelo teste McNemar, sendo $P < 0,05$ considerado como significativo (Siegel, 1975).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Dos 32 lavados prepuciais submetidos ao exame de IFD foram identificados 27 animais positivos (84,37%) para o *C. fetus* ao final das três coletas. Na primeira coleta foram detectados 23, na segunda coleta foram detectados 3 animais positivos que não haviam sido identificados no exame anterior e na terceira coleta foi detectado 1 animal positivo não identificado anteriormente.

Após a primeira vacinação, dos 27 animais considerados infectados pela IFD, 15 ainda permaneceram positivos ao final das duas coletas (dias 70 e 80), demonstrando uma queda significativa de 44,45% ($p < 0,05$) no número de animais infectados pelo *C. fetus* (Tabela 1).

Após a segunda vacinação, dos 27 animais considerados infectados pela IFD, 12 ainda permaneceram positivos ao final de duas coletas (dias 90 e 97), demonstrando uma queda significativa de 55,55% ($p < 0,05$) no número de animais infectados pelo *C. fetus*. Entretanto, não se observou diferença significativa na redução do número de animais positivos entre a primeira e a segunda vacinação (Tabela 1).

Tabela 1 Efeito da vacinação contra CGB em 27 touros infectados.

Fase	Infectados (%)	Não infectados (%)	Total
Antes da primeira vacinação	27 (100%)	0 (0%)	27
Após a primeira vacinação	15 (55,55%)	12 (44,45%)	27
Após a segunda vacinação	12 (44,45%)	15 (55,55%)	27

A dose de 3 ml aplicada por via subcutânea produziu uma pequena reação local com uma variação do aumento de volume da região, sem formação de abscessos. Esta reação foi decorrente do adjuvante Emulsigen®, que é uma emulsão de óleo em água que minimiza a formação de abscessos e nódulos no local da injeção por apresentar uma concentração de óleo reduzida. Além disto ele é menos viscoso do que adjuvantes de água em óleo. O principal papel do adjuvante é que ocorra uma absorção lenta desejável e potencializar o efeito vacinal e o tempo de proteção. Os animais não apresentaram nenhuma outra reação. Clark et al. (1968), Leite (1977), Leite et al. (1980) e Ramos et al. (1986) quando utilizaram um adjuvante a base de óleo mineral, descreveram uma reação local com presença de nódulos com duração média de 3 meses e sem presença de outras reações. Os resultados deste trabalho comprovam a boa tolerância da vacina produzida com um adjuvante com emulsão de óleo em água e sua segurança para o emprego em larga escala.

O método de Imunofluorescência Direta tem sido usado por muitos pesquisadores como método conclusivo e de grande eficiência no diagnóstico da CGB (Philppot, 1968; Ruckerbauer et al., 1974; Leite, 1977; Cipolla et al., 1984; El-Jakee et al., 1991).

Por ser um teste dependente do repouso sexual prévio e da eficiência da coleta, podem ocorrer falhas e presença de falso-negativos à IFD quando realizada somente uma coleta para o diagnóstico, por isto um teste negativo não pode ser considerado conclusivo, devendo-se repetir a coleta e o teste mais de uma vez, o que também é descrito para o isolamento e identificação (Duffy et al., 1969; Plastringe et al., 1961).

A coleta seriada teve como objetivo aumentar a sensibilidade da técnica, diminuindo os animais falso-negativos. A escolha do intervalo de 10 dias foi a melhor opção para que não houvesse interferência com a rotina da fazenda. As coletas foram baseadas no trabalho de Soto & Dick (1983) que conseguiram resultados seriados positivos na técnica de imunofluorescência direta com intervalos de coletas entre 8 e 15 dias. Este intervalo de tempo tem como objetivo permitir que a população de *C. fetus* se restabeleça após sofrer

uma queda em sua concentração devido à lavagem prepucial, evitando resultados falso-negativos, devido ao baixo número de bactérias presente o que poderia dificultar o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina pela IFD (Winter et al., 1967; Philpott, 1968.).

Todos os animais utilizados no experimento estavam em bom estado corporal e não apresentavam sinais clínicos de outras doenças, o que é fundamental para que se obtenha uma boa resposta imune induzida pela vacina.

O intervalo de 23 dias entre as duas doses vacinais pode ter interferido na imunização dos animais que ainda estavam infectados, pois os anticorpos produzidos pela resposta da primeira dose vacinal estariam eliminando os antígenos da segunda dose vacinal, acarretando uma queda na proteção contra *C. fetus*. Isto foi verificado por Ramos et al. (1986) que vacinaram um grupo de novilhas duas vezes com um intervalo de 14 dias, e observaram que é necessário um maior intervalo entre as doses vacinais, evitando assim uma possível interferência da concentração de anticorpos obtidos com a primeira dose na resposta antigênica à segunda inoculação levando a uma resposta imunológica menor com possível falha na eliminação do agente.

O intervalo de tempo entre a segunda vacinação e o último teste de IFD foi de apenas 14 dias, pois os animais precisavam entrar em estação de monta e o adiamento desta acarretaria prejuízos à fazenda. Isto pode ter influenciado na ausência de observação de um efeito significativo da segunda vacinação, pois o período de observação teria sido muito curto para a manifestação do efeito total da segunda vacinação. Esta ausência de observação de resposta à segunda dose da vacina sugere que os animais ainda infectados não tiveram tempo para que a resposta imune eliminasse o agente. Alguns trabalhos descrevem que após uma dose vacinal os animais demoram um período de 14 a 56 dias para adquirir imunidade e apresentar resultados negativos contra *C. fetus* pela IFD (Bouters et al., 1973; Vasquez et al., 1983).

Bouters et al. (1973) concluíram que a IFD detecta o *C. fetus* por um período maior após a vacinação, quando comparada com o isolamento, sugerindo que o agente, apesar de

inativado pelas imunoglobulinas, ainda poderia estar presente no prepúcio sendo posteriormente eliminado. Estes resultados sugerem que possivelmente o número de animais infectados após a segunda vacinação seria bem menor do que os 44,45% observados, indicando que o poder de cura da vacina, demonstrado no teste de IFD, seria bem maior do que o encontrado.

A vacina produzida com amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 em adjuvante oleoso produziu cura, demonstrada pela IFD, em 15 touros o que equivale a 55,5% do total dos 27 animais positivos. Esse resultado é inferior ao encontrado por Bouters et al. (1973), quando vacinaram 41 touros positivos para *C. fetus* subsp. *venerealis*, com vacina inativada, obtendo 70% de cura com uma primeira dose e a cura de 100% dos animais após segunda dose. Entretanto, o tempo para se obter um diagnóstico de 70% livre da infecção na primeira dose foi de 42 dias, quando a segunda dose foi então aplicada. Além disso, estes autores não descrevem em seu trabalho a concentração bacteriana na dose de 5 ml da vacina utilizada. Estes fatos podem ter resultado na diferença observada, pois o intervalo de tempo entre as doses utilizadas neste trabalho foi de apenas 23 dias.

Outro fator que pode influir na baixa eficácia da vacina em relação ao seu efeito curativo é a utilização de doses inadequadas de antígeno. Os autores que trabalharam com vacinas experimentais geralmente descrevem a dose bacteriana em mg/dose, sendo que a vacina produzida neste trabalho apresentava 18 mg/dose o que não diferenciou de trabalhos que obtiveram bons resultados com doses entre 10 mg a 40 mg (Schurig et al., 1975; Clark, 1978; Clark e Duffy, 1982; Bryner et al., 1988). Isto sugere que a concentração antigênica por dose vacinal utilizada neste trabalho pode não ter sido responsável pelas diferenças observadas. Além disto, Bryner et al. (1988) sugeriram falhas pela imunogenicidade variável das amostras usadas na vacina ou pelo tipo de adjuvante empregado. Segundo Hum et al. (1993) e Winter et al. (1982) além da qualidade das vacinas, as alterações antigênicas das amostras infectantes somadas à localização superficial do agente no prepúcio podem levar a evasão da resposta imune.

A ausência de redução significativa no número de touros infectados entre a primeira e a segunda dose da vacina pode ser devido ao intervalo de 14 dias entre a aplicação e a realização da IFD, que teria sido muito curto para a detecção do efeito curativo da segunda dose vacinal. Berg et al. (1979) demonstraram que a eliminação da infecção, após uma segunda dose de vacina, pode demorar até 136 dias. A utilização de duas doses de vacinas inativadas, portanto, pode ser benéfica, pois o mecanismo de memória imunológica ativado após a primeira dose é estimulado com o reforço vacinal, resultando em uma melhor proteção humoral e diminuindo as falhas da primeira vacinação.

Os resultados obtidos sugerem que a vacinação de touros pode contribuir para o controle da CGB. Entretanto, como não houve cura em 100% dos touros testados e há a possibilidade que estes animais mantenham a infecção no rebanho, deve-se fazer a vacinação dos touros em conjunto com a vacinação das fêmeas (Clark et al., 1972; Clark et al., 1976; Leite et al., 1980; Eaglesome et al., 1986; Ramos et al., 1986). A redução do número de touros infectados reduziria direta e proporcionalmente a incidência e a prevalência da infecção nas fêmeas, facilitando o controle da CGB.

5. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo permitem concluir que a vacinação de touros com uma bacterina contra *C. fetus* subsp. *venerealis* contendo adjuvante óleo em água, em duas doses intercaladas de 14 dias, reduziu o número de animais infectados em 55,55%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, PJ. A field evaluation of vaccination of bulls against bovine vibriosis. *Aust. Vet. J.*, v.48, p.72-73, 1972.

BERG, RL; FIREHAMMER, B.D; BORDER, M et al. Effects of passively and actively acquired antibody on bovine *Campylobacteriosis* (Vibriosis). *Am. J. Vet. Res.*, v.40, n.1, p.21-25, 1979.

BIER, PJ; MAY, CE; DUNCAN, JR et al. Experimental infections with *Campylobacter fetus* in bulls of different ages. *Vet. Microbiol.*, v.2, p.13-27, 1977.

BOUTERS, R; KEYSER, J; VANDEPLASSCHE, M et al. *Vibrio Fetus* infection in bulls: curative and preventive vaccination. *Br. Vet. J.* v.129, p. 52-57, 1973.

BRYNER, JH; FIREHAMMER, MS; WESLEY, IV. Vaccination of pregnant guinea pigs with *Campylobacter fetus*: Effects of antigen dose, *Campylobacter* strain, and adjuvant type. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, n.4, p.449-455, 1988.

CASTRO, AFP; GIORGI, W; AOKI, D et al. Pesquisas de aglutininas anti-*Vibrio fetus* em mucos vaginais de rebanhos bovinos dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. *O Biológico*, v.37, p.115-118, 1971.

CIPPOLA, AL; PALLADINO, MR; CAMPERO, CM et al. Aislamiento y tipificación de *Campylobacter* en toros enviados a faena. *Vet. Arg.* v. 1, p. 353-359, 1984

CIPOLLA, AL; CASARO, AP; TERZOLO, HR. et al. Persistence of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in experimentally infected heifers. *Vet. Rec.*, v.134, p.628, 1994.

CLARK, BL; DUFTY, JH; MONSBOURGH, MJ. Experimental *Vibrio fetus (venerealis)* infection in heifers. *Aust. Vet. J.* v.44, p.111-114, 1968.

CLARK, BL. A review of vibriosis bovine. *Aust. Vet. J.*, v.47, p.103-107, 1971.

CLARK, BL; DUFTY, JH; MONSBOURGH, MJ et al. Immunisation against bovine vibriosis. *Aust. Vet. J.*, v.50, p.407-409, 1974.

CLARK, BL; DUFTY, JH; MONSBOURGH, MJ et al. Immunisation against bovine vibriosis due to *Campylobacter fetus* subsp. *Fetus* biotype *intermedius*. *Aust. Vet. J.*, v.52, p.362-365, 1976.

- CLARK, BL; DUFTY, JH. Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. *Aust. Vet. J.*, v.54, p.262-263, 1978.
- CLARK, BL; DUFTY, JH. The duration of protection against infection with *Campylobacter fetus* subsp. *Veneralis* in the immunized bulls. *Aust. Vet. J.*, v.58, p.220, 1982.
- CORBEIL, LB; SCHURIG, GGD; BIER, PJ et al. Bovine Venereal Vibriosis: antigenic variation of the bacterium during infection. *Infection and Immunity*, v.11, n.2, p.240-244, 1975.
- D'APICE, M. Ocorrência do aborto no Estado de São Paulo, devido ao *Vibrio fetus*. *Biológico*, v.22, p.15-18, 1956.
- DEKEYSER, J. In: BUTZLER, JP. *Campylobacter infection in man and animal*. Boca Raton: CRC Press, 1984, p.181-191.
- DUFTY, JH. Diagnosis of vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, v.43, p.433-437, 1967.
- DUFTY, JH; McENTEE, K. Evaluation of some culture media and sampling techniques for the diagnosis of vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.* v. 45, p. 140-144, 1969.
- EAGLESOME, MD; GARCIA, MM; HAWKINS, CF et al. Vaccination studies for the control of Campylobacteriosis in Jamaican cattle. *Vet. Record*, v. 119, p.299-301, 1986.
- EDWARDS, PR.; EWING, WH. *Identification of enterobacteriaceae*. 3 ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972, Cap.5, 67-108p.
- EL-JAKEE, J; SOLIMAN, R; KHALID, A et al. Rapid laboratory diagnosis of Campylobacter infection using immunofluorescent antibody technique (IFAT). *Vet. Med. J.*, v.39, n.3, p885-894, 1991.
- FAO Production Yearbook. Rome: FAO, Rome, Italy, 1999.
- FRANK, AH; BRYNER, JH; O'BERRY, PA. The effect of *Vibrio fetus* vaccination on the breeding efficiency of cows bred to *vibriosis fetus* infected bulls. *Am. J. Vet. Res.*, v.28, n.126, p.1237-1242, 1967.
- GARCIA, MM; BROOKS, BW. Campilobacter. In: PRESCOTT, JF; ZUERMER, RL; GYLES, CL; THOEN, CD (ed.) *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2 ed., Iowa: States University Press, p.262-272, 1993.
- GENOVEZ, ME; SCARCELLI, E; PICONE, ABB. Avaliação de dois métodos de coleta de muco prepucial no diagnóstico da campilobacteriose genital em touros. *O Biológico*, v.52, n.1/3, p.7-11, 1986.
- GIBSON, CD; DREHER, WH; ZEMJANIS, R. Simplified technique for collection of preputial samples from bulls for isolation of *Vibrio fetus*. *J.A.V.M.A.*, v.157, n.6, p.834-836, 1970.
- HEWSON, PI; LANDER, KP; GILL, KP. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Campylobacter fetus* in bovine vaginal mucus. *Rev. Vet. Sci.* v.38, p.41-45, 1985.
- HUM, S; BRUNNER, J; GARDINER, B. Failure of therapeutic vaccination of a bull infected with *campylobacter fetus*. *Aust. Vet. J.* v.70, n.10, p.386-387, 1993.
- JESUS, VLT; GUIDA, HG., ANDRADE, VLB et al. Comparação entre o uso de tripaflavina e dimetridazole no tratamento da tricomonose bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v.16, p.49-51, 1996.
- JESUS, VLT; ANDRADE, VLD., ALBUQUERQUE, FT et al. A incidência das doenças da reprodução no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado. Anais... Gramado: CBMV, 1997, p.238.
- LAGE, AP; PELLEGRIN, AO; COSTA, GM; et al. Campilobacteriose Genital Bovina: diagnóstico na Escola de Veterinária da UFMG de 1976 a 1996. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.2, n 2, p164-166, 1997.
- LAGE, AP; LEITE, RC. Campilobacteriose Genital Bovina (Vibriose). *Pecuaría de corte*, 2000.
- LANDER, KP. The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Br. Vet. J.*, v.146, p.327-333, 1990a.

- LANDER, KP. The application of a transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. *Br. Vet. J.*, v.146, p.334-340, 1990.
- LEITE, RC. *Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 1977. 38p Dissertação (Mestrado).
- LEITE, R.C; REIS, R; RIVERA, FEB. Controle da Vibriose Bovina através da vacinação. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.32, n.2, p.259-264, 1980.
- LEITE, RC; HADDAD, JPA; COSTA, GM; et al. Técnica modificada para coleta de lavado prepucial de touros, para exame de Tricomonose e ou Campilobacteriose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: [s.n.], 1995. p.434.
- MC.COOL, CJ; TOWNSEND, MP; WOLFE, SG et al. Prevalence of bovine venereal disease in the Victoria River District of the Northern Territory likely economic effects and practicable control measures. *Aust. Vet. J.*, v.65, n.5, p.153-156, 1988.
- MELLICK, PW; WINTER, AJ; McENTEE, K. Diagnosis of vibriosis in the bull by the use of the fluorescent antibody technic. *Cornell Vet.*, v.55, n. 2, p. 280 - 294, 1964.
- MIES FILHO, A. Incidência da vibriose bovina em alguns rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. *Rev. Fac. Agron. Vet. UFRGS.*, Porto Alegre, v.3, p.195-199, 1960.
- MIES FILHO, A. Vibriose bovina. Evolução de um foco no Rio Grande do Sul. *Rer. Fac. Agr. Vet. UFRGS*, v.6, p.73-83, 1963.
- MOODY, MD; GOLDMAN, M; THOMASON, BM. Staining bacterial smears with fluorescent antibody. I. General methods for *Malleomyces pseudomallei*. *J. Bact.*, v.72, p.357, 1956.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, Manual of standards for diagnostic tests & vaccines, 3 ed., 1996.
- PELLEGRIN, AO; LEITE, RC; SERENO, JRB et al. *Prevalência da campilobacteriose genital bovina em touros nelore do Pantanal Mato-Grossense*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 1999. 11p. (Comunicado Técnico, 23).
- PELLEGRIN, AO; SERENO, JRB; MAZZA, MCM et al. *Doenças da reprodução e conservação genética: Levantamento no núcleo de conservação do bovino Pantaneiro*. Corumbá: MS, EMBRAPA-CPAP. (Comunicado Técnico, n.21), 1997.
- PELLEGRIN, AO. A Campilobacteriose e Tricomonose são doenças reemergentes? *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, n.4, p.479-566, 1999.
- PELLEGRIN, AO; SERENO, JRB; LEITE, RC; et al. Campilobacteriose genital bovina em touros do mato grosso do sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21,n1, p.43-46, 1998.
- PHILPOTT, M. Diagnosis of *Vibrio fetus* infection in the bull. *Vet. Rec.*, v. 82, p. 458 - 463, 1968.
- PLASTRIDGE, WN; KOTHS, ME; WILLIAMS, LF. Antibiotic mediums for the isolation of vibrios from bull semen. *Am. J. Vet. Res.*, v. 22, p. 867-870, 1961.
- PLUMER, GJ; DURVALL, WC; SHEPLER, VM. A preliminary report on a new technic for isolation of *vibrio fetus* from carrier bulls. *Cornell. Vet.*, v.52, p.110-121, 1962.
- RAMOS, AA; GUIDA, HG. Aglutininas anti-*Campylobacter fetus* em mucos vaginais de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.2 n.3, p.7-15, 1978.
- RAMOS, AA; LEITE, MLAS; GUIDA, HG et al. Eficiência de uma vacina contra a Campilobacteriose Bovina com culturas autóctones em adjuvante oleoso. *Pesq. Vet. Bras.*, v.6, n.1, p.15-21, 1986.
- RIBEIRO, LMM; HERR, S; PEFANIS, SM et al. The use of sensitivity discs in the identification of *campylobacter* species. *Onderstepoortj. Vet. Res.*, v.57, p.129-131, 1990.

- RUCKERBAUER, GM; MALKIN, K; MITCHELL, D et al. Vibriosis: demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubulus* organisms in preputial fluid by immunofluorescence and culture techniques. *Can. J. Comp. Med.*, v.38, p.321-327, 1974.
- SAMUELSON, JD; WINTER, JA. Bovine vibriosis the nature of the carrier state. In: *The Bull. Jour. Infect. Dis.*, v.116, p.881-892, 1966.
- SCHURIG, CE; HALL, LB et al. Bovine venereal vibriosis : Cure of genital infection in females by systemic immunization. *Infect. And Immun.*, v.11, n.2, p.245-251, 1975.
- SEGER, CL; LANK, RB; LEVY, H.E. Dihydrostreptomycin for treatment of genital Vibriosis in the bull. Symposium on Bovine Vibriosis. J.A.V.M.A., v.149, n.12, 1966.
- SHEPLER, CM; PLUMER, GJ; FABER, JE. Isolation of *Vibrio fetus* from bovine preputial fluid, using millipore filters and an antibiotic medium. *Am. J. Vet. Res.*, v.24, n.101, 1963.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica: para as ciências do comportamento*. São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 350p, 1975.
- SKIRROW, M. B. Campylobacter enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.*, v. 2, p.9-11, 1977.
- SKIRROW, MB; BENJAMIN, J. Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.*, v.33, p.1122, 1980.
- SOTO, P., Di ROCCO, M. J. Diagnóstico de Campylobacteriosis (Vibriosis) em toros por la técnica de anticuerpos fluorescentes. *Gac. Vet. Bs. As.*, v. 367, p.37-43, 1982.
- SOTO, P; DICK, A. Campylobacteriosis: infección experimental de toros jóvenes. *Rev. Med. Vet.* V.64, n.3, p.166-169, 1983.
- SOTO, P; DI ROCCO, MJ. Campylobacteriosis bovina: Prevalencia en diversas zonas de la República Argentina. *Rev. de Inves. Agrop.*, v.19, n.2, p.273-279, 1984.
- STOESSEL, F. *Las enfermedades venereas de los bovinos: Trichomoniasis y vibriosis genital*, Zaragoza: acribia, 1982, 163 p.
- TAUL, LK; KLECKNER, AL. fluorescent antibody studies of *Vibrio fetus*: Staining characteristics in semen, preputial exudates, and pure culture. *Am. J. Vet. Res.*, v.29, n.3, p.711-715, 1968.
- VAN AERT, A; DEKEYSER, P; BRONE, E et al. Nature of antibodies to *Campylobacter fetus* in preputial secretions from a vaccinated bull. *Br. Vet. J.*, v. 132, p. 615-620, 1976.
- VANDEPLASSCHE, M; FLORENT, A; BOUTERS, R et al. The pathogenesis, epidemiology, and treatment of *Vibrio fetus* infection in cattle, I.W.O.N.L., v.29, n.18, 1963.
- VASQUEZ, LA; BALL, L; BENNETT, BW et al. Bovine genital campylobacteriosis (vibriosis): Vaccination of experimentally infected bulls. *Am. J. Vet. Res.*, v.44, n.8, p.1553-1557, 1983.
- VILLAR, JÁ; SPINA, EM Campylobacteriosis (vibriosis) bovina. Una recopilación de datos sobre su incidencia en el periodo 1966-1981. *Gac. Vet.* V.44, p.647-658, 1982.
- WALSH, AF; WHITE, F. Biochemical and serological characteristics of *Vibrio* isolated from cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 29:1377-1383, 1968.
- WINTER, AJ; SAMUELSON, JD; ELKANA, M. A comparison of immunofluorescence and cultural techniques for demonstration of *Vibrio fetus*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.150, n.8, p.498-502, 1967.
- WINTER, AJ; BURDA, K; DUNN, HO. An evaluation of cultural techniques for the detection of *Vibrio fetus* in bovine semen. *Cornell Vet.* v. 55, n. 3, p. 431- 4, 44, 1965.
- YASSU, F. Vendas de sêmen batem recorde em 1997. *DBO Rur.*, v.209, p.42-44, 1998.