

RÔMULO CERQUEIRA LEITE

AVALIAÇÃO DE ALGUNS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E ANÁLISE/CUSTO/BENEFÍCIO DO CONTRÔLE DA CAMPILOBACTERIOSE BOVINA,

Tese apresentada ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária.

BELO HORIZONTE

MINAS GERAIS - BRASIL

1977

Leite, Rômulo Cerqueira, 1943

L533a      Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1977.

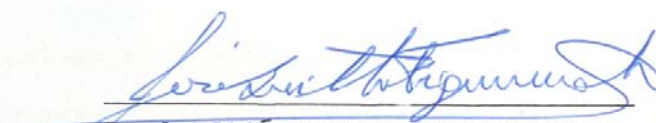
vii 43p.      ilustr.

Tese, Mestre em Medicina Veterinária

1. Epidemiologia. 2. Campilobacteriose - Análise cus  
to/benefício. I. Título.

CDD-636.208 969 2

APROVADA EM: 25/08/1977

  
Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO  
- Orientador -

  
Prof. RONALDO REIS

  
Prof. ÉLVIO CARLOS MOREIRA

Aos meus pais,  
A minha mulher Suely,  
Aos meus filhos Boris e Felipe,  
Aos meus irmãos.

Aos Mestres,  
José Lavaquial Biosca e  
Paulo Dacorso Filho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Britto Figueiredo, pela orientação e apóio indispensáveis à realização deste trabalho.

Aos professores Ronaldo Reis; Fred Emil Brautigan Rivera; Élvio Carlos Moreira; Francisco Megale pela valiosa co laboração.

Aos colegas Nilton Martins Coelho e Anna Maria Baptista Coelho, pela ajuda.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Ministério da Agricultura, pelo indispensável apoio.

A CARL ZEISS, pela colaboração.

O presente trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva; Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e FUNTEC.

## SUMÁRIO

	PÁGINA
INTRODUÇÃO .....	01
REVISÃO DE LITERATURA .....	02
MATERIAL E MÉTODOS .....	07
RESULTADOS .....	13
DISCUSSÃO .....	23
RESUMO E CONCLUSÕES .....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30



## INTRODUÇÃO

A campilobacteriose bovina é doença endêmica de caráter venéreo e responsável por perdas indeterminadas em nosso efetivo bovino. A imprecisão dos métodos sorológicos e as distâncias entre os rebanhos e os centros de diagnósticos, são fatores contribuintes para o escasso conhecimento de sua prevalência em nosso meio.

A baixa resistência do agente fora de seu "habitat" e seu lento crescimento nos meios de cultura especiais, dificultam o isolamento. Por outro lado, o baixo índice de abortos, a disseminação lenta e progressiva da doença e a falta de facilidade de diagnóstico em nosso meio, despertam pouca atenção para os prejuízos causados. E como consequência, medidas preventivas e curativas são praticamente inexistentes no Brasil.

As finalidades desta tese foram estudar a viabilidade de de quatro métodos de diagnóstico, o controle da campilobacteriose bovina através de bacterinas e o cálculo do prejuízo e análise custo/benefício do controle desta doença, que talvez, pelo seu pioneirismo, seja o tópico mais importante deste trabalho.

Utilizaremos o termo *Campilobacter fetus*, taxionomia apresentada por VERON & CHATELAIN, 1973 e aceita e publicada por BUCHANAN & GIBBONS, 1974 no BERGEY - Determinative of Bacteriology.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - ETIOLOGIA

McFADYEAN & STOCKMAN (1909 e 1913) descreveram, na Inglaterra, uma doença abortiva em ovelhas causada por bactéria Gram negativa, em forma de vírgula ou de "S", móvel através de único flagelo polar. Em 1913, diagnosticaram a mesma doença em rebanhos bovinos, sem nomear, entretanto, o agente causador.

SMITH & TAYLOR (1919) estudaram nos EUA, organismo semelhante sob aspecto morfológico e da patogenicidade natural, dando-lhe o nome de *Vibrio foetus*.

A doença mereceu pouca atenção até que foi admitida como uma das principais causas de infertilidade e abortos em bovinos (PLASTRIDGE & WILLIAMS, 1943; PLASTRIDGE et alii, 1947 e 1951).

Desde então sua etiologia tem merecido crescente atenção e muitos trabalhos vêm sendo publicados. Alguns destes são contribuições importantes ligadas não só à etiologia como à epidemiologia da doença e estão relacionados ao achado de amostras muito patogênicas, provocando abortos esporádicos, e/ou mesmo de amostras apatogênicas ou saprófitas do sistema genital (FLORENT, 1953; HUGHES, 1956; FIREHAMMER & HAWKINS, 1964); WALSH & WHITE (1968).

SEBALD & VERÓN (1963), com base na fermentação da glicose e quantidade em mol de guanina e citosina, no DNA de

germes do gênero *Vibrio*, propuseram a criação de novo gênero, o *Campylobacter*. Em 1973, o *Vibrio fetus*; *Vibrio bubulus*; *Vibrio coli* e *Vibrio jejuni*, foram situados neste novo gênero. As demais espécies não seriam transladadas (VERÓN & CHATELAIN, 1973).

## 2.2 - IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA

Foi demonstrado, em 1954, que os prejuízos causados pela campilobacteriose chegavam a 137 mil dólares, anualmente, nos Estados Unidos da América.

Estas perdas são resultado do decréscimo da capacidade reprodutiva, por falhas de coberturas, interrupções de gestações, esterilidade permanente, ou, a nível de rebanho, redução da produção leiteira, tudo influenciando diretamente no desfrute (FRANK, 1956).

No Rio Grande do Sul, MIES FILHO (1963), estudando a evolução de um foco da doença, verificou que os prejuízos ascendiam a Cr\$ 614.200,00, entre produção de bezerros e leite, reposição do rebanho e mão-de-obra.

Em 1963, o Laboratório de Pesquisa da RAY Foundation, Montana-USA, conduziu pesquisa em rebanho de 41.000 bovinos. De zessete por cento das fêmeas não estavam gestantes após a estação de monta, e isto devido à infertilidade e abortos precoces no período inicial da gestação. O prejuízo, devido à doença, equivalia a 225 mil dólares americanos, em um ano (SAFFORD, 1969).

Na Geórgia, USA, um rebanho de 150 vacas por melhoria de manejo teve sua produção leiteira, aumentada de 4.536kg para 6.638kg de média no período de 1963 a 1969. Durante os anos de 1970/71, esta média caiu para 1.540 kg, enquanto o intervalo entre partos passou de 13,0 para 16,1 meses; número de serviços para concepção, de 1,3 para 2,8; e a média dos intervalos entre lactações, de 54 para 92 dias. A causa responsável foi a campilobacteriose. Melhoria de manejo, rotina de vacinação, exames periódicos dos animais e demais serviços de assis-

tência veterinária, contribuíram para a normalização da vida reprodutiva do rebanho. Foram necessários, entretanto, cinco anos para o total restabelecimento. O prejuízo foi avaliado em 250 mil dólares, MADOUX & WILLIANS (1975).

### 2.3 - DIAGNÓSTICO

O isolamento e identificação são, ainda, o mais seguro método de diagnóstico da campilobacteriose. Apesar das dificuldades que apresentam, é a única maneira prática de se poder afirmar, através de bioquímismo bacteriano, que a amostra isolada é responsável pela infertilidade e abortos observados.

PLASTRIDGE (1941) e DOYLE (1948) mostraram o efeito benéfico das condições de microaerofilia no isolamento do *Campylobacter*. FLORENT (1956) usou atmosfera de dois terços de N, 5% de CO<sub>2</sub> e o restante de O<sub>2</sub> para o isolamento do *C. fetus*. KINGGENS & PLASTRIDGE (1956) determinaram ser uma atmosfera contendo 85% de N, 10% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, a melhor combinação para cultivos primários.

A adição de drogas e antibióticos inibidores de contaminantes vieram facilitar o isolamento do agente. O cristal violeta, verde brilhante e bile de boi foram utilizados por RYFF & LEE (1945); TERPSTRA & EISMA (1951) e FLORENT (1953) com a mesma finalidade.

A resistência do agente da campilobacteriose a alguns antibióticos foi reportada por PLASTRIDGE et alii (1961). Os mesmos autores relataram, ainda, o valor da adição de antibióticos, nos meios de cultivo utilizados para o isolamento.

Filtros seletivos foram utilizados com bons resultados por PLUMER et alii (1962); SHEPLER et alii (1963), relatam o grande valor da utilização de filtros e meios com antibióticos para o isolamento do *Campylobacter fetus*; DUNN et alii (1965) e WINTER et alii (1965) referem-se à necessidade do uso de filtros para o isolamento do agente em sêmem muito contaminado.

No Brasil, D'APICE (1956); PESTANA DE CASTRO et alii (1963) e PESTANA DE CASTRO et alii (1967), isolaram *Campylobacter fetus* de fetos, de muco-vaginal de vacas naturalmente infectadas e de conteúdos prepuciais.

JEPSEN & WINDEKILDE (1951) usaram, pela primeira vez muco cervico-vaginal (MCV) como material onde se podia pesquisar aglutininas. Seu trabalho se referia a brucelose.

SZABO (1951) e PLASTRIDGE et alii (1953) descreveram o método do tampão para a colheita de MCV para detectar aglutininas anti-campilobacter. Este método foi melhorado por HUGHES (1953). Embora de grande valor prático quando usado em base de rebanho, não tem precisão para detectar portadores, pois demonstra a presença de anticorpos sem correlacionar com o poder patogênico do agente LAWSON & MCKINNON (1952); HUGHES (1953); McENTEE et alii (1954); BOYD (1955); LAING (1960).

No Brasil, GUIDA et alii (1960/61); MIES FILHO (1960 e 1963); PESTANA DE CASTRO et alii (1967) e MEDEIROS & FIGUEIREDO (1971), relatam a presença de campilobacteriose bovina, pela detecção de aglutininas anticampilobacter em (MCV).

O emprego da imunofluorescência direta (IFD) para o diagnóstico da campilobacteriose foi feito, a primeira vez, por HERSCHLER (1963).

Para touros portadores, é alta a sensibilidade da IFD (MELLICK et alii, 1965; KITA et alii, 1966; DUFTY, 1967).

A localização exata do *Campylobacter fetus* na cavidade prepucial, pode ser determinada através da IFD. SAMUELSON & WINTER (1966) o fizeram pela primeira vez.

O valor da IFD para o diagnóstico de campilobacteriose em muco-cervico-vaginal é contraditório. Assim, CARROLL & HOERLEIN (1972) julgam-no de pouco valor, enquanto SHIRES & KRAMER (1974) acham que o muco filtrado é método seguro para o diagnóstico.

Muitos pesquisadores têm utilizado o teste da novilha virgem, entre eles, ADLER et alii (1952); BIERCHWAL & Mc-

DOUGLE (1965); CLARK et alii (1969); DOBSON et alii (1970) concordam em dois tópicos: (1) é muito eficiente; (2) dispendioso e demorado.

#### 2,4 - COMPARAÇÃO DE ALGUNS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS

Muitos são os métodos empregados para o diagnóstico da campilobacteriose bovina. Suas características, valores e utilização vêm sendo motivo de numerosas pesquisas. Assim, PLAS TRIDGE & EASTERBROOKS (1953) compararam (MCV) com aglutinação de soro sanguíneo de animais positivos. SHEPLER et alii (1963), verificaram a eficiência de antibióticos e de filtração de conteúdos prepuciais para o isolamento do *C. fetus*. WINTER et alii (1965) compararam diversas técnicas de cultivo para o isolamento de *C. fetus*. Em 1967 WINTER et alii compararam IFD e cultivo para demonstração de *C. fetus* em lavado prepucial de touros. RUCKERBAUER et alii (1974) demonstraram a presença de *C. fetus* e *C. bubulus* em conteúdos prepuciais pelas técnicas de IFD e cultivo. ANDREWS & FRANK (1974) compararam quatro métodos de diagnósticos - cultivo, IFD, MCV e soro aglutinação.

#### 2.5 - CONTRÔLE ATRAVÉS DE BACTERINAS

A primeira tentativa de produção de anticorpos contra *C. fetus*, pelo uso de vacina, foi feita por AMELL & STOCKTON (1956).

Vacinas e bacterinas, como medida preventiva frente a infecção natural e experimental, foram introduzidas e/ou modificadas por HOERLEIN & KRAMER (1963 e 1964); HOERLEIN et alii (1965); SCOTT (1966); FIREHAMMER & BERG (1966); NEWHALL (1966); BECKERHAUER (1967); CLARK (1967); ALLAN & MUTH (1971); CARROLL & HOERLEIN (1972); CLARK et alii (1975); enquanto BOUTERS et alii (1973) usaram bacterina, também, como medida curativa.

A duração da imunidade conferida pela vacina ou doença natural foi estudada por HOERLEIN & CARROLL (1970) que afirmam ser efetiva até 15 meses.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material de pesquisa utilizado neste trabalho veio de rebanhos localizados em nove municípios de Minas Gerais, distribuídos em três zonas fisiográficas, e classificados como rebanhos A e B - Betim; C - Botelhos; D - Carmo da Cachoeira; E - Ibertioga; F - Nepomuceno; G - Pedro Leopoldo; H - Santa Luzia; I - Santana da Várzea e J - Três Pontas, dentre aqueles com histórico de repetição de cios, baixa fertilidade e abortos. Estes rebanhos, exceto dois, eram, sorologicamente, isentos de brucelose e leptospirose. Através de exame direto, a tricomonose não foi diagnosticada em nenhum.

Todos os animais trabalhados tinham transtornos reprodutivos e o material utilizado neste trabalho foi constituído de quatro fetos, muco cêrvico-vaginal (MCV) e conteúdo prepuccial.

O Quadro I mostra detalhes sobre a composição dos rebanhos, e número de amostras.

Dos fetos enviados ao nosso laboratório, em refrigeração, colhiam-se para cultivo bacteriano, líquido estomacal e fragmento de órgãos.

O MCV para aglutinação era colhido pelo método descrito por MEDEIROS & FIGUEIREDO (1971) e, para isolamento e imunofluorescência direta, em 10 ml de salina a 0,85%, tamponada pH 7,2; com uso de pipeta semelhante àquela descrita por BARTLETT (1949).

Para colheita do material os touros eram mantidos em repouso sexual por 10 dias, no mínimo, e a colheita era feita segundo a técnica de BARTLETT (1949).

Os meios de cultivo utilizados foram: ágar a 2% contendo 10% de sangue, desfibrinado, de carneiro; Thioglicolato de sódio<sup>1</sup> e Thiol<sup>1</sup>.

O muco-cérvico-vaginal e o conteúdo prepucial eram centrifugados por 15 minutos, a 100 G. Do sobrenadante, tomava-se 0,1 ml que era semeado em meios de cultivo, acima descritos, sólidos contendo 12,5 mcg de novobiocin<sup>2</sup>, 62,5 unidades de nistatina<sup>3</sup> e 10 unidades de sulfato de polimixina<sup>4</sup> "B" por mililitro de meio. Quando a fazenda distava mais de cinco horas do laboratório, a centrifugação e semeadura eram feitas no local, em meio de Thiol semi-sólido, com antibióticos nas concentrações já descritas. No laboratório, incubava-se por 24 horas em atmosfera de 85% de N e 10% de CO<sub>2</sub> e então repicava-se para meio sólido, reincubava-se nas mesmas condições atmosféricas, a 37°C, por nove dias. Observava-se o crescimento a partir do terceiro dia.

Parte do conteúdo prepucial, filtrado em membrana de 0,65 micro, era semeado em meios sólidos, com e sem antibióticos. (WINTER, 1967); (KINGGENS & PLASTRIDGE, 1953) e NADC (1975).

Na identificação dos agentes isolados, seguiu-se métodos recomendados por BERG et alii (1971).

O antígeno foi produzido em garrafas de Roux, contendo meio de Thiol sólido, sem antibióticos.

Três mililitros de cultura de *C. fetus*, tipo A biotipo 1, com 48 horas de crescimento, eram inoculados nas garrafas e estas, incubadas por 72 horas em atmosfera normal da estufa a 37°C. Após crescimento e eliminação do líquido de con-

1 - Meios n<sup>os</sup> B256 e B307, DIFCO Laboratórios, Detroit - USA.

2 - Albamicina - UPJOHN Produtos Farmaceutivos Ltda.

3 - Nistatina - Ledere - Cyanamid.

4 - Polimixina B - Pfizer Química Ltda.



densação, as células bacterianas eram retiradas por lavagem das colônias. Para tal, as garrafas eram deixadas em repouso, por 10 minutos, com 20 ml de salina formolada a 0,4%, para o desprendimento das colônias. Se não fosse suficiente, utilizavam-se bastões de vidro, previamente esterilizados.

A suspensão obtida era filtrada em gaze dobrada para remover fragmentos do meio de cultura e posteriormente mantida em estufa a 37°C, por 24 horas, para inativação. Após este tempo, centrifugava-se a 12.000 G por 20 minutos, descartando-se o sobrenadante. A operação era repetida três vezes ou mais até que se obtivesse suspensão suficientemente clarificada.

Fazia-se padronização por diluição em salina até que se obtivesse 0,22 DO em 525 nano, usando-se do Spectronic<sup>5</sup>. O antígeno era estocado concentrado, e diluído na hora o uso.

Verificava-se a especificidade segundo a técnica de Weybridge, citada por LAING (1960).

O teste de aglutinação lenta em tubos foi feito seguindo-se a técnica descrita por KENDRICK (1967).

Para a realização da imunofluorescência direta, o soro imune, foi produzido em cabra e coelho, com amostras autóctonas de *C. fetus* tipo "A", biotipo 1 e biotipo 2. A técnica utilizada foi a descrita por RUCKERBAUER et alii (1974).

O conjugado a partir do soro imune, foi preparado segundo a técnica de estandarização do NADC (1975). Sua especificidade foi verificada frente a esfregaços de *C. fetus* e *C. bubulus* e *C. fetus* associados a outras bactérias.

A técnica empregada para o teste da IFD, foi a descrita por MELLICH et alii (1963) e WINTER et alii (1967).

O controle positivo constituiu-se de cultura recente do *C. fetus* e o negativo de cultura recente do *C. bubulus*.

Utilizou-se microscópio ZEISS, binocular, "standard WL", objetiva de imersão 40X, provido de diafragma, ocular 10X,

5 - SPECTRONIC- 20 - Bausch & Lomb Incorporated Rochester, N.Y. - USA.

6 - Produzido por CARL ZEISS - 7082 Oberkochen - Alemanha Ocidental.

condensador de campo escuro a óleo, filtro excitador UG-2, filtros de barreira 0/41 e iluminação com lâmpada de mercúrio HBO-2006<sup>6</sup>.

O teste da novilha virgem foi utilizado em um rebanho que tinha três touros positivos por imunofluorescência e no qual ainda não tinha sido possível o isolamento do *C. fetus*. Cada touro cobriu duas novilhas e, todas elas, foram testadas através de MACV e cultivo antes e após 60 dias da cobrição.

A bacterina foi produzida utilizando três amostras autóctonas, isoladas por nós no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, e denominadas/MVP<sup>2</sup>, MVP<sup>8</sup> e MVP<sup>9</sup>. Das três duas eram do tipo "A" biotipo 1 e uma do tipo "A" biotipo 2.

Foram utilizados balões de FERBACH com capacidade de dois e meio litros, contendo dois litros de Thioglicolato de sódio líquido. Em cada balão foi inoculado 200 ml de uma das culturas citadas, com 48 horas de cultivo.

Estes eram incubados a 37°C em atmosfera normal sob agitação lateral de 50 movimentos por minutos, durante 96 horas. Após verificação de crescimento e pureza, através de esfregaços, corados pelo método de Gram, adicionava-se 0,5% de formalina, voltando os balões a estufa comum, a 37°C, por 18 horas, para inativação. A cultura morta era centrifugada em fluxo contínuo<sup>7</sup>, a 17.000 G. Em seguida lavava-se a massa obtida em salina formolada a 0,4% duas ou três vezes, até atingir a clarificação desejada. Sua padronização era feita de maneira que em uma diluição de 1:200 obtivesse 0,30T em 525 nano.

Adicionando-se um terço da massa bacteriana padronizada e o restante de adjuvante oleoso (10% de arlace<sup>8</sup> e 90% de óleo mineral<sup>9</sup>). A homogeneização era a 10.000 r.p.m., por 30 minutos, em "ultra turrax"<sup>10</sup>). Obtinha-se então a bacterina.

7 - SORVALL Superspeed - RC2 - B

8 - ARLACEL A - Atlas - lot. n° 349 - B

9 - THECNICAL OIL

10 - ULTRA-TURRAX - Janke & Kinkel Ika Werk Staufeni - Breisgau-Typ-T 45.

O teste de viabilidade e inocuidade era realizado em cinco cobaias de 300 g, que eram inoculados com dois mililitros da bacterina, pela via parenteral, duas vezes intervaladas de 14 dias. Antes da primeira e 14 dias após a segunda inoculação, colhia-se sangue para soro-aglutinação.

Para testar a esterilidade semeava-se 0,1 ml da bacterina em meio de Thioglicolato de sódio e em ágar com 10% de sangue de carneiro e incubava-se a 37°C, por 14 dias, em estufa comum, com ambiente úmido.

A eficiência da bacterina foi realizada em três rebanhos (C, D e F) comprovadamente positivos controlando-se as coberturas e frequência de nascimentos.

Os animais foram inoculados com dois mililitros da bacterina, via subcutânea, duas vezes com intervalo de 150 dias. Utilizou-se uma vacina comercial, Vibrin<sup>11</sup> e a produzida por nós.

O cálculo do custo/benefício do controle da doença através da vacinação foi feito segundo SCHWABE et alii (1977), nos rebanhos C, D e F.

---

11 - SMITH KLINE LABORATORIES

TABELA I - Composição, amostragem e Índice de natalidade de alguns rebanhos bovinos em municípios de Minas Gerais, 1975/76.

Identificação do Rebanho	Municípios	Composição do Rebanho		Amostragem		Índice de Natalidade	
		Vacas	Touros	Total	Nº		%
A	Betim	16	1	17	11	64,7	12,5
B	Betim	58	2	60	12	20,0	58,6
C	Botelhos	240	6	246	58	18,6	50,0
D	Carmo da Cachoeira	170	7	177	12	6,7	70,0
E	Ibertioga	70	4	74	10	13,5	70,0
F	Nepomuceno	120	2	122	30	24,5	66,0
G	Pedro Leopoldo	120	2	122	05	4,1	75,0
H	Santa Luzia	45	2	47	05	10,6	46,6
I	Santana da Vargem	19	2	21	06	28,5	63,4
J	Três Pontas	70	2	72	07	9,7	52,0
Total		928	30	958	156	18,8	68,3

## RESULTADOS

### 4.1 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO, MACV E IFD

De 138 amostras de MCV, em apenas três foi possível isolar *C. fetus*, classificados como tipo "A" biotipo 1.

De quatro entre as 21 amostras de raspado prepucial, estudadas, isolou-se o *C. fetus* dos quais três se enquadraram no tipo "A" biotipo 1 e o outro no "A" biotipo 2. Em seis amostras foram isoladas o *C. bubulus*. De quatro fetos necropsiados, conseguiu-se isolar o *C. fetus* um deles e classificada como amostra "A" biotipo 2.

A frequência geral de isolamentos foi de 8,58% (14 em 163) sendo que somente 4,90% das amostras (8 em 163) foram tipificadas como patogênicas. Sobre o total de isolamentos, os patogênicos correspondem a 57,1%. A frequência do *C. fetus*, através de isolamento, MACV e IFD em raspados prepuciais e MCV é apresentada nas TABELAS III e IV.

### 4.2 - TESTE DA NOVILHA VIRGEM

Das seis novilhas cobertas com touros positivos, duas ficaram prenhes na primeira cobertura, e nas restantes, a repetição deaios persistiu por período superior a 10 meses.

Nas quatro novilhas não gestantes, a muco-aglutinação-cervico-vaginal apresentou-se positiva durante todo esse período e foi possível o isolamento do *C. fetus*, tipo "A" biotipo 1, de uma das novilhas.

### 4.3 - EFICIÊNCIA DA BACTERINA NO CONTRÔLE DA CAMPILOBACTERIOSE BOVINA

A eficiência das bacterinas avaliadas pela diminuição da repetição de cios e resultados observados com relação a vacas com anormalidades do ciclo estral são apresentadas na TABELA V e GRÁFICO 1.

### 4.4 - ANÁLISE/CUSTO/BENEFÍCIO

Em três rebanhos (C.D.F.) dentre os 10 registrados na TABELA I, com diagnóstico confirmado da campilobacteriose, foi calculado o prejuízo e o custo/benefício do controle da doença por meio vacinal.

Um dos rebanhos C era holandês e preto e branco, destinado a venda de reprodutores e produção leiteira e os outros dois (D.F.) eram rebanhos mestiços holando-zebu para exploração de leite.

Os cálculos para a avaliação custo/benefício são pormenorizados apenas para o rebanho C, sendo que para os rebanhos D e F são apresentados os totais das informações disponíveis.

Custo atribuível a doença no rebanho "C", HPB, composto de 240 vacas e três touros, de acordo com preços vigentes em 1974.

#### Produção Leiteira

1973 .....	1.700 litros
1974 .....	1.300 litros

Preço do litro de leite, Cr\$ 1,40

Cr\$ 1,40 X 400 litros = Cr\$ 560,00 por dia

Cr\$ 560,00 X 365 dias = Cr\$ 204.400,00 por ano

#### Renovação do Rebanho e Eficiência Reprodutiva das Vacas

1973 - número de abortos anotados.....	03
1974 - número de abortos anotados .....	14

Preço por bezerro = Cr\$ 5.000,00  
 14 bezerros X Cr\$ 5.000,00 = Cr\$ 70.000,00

#### Infertilidade

Nascimento de bezerros em 1973 ..... 184  
 Nascimento de bezerros em 1974 ..... 144  
 Diferença ..... 40  
 40 bezerros X Cr\$ 5.000,00 = Cr\$ 200.000,00

No cômputo geral, se fossem eliminados os touros por doença, poderíamos acrescentar os seguintes prejuízos:

Preço de matadouro ..... Cr\$ 3.000,00  
 Preço de revenda ..... Cr\$ 30.000,00  
 Preço de compra ..... Cr\$ 50.000,00

No rebanho em estudo os touros foram tratados 15 meses após a constatação da doença e, portanto, não houve perda total.

Custo da alimentação por dia durante o repouso sexual.

Silagem ..... 30 kg X Cr\$ 0,10 = Cr\$ 3,00  
 Pasto ..... 10 kg X Cr\$ 0,05 = Cr\$ 0,50  
 Ração ..... Cr\$ 20,00  
 Total Diário .... Cr\$ 23,50  
 1.350 dias X Cr\$ 23,50 = Cr\$ 31.725,00

Custo de medicamentos, por mês, aplicados no rebanho em tratamento das doenças e suas sequelas.

Cr\$ 1.700,00<sup>(12)</sup> X 12 meses = Cr\$ 20.400,00

Total de avaliação do custo anual da doença no rebanho "A".

Cr\$ 204.400,00 + Cr\$ 270.000,00 + Cr\$ 31.725,00 + Cr\$ 20.400,00  
 = Cr\$ 526.525,00.

Custo da prevenção da doença no rebanho "C".

#### Assistência Veterinária

Vinte e cinco cruzeiros por vaca/lactação seriam

12 - Média mensal com base em dados reais, obtidos na propriedade.

cobrados, especificamente, para assistência do rebanho visando o combate a campilobacteriose.

240 bacas X Cr\$ 25,00 = Cr\$ 6.000,00

#### Vacinação

Custo da vacina = Cr\$ 10,00

240 vacas X duas aplicações iniciais = 480 doses

480 X Cr\$ 10,00 = Cr\$ 4.800,00

Custo total do benefício X

Cr\$ 6.000,00 + Cr\$ 4.800,00 = Cr\$ 10.800,0

#### Cálculo do benefício líquido

Prejuízos totais ..... Cr\$ 526.252,00

Custo total da prevenção ... Cr\$ 10.800,00

Benefício líquido ..... Cr\$ 515.725,00

#### Avaliação unitária do custo benefício

Por cruzheiro investido.

Cr\$ 515.725,00 = Cr\$ 47,68 / unidade

Cr\$ 10.800,00

Por vaca

Cr\$ 515.725,00 = Cr\$ 2.128,02 / unidade

240 vacas

Custo da doença e de sua prevenção no Rebanho "F", mestiço HZ, composto de 120 vacas e um touro. A avaliação custo/benefício foi feita exclusivamente sobre a produção leiteira, único dado disponível, e de acordo com preços vigente em 1975.

#### Prejuízos

Com queda diária de 75 litros de leite e prejuízo anual de Cr\$ 65.331,50 (litro de leite a Cr\$ 2,38).

#### Custo da prevenção da doença

Assistência veterinária ..... Cr\$ 3.000,00

Vacinação ..... Cr\$ 2.400,00

Total ..... Cr\$ 5.400,00



## Cálculo do benefício líquido

Prejuízos totais .....	Cr\$ 65.331,50
Custo total da prevenção .....	Cr\$ 5.400,00
Benefício líquido .....	Cr\$ 59.931,50

## Avaliação unitária do custo/benefício

Por cruzheiro investido

$$\text{Cr\$ } \frac{59.331,50}{5.400,00} = \text{Cr\$ } 11,09/\text{unidade}$$

Por vaca

$$\text{Cr\$ } \frac{59.931,50}{120} = \text{Cr\$ } 499,92/\text{unidade}$$

Custo da doença e de sua prevenção no rebanho "D", mestiço HZ, composto de 170 vacas e oito touros. Os cálculos do custo/benefício são relativos também, unicamente à produção leiteira e estão relacionados com os preços de 1975.

## Prejuízos

A redução da produção leiteira diária durante o ano de 1975 foi de 170 litros no total de Cr\$ 147.679,00 (preço unitário do leite e Cr\$ 2,38).

## Custo da prevenção da doença

Assistência veterinária .....	Cr\$ 4.250,00
Vacinação .....	Cr\$ 3.400,00
Total .....	Cr\$ 7.650,00

## Cálculo do benefício líquido

Prejuízos totais .....	Cr\$ 147.679,00
Custo total da prevenção .....	Cr\$ 7.650,00
Benefício líquido .....	Cr\$ 140.029,00

## Avaliação unitária do custo/benefício

$$\text{Cr\$ } \frac{140.029,00}{7.650,00} = \text{Cr\$ } 18,30/\text{unidade}$$

Por vaca

$$\text{Cr\$ } \frac{140.029,00}{170} = \text{Cr\$ } 823,70/\text{unidade}$$

TABELA II - Frequência de *C. jejuni* encontradas em raspados prepuciais através das técnicas de IFD e isolamento com antibióticos e ou filtração prévia em rebanhos bovinos de Minas Gerais, 1975/76.

Identificação do Rebanho	Nº de Touros	Nº de Colheitas	IFD Positivo	Isolamentos	
				C/Antibiótico	C/Filtração
A	1	2	1	1	0
B	2	1	-	-	-
C	6	9	9	5	5
D	7	3	2	1	1
E	4	-	-	-	-
F	2	3	2	2	2
G	2	1	-	1	1
H	2	1	-	-	-
I	2	-	-	-	-
J	2	1	1	-	-
Total	30	21	15	10	9

TABELA III - Frequência de *C. fetus* encontrados em muco-cérvico-vaginal através das técnicas de IFD, isolamento e MACV de alguns rebanhos bovinos de Minas Gerais, 1975/76.

Identificação do Rebanho	Número de Amostras	IFD		Isolamento		Aglutinação	
		Positivo	%	Positivo	%	Positivo	%
A	10	03	30,00	-	-	07	70,00
B	12	-	0	-	-	03	25,00
C	44	16	36,36	01	2,27	33	75,00
D	12	06	50,00	-	-	07	58,33
E	10	02	20,00	02	20,00	09	90,00
F	28	10	35,71	-	-	23	82,14
G	05	-	-	-	-	-	-
H	05	-	-	-	-	-	-
I	06	02	33,33	-	-	03	50,00
J	06	01	16,66	-	-	01	16,66
Total	138	40	28,98	03	2,17	86	62,31

TABELA IV - Eficiência da vacinação contra campilabacteriose bovina nos rebanhos D e F, em Minas Gerais, 1975/76.

Característica da Bacterina	Rebanhos	Vacas com anormalidade de Cíclo estral		Números de repetições de cícos			
		Nº	%	Antes da Vacinação	Após a 1.ª Vacinação**	Após a 2.ª Vacinação***	Após a 3.ª Vacinação****
Experimental	D	46	27,05	136	35	01	01
Comercial*	F	20	16,66	47	13	01	01

- \* - Vibrin - Smith Kline
- \*\* - Observação durante seis meses
- \*\*\* - Observação durante cinco meses
- \*\*\*\* - Observação durante sete meses

TABELA V - Avaliação de sensibilidade e especificidade da MACV.

MACV	Diagnóstico		Total
	Confirmado pela IFD (doentes)	Não confirmado pela IFD (não doentes)	
Positivo	40	46	86
Negativo	0	52	52
Total	40	98	138

$$\text{Sens.} - \frac{40}{40} \times 100 = 100,00\%$$

$$\text{Esp.} - \frac{52}{98} \times 100 = 53,06\%$$

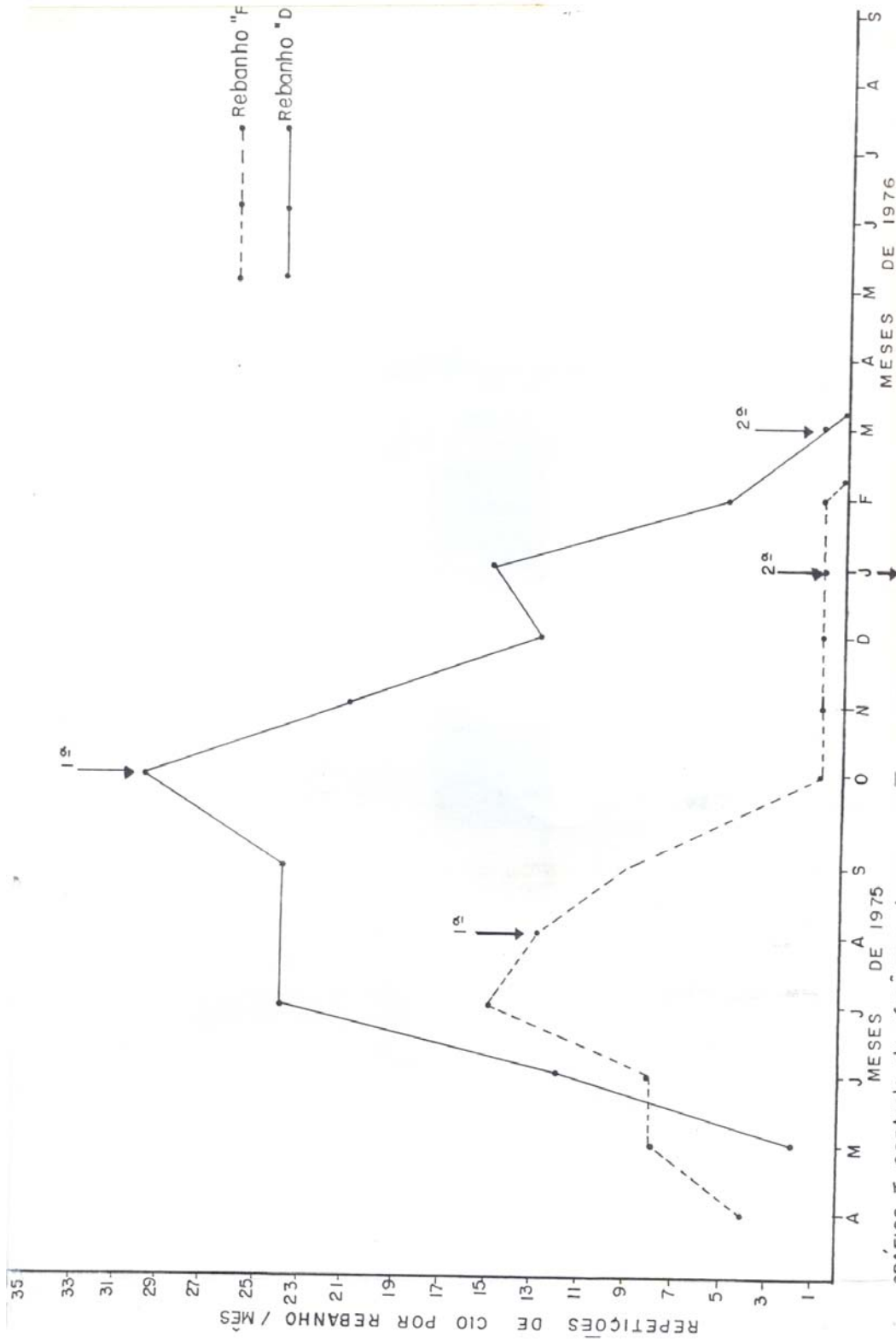


GRÁFICO I controle de eficiência da vacinação contra campilobacteriose bovina nos rebanhos "D" e "F" evidenciada através de repetições de cio, observados durante 18 meses, em Minas Gerais

## DISCUSSÃO

### 5.1 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTOS

A frequência de isolamentos foi baixa, principalmente nas fêmeas (2,17%), o que vem concordar com PLASTRIDGE (1941); PLASTRIDGE et alii (1961); SHEPLER et alii (1963); PESTANA DE CASTRO et alii (1963). Talvez o fato ocorra devido a pequena quantidade de germes no muco-cervico-vaginal, a cura espontânea de alguns animais, a influência da fase estral na multiplicação dos germes e, por último, a demora entre colheita e manipulação do material. Há que se considerar ainda, dois fatores não menos importantes: nas semeaduras em campo as condições técnicas são precárias e, mesmo transportando-se o material ao laboratório, sempre houve um lapso indesejavelmente grande de tempo.

Independentemente das ligeiras modificações introduzidas na técnica de colheita do raspado prepucial sugerido por BARTLETT (1949), o resultado nos machos, de frequência mais elevada, melhor se assemelha ao de DUNN et alii (1965); WINTER et alii (1965), nos quais é mencionado o fato de ser maior o número de germes presentes e que, no reprodutor, não há cura espontânea TABELA II.

Em fetos, onde o conteúdo estomacal é muito rico (D'APICE, 1956); PESTANA DE CASTRO et alii (1967), só foi possível o isolamento do *C. fetus* uma vez. Muito influenciou o mau acondicionamento do material recebido e a demora em chegar ao



laboratório, pois, em muitos casos, outros veterinários faziam a colheita e a remessa.

O isolamento de amostras parece-nos bastante facilitado quando se emprega antibióticos seletivos, no entanto o uso de filtragem prévia em micromembrana, teve aproximadamente o mesmo valor, sendo mais prático, TABELA II.

## 5.2 - MUCO-AGLUTINAÇÃO-CÉRVICO-VAGINAL

Desde que JAPSEN & WINDEKILDE (1951) usaram o (MCV) para pesquisa de aglutininas, muitos pesquisadores utilizaram o método para diagnóstico. Várias foram as modificações introduzidas, numa tentativa de obtenção de melhora dos resultados, MEDEIROS & FIGUEIREDO (1971); PLASTIDGE et alii (1953) e HUGHES (1953).

Em nosso meio, é o mais aceito, talvez por ser o mais prático ou por faltar aos nossos pesquisadores condições de utilização de outros métodos. No entanto, em nossos resultados e no de muitos outros pesquisadores, o índice de falsos positivos é muito grande. Assim, enquanto 62,31% das amostras trabalhadas deram resultados positivos, somente em 28,98% foi possível obter-se reações confirmatórias pela IFD. Se usássemos o isolamento como teste definitivo a percentagem seria mínima, isto é, 2,17.

O método apresenta sensibilidade de 100,00% embora seja de especificidade baixa (53,06%), determinadas na TABELA V, segundo os princípios de diagnóstico de triagem elaborados por THORNER & REMEIN (1961). Estes resultados sugerem a utilização do método para triagem, sendo necessário a confirmação através de métodos mais seguros, como IFD e isolamento do *C. fetus*.

## 5.3 - IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Este método veio simplificar muito o diagnóstico da campilobacteriose. Muitos pesquisadores têm utilizado com fre-

quência a IFD como método conclusivo e de grande eficiência. No presente estudo, foi utilizado como tal, servindo para avaliar a MACV.

Em nosso trabalho, foi o que melhor apresentou resultados em machos, sendo muito semelhante a frequência de isolamento com a vantagem de ser mais simples TABELA II. Isso concorda com o resultado de MELLIC et alii (1965); KITA et alii (1966) e DUFTY (1967). No entanto, quando aplicado para o diagnóstico em fêmeas, os resultados não foram satisfatórios. A pouca quantidade de *C. fetus*, as frequentes contaminações e a grande viscosidade do muco são fatores limitantes.

Achamos, sem dúvida, ser esse método o mais adequado, dentro das nossas condições, para o diagnóstico da doença em machos e em material de fetos abortados.

#### 5.4 - TESTE DA NOVILHA VIRGEM

Este teste tem sido aplicado desde a década de 1950 e 1960 com bons resultados, ADLER et alii (1952); BIERCHWAL & McDOUGLE (1965); CLARK et alii (1969). Seu uso, no entanto, pouco prático devido, principalmente, ao custo elevado e à demora para o diagnóstico, DOBSON et alii (1970).

As repetições de cios e MACV positiva em 66,66% das seis novilhas trabalhadas e o isolamento do *C. fetus* em uma delas vem comprovar a eficiência do método, pois, em verdade, os touros que fizeram cobrições de prova contaminaram por menos uma das duas novilhas utilizadas para cada um.

#### 5.5 - COMPARAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Dentre os quatro métodos utilizados, a IFD é o que mais satisfaz em nossas condições, no entanto deveria ser confirmado com isolamento e tipificação do patógeno por outro lado, ele tem vantagem de ser suficiente trabalhar com os reprodutores machos somente e o diagnóstico positivo, significa do-

ença, enquanto a MACV positiva pode significar anticorpos de infecção passada ou reações cruzadas, isto vem confirmar os trabalhos de WINTER et alii (1965/1967); ANDREWS & FRANK (1974). O isolamento é difícil e o teste da novilha virgem é demorado e dispendioso.

## 5.6 - CONTRÔLE DA CAMPILOBACTERIOSE ATRAVÉS DE IMUNÓGENOS

Desde 1957 tem-se procurado controlar a campilobacteriose através de vacinas e bacterinas. Os resultados são variáveis e grande são os esforços para se encontrar um imunógeno eficiente, AMELL & STOCKTON (1956).

Com base em pesquisas recentes, parece-nos que o resultado obtido com bacterinas oleosas é satisfatório, tanto em uso preventivo como curativo. Estes achados concordam com os de HOERLEIN & KRAMER (1963/1964); HOERLEIN et alii (1965); FIREHAMMER & BERG (1966); SCOTT (1966); BECKENHAUER (1967); CLARK (1967); HOERLEIN & CARROLL (1970); ALLAN & MUTCH (1971); CARROLL & HOERLEIN (1972); BOUTERS et alii (1973); CLARK et alii (1975).

A vacinação dos animais deve ser feita um a dois meses da estação de cobrição. Como em nosso meio, praticamente, não há estação de monta para rebanhos leiteiros, a vacinação foi feita imediatamente após constatação do diagnóstico positivo, e o resultado foi satisfatório.

A bacterina oleosa produziu uma reação indesejável em forma de tumefação no local da inoculação, que pode variar de um a cinco centímetros de diâmetro, com duração de até um ano. Isto é devido a imunologicamente desejável lenta absorção do adjuvante oleoso. A inoculação, sempre subcutânea, em áreas clássicas de pele solta, como proximidade da espádua, oferecem este inconvenientes, mais de aspecto estético. Por isso, deve-se procurar áreas menos nobres para vacinação. No pescoço seria o lugar de preferência, mas é necessário evitar-se o local do canzil ou corrente, pois a fricção constante pode abrir so-

luções de continuidade cutânea trazendo danos ao animal. Experiências com outros adjuvantes talvez venha oferecer menos inconvenientes. Outro recurso, seria a aplicação por via intramuscular profunda, o que evitaria a tumefação local pela absorção mais rápida, no entanto a maior velocidade de absorção poderia produzir uma imunidade mais curta.

A redução total dos abôrtos logo após a aplicação da primeira dose da bacterina, autóctona ou importada, a regularização de cios e fertilização das vacas confirmam a opinião de HOERLEIN et alii (1965); SCOTT (1966); FIREHAMMER & BERG (1966); NEWHALL (1966); HOERLEIN & CARROLL (1970); BECKERHAUER (1967); CLARK (1967); ALLAN & MUTH (1971); CARROLL & HOERLEIN (1972); CLARK et alii (1975); BOUTERS et alii (1973), de que a imunização é a melhor e mais econômica forma de eliminar a campilobacteriose. No entanto, o aparecimento de algumas repetições de cios após um ano da última vacinação demonstra que o período de proteção é este, tornando-se portanto, necessárias revacinações anuais.

## 5.7 - AVALIAÇÃO CUSTO/BENEFÍCIO

Dos três rebanhos trabalhados, apenas do primeiro, denominado rebanho "C", foi possível obter dados completos de perdas e, portanto, o único do qual se fez um cálculo total do custo/benefício. Para os outros dois, rebanhos "F" e "D", os cálculos se basearam apenas na diminuição leiteira.

Os valores encontrados e a razão destas perdas não diferem muito daquelas citadas por autores nacionais e estrangeiros, como FRANK, (1956); MIES FILHO (1963); SAFFORD (1969), MADOUX & WILLIAMS (1975).

A falta de esclarecimento de muitos fazendeiros, a inexistência de contabilidade agrícola na quase totalidade das nossas fazendas e a dificuldade de diagnóstico dos problemas da pecuária fazem com que os prejuízos causados, inclusive os devido à campilobacteriose bovina, pareçam muito menores do que realmente ocorrem no rebanho nacional. As perdas devido a doen

ça foram, ao contrário, bem altas sejam as totais do rebanho "A" ou unicamente as ligadas à diminuição da produção leiteira, rebanhos "F" e "D".

Assim, do que foi encontrado nesse trabalho, deduz-se que é altamente compensador o investimento no controle desta doença, uma vez que para cada cruzeiro investido haverá um retorno de Cr\$ 47,00 para o rebanho cujo cálculo se baseou nas perdas totais. Nos rebanhos "F" e "D", somente atento às perdas na produção leiteira, o retorno foi de Cr\$ 11,09 e Cr\$ 18,30 vezes o custo da prevenção.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Em 10 rebanhos leiteiros, distribuídos em nove municípios de Minas Gerais, envolvendo 928 fêmeas e 30 machos, foi obtida uma amostragem de 138 materiais de fêmeas, 21 raspados prepuciais e quatro fetos, visando a comprovação de quatro métodos de diagnóstico da campilobacteriose, bem como foi estabelecido o custo/benefício do controle da doença em três destes rebanhos.

### 6.1 - DIAGNÓSTICO POR ISOLAMENTO

O isolamento continua, ainda, a ser o método de maior segurança, embora sejam necessários artifícios para melhorar a frequência de resultados positivos. Em raspados prepuciais, a adição de antibióticos forneceu 46,61% de resultados positivos contra 42,85% de positividade quando se usou filtração prévia do inóculo. Nas fêmeas, apresentou apenas 2,17% de resultados positivos.

### 6.2 - DIAGNÓSTICO PELA MUCO-AGLUTINAÇÃO-CÉRVICO-VAGINAL

A MACV com 62,31% de exames considerados positivos, mostra boa sensibilidade mas, se comparada aos resultados dos outros métodos, sua especificidade é baixa.

A MACV é válida como teste de triagem, necessitando a confirmação de diagnósticos precisos e acurados, como isola-

mento.

### 6.3 - DIAGNÓSTICO PELA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

O método é simples, econômico e apresentou, em machos, resultados muito próximos aos do isolamento. Para diagnóstico em fêmeas, dada a alta densidade do muco-vaginal e dificuldade de sua filtração, oferece resultados não satisfatórios.

### 6.4 - DIAGNÓSTICO PELO TESTE DA NOVILHA VIRGEM

Como esperado, funcionou bem o teste da novilha virgem (66,66%). O seu custo elevado e a delonga em oferecer diagnósticos conclusivos continuam sendo fatores limitantes.

### 6.5 - CONTRÔLE ATRAVÉS DE BACTERINA

A prevenção da doença pode ser feita com segurança, através de vacinações sistemáticas. A bacterina por nós preparada a partir de amostra autoctona, apresentou muitos bons resultados, comparados com produto importado. GRÁFICO 1.

### 6.6 - AVALIAÇÃO CUSTO/BENEFÍCIO

A campilobacteriose bovina é doença que muito interfere na reprodução, causando perdas acentuadas em rebanhos. Neste trabalho, os cálculos totais de perdas relativos ao rebanho "C" foram de Cr\$ 2.128,02 por vaca e retorno de Cr\$ 47,68 por um cruzeiro investido na prevenção da doença. As perdas unicamente baseadas na diminuição da produção leiteira dos rebanhos "F" e "D", foram de Cr\$ 499,92 e Cr\$ 823,70 por vaca com retornos de Cr\$ 11,09 e Cr\$ 18,30 vezes o custo da prevenção respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, H.C.; ALBERTSEN, B.E.; RASBECH, N.O.; SZABO, L. Diagnosing of *Vibrio fetus* - infektioner hos tyrevædd smittefor - sog. Nord. Vet. Med., Copenhagen, 4:464-70, 1952.
- ALLAN, P.J. & MUTCH, C.B. The effect of vaccination against bovine vibriosis on pregnancy rates in heifers in a Northern Queensland beef herd. Aust. Vet. J., Parkville, 47(5):184 - 5, 1971.
- AMELL, V.H. & STOCKTON, J.J. Serological responses of cattle to *Vibrio fetus* vaccine as measured by the complement - fixation test and tube-agglutination test. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 17(65):626-9, 1956.
- ANDREWS, P.J. & FRANK, F.W. Comparison of four diagnostic tests for detection of bovine genital vibriosis. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 165(8):695-7, 1974.
- BARTLETT, D.E. Procedures for diagnosing bovine venereal trichomoniasis and handling affected herds. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 114(866):293-305, 1949.
- BECKERHAUER, W.H. Vaccination in the control of bovine vibriosis. Iowa Vet., Ames, 38:6-13, 1967.



- BERG, R.L.; JUTILA, J.W.; FIREHAMMER, B.D. A revised classification of *Vibrio fetus*. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 32(1) : 11-22, 1971.
- BIERSCHWAL, C.J. & McDOUGLE, H.C. Bovine vibriosis in Missouri. Vet. Med. Small Anim. Clin., Bonner Springs, 60(5):534-8, 1965.
- BOUTERS, R.; DE KEYSER, J.; BONTE, P.; VANDEPLASSCHE, M.; VAN AERT, A.; BONTE, E.; BONTE, P. *Vibrio fetus* infection in bulls: curative and preventive vaccination. Br. Vet. J., London, 129(1):52-7, 1973.
- BOYD, E. *Bovine genital vibriosis*. Uppsala, Almqvist Wikseels boktryckeri, 1955. 89 p. (Thesis).
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E., ed. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8. ed. Baltimore, Willims & Wilkins, 1974. 1268 p.
- CARROLL, E.J. & HERLEIN, A.B. Diagnosis and control of bovine genital vibriosis. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 161(11):1359-64, 1972.
- CLARK, B.L. Control of bovine vibriosis by vaccination. Aust. Vet. J., Parkville, 43(10):437-40. 1967.
- CLARK, B.L.; DUFTY, J.H.; MONSBOURGH, M.J. Immunization of cattle against vibriosis with vaccines prepared from *Campylobacter fetus subs fetus*. Aust. Vet. J., Parkville, 51(7):333-6, 1975.
- CLARK, B.L.; DUFTY, J.H.; MONSBOURGH, M.J. Observations on isolation of *Vibrio fetus* (venerealis) from the vaginal mucus of experimentally infected heifers. Aust. Vet. J., Parkville, 45(5):209-11, 1969.

- D'APICE, M. Ocorrência do abôrto bovino no Estado de São Paulo devido ao *Vibrio fetus*. Biológico, São Paulo, 22(1):15-8, 1956.
- DOBSON, A.W.; BIERSchWAL, C.J.; McDOUGLE, C. Induced estrus as an aid in detection of bovine genital vibriosis by means of the virgin heifers test. J. Am. Med. Assoc., Schaumburg, 156(11):1584-8, 1970.
- DOYLE, L.P. The etiology of swine dysentery. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 9(30):50-1, 1948.
- DUFTY, J.H. Diagnosis of vibriosis in the bull. Aust. Vet. J., Parkville, 43(10):433-7, 1967.
- DUNN, H.O.; BURDA, K.; WAGNER, W.G.; GILMAN, H.L. Isolation of *Vibrio fetus* from bovine semen. Cornell Vet., Ithaca, 55(2):220-9, 1965.
- FIREHAMMER, B.D. & BERG, R.L. Bacterins for immunization against bovine vibriosis. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 149(12):1640-2, 1966.
- FIREHAMMER, B.D. & HAWKINS, W.W. The patogenicity of *Vibrio fetus* isolated from ovine bile. Cornell Vet., Ithaca, 54(2):308-14, 1964.
- FLORENT, A. Isolament d'un vibrion saprophyte du sperme du taureau et du vagin de la vache (*Vibrio bubulus*). C. R. Seances Soc. Biol., Paris, 147:2066-9, 1953.
- FLORENT, A. Méthode d'isolament de *Vibrio foetus* à partu d'échantillons polymicrobiens, spécialement du liquide préputial. Milieu selectif "coeur - song - gelose on vert brillant", em microaerobiose. C.R. Seances Soc. Biol., Paris, 150(5):1059-61, 1956.

- FRANK, A.H. Vibriose in cattle. Vet. Scope, Kalamazoo, U.S.A. 1(12):2-6, 1956.
- GUIDA, H.G.; GOMES, W.V.; MEDEIROS, P.M.; PIZELLI, G.N. Vibriose bovina. Veterinária, Rio de Janeiro, 14:37-61, 1960/61.
- HERSCHLER, R.C. *The diagnosis of Vibrio fetus in the bovine*. St. Paul, University of Menesota, 1963. (Ph. Thesis) apud SCHUTTE, A.P. *Some aspects of Vibrio fetus infection in bulls*. Ghent, State University, 1963. 87 p. (Thesis).
- HERLEIN, A.B. & CARROLL, E.J. Duration of immunity to bovine genital vibriosis. J. Am. Med. Assoc., Schaumburg, 156(6):775-8, 1970.
- HOERLEIN, A.B.; CARROLL, E.J.; KRAMER, T.; BECKENHAUER, W. H. Bovine vibriosis immunization. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 146(8):828-35, 1965.
- HOERLEIN, A.B. & KRAMER, T. Artificial stimulation of resistance to bovine vibriosis. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 24(102):951-5, 1963.
- HOERLEIN, A.B. & KRAMER, T. Artificial stimulation of resistance to bovine vibriosis; use of bacterins. Am. J. Vet. Res. Schaumburg, 25(105):371-3, 1964.
- HUGHES, D.E. A study of the diagnosis of bovine vibriosis with special reference to the detection of agglutinins in the vaginal secretions. Cornell Vet., Ithaca, 43(3):431-44, 1953.
- HUGHES, D.E. Notes on vibriosis, with special reference to the isolation of Vibrio fetus from semem and preputial fluids. Cornell Vet., Ithaca, 46(2):249-56, 1956.

- JEPSEN, A. & WINDEKILDE, T. The occurrence and significance of agglutinins in the genital organs of brucella-infected cows. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 12(43):97-9, 1951.
- KENDRICK, j.W. The vaginal mucus agglutination test for bovine vibriosis. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 150(5)495-8, 1967.
- KIGGINS, E.M. & PLASTRIDGE, W.N. Effect of gaseous environment on growth and catalase content of *Vibrio fetus* cultures of bovine origin. J. Bacteriol., Bethesda, 72(3):397-400, 1956.
- KITA, E.; OGIMOTO, K.; SUTO, T. Detection of *Vibrio fetus* from bulls by means of fluorescent antibody technique. Natl. Inst. Anim. Health Q., Tokyo, 6(4):223-32, 1966.
- LAINING, J.A. *Vibrio fetus* infection of cattle. Rome, FAO, 1960. (Agricultural studies, 51).
- LAWSON, J.R. & MCKINNON, D.W. *Vibrio fetus* infection in cattle. Vet. Rec., London, 64(48):763-71, 1952.
- MADOUX, J.N. & WILLIAMS, D.J. Influence of *Vibrio fetus* on reproductive efficiency and milk production in a Georgia dairy herd. J. Dairy Sci., Champaign, 58(1):143-4, 1975.
- McENTEE, K.; HUGHES, D.E.; GILMAN, H.L. Prevention of vibriosis in inseminated heifers by treating the semen from *Vibrio* infected bulls with penicillin, streptomycin and sulphanilimide. Cornell Vet., Ithaca, 44(3):395-402, 1954.
- McFADYEAN, F. & STOCKMAN, S. Report of the Departmental Committee Appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to Inquire into Epizootic Abortion. Part I, 1909, p. 15. Part III, 1913, p. 9. apud BRUNER, D.W. & GILLESPIE, J.H. Hagan's Infections Diseases of Domestic Animals. 6. ed. Ithaca, Comstock, 1973. p. 125.

- MEDEIROS, P.M. & FIGUEIREDO, J.B. Vibriose bovina no Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 23:137-41, 1971.
- MELLIICK, P.W.; WINTER, A.J.; McENTEE, K. Diagnosis of vibriosis in the bull by the use of the fluorescent antibody technique. Cornell Vet., Ithaca, 55(2):280-94, 1965.
- MIES FILHO, A. Incidência da vibriose bovina em alguns rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul. Rev. Fac. Agron. Vet., Porto Alegre, 3( ):195-9, 1960.
- MIES FILHO, A. Vibriose bovina; evolução de um foco no Rio Grande do Sul. Rev. Fac. Agron. Vet., Porto Alegre, 6(2):73-83, 1963.
- NATIONAL ANIMAL DISEASE CENTER. Standard tecnicis for immufluorescens. Ames, Iowa, 1975.
- NEWHALL, J.H. Results of field trials and controlled laboratory studies on bovine vibriosis bacterins. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 149(12):1643-6, 1966.
- PESTANA DE CASTRO, A.F.; GIORGI, W.; SANTA ROSA, C.A.; RIBEIRO, W. B. Vibriose bovina no Estado de São Paulo: isolamento de novas amostras de *Vibrio fetus* e pesquisa de aglutininas anti-*Vibrio fetus* no muco vaginal. Arq. Inst. Biol. São Paulo, 34(1):29-43, 1967.
- PESTANA DE CASTRO, A.F.; SANTA ROSA, C.A.; TOISE, C.; BERTHET, L. E. A. Vibriose bovina no Estado de São Paulo. Isolamento do *Vibrio fetus* de um feto bovino e de um touro. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 30:175-9, 1963.
- PLASTRIDGE, W.N. Cultural and serological observations on *Vibrio fetus* infection in cattle. J. Bacteriol., Bethesda, 42 816-7, 1941.

- PLASTRIDGE, W.N. & EASTERBROOKS, H.L. Diagnosis, diagnostic tests, and their reliability. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 89<sup>th</sup>, Atlantic City, 1952. Proceedings. Schaumburg, American Veterinary Medical Association, 1953. p. 331-4.
- PLASTRIDGE, W.N.; EASTERBROOKS, H.L.; WILLIAMS, L.F. The Tampon method of collection and the examination of cervicovaginal mucus for *Vibrio fetus* agglutinins. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 123(12):516-20, 1953.
- PLASTRIDGE, W.N.; KOTHS, M.E.; WILLIAMS, L.F. Antibiotic medium for the isolation of *Vibriosis* in semen. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 22(90):867-70, 1961.
- PLASTRIDGE, W.N. & WILLIAMS, L.F. Observations on *Vibrio fetus* infection in cattle. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 102(191):89-95, 1943.
- PLASTRIDGE, W.N.; WILLIAMS, L.F.; EASTERBROOKS, H.L.; WALKER, E.C.; BECCIA, R.N. *Bibriosis* in cattle. Storrs, Agric. Exp. Sta., 1951. 53 p. (Bulletin, 281).
- PLASTRIDGE, W.N.; WILLIAMS, L.F.; PETRIE, D. *Vibriosis* abortion in cattle. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 8(27):178-83, 1947.
- PLUMER, C.J.; DUVALL, W.C.; SHEPLER, V.M. A preliminary report on a new technic for isolation of *Vibrio fetus* from carrier bulls. Cornell Vet., Ithaca, 52(1):110-21, 1962.
- RUCKERBAUER, G.M.; MALKIN, K.; MITCHELL, D.; BOULANGER, P. *Vibriosis*: demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubulus*, organisms in preputial fluid by immunofluorescence and cultural techniques. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 38(7):321-7, 1974.

- RYFF, J.F. & LEE, A.M. *Vibrio fetus* infection in sheep. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 6(20):149-58, 1945.
- SAFFORD, J.W. Bovine vibriosis and regulatory veterinary medicine. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 155(12):178-81, 1969.
- SAMUELSON, J.D. & WINTER, A.J. Bovine vibriosis: the nature of the carrier state in the bull. J. Infect. Dis., Chicago, 116(5):581-92, 1966.
- SEBALD, M. & VERON, M. Teneur en bases de l'ADN et classification de vibrions. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 105:208-9, 1963.
- SCHWABE, C.W.; RIEMANN, H.P.; FRANTI, C.E. Epidemiology in veterinary practice. Philadelphia, Lea Febiger, 1977. 254 p. (no prelo).
- SCOTT, J.A. Vaccination in the control of vibriosis in beef cattle. Norden News, Lincoln, 41(4):6-9, 1966.
- SHEPLER, V.M.; PLUMER, G.J.; FABER, J.E. Isolation of *Vibrio fetus* from bovine preputial fluid, using millipore filters and on antibiotic medium. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 24(101):749-55, 1963.
- SHIRES, G.M.H. & KRAMER, T. Filtration of bovine cervicobaginal mucus for diagnosis of vibriosis, using the fluorescent antibody test. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 164(4) : 398-401, 1974.
- SMITH, H.J. & TAYLOR, M.S. Some morfological and biological characteristics of the spirtilla associated with disease of fetal membranes in cattle. J. Exp. Med., New York, 30(4):299-312, 1919.
- SZABO, L. Infektionspathologiske problemer in forbindelsa med afrugtbarhed hos kraegest. Nord. Vet. Med., Copenhagen, 3: 597-608, 1951.

- THORNER, R.M. & REMEIN, Q.R. *Principles and procedures in the evaluation of screening for disease*. Washington, D.C., U.S. Government Printing Office, 1961. 24 p. (Public Health Service Publication, 846).
- TERPSTRA, J.I. & EISMA, W.A. *Vibrio fetus* infection in cattle and enzootic infertility. Tijdschr. Diergeneesk., Utrecht, 76 433-7, 1951.
- VERON, M. & CHATELAIN, R. Taxinomic study of the Genus *Campylobacter* SEBALD and VERON and designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (SMITH & TAYLOR) SEBALD AND VERON. Int. J. Syst. Bacteriol., Bethesda, 23(2):122-34, 1973.
- WALSH, A.F. & WHITE, F.H. Biochemical and serologic characteristics of *Vibrio* isolants from cattle. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 29(7):1377-83, 1968.
- WINTER, A.J.; BURDA, K.; DUNN, H.O. An evaluation of cultural technics for the detection of *Vibrio fetus* in bovine semen. Cornell Vet., Ithaca, 55(3):431-44, 1965.
- WINTER, A.J.; SAMUELSON, J.D.; ELKANA, M. A comparison of immunofluorescence and cultural techniques for demonstration of *Vibrio fetus*. J. Am. Vet. Med. Assoc. Schaumburg, 150(8):499-502, 1967.