

COMPARAÇÃO DE TRÊS TÉCNICAS DE COLETA DE AMOSTRA DE MATERIAL PREPUICIAL PARA DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE¹

AUVANIR DE A. RAMOS², HÉLIO GUSTAVO GUIDA
e VANIA LUCIA B. ANDRADE³

RESUMO - Utilizaram-se seis reprodutores bovinos infectados naturalmente com *Campylobacter fetus*, para comparar três métodos de coleta de material prepucial para exame bacteriológico: o da pipeta e bulbo de plástico Bartlett et al. (1947), com escarificação da região prepucial e aspiração do esmegma; o da mecha ("swab") Gibson et al. (1970), com adaptação de uma bucha de gaze e algodão à extremidade de uma pipeta de plástico para fricção da região prepucial; e o da lavagem, com caldo tripticase, do prepúcio com o aparelho G.M., descrito por Mello (1953). O exame bacteriológico do material coletado mostrou conclusivamente que a coleta do esmegma prepucial com pipeta e bulbo de plástico foi a técnica mais eficiente, considerando-se o maior número de amostras positivas para a identificação e recuperação do *Campylobacter fetus* e a menor interferência dos organismos contaminantes.

Termos para indexação: *Vibrio fetus*, vibriose, aborto vibrionico, infecção vibrionica, *Campylobacter fetus*, esterilidade enzoótica.

COMPARISON OF THREE TECHNIQS FOR COLLECTION OF PREPUICIAL SAMPLES FOR THE DIAGNOSIS OF CAMPILOBACTERIOSIS

ABSTRACT - Using six bulls naturally infected with *Campylobacter fetus*, three technics for collection of preputial samples for bacteriological examination were compared: the first technic consisted in utilizing a plastic pipette and bulb of artificial insemination Bartlett et al. (1947), to aspirate material; the second, using a "swab" Gibson et al. (1970), adapted to a plastic pipette of artificial insemination was used to scrub the preputial cavity mucosa; the third technic involves the washing of the preputial cavity with the aid of a G.M. apparatus Mello (1953), with tripticase broth. Bacteriological examination of the samples shows conclusively that aspirating was the technic of choice because it permits the identification of more *Campylobacter fetus* positive samples besides less interference from contaminating organisms.

Index terms: *Vibrio fetus*, vibriosis, vibrionic abortion, vibrionic infection, *Campylobacter fetus*, enzootic sterility.

INTRODUÇÃO

É reconhecido, de longa data, que a campilobacteriose é uma doença verdadeiramente venérea e que reprodutores infectados são o fator-chave do seu diagnóstico e controle, segundo Dufty (1967), Schutte (1969) e Carrol & Hoerlein (1972).

Assim, sempre que se pretende alcançar um diagnóstico definitivo, o *Campylobacter fetus* deve ser isolado das amostras coletadas do saco prepucial de reprodutores suspeitos de infecção. Entretanto, o isolamento desses organismos a partir das secreções prepuciais é dificultado pelo reduzido número

de colônias de *Campylobacter fetus* existentes nas amostras e pela alta taxa de contaminantes resistentes, segundo Shepler et al. (1963), Dufty (1967) e Winter et al. (1967).

Embora estudos epidemiológicos realizados por Schutte (1969) e Clark (1971) tenham evidenciado a importância do reprodutor na transmissão da campilobacteriose venérea, tal fato só passou a ser considerado após o desenvolvimento de meios de cultura seletivos para o primeiro isolamento do *Campylobacter fetus* dos fluidos prepuciais, posto em prática por Smibert (1974).

Florent (1953) e Plastring et al. (1961) reconhecem ser o macho o elemento preponderante para o diagnóstico da doença nos rebanhos. O sucesso do uso de meios de cultura seletivos, embora apresentando resultados variáveis, vem favorecendo o acréscimo da média de isolamentos do germen

¹ Aceito para publicação em 6 de fevereiro de 1986.

² Méd. - Vet., M.Sc., EMBRAPA/Unidade de Apoio ao Plano Nacional de Saúde Animal, antiga estrada Rio-São Paulo, km 47, CEP 23460 Seropédica, RJ.

³ Méd. - Vet., EMBRAPA, Seropédica, RJ.

em reprodutores infectados (Plumer et al. 1962, Shepler et al. 1963, Winter et al. 1965, Dufty & McEntee 1969).

Ao mesmo tempo, diferentes técnicas têm sido também desenvolvidas para a coleta de amostras, como: a utilização da pipeta de plástico de inseminação artificial, com pequenas adaptações de acoplamento segundo Bartlett et al. (1947), Hughes (1956), Plumer et al. (1962), Dufty (1967), Dufty & McEntee (1969), Castro et al. (1963, 1967), Clark et al. (1969), Fernandes et al. (1975) e Leite (1977); a utilização da lavagem prepucial segundo Murnane et al. (1959) e Dufty & McEntee (1969), ou, ainda, a utilização da raspagem prepucial segundo Sutka & Katai (1969) e Gibson et al. (1970).

Tedesco et al. (1977) realizaram um estudo comparativo de três técnicas de coleta de amostras de material para diagnóstico da doença de reprodutores bovinos.

O presente estudo visou a comparar a eficiência de três técnicas simples para a coleta de material prepucial em reprodutores bovinos para diagnóstico da campilobacteriose.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis reprodutores bovinos da raça Holandesa, com cinco a seis anos de idade, sendo um da variedade preto-e-branco e três da variedade vermelho-branco, e os demais, das raças Devon e Guernsey. Os animais estavam localizados nos municípios de Itaguaí e Santa Cruz, no Estado do Rio de Janeiro.

Esses reprodutores foram infectados naturalmente, mediante monta em fêmeas contaminadas com *Campylobacter fetus* e considerados positivos através de procedimento segundo Ramos et al. (1983). Uma vez comprovada a infecção, os machos foram isolados das fêmeas, servindo para o estudo comparativo de três técnicas de coleta de material prepucial, a saber: coleta de esmegma (Técnica 1), coleta de muco por fricção (Técnica 2) e coleta de lavado prepucial (Técnica 3). As amostras prepuciais foram coletadas simultaneamente pelas três técnicas, decididas ao acaso, durante seis meses, com intervalos de 30 dias para cada lote de dois animais, sorteados também ao acaso, de modo que ocorresse sempre um rodízio da utilização de cada técnica e do lote de reprodutores. Como a cada coleta de material prepucial envolvia a utilização das três técnicas, obtiveram-se 18 amostras de material prepucial de cada reprodutor. O óstio prepucial era higienizado por lavagem com água corrente e sabão e secagem com toalha limpa, recebendo aplicação de orto-fenil/fenol na forma de spray.

O esmegma prepucial era coletado com pipeta de plástico de inseminação artificial, acoplada a um bulbo de plástico (Fig. 1) segundo Bartlett (1947), com a qual se fazia a aspiração das secreções após escarificação da face dorsal do pênis e mucosa adjacente (Fig. 2 e 3).

O muco prepucial era coletado com o auxílio de uma mecha de algodão e gaze ("swab") adaptada a uma pipeta de plástico de inseminação artificial previamente esterilizada (Fig. 1) segundo Gibson et al. (1970), com a qual se fazia vigorosa fricção na cavidade prepucial (Fig. 4). As amostras coletadas com pipetas de plástico (esmegma prepucial) foram transferidas para tubos com caldo tripticase, e as mechas (muco prepucial), lavadas, durante 1 minuto, com caldo tripticase. Os tubos eram conservados à temperatura de 4°C, até a chegada ao laboratório. O tempo gasto na coleta das amostras foi de, aproximadamente, um minuto.

A secreção prepucial era coletada pelo aparelho G.M. (Mello 1953), devidamente esterilizado (Fig. 1), contendo aproximadamente 60 ml de caldo tripticase, que era injetado no saco prepucial. Após fechar o óstio prepucial com uma pinça de coprostase (Fig. 5 e 6), fazia-se vigorosa massagem externa, desde a glândula até o fundo do saco prepucial, para desalojar os germens das criptas da mucosa prepucial; a seguir, o material era recolhido no erlenmeyer do G.M. e conservado à temperatura de 4°C, até chegar ao laboratório. A coleta foi realizada em aproximadamente cinco minutos.

Os materiais coletados eram remetidos ao laboratório dentro de cerca de duas horas. As amostras eram centrifugadas por 20 minutos, a 100 G.

Do sobrenadante, tomava-se 0,1 ml, que era semeado em seis placas-de-Petri para cada técnica, as quais continham, sucessivamente, meio seletivo constituído de infuso de cérebro/coração, agar a 1,5% com sangue de bovino desfibrinado 10%, bacitracina 15 unidades por ml, sulfato de polimixina β 1 unidade por ml, novobiocina 5 μ g por ml, e verde brilhante a 0,33%, 0,1 ml por ml. As placas eram incubadas em atmosfera com 10% de CO₂ e mantidas a 37°C por 96 horas, sendo examinadas após o quarto dia de incubação. Colônias suspeitas de cada placa eram identificadas com base nos caracteres morfológicos e tintoriais, utilizando-se os métodos de Gram, Ziel-Nilsen modificado, cristal violeta e a motilidade em campo escuro e contraste de fase, e provas bioquímicas, incluindo a produção de catalase, oxidase e negatividade para produção de H₂S.

O grau de contaminação das placas era relatado como leve, médio e forte, segundo Dufty (1967), o que correspondia respectivamente, a menos de um terço da área da placa, entre um e dois terços da área da placa, e mais de dois terços da área da placa. Os dados obtidos foram examinados e analisados estatisticamente, empregando-se o teste do qui-quadrado tanto em relação à comparação das técnicas como no que se referiu ao grau de contaminação e à frequência de contaminantes em relação ao número de placas utilizadas.

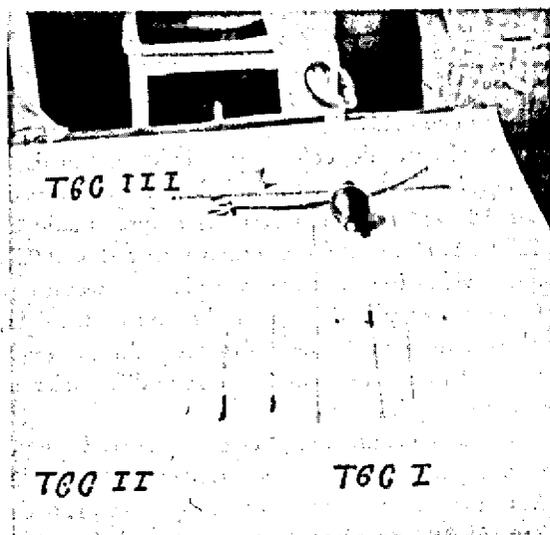


FIG. 1. (Técnica 1) pipeta de plástico de inseminação artificial acoplada a um bulbo de plástico; (Técnica 2) "swab" (algodão mais gaze) adaptada a uma pipeta de plástico de inseminação artificial; (Técnica 3) G.M. (Mello 1953).

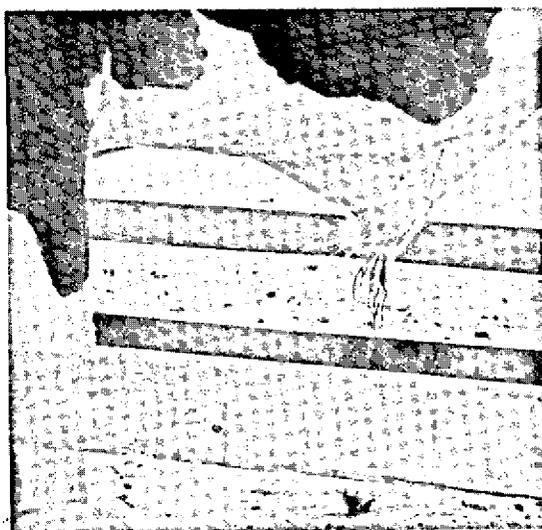


FIG. 3. (Técnica 1) aspiração das secreções após escarificação da face dorsal do pênis e mucosa prepucial adjacente.

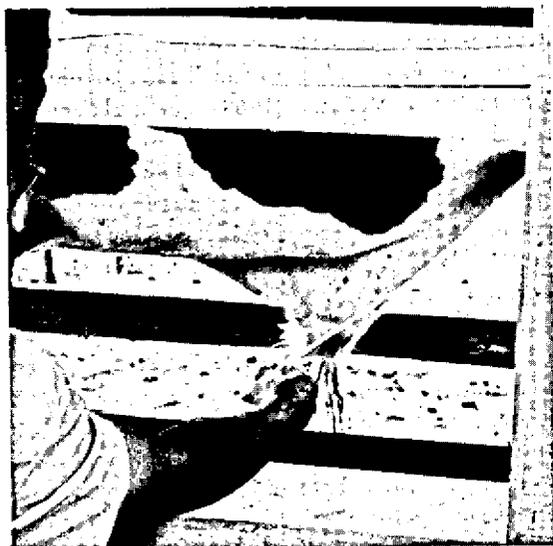


FIG. 2. (Técnica 1) aspiração das secreções após escarificação da face dorsal do pênis e mucosa prepucial adjacente.



FIG. 4. (Técnica 2) Fricção/esfregaço na cavidade prepucial.



FIG. 5. (Técnica 3) lavagem prepucial após introdução da sonda metálica do G.M. (Mello 1953) no saco prepucial.



FIG. 6. (Técnica 3) lavagem prepucial após introdução da sonda metálica do G.M. (Mello 1953) no saco prepucial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve dificuldades na coleta de amostras de material do fundo do saco prepucial de reprodutores bovinos sabidamente infectados, em

nenhuma das três técnicas de coleta utilizadas. Algumas poucas vezes a pipeta de plástico de inseminação artificial causou ligeira irritação ao nível da região explorada, sem, entretanto, prejudicar a amostra coletada.

O número de coletas positivas, nas quais o *Campylobacter fetus* foi isolado em uma ou mais das 18 seções de amostragem, é apresentado na Tabela 1. Houve diferença significativa ($P < 0,01$), que evidenciou a superioridade da técnica 1 (esmegma prepucial) sobre as duas outras técnicas, no tocante à média de isolamentos do *Campylobacter fetus*; as técnicas 2 e 3 não se diferenciaram quanto a esse aspecto.

O grau de contaminação e a freqüência de placas com contaminantes são mostrados na Tabela 2. A técnica 1 apresentou alta proporção (126 em 216, 58,3%) de placas com grau leve de contaminação, diferindo significativamente das outras duas ($P < 0,01$). Também foi observada diferença significativa entre a técnica 2 (60 em 216, 27,7%) e a técnica 3 (38 em 216, 17,6%) quanto à proporção do número de placas com grau leve de contaminação.

Com o emprego da técnica 1, o gérmen foi isolado em 22 de 36 coletas de amostras de seis reprodutores sabidamente infectados com *Campylobacter fetus*, enquanto com o uso das outras técnicas só se conseguiu o isolamento em 10 de 36 coletas. Estes dados são semelhantes aos obtidos por Dufty & McEntee (1969), que declaram que a coleta de amostras prepuciais de reprodutores bovinos para o diagnóstico bacteriológico da campylobacteriose com a pipeta de plástico de inseminação artificial é superior à coleta de amostras através da lavagem do prepúcio. Estes resultados corroboram, ainda, os de Clark et al. (1969), Fernandes et al. (1975) e Leite (1977), que, normalmente, utilizaram a técnica da pipeta de plástico de inseminação artificial, com pequenas adaptações de acoplamento para a obtenção de amostras de esmegma prepucial por aspiração, visando ao isolamento do gérmen. Entretanto, esses dados não concordam com os de Tedesco et al. (1977), que não acharam diferença significativa entre essas duas técnicas e afirmaram que a técnica da raspagem da mucosa peniana e das pregas prepuciais pelo instrumental de Sutka &

TABELA 1. Recuperação de amostras de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* de reprodutores bovinos comprovadamente infectados, utilizando-se três métodos de coleta de material.

| Identificação dos reprodutores utilizados | N.º total de coletas por animal | Técnica 1 Aspiração (pipeta de plástico) Esmegma prepucial | | | Técnica 2 Esfregão/fricção ("Swab") Muco prepucial | | | Técnica 3 Lavagem (G.M., Mello 1953) Lavado prepucial | | |
|---|---------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|--|--------------------------|--------------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| | | N.º de coletas (total) | N.º de coletas positivas | N.º de coletas negativas | N.º de coletas (total) | N.º de coletas positivas | N.º de coletas negativas | N.º de coletas (total) | N.º de coletas positivas | N.º de coletas negativas |
| 1 | 18 | 6 | 3 | 3 | 6 | 2 | 4 | 6 | 1 | 5 |
| 2 | 18 | 6 | 3 | 3 | 6 | 1 | 5 | 6 | 2 | 4 |
| 3 | 18 | 6 | 4 | 4 | 6 | 2 | 4 | 6 | 2 | 4 |
| 4 | 18 | 6 | 5 | 1 | 6 | 2 | 4 | 6 | 2 | 4 |
| 5 | 18 | 6 | 4 | 2 | 6 | 1 | 5 | 6 | 1 | 5 |
| 6 | 18 | 6 | 3 | 3 | 6 | 2 | 4 | 6 | 2 | 4 |
| Totais | 108 | 36 | 22a | 14 | 36 | 10b | 26 | 36 | 10b | 26 |

TABELA 2. Grau e frequência de contaminantes nas amostras de *Campylobacter fetus* sp. *fetus* obtidas de reprodutores bovinos comprovadamente infectados, utilizando-se três métodos de coleta de material.

| Técnicas | N.º total de placas | Contaminação leve ^a | | | Contaminação média ^b | | | Contaminação forte ^c | | | |
|----------|---------------------|--------------------------------|-----------------------|-----|---------------------------------|-----------------------|------|---------------------------------|-----------------------|----|------|
| | | N.º de placas | % Isolamentos obtidos | % | N.º de placas | % Isolamentos obtidos | % | N.º de placas | % Isolamentos obtidos | % | |
| 1 | 216 | 126 | 58,3a | 110 | 87,3 | 64 | 29,6 | 26 | 12,1 | 2 | 7,7 |
| 2 | 216 | 60 | 27,7b | 45 | 75,0 | 89 | 41,2 | 70 | 78,7 | 6 | 9,0 |
| 3 | 216 | 38 | 17,6c | 30 | 78,9 | 87 | 40,3 | 65 | 74,7 | 13 | 14,3 |

a Menos de 1/3 da área da placa.

b Entre 1/3 e 2/3 da área da placa.

c Mais de 2/3 da área da placa.

Katai (1969) era superior a ambas as técnicas, aspiração e lavagem, usadas anteriormente.

Quanto ao grau de contaminação das placas, a técnica 1 foi significativamente superior às outras duas técnicas, e a técnica 2, por sua vez, significativamente superior à técnica 3 (Tabela 2). As placas que apresentaram grau leve de contaminação foram as que propiciaram maior número de isolamentos do *Campylobacter fetus*. Assim, pela técnica 1, foram obtidos 110 isolamentos em 126 placas (87,3%); pela técnica 2, 45 isolamentos em 60 placas (75,0%); e pela técnica 3, 30 isolamentos em 38 placas (78,9%) com grau leve de contaminação, entre 216 placas trabalhadas para cada técnica. Isto vem confirmar os resultados de Dufty & McEntee (1969), que obtiveram pequena diferença quanto à eficiência no diagnóstico entre as técnicas de aspiração e de lavagem prepucial, visto que as amostras se apresentavam fortemente contaminadas, tornando quase impossível um diagnóstico efetivo. Porém, quando era realizado um controle adequado através de um meio de cultura seletivo, as amostras coletadas pela técnica da aspiração eram sempre mais eficientes do que as obtidas pela técnica da lavagem prepucial. Por outro lado, Tedesco et al. (1977) mostraram também que, quando o número de colônias contaminantes era reduzido, o número de colônias identificáveis de *Campylobacter fetus* era maior nas amostras obtidas pela técnica de aspiração do que nas amostras colhidas pela técnica da lavagem.

Também Dufty (1967) afirmou que indubitavelmente a contaminação bacteriana dificulta o diagnóstico da campilobacteriose em reprodutores bovinos, pois quando a contaminação está ausente ou é mínima, a eficiência do diagnóstico é elevada. Quando a contaminação ocupa mais de 2/3 da placa, o isolamento do *Campylobacter fetus* é sensivelmente prejudicado (Tabela 2).

Dufty & McEntee (1969) sugeriram duas condições para se obter sucesso no diagnóstico bacteriológico baseado em amostras prepuciais de reprodutores bovinos suspeitos de campylobacteriose: o método de coleta da amostra deve ser apropriado para detectar, em touros ao acaso, pequeno número de colônias de *Campylobacter fetus*, e o meio de cultura usado deve inibir o crescimento de organismos contaminantes sem atingir a viabilidade

do *Campylobacter fetus*. Nessas condições, Winter et al. (1965, 1967) mostraram que o fator mais importante para o isolamento do germen do prepúcio de reprodutores bovinos é o meio de cultura.

CONCLUSÕES

1. A técnica da aspiração para obtenção de esmegma prepucial, utilizando pipeta plástica de inseminação artificial acoplada a um bulbo, foi a que apresentou melhores resultados nesta investigação.

2. Por não apresentar qualquer desconforto ou efeitos secundários para os animais, e por ser simples e prática, pode-se recomendar preferencialmente às técnicas de fricção ou de lavagem prepucial, como eficiente método para a coleta de amostra prepucial de reprodutores bovinos suspeitos, quando se visar ao isolamento do *Campylobacter fetus*.

REFERÊNCIAS

- BARTLETT, D.E.; HASSON, E.V. & TEETER, K.G. Occurrence of *Trichomonas foetus* in preputial samples from infected bulls. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 110:114-20, 1947.
- CARROL, E.J. & HOERLEIN, A.B. Diagnosis and control of bovine genital vibriosis. *Am. J. Vet. Res.*, 161: 1359-69, 1972.
- CASTRO, A.F.P. de; GIORGI, W.; ROSA, C.A.S. & 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.*, 34(1):30-43, 1967.
- CASTRO, A.F.P. de; ROSA, C.A.S.; TROISE, C. & BERTHET, L.E.A. Vibriose bovina no Estado de S. Paulo; isolamento do vibrio em um feto bovino e de um touro. *Arq. Inst. Biol.*, 30:175-6, 1963.
- CLARK, B.L. Review of bovine vibriosis. *Aust. Vet. J.*, 47(3):103-7, 1971.
- CLARK, B.L.; DUFTY, J.H. & MONSBOURCH, M.J. Observations on isolation of *Vibrio fetus* (veneralis) from the vaginal mucus of experimentally infected heifers. *Aust. Vet. J.*, 45(5):209-11, 1969.
- DUFTY, J.H. Diagnosis of vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, 43:437, 1967.
- DUFTY, J.H. & MCENTEE, K. Evaluation of some culture media and sampling techniques for the diagnosis of vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, 45(4): 140-4, 1969.

- FERNANDES, J.C.T.; MOOGEN, V. & PALÁCIO, P.T. Isolamento do *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* sorótipo A de touros, no Rio Grande do Sul. Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. Rio G. Sul, 3(1): 7-12, 1975.
- FLORENT, A. Isolement d'un vibrion saprophyte du sperme du taureau et du vagin de la vache (*Vibrio bubulus*). CR Seances Soc. Biol. Paris, 147:2066-9, 1953.
- GIBSON, H.A.; DREHER, W.H. & ZEMJANIS, R. Simplified technique for collection of preputial samples from bulls for isolation of *Vibrio fetus*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 157:834-6, 1970.
- HUGHES, D.E. Notes on vibriosis, with special reference to the isolation of *Vibrio fetus* from semen and preputial fluids. Cornell Vet., 46(2):249-56, 1956.
- LEITE, R.C. Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo - benefício do controle da campilobacteriose bovina. Belo Horizonte, UFMG, 1977. 38p. Tese Mestrado.
- MELLO, M.R. Meio prático para diagnóstico da tricomonose bovina. B. Soc. Med. Vet., 21:11-9, 1953.
- MURNANE, D.; EALES, C.E. & MONSBOURGH, M.J. Vibriosis as a cause of infertility in selected dairy herds, and related studies. Aust. Vet. J., 5:234-41, 1959.
- PLASTRIDGE, W.N.; KOTHS, M.E. & WILLIAMS, L.F. Antibiotic mediums for the isolation of Vibrios from bull semen. Am. J. Vet. Res., 22:867-70, 1961.
- 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., 52(1): 110-21, 1962.
- RAMOS, A. de A.; GUIDA, H.G. & ANDRADE, V.L.B. Isolamento e tipificação de *Campylobacter fetus*, no Estado do Rio de Janeiro. Pesq. agropec. bras., Brasília, 18(5):551-6, maio 1983.
- SCHUTTE, A.P. Some aspects of *Vibrio fetus* infection in bulls. Meded. Veeartsenijch. Rijksuniv. Gent., 13(1): 87, 1969.
- SHEPLER, V.M.; PLUMER, G.J. & FARER, J.E. Isolation of *Vibrio fetus* from bovine preputial fluid using millipore filters and an antibiotic medium. Am. J. Vet. Res., 24(101):749-55, 1963.
- SMIBERT, R.M. *Genus II; Campylobacter* Sebald & Veron 1963. In: BUCHANAN, R.A. & GIBBONS, N.E. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974. p.207-14.
- SUTKA, P. & KATAI, P.L. Rapid demonstration of bull trichomoniasis in unstained smear preparations from preputial scraping. Acta Vet. Acad. Sci. Hung., 19(4): 385, 1969.
- TEDESCO, L.F.; ERRICO, F. & DEL BAGLIVI, L.P. Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. Aust. Vet. J., 53:470-2, 1977.
- WINTER, A.J.; BURDA, K. & DUNN, H.O. An evaluation of cultural technics for the detection of *Vibrio fetus* in bovine semen. Cornell Vet., 55(3):431-44, 1965.
- WINTER, A.J.; SAMUELSON, J.D. & ELKAWA, M.A. Comparison of immunofluorescence and cultural technique for demonstration of *Vibrio fetus*. J. Am. Vet. Med. Assoc., 150:499-502, 1967.