

# ISOLAMENTO E TIPIFICAÇÃO DE *CAMPYLOBACTER FETUS*, NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO<sup>1</sup>

AUVANIR DE ALMEIDA RAMOS, HÉLIO GUSTAVO GUIDA<sup>2</sup> e  
VANIA LUCIA BAETA ANDRADE<sup>3</sup>

RESUMO - No período de 1972 a 1978 isolaram-se e tipificaram-se quatorze amostras de *Campylobacter fetus* (*Vibrio fetus*), a partir de esmegma, lavado prepucial, sêmen, muco vaginal e conteúdo estomacal de fetos abortados, de bovinos com problemas de reprodução. As amostras isoladas foram identificadas como *Campylobacter fetus* subespécies *fetus* e *intestinalis*.

Termos para indexação: campilobacteriose, *vibrio fetus*, sêmen, muco vaginal, fetos abortados.

## ISOLATION AND TYPIFICATION OF *CAMPYLOBACTER FETUS* IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL

ABSTRACT - From 1972 to 1978, 14 strains of *Campylobacter fetus* (*Vibrio fetus*) were isolated and typified, starting from a part of smegma, preputial washing, semen, vaginal mucus, stomach content of aborted fetuses of bovines with reproduction problems. The isolated samples strains were identified as *Campylobacter fetus*, subspecies *fetus* and *intestinales*.

Index terms: campylobacteriosis, *vibrio fetus*, semen, vaginal mucus, aborted fetuses.

## INTRODUÇÃO

Desde as primeiras observações da campilobacteriose bovina, descrita na Inglaterra (Mcfadyean & Stockman, em 1909, e Smith, em 1918) citados por Plastring et al. 1951, vários autores têm relatado a ocorrência da doença, responsabilizando o *Campylobacter fetus* como agente causal de aborto e de infertilidade no gado bovino. Assim Smith & Taylor (1919) estudaram o microrganismo responsável pela doença em seus caracteres morfológicos, culturais e sorológicos. O próprio Smith (1923) estabeleceu que a campilobacteriose era essencialmente uma moléstia que atingia as membranas fetais, ocasionando a morte e expulsão do feto. Bryner e Frank (1955) descreveram as técnicas para o isolamento do *Campylobacter fetus* e Kuzdas & Morse (1956) definiram as características fisiológicas desse germe.

No Brasil, Apice (1956), em São Paulo, isolou, pela primeira vez, o *Campylobacter fetus* do conteúdo estomacal de um feto abortado. Guida et al. (1959) no Estado do Rio de Janeiro, apresentaram um amplo estudo da doença, utilizando a pro-

va de mucoaglutinação lenta como veículo de diagnóstico. Mies Filho (1960, 1963), no Rio Grande do Sul, encontrou 84 reagentes entre 311 animais examinados; demonstrou também os efeitos da campilobacteriose em um rebanho leiteiro do município de São Leopoldo, estudando a patogenia do *Campylobacter fetus* var. *venerealis*, com base na prova de mucoaglutinação lenta.

Em 1963 no Estado de São Paulo, foi isolado o *Campylobacter fetus* de um feto bovino e de um touro; em 1967 foram isoladas novas amostras e, em 1971 foi apresentado um amplo estudo sobre aglutininas anti-*Campylobacter fetus* (Castro et al. 1963, 1967 e 1971). Giorgi et al. (1971), em São Paulo, tipificaram o *Campylobacter fetus* isolado de bovinos. Medeiros & Figueiredo (1971) efetuaram o estudo dessa doença no Estado de Minas Gerais. Fernandes et al. (1975), no Rio Grande do Sul, isolaram o *Campylobacter fetus* a partir do esmegma de dois touros e Cohn (1976), no Estado do Rio de Janeiro, apresentou substancial estudo referente a alguns aspectos culturais do microrganismo. Costa (1976), na Bahia, realizou uma pesquisa de aglutininas anti-*Campylobacter fetus* no muco vaginal de bovinos, utilizando a prova de mucoaglutinação lenta, Ramos & Guida (1978) apresentaram amplo e circunstanciado estudo referente a aglutininas anti-*Campylobacter fetus* em mucos vaginais de bovinos, no Estado do Rio

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 24 de maio de 1983.

<sup>2</sup> Méd. - Vet., M.Sc. Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, EMBRAPA, estrada Rio-São Paulo, km 47, CEP 23460, Seropédica, RJ.

<sup>3</sup> Méd. - Vet., EMBRAPA, Seropédica, RJ.

de Janeiro, empregando a técnica de mucoaglutinação lenta para o diagnóstico da doença e utilizando 4.092 mucos vaginais de bovinos, provenientes de 251 propriedades agropastoris, localizadas em 39 municípios de 13 microrregiões homogêneas do estado.

Apesar desses estudos, ainda são escassos os conhecimentos a respeito da frequência da campilobacteriose em nossos rebanhos bovinos, e dos reais prejuízos que acarreta. O propósito deste trabalho é divulgar os tipos do gênero *Campylobacter* isolados no Estado do Rio de Janeiro, sua distribuição e as manifestações clínicas relacionadas com os isolamentos.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 201 amostras de materiais para exames, compreendendo esmegma, lavado prepucial, sêmen e muco vaginal de bovinos adultos e conteúdo estomacal de feto abortado, colhidos no período de 1972 a 1978, provenientes de 56 animais, de 52 propriedades agropastoris, localizadas em doze municípios do Estado do Rio de Janeiro.

O esmegma foi coletado com o auxílio de pipeta de plástico de inseminação artificial acoplada a um bulbo de plástico, com o qual se fez a aspiração após a escarificação da glândula e do revestimento prepucial. Após a coleta, o material da pipeta foi transferido, o mais estéril possível, para tubos com caldo simples e conservado à temperatura de 4°C até chegar ao laboratório.

Para a coleta da secreção prepucial foi empregado o aparelho G.M. (Mello 1953), devidamente esterilizado, contendo 60 ml de caldo simples estéril que eram introduzidos no saco prepucial. Depois de fechar o óstio prepucial com uma pinça de copróstase, realizou-se vigorosa massagem, desde a glândula até o fundo do saco prepucial, para desalojar os germes das criptas da pele prepucial. O material foi recolhido no erlenmeyer do G.M. e conservado à temperatura de 4°C.

O sêmen foi coletado em vagina artificial, com tubo flexível de borracha e copo coletor estéreis, observando-se os cuidados de higienização do doador e do manequim. Entretanto, muitas amostras foram obtidas através da massagem manual, via reto, de próstata, ampolas e vesículas seminais, com os mesmos cuidados de higienização e assepsia.

Os mucos vaginais foram obtidos pelo aparelho de Frank ou através de tampões vaginais ou mesmo diretamente do fundo do saco vaginal, utilizando-se pipeta de plástico de inseminação artificial ou tubos de vidro com pequena espessura adrede preparados, aplicados com o auxílio do espéculo tubular. A amostra colhida era distribuída em veículo diluidor (caldo simples) de preferência, refrigerada e remetida ao laboratório. Os fetos abortados

eram devidamente registrados e trabalhados o mais assepticamente possível, com leitura direta do conteúdo estomacal em microscópio de campo escuro e em contraste de fase, utilizando-se o aumento de 400 x, procurando-se estudar a morfologia e a motilidade do material colhido.

Após o recebimento e registro do material, fazia-se a centrifugação em duas velocidades 4.000 rpm - 10' e 4 a 10.000 rpm - 40', algumas vezes, a filtração através de filtro Millipore, com poros de 0,65 µm, e sementeira em placas de caldo de coração e cérebro + ágar + antibióticos + inibidor de preferência. O material semeado em meio sólido era colocado em jarra de anaerobiose com atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>, 85% de N<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> e incubado a 37°C por 96 horas. As colônias suspeitas eram isoladas e observadas com iluminação especial, estudando-se a morfologia através de coloração simples com cristal violeta, após fixação branda pelo calor; a motilidade era constatada por microscopia em campo escuro e contraste de fase.

As amostras eram repicadas em caldo semi-sólido de tiol e incubadas a 37°C, em 10% de CO<sub>2</sub>, durante três dias, efetuando-se, a partir desse meio, as provas bioquímicas que constaram dos testes de produção de catalase, produção de H<sub>2</sub>S (inclusive a prova de pouca sensibilidade), produção de oxidase, tolerância à glicina a 1%, tolerância ao NaCl 3,5%, redução de nitrato a nitrito, crescimento em profundidade e crescimento a 28, 37 e 42°C.

Em todos os rebanhos participantes, procurou-se fazer um levantamento dos sintomas visando, sobretudo, aqueles animais que apresentassem indícios de sinais de campilobacteriose, uma vez que tais dados relacionariam os estudos desenvolvidos com os da pesquisa de aglutininas anti-*Campylobacter fetus* em mucos vaginais de bovinos no Estado do Rio de Janeiro (Ramos & Guida 1978).

Exames complementares de leptospirose, brucelose, tricomonose e tuberculose foram feitos em todos os animais utilizados neste trabalho, tendo-se em vista a importância dessas afecções como causa de baixa fertilidade e aborto, e principalmente, para confirmação dos achados.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 201 exames realizados em 56 animais, isolaram-se e tipificaram-se bioquimicamente quatorze amostras.

As colônias desenvolvidas apresentaram formas regulares, de cor branco-acinzentada. A coloração simples, em lâmina, com cristal violeta, revelou formas em vírgula e formas espiraladas. Estas, ao exame em microscópio de campo escuro e contraste de fase, apresentaram-se extremamente móveis. As subespécies encontradas por município, a origem dos isolados, os sintomas relacionados com a afecção, bem como sua classificação bioquí-

mica, estão sumarizados e evidenciados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Os resultados indicaram que o *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* parece predominar no Estado do Rio de Janeiro, fato este que concorda com os dados descritos por Mies Filho (1960, 1963) e Fernandes et al. (1975) no Rio Grande do Sul, e por Castro et al. (1963) e Giorgi et al. (1971) em S. Paulo.

Consideram-se de grande interesse o conhecimento dos tipos atuantes e seu comportamento antigênico, como base para o desenvolvimento de uma vacina, já que é possível existirem diferenças imunológicas entre *Campylobacter fetus* subsp.

*fetus e intestinalis* e inclusive entre cepas, uma vez que existe uma gama de antígenos e que o estudo destes não é completo. Assim, Hoerlein & Carroll (1970), nos Estados Unidos, e Clark (1969, 1970) e Clark et al. (1974), na Austrália, têm realizado, com êxito, diversos ensaios de vacinação, afirmando que uma vacina preparada com o tipo genital protegerá contra o tipo intestinal, muito embora existam diferenças imunológicas entre sorotipos do *Campylobacter fetus*.

O *Campylobacter fetus* subsp. *intestinalis* (Florent) também foi isolado uma única vez, e a cepa estava relacionada com aborto, visto que foi

TABELA 1. Exames bacteriológicos em esmegma, lavado prepucial, sêmen, muco vaginal e fetos, para isolamento do *Campylobacter fetus*, em bovinos no Estado do Rio de Janeiro.

Ano	Nº de animais examinados	Nº de exames	Propriedades visitadas	Propriedade c/isolamento do <i>C. fetus</i>	Origem do material examinado e isolado			
					Esmegma			
					Nº de animais examinados	Nº de exames	Propriedades visitadas	Propriedade c/isolamento
1972	5	20	5	1	-	-	-	-
1973	11	30	11	5	5	15	5	4
1974	10	50	10	2	5	30	5	2
1975	10	43	10	1	4	20	4	1
1976	10	30	6	2	4	8	2	1
1977	5	18	5	2	2	5	2	2
1978	5	10	5	1	5	10	5	1
Totais	56	201	52	14	25	88	23	11

  

Ano	Nº de animais examinados	Nº de exames	Propriedades visitadas	Propriedades c/isolamento	Origem do material examinado e isolado			
					Lavado prepucial		Sêmen	
					Nº de animais examinados	Nº de exames	Propriedades visitadas	Propriedades c/isolamento
1972	3	10	3	1	1	3	1	
1973	3	8	3	0	1	3	1	0
1974	3	10	3	0	1	5	1	0
1975	3	10	3	0	1	5	1	0
1976	2	7	1	0	1	3	1	1
1977	1	5	1	0	1	3	1	0
1978	0	0	0	0	0	0	0	0
Totais	15	50	14	1	6	22	6	1

TABELA 1. Continuação.

Origem do material examinado e isolado								
Ano	Muco vaginal				Fetos abortados			
	Nº de animais examinados	Nº de exames	Propriedades visitadas	Propriedades c/isolamento	Nº de animais examinados	Nº de exames	Propriedades visitadas	Propriedades c/isolamento
1972	1	7	1	-	-	-	-	-
1973	1	2	1	0	1	2	1	1
1974	1	5	1	0	-	-	-	-
1975	1	5	1	0	1	3	1	0
1976	2	10	1	0	1	2	1	0
1977	1	5	1	0	-	-	-	-
1978	0	0	0	0	0	0	0	0
Totais	7	34	6	0	3	7	3	1

TABELA 2. Amostras de *Campylobacter* spp. isoladas de bovinos no Estado do Rio de Janeiro, por município, e respectiva tipificação bioquímica (Bryner & Frank) 1955.

Tipos	Nº de amostras, por município							Totais
	Itaguaí	Rio de Janeiro	Trajano de Moraes	Campos	Miracema	Nova Friburgo	S. Antônio de Pádua	
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	1	5	1	1	3	1	1	13
<i>C. fetus</i> subsp. <i>intestinalis</i>		1						1
Totais	1	6	1	1	3	1	1	14

TABELA 3. Comportamento nas provas bioquímicas, localização e patogenicidade das amostras de *Campylobacter fetus* isoladas no Estado do Rio de Janeiro (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) oitava edição. (Buchaman & Gibbons).

Testes	<i>C. fetus</i> subsp. ( <i>fetus</i> ) (venerealis Florent)	<i>C. fetus</i> subsp. <i>intestinalis</i> <i>V. fetus</i> var. <i>intestinalis</i> (Florent) 1959 <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> (Veron & Chatelain) 1973
	Produção de catalase	+
Bile 1%	+	-
Produção de H <sub>2</sub> S em 24 horas	-	-
Produção de H <sub>2</sub> S em 5 dias (meio sensível)	-	+
Tolerância à glicina 1%	-	+
Tolerância a NaCl, 3,5%	-	-
Redução de nitrato/nitrito	+	-
Produção de oxidase	+	-
Crescimento de profundidade	-	+
Crescimento a 28°C	+	+
Crescimento a 37°C	+	+
Crescimento a 42°C	-	+
Localização hábitat	Trato genital	Trato genital e intestinal
Patogenicidade	Infertilidade e aborto	Aborto

isolado diretamente do conteúdo estomacal do feto abortado.

As amostras de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* isoladas foram catalase-positivas e não produziram gás sulfídrico, sendo consideradas como espécie *fetus* em vista de sua associação com a infertilidade, da morfologia e do crescimento característico, de acordo com Bryner & Frank (1955). Outra característica que veio confirmar a patogenicidade das amostras isoladas foi o não crescimento em presença de cloreto de sódio a 3,5% e de glicina a 1%, de acordo com Kuzdas & Morse (1956).

Deve-se admitir que os resultados obtidos não constituem fiel imagem da realidade do Estado do Rio de Janeiro, e que eles estão sujeitos a modificações, em virtude de ter sido pequena a amostragem bem como a quantidade das cepas isoladas.

#### CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Pela combinação dos resultados da morfologia colonial e bacteriana, pelo desempenho nas provas bioquímicas e pelos dados clínicos colhidos, pode-se concluir que as amostras isoladas eram *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *intestinalis*, (Florent) parecendo predominar, no Estado do Rio de Janeiro, o *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* sobre as demais subespécies de *Campylobacter*.

Considera-se de interesse a tipificação das cepas de *Campylobacter fetus* isoladas, assim como seu estudo antigênico, para futuros estudos imunológicos, tendo em vista a elaboração de vacinas com amostras de *Campylobacter fetus* autóctones.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos os funcionários do Setor de Patologia da Reprodução da EMBRAPA, Itaguaí, Rio de Janeiro, que de uma forma ou de outra contribuíram para o bom êxito deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS

- APICE, M.d'. Ocorrência do aborto no Estado de São Paulo devido ao *Vibrio fetus*. O Biológico, São Paulo, 22(1):15-8, 1956.
- BRYNER, J.H. & FRANK, A.H. Laboratory techniques for isolation and propagation of *Vibrio fetus* from cattle. Am. J. Vet. Res., 16(61):634-5, 1955.
- CASTRO, A.F.P. de; GIORGI, W.; AOKI, D. & HENRIQUES, J. Pesquisa de aglutininas anti-*Vibrio fetus* em mucos vaginais de rebanhos bovinos dos Estados de S. Paulo, Minas Gerais e Paraná. O Biológico, São Paulo, 37:115-8, 1971.
- 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., S. Paulo, 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 São Paulo. Isolamento do *Vibrio* em um feto bovino e de um touro. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 30:175-6, 1963.
- CLARK, B.L. The occurrence of *Vibrio fetus* (intestinalis) in Australian cattle. Aust. Vet. J., 45:137-9, 1969.
- CLARK, B.L. Vaccination of heifers with *Vibrio fetus* (intestinalis) against infection with *Vibrio fetus* (genital type) J. Comp. Path., 80:47-52, 1970.
- CLARK, B.L.; DUFTY, J.H.; MONSBOURGH, M.J. & PARSONSON, J.H. Immunization against bovine vibrioses vaccination of bulls against infection with *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Aust. Vet. J., 50:407-9, 1974.
- COHN, E.C. Alguns aspectos culturais do *Campylobacter fetus*. Rio de Janeiro, UFRRJ, 1976. 44p. Mimeografado.
- COSTA, E.A. Vibriose bovina no Estado da Bahia. I. Pesquisa de aglutininas anti-*Campylobacter fetus* no muco vaginal. B. Inst. Biol., Bahia, 15(1):14-8, 1976.
- FERNANDES, J.C.T.; MOOGEN, V. & PALÁCIO, P.T. Isolamento do *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* sorotipo A de touros, no Rio Grande do Sul. Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. Rio G. Sul, Porto Alegre, 3(1):7-12, 1975.
- GIORGI, W.; CASTRO, A.F.P. de & OLIVEIRA JUNIOR, B.S. Typification of *Vibrio fetus* isolated from bovine in the State of S. Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 38(1):31-6, 1971.
- GUIDA, H.G.; MEDEIROS, P.M. & PIZELLI, G.N. Relatório. Rio de Janeiro, s.ed., 1959. (Projeto Experimental Nº 5.215/58). Relatório apresentado ao Conselho Nacional de Pesquisa.
- HOERLEIN, A.B. & CARROLL, J.E. Duration of immunity of bovine genital vibriose. J. Am. Vet. Med. Ass., 156:1775-8, 1970.
- KUZDAS, C.D. & MORSE, E.V. Physiological characteristics differentiating *Vibrio fetus* and other vibriose. Am. J. Vet. Res., 17:331-6, 1956.
- MEDEIROS, P.M. & FIGUEIREDO, J.B. Vibriose bovina no Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais, Belo Horizonte, 23:138-41, 1971.

- MELLO, M.R. Meio prático para diagnóstico da tricomonose bovina. B. Soc. Med. Vet. Rio de Janeiro, 21: 11-9, 1953.
- MIES FILHO, A. Incidência da vibriose bovina em alguns rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul. R. Fac. Agron. Vet. Univ. Fed. Rio G. Sul, Porto Alegre, 3:195-9, 1960.
- MIES FILHO, A. Vibriose bovina. Evolução de um foco no Rio Grande do Sul. R. Fac. Agron. Vet. Univ. Fed. Rio G. Sul, Porto Alegre, 6:73-83, 1963.
- PLASTRIDGE, W.N. WILLIAMS, L.F.; EASTERBROOKS, H.L. WALKER, E.C. & BECCIA, R.N. Vibriosis in cattle. Stors. Agric. Exp. Sta Bull, Connecticut, 281:5-54, 1951.
- RAMOS, A.A. & GUIDA, H.G. Aglutininas anti-*Campylobacter fetus* em mucos vaginais de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. R. bras. Reprod. anim., 2(3): 7-15, 1978.
- SMITH, T. Further studies on the etiological significance of *Vibrio fetus*. J. Exp. Med., 37:341-6, 1923.
- SMITH, T. & TAYLOR, M.S. Some morphological and biological characters of the Spirilla (*Vibrio fetus* N. sp.) associated with disease of fetal membranes in cattle. J. Exp. Med., 30:299-311, 1919.