

Campylobacter fetus em bovinos no estado do Rio Grande do Sul

Campylobacter fetus in cattle from Rio Grande do Sul state, Brazil

Rosângela Estel Ziech^I Gustavo Machado^I Jackeline Karsten Kirinus^I Felipe Libardoni^I
Julcemar Dias Kessler^{II} Luciana Pötter^{III} Agueda Castagna de Vargas^{I*}

RESUMO

A campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma doença infectocontagiosa causada por *Campylobacter fetus*, determina infertilidade temporária, endometrite leve e aborto em fêmeas, além de aumentar o intervalo entre partos. A ocorrência de CGB entre rebanhos no Brasil tem variado muito entre as diferentes regiões. Com isso, o objetivo deste trabalho foi identificar, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), a ocorrência de amostras positivas para *C. fetus*, oriundas de bovinos, no período de 1999 a 2010, no Rio Grande do Sul, e analisar a positividade em machos e fêmeas. Foram utilizadas 816 amostras procedentes de 37 municípios, localizados predominantemente nas mesorregiões sudoeste e centro ocidental rio-grandense, das quais 480 aspirados prepuciais (92 provenientes de duas centrais de inseminação artificial e 388 de estabelecimentos de criação - monta natural), 324 aspirados cervicais e conteúdo abomasal de 12 fetos bovinos abortados. Como resultado, 10,9% das amostras (89/816) foram positivas para *C. fetus*. Quando analisados os resultados em relação à origem das amostras, 6,5% (6/92) das coletadas de machos de centrais de inseminação foram positivas, e das obtidas de touros utilizados em monta natural, 9% (35/388). Já entre as fêmeas, esse percentual foi de 13,6% (44/324) e, nas amostras obtidas de fetos abortados, 33,3% (4/12) foram positivas. Quando analisados os 91 estabelecimentos de criação com monta natural e os 37 municípios, foram positivos 44,0% (40/91) e 63,2% (24/37), respectivamente. Com isso, foi demonstrada a importância da CGB para os rebanhos bovinos, e uma maior ocorrência de amostras positivas em fêmeas, quando comparadas às amostras provenientes de machos.

Palavras-chave: doença venérea, campilobacteriose genital bovina, diagnóstico, frequência.

ABSTRACT

Bovine genital campylobacteriosis (BGC) is an infectious disease caused by *Campylobacter fetus*, which

determines temporary infertility, mild endometritis, miscarriage in females and also increases the calving interval. The occurrence of BGC in the Brazilian herds has varied widely among regions. The aim of this study was to identify by polymerase chain reaction (PCR) the occurrence of *C. fetus* in bovines from Rio Grande do Sul (RS), Brazil using samples collected from 1999 to 2010. A total of 816 samples from 37 counties localized predominantly in the Southwest and Central Western regions of the RS state were analyzed. Four hundred eighty preputial aspirated samples (92 from artificial insemination centers and 388 from farms that use natural mating) and 324 cervical aspirates and abomasal contents of 12 aborted fetuses were analyzed. As result, 10.9% (89/816) were positive for *C. fetus*. When the results were analyzed in relation to its origin, 6.5% (6/92) of the males samples from insemination centers were positive, and the ones from natural mating 9% (35/388) were positives. For the females, this percentage was 13.6% (44/324) of positivity, and the samples from the aborted fetuses 33.3% (4/12) were positive. When the 91 farms that used natural mating and the 37 counties were analyzed, it showed a positivity rate of 44.0% (40/91) and 63.2% (24/37), respectively. This study shows the importance of BGC for bovine herds, and a larger occurrence of positive samples among females when compared to male.

Key words: venereal disease, bovine genital campylobacteriosis, diagnosis.

INTRODUÇÃO

A campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma enfermidade infecciosa de transmissão venérea, causada por *Campylobacter fetus*, subespécie *venerealis* e, ocasionalmente, por *Campylobacter fetus* subespécie *fetus*. Essa bactéria foi preliminarmente denominada de "*Vibrio fetus*" e,

^ILaboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: agueda.vargas@gmail.com.

*Autor para correspondência.

^{II}Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Programa de Pós-graduação em Zootecnia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

após estudos taxonômicos, passou a ser denominada de *Campylobacter fetus* (SMIBERT, 1978). Desde então, as duas subespécies foram descritas, ambas relacionadas à infertilidade sexualmente transmissível em bovinos e ovinos, e também a abortos esporádicos em vacas e ovelhas, responsável por prejuízos econômicos (SKIRROW, 1994; CALDOW & TAYLOR, 1997; CAMPERO et al., 2005; GRESSLER et al., 2012). A infecção geralmente ocasiona doença subclínica, resultando em aumento no intervalo entre partos, que, muitas vezes, passa despercebida na maioria dos estabelecimentos de criação.

A CGB é uma doença de distribuição mundial. Na década de 1970, já havia sido registrada nos rebanhos bovinos em 41% dos 168 países informantes da WHO-OIE (STOESSEL, 1982). *C. fetus* subsp. *venerealis* localiza-se no trato genital de bovinos infectados e sua transmissão ocorre do macho para a fêmea, e vice versa, principalmente pela monta natural. Os machos são portadores assintomáticos permanentes, responsáveis pela disseminação da bactéria nos rebanhos e a infecção é limitada ao prepúcio (GARCIA et al., 1983; DEKEYSER, 1984), por isso não adquirem imunidade ao patógeno (SKIRROW & BON DURANT, 1988). Isso ocorre devido a variações antigênicas que a bactéria sofre no curso de infecção, não ter um caráter invasivo nos machos e portanto não induz grande produção de anticorpos.

A transmissão do *C. fetus* subsp. *venerealis* de touros infectados para fêmeas pode variar de 50 a 100% e a infertilidade é observada pela repetição de cio, que atinge mais comumente novilhas e vacas jovens, devido à falta de imunidade. O aborto pode ocorrer em torno do quinto mês de gestação, porém menos de 10% das fêmeas infectadas abortam (NEWSAN, 1960; GARCIA & BROOKS, 1993) e a taxa de prenhez em fêmeas de rebanhos infectados pode chegar a 20% (NEWSAN, 1960).

Dados obtidos sobre a ocorrência de animais infectados no Brasil variam de 35,9% até 66,9% (GENOVEZ et al., 1986; MIRANDA, 2005; ALVES et al., 2011). No Rio Grande do Sul, MIES FILHO (1960) detectou 27% de animais portadores pela técnica de muco-aglutinação em levantamento epidemiológico de rebanhos leiteiros, e este é o único autor citado na atualização de ALVES et al. (2011), o que evidencia a escassez de dados sobre a enfermidade neste estado.

O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência da CGB em estabelecimentos de criação de bovinos em 37 municípios do Rio Grande do Sul, aplicando a técnica de PCR em 816 amostras obtidas de machos e fêmeas no período de 1999 a 2010.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

No período de 1999 a 2010 foram analisadas 816 amostras (480 aspirados prepuciais de touros, dos quais 92 provenientes de centrais de inseminação artificial e 388 de estabelecimentos de criação com monta natural, 324 aspirados de muco cervical e 12 aspirados de conteúdo abomasal de fetos bovinos abortados). As amostras eram procedentes de 37 municípios do Rio Grande do Sul, 91 estabelecimentos de criação com monta natural com suspeita de CGB e de duas centrais de IA. A coleta das amostras de machos e fêmeas foi realizada por aspirado prepucial e cervical, utilizando bairrada de inseminação artificial (IA) IMV (Instruments de Médecine Vétérinaire Technologies®) francesa estéril, conectada em seringa de 20 a 60mL, e nos fetos abortados nessa coleta foi efetuada com auxílio de agulha e seringa estéril de 60mL. As amostras foram acondicionadas em meio de transporte e enriquecimento (TEM) (LANDER, 1990) e remetidos em até 48 horas após a colheita em temperatura ambiente ao laboratório, onde foram incubadas a 37°C durante cinco dias, para posterior extração de DNA e PCR, de acordo com GROFF et al. (2010).

Extração de DNA e PCR

A PCR foi realizada a partir do DNA extraído do TEM, após prévia incubação a 37°C por cinco dias. As condições para a extração e amplificação de DNA seguiram as descrições de HUM et al. (1997), com modificações realizadas por VARGAS et al. (2003) e GROFF et al. (2010). Os primers utilizados foram espécie específicos, MG3F (5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3') e MG4R (5'-TAGCTACAATAACGACAAC-3') com um amplicon de 750 pb (GROFF et al., 2010). Os produtos de amplificação da técnica de PCR foram verificados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta.

Análise estatística

Para análise estatística, os dados foram submetidos ao teste exato de Fisher para efeito de comparação entre sexo (macho e fêmea), e entre machos de central de inseminação artificial e monta natural positivos, com probabilidade de 5%. (SAS, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mesmo que os problemas reprodutivos em bovinos sejam multifatoriais, a campilobacteriose

genital bovina tem papel importante nesses distúrbios, ocasionando aborto, aumento do intervalo entre partos e infertilidade em fêmeas (DEKEYSER, 1984; ALVES et al., 2011). Em nosso estudo, utilizando a PCR espécie específica para *C. fetus*, foi verificada positividade em 10,9% (89/816) das amostras, oriundas de 37 municípios da unidade federativa. Esses dados são comparáveis aos obtidos por GOMES et al. (1997), que relatam 104 (9,8%) amostras positivas para *C. fetus* de um total de 1053 culturas microbiológicas de esmegma, placenta, secreção vaginal e fetos abortados de rebanhos bovinos provenientes de 24 municípios do Rio Grande do Sul.

Neste trabalho, demonstramos 9% (35/388) de animais positivos à *C. fetus* em amostras de machos, provenientes de estabelecimentos que realizam monta natural, e 6,5% (6/92) em amostras de centrais de IA ($P < 0,05$). No entanto, em um estudo realizado no estado de São Paulo, GENOVEZ (1997) demonstrou 23,9% de touros portadores de *C. fetus* por meio de isolamento bacteriano, o que pode ser justificado pela diferença entre as populações estudadas, bem como as técnicas utilizadas. Esses resultados comprovam o envolvimento dessa bactéria com os problemas reprodutivos em rebanhos no Brasil.

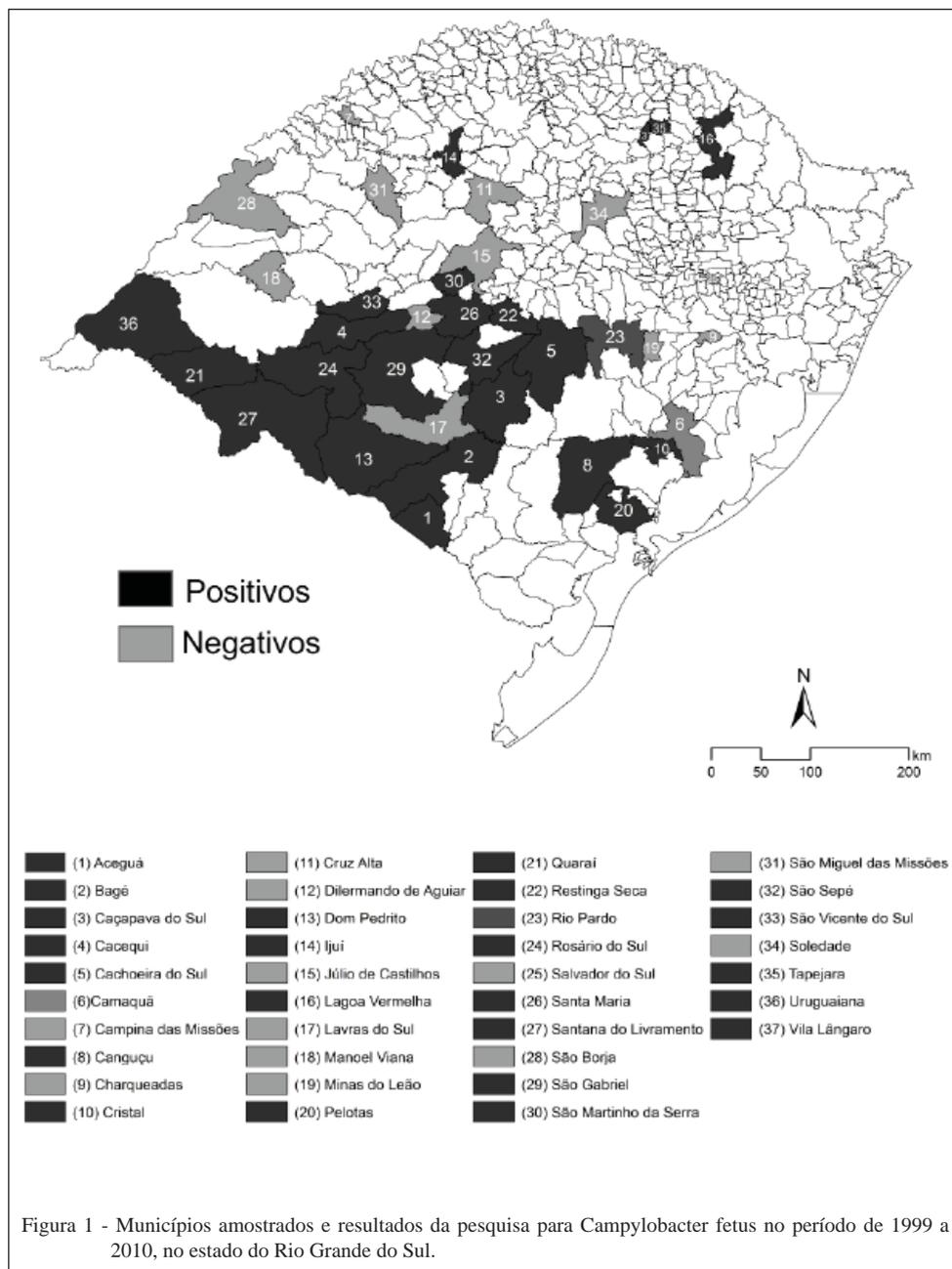
Com relação aos estabelecimentos de criação analisados, foram positivos 44,0% (40/91), determinando uma alta ocorrência da CGB, especialmente nas mesorregiões sudoeste e centro ocidental do Rio Grande do Sul (Figura 1). Esse resultado aproxima-se aos índices de ocorrência da CGB encontrados em Minas Gerais por LAGE et al. (1997), que realizaram 942 diagnósticos de CGB no período de 1976 a 1996, através da técnica de imunofluorescência direta (IFD), no qual identificaram 27,92% das amostras positivas, que eram provenientes de 50,88% dos 114 estabelecimentos de criação amostrados. Também em Minas Gerais, no município de Varginha, a ocorrência de CGB em nove estabelecimentos leiteiros foi de 100% e, em média, cerca de 25% dos animais de cada estabelecimento apresentavam a infecção (STYNEN et al., 2000). De acordo com os resultados deste estudo, e com ênfase ao número de amostras utilizadas, fica demonstrada a importância da CGB para os rebanhos bovinos.

A identificação de 9% de positividade ao *C. fetus* em amostras oriundas de machos em estabelecimentos com monta natural e 6,5% de amostras de touros coletadas em centrais de IA, comprova o risco de transmissão da CGB. Entretanto, ao realizar cultura única, método de diagnóstico indicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (BRASIL, 2003), estes animais foram negativos para *C. fetus* (Dados não publicados). Usualmente, antes de um touro ingressar em uma "Central de IA", são realizadas três amostragens do prepúcio para investigação de *C. fetus* pelo método de cultura e, após, são realizados testes semestrais (EAGLESOME & GARCIA, 1992). Os resultados obtidos vêm ao encontro das recomendações do Código Zoonosológico Internacional da Organização Internacional para a Saúde Animal, de que o sêmen destinado à comercialização deve ser tratado com antimicrobianos (BRASIL, 2003), e isso reduziu a transmissão durante a IA. Ao analisarmos a figura 1, verificamos uma maior concentração de amostras positivas, ao *C. fetus*, na mesorregião do sudoeste rio-grandense, o que pode ser atribuído aos tipos de rebanhos amostrados, em que predomina a exploração de gado de corte que utilizam monta natural, além das amostras serem predominantemente desta região.

Isoladamente, 33,3% (4/12) das amostras coletadas de fetos abortados também foram positivas, demonstrando também a presença desse agente nas causas de aborto. Porém, de acordo com as características epidemiológicas e dados descritos na literatura, para o diagnóstico de CGB em rebanhos suspeitos, é preconizada a coleta de esmegma ou lavado prepucial (ALVES et al., 2011). Isso é justificado, pois, além de representar um número reduzido em relação à população de vacas (diminui os custos com diagnóstico), os machos entram em contato com grande número de fêmeas durante o período reprodutivo, transmitindo *C. fetus* (LAGE & LEITE, 2000) e mantêm a infecção por maior tempo, pela baixa estimulação imunológica em nível de mucosa prepucial. Somado a isso, IRONS et al. (2004) afirmam que a probabilidade de obter amostras positivas de machos é maior do que de fêmeas. Entretanto, deve-se observar a técnica de coleta e diagnóstico empregadas. Ressalta-se que coletas eficientes nos machos são mais laboriosas, em decorrência da dificuldade em aspirar conteúdo prepucial, da obtenção de pouca quantidade de amostra, somado ao risco de acidentes, devido ao temperamento sanguíneo de alguns machos.

Embora a maior amostragem de animais utilizados neste estudo serem oriundas de machos (59,0%), foi observado que o maior percentual de positividade deu-se nas amostras coletadas de fêmeas (13,6%) em relação às de touros (9%), diferença essa comprovada estatisticamente ($P < 0,05$) que pode ser atribuída à condição de coleta eficiente e mais segura nas fêmeas, o que possibilita a obtenção de maior quantidade de muco. Recomenda-se a coleta das



fêmeas no período de estro, devido à maior quantidade de secreção obtida. Logo, a sincronização de cio pode ser utilizada quando o objetivo for a obtenção de uma amostragem representativa do rebanho.

CONCLUSÃO

O *Campylobacter fetus* está presente nas amostras de aspirado prepucial, cervical e conteúdo abomasal de fetos oriundas de bovinos. Além disso,

o grupo das fêmeas teve o maior número de amostras positivas, quando comparado aos machos.

REFERÊNCIAS

ALVES, T.M. et al. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.4, p.336-344, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n4/a11v31n4.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2012.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria/ SDA no 46, de 30 de julho de 2003. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://www.crmvgo.org.br/legislacao/multiplicacao/POR00000046.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2011.
- CALDOW, G.L.; TAYLOR, D.W. Experiences with venereal *Campylobacter* infection in suckler herds. **Cattle Practice**, v.5, p.327-334, 1997. Disponível em: <<http://www.bcva.eu/bcva/education/documents/experiences-venereal-campylobacter-infection-suckler-herds>>. Acesso em: 20 maio 2011.
- CAMPERO, C. et al. Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p.138-141, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15876227>>. Acesso em: 14 mar. 2011.
- DEKEYSER, J. Bovine genital Campylobacteriosis. In: BUTZLER, J.P. **Campylobacter infection in man and animal**. Boca Raton: CRC, 1984. p.181-191.
- EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. I: *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas fetus*. **Veterinary Bulletin**, v.62, p.743-775, 1992. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1996%2FGB%2FGB96247.xml%3BGB9128872>>. Acesso em: 20 maio 2011.
- GARCIA, M.M. et al. Detection of *Campylobacter fetus* in artificial insemination bulls with a transport enrichment medium. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 47, p.336-340, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1235949/>>. Acesso em: 20 maio 2011.
- GARCIA, M.M.; BROOKS B.W. *Campylobacter*. In: PRESCOTT J.F. et al. (Ed.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Iowa State University Press, 1993. p.262-272.
- GENOVEZ, M.E. et al. Avaliação de dois métodos de coleta de muco prepucial no diagnóstico da Campilobacteriose genital no touro. **Instituto Biológico**, v. 52, p.7-11, 1986.
- GENOVEZ, M.E. Campilobacteriose genital bovina. In: SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 2., 1997, Caxambu, MG. **Anais...** Caxambú: Pfizer, 1997. p.49-53.
- GOMES, M.J.P. et al. Campilobacteriose genital bovina: Isolamento de *Campylobacter fetus* em municípios, no estado do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25., 1997, Gramado: RS. **Anais...** Gramado: SOVERGS, 1997. p.175.
- GRESSLER, L.T. et al. *Campylobacter fetus* subespécie *fetus*: abortamento e natimortalidade em ovinos. **Ciência Rural**, v.42, n.4, p.697-700, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782012000400020&script=sci_arttext>. Acesso em: 27 de set. 2012. doi: 10.1590/S0103-84782012000400020.
- GROFF, A.C.M. et al. Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.12, p.1031-1035, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2010001200005&script=sci_arttext>. Acesso em: 24 set. 2011.
- HUM, S. et al. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. **Australian Veterinary Journal**, v.75, p.827-831, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9404619>>. Acesso em: 30 set. 2013. doi: 10.1111/j.1751-0813.1997.tb15665.x.
- IRONS, P.C. et al. Genital campylobacteriosis in cattle. In: COETZER, J. A. W. & TUSTIN, R. C. **Infectious disease of livestock**. 2.ed. África do Sul: Oxford University, 2004. V.3, p.1459-1468.
- LAGE, A.P. et al. Campilobacteriose Genital Bovina: diagnóstico na Escola de Veterinária da UFMG de 1976 à 1996. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.164-166, 1997.
- LAGE, A.P.; LEITE, R.C. Campilobacteriose genital bovina. **Pecuária de Corte**, v.10, p.50-54, 2000.
- LANDER, K.P. The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. **British Veterinary Journal**, v.146, p.327-333, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007193511800254>>. Acesso em: 24 set. 2011.
- MIES FILHO, A. Incidência da vibriose bovina em alguns rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária da UFRGS**, v.3, p.195-199, 1960.
- MIRANDA, K.L. **Prevalência da infecção por Campylobacter fetus em bovinos de corte do Brasil**. 2005. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- NEWSAN, I.D.B. Experimental *Vibrio fetus* infection in heifers. **Australian Veterinary Journal**, v.43, p.426-432, 1960. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.1960.tb03728.x/abstract>>. Acesso em: 15 maio 2011.
- SKIRROW, S.Z.; BON DURANT, R. Bovine Trichomoniasis. **Veterinary Bulletin**, v. 58, p.591-603, 1988.
- SKIRROW, M.B. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. **Journal Comparative Pathology**, v.111, p.113-149, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7806700>>. Acesso em: 10 nov. 2011.
- SMIBERT, R.M. The genus *Campylobacter*. **Annual Review of Microbiology**, v.32, p.673-709, 1978. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.mi.32.100178.003325>>. Acesso em: 10 jan. 2011.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **User's guide: statistics, version 8.2. (SAS)**. Cary, 2001. 1686p.
- STYNEN, A.P.S. **Deteção de Campylobacter fetus em lavados prepuciais de touros pela PCR**. 2000. 36f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- STOESSEL, F. **Las enfermedades venereas de los bovinos: Trichomoniasis y vibriosis genital**. Zaragoza: Acribia, 1982. 163p.

VARGAS, A.C. et al. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.93, p.121-

132, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350300018X>>. Acesso em: 10 nov. 2011. doi: 10.1016/S0378-1135(03)00018-X.