

EFICIÊNCIA DE UMA VACINA CONTRA A CAMPILOBACTERIOSE BOVINA COM CULTURAS AUTÓCTONES EM ADJUVANTE OLEOSO¹

AUVANIR DE ALMEIDA RAMOS², MARIA LENIRA DOS ANJOS SANTOS LEITE³, HÉLIO GUSTAVO GUIDA², RAIMUNDO DIOGO MACHADO⁴, VANIA LUCIA BAËTA ANDRADE², VERA LÚCIA TEIXEIRA DE JESUS² E AGOSTINHO JORGE DOS REIS CAMARGO⁵

ABSTRACT.- Ramos A.A., Leite M.L.A.S., Guida H.G., Machado R.D., Andrade V.L.B., Jesus V.L.T. & Camargo A.J.R. 1985. [Efficiency of a vaccine against Bovine Campylobacteriosis with autochthonous cultures in oily adjuvant.] Eficiência de uma vacina contra a Campilobacteriose bovina com culturas autóctones em adjuvante oleoso. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 6(1): 15-21. Embrapa-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, RJ 23851, Brazil.

The study of a vaccine containing 13 cultures of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and one *intestinalis* was carried out. These cultures were isolated in Rio de Janeiro State from animals suffering of reproductive diseases, from an aborted fetus and from the foreskin cavity of infected bulls. Those cultures were inactivated by a 0,5% formalin solution and treated by heating at 37°C for 24h in oily adjuvant.

The immunogenicity of the vaccine was assayed on two groups of eight half-breed virgin Holstein aging over two year old weighing over 300 kg. This was performed by infecting subcutaneously 5.0 ml of the vaccine in both groups. The second group animals received a 5.0 ml booster 14 days later.

Indirect immunofluorescence and serum-agglutination test showed an optimal antibody production at 30th and 36th days, respectively for animals vaccinated with one and two doses.

Sixty days after the first vaccination the heifers were infected with 4×10^6 cells (culture RJ 14, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*) at the moment of artificial insemination at the cervicovaginal region.

The reproductive efficacy of 100 and 75%, for one and two doses respectively, with three inseminations, showed to be the best way to assay immunity conferred by the vaccine. On the other hand, for the eight heifers composing group II, 15 inseminations were necessary for an efficiency of 100%, or 1.8 semen doses, for fertilization. The result was superior to that of group III, in which 16 inseminations were necessary for pregnancy in 7 out of 8 heifers; an efficiency of 75%, or 2.2 semen doses, for fertilization.

The control group of 8 heifers presented only 4 pregnancies from 19 inseminations, or 4.7 semen doses, for fertilization. The opsonizing effect of IgG was the responsible by the absence of microorganisms in the cervico mucous of the vaccinated heifers. However the presence of microorganisms in some heifers did not affect the reproductive efficacy in these animals.

INDEX TERMS: *Vibrio fetus*, vaccination, vibriosis, control method, evaluation.

¹Aceito para publicação em 23 de outubro de 1985.

Baseado na Tese submetida à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, por Maria Lenira dos Anjos Santos Leite, para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária, área especializada em concentração de Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação Artificial, em abril de 1985.

²Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal, Embrapa, Km 47, Seropédica, RJ 23851.

³Epaba, Av. Ademar de Barros 967, Ondina, Salvador, Bahia, 40000.

⁴Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

⁵Pesagro-Rio, Seropédica, RJ.

SINOPSE.- O presente estudo trata de uma vacina contendo 13 culturas de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e uma cultura do *Campylobacter fetus* subsp. *intestinalis*, isoladas no Estado do Rio de Janeiro, provenientes de animais com problemas de reprodução, de um feto abortado e da cavidade prepucial de touros infectados, inativada pelo formol a 0,5% e normalizada pelo calor à 37°C por 24h em adjuvante oleoso.

Para a pesquisa da ação imunogênica da vacina foram empregados dois grupos compostos por oito novilhas virgens mestiças de holandês, com idades acima de dois anos e pesos acima de 300 kg. A vacinação realizou-se com uma aplicação de 5,0 ml da vacina na região cervical via subcutânea, sendo que no segundo grupo, houve uma vacinação com mais 5,0 ml com intervalo de 14 dias entre as doses.

Os testes de imunofluorescência indireta e de soroaglutinação, indicavam haver um ótimo pique na média da produção de anticorpos para o grupo vacinado com uma dose ao 30º dia e no 36º dia para o grupo vacinado com duas doses.

Após 60 dias da primeira vacinação, os animais foram contaminados com 4×10^6 células da amostra RJ 14 do *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* no momento da primeira inseminação artificial na região anterior da vagina.

A eficácia de 100 e 75% para uma dose e duas doses da vacina respectivamente com base no desempenho reprodutivo obtido com no máximo três inseminações, demonstrou ser o melhor método de avaliação da imunidade conferida pela vacina. Por outro lado, para as oito novilhas que compunham o grupo II foram necessárias 15 inseminações para se obter a eficiência de 100%, ou seja, 1,8 dose de sêmen por fecundação. Tal resultado foi superior ao do grupo III, no qual, dentre oito novilhas, sete ficaram gestantes, sendo necessárias 16 inseminações para se obter uma eficiência de 75%, ou seja, 2,2 doses de sêmen por fecundação.

O grupo controle apresentou apenas quatro novilhas gestantes e requereu 19 inseminações, ou seja, 4,7 doses de sêmen por fecundação. A opsonização pelo IgG foi a responsável pela ausência do microrganismo no muco cérvico-vaginal de novilhas vacinadas, porém, a presença de microrganismo no muco cérvico-vaginal de algumas novilhas não afetou a eficiência reprodutiva desses animais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Vibrio fetus*, vacinação, vibriose, método de controle, avaliação.

INTRODUÇÃO

Os prejuízos econômicos causados pela Campilobacteriose são ocasionados pelas falhas de coberturas, redução do índice de natalidade, perda na produção leiteira, infertilidade a nível de rebanho, influenciando o desfrute (Frank 1956, Mies Filho 1960, Safford 1969, Madoux & Willians 1975, Leite et al. 1980). Isto motivou vários pesquisadores a avaliarem métodos para o seu controle, tendo sido realizada por Amell & Stockton (1956) a primeira tentativa de produzir a imunidade através da vacinação contra a Campilobacteriose. Logo após, a vacinação demonstrou ser efetiva na prevenção da enfermidade, podendo ser também curativa (Clark et al. 1970, Zemjanis 1974, Schurig et al. 1975, Leite et al. 1980).

Hoerlein & Kramer (1964) vacinaram novilhas com vacinas inativadas pelo formol, fenol, calor, congelamento e descongelamento. Esses animais foram posteriormente infectados, obtendo-se uma variação na taxa de prenhez de 80 a 100%, requerendo uma, duas ou três coberturas por prenhez, contra 39 coberturas por prenhez no grupo controle. Várias tentativas para se determinar o adjuvante que melhor auxilia na resposta imunológica do animal foram empreendidas. Os resultados de Hoerlein et al. (1964, 1965), Scott (1966) Beckenhauer (1967), Clark et al. (1968), Hoerlein & Carrol (1970), Carrol & Hoerlein (1972), Clark et al. (1970) e Leite et al. (1980) indicam que o óleo mineral mostrou ser

satisfatório por estimular mais intensamente o sistema imunológico, e por proporcionar um estímulo antigênico mais prolongado.

Com a imunização sistêmica, os anticorpos do soro passam, por transudação, à mucosa uterina e tudo indica que a opsonização pelos anticorpos do soro é crítica e provavelmente explica a imunidade vacinal (Dozsa et al. 1962, Vandeplassche et al. 1963, Peterson & Newsam 1964, Carrier & Kramer 1971, Wilkie & Winter 1971, Schurig et al. 1974, Corbeil et al. 1974, Border & Firehammer 1980).

Hoerlein et al. (1965), Hoerlein & Carrol (1970) sugerem que, para se obter imunidade máxima, a vacinação deverá ser feita de 30 a 120 dias antes da cobertura, em todas as fêmeas (novilhas e vacas), com dose única da vacina em adjuvante adequado. E que, com tal procedimento, a resposta é superior à que se obtém quando se aplicam duas doses da vacina. Carrol & Hoerlein (1972) relatam, ainda, que um dos pontos importantes a considerar, quando se avalia a imunidade vacinal de um rebanho contra a Campilobacteriose, é o percentual de gestações, sendo esse o melhor critério para avaliação. O uso exclusivo do isolamento ou dos achados sorológicos seria insuficiente para se avaliar a proteção contra os efeitos da doença. Berg & Firehammer (1978) relatam, no entanto, que através da soro-aglutinação em tubos se pode determinar os títulos que conferiram a imunidade vacinal, visto que, há correlação entre os resultados sorológicos e a eficiência da vacina.

O objetivo deste estudo foi a obtenção de uma vacina eficaz elaborada com culturas autóctones para imunizar bovinos contra a Campilobacteriose, em face dos grandes prejuízos econômicos determinados pela doença em nosso meio.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de *Campylobacter fetus* usadas na preparação da vacina foram isoladas da cavidade prepuccial de touros infectados naturalmente e do conteúdo estomacal de um feto abortado, de animais pertencentes a rebanhos leiteiro localizados no Estado do Rio de Janeiro. Essas amostras foram tipificadas por Ramos et al. (1983), conforme consta do Quadro 1.

A preparação da vacina constou de um "pool" das amostras RJ 1 a RJ 14 do microrganismo (Quadro 1) as quais reativadas a partir de estoques liofilizados em meio de tripticase contendo 0,50; 0,25; 0,10 de ágar e multiplicadas em caldo tripticase em tubos de ensaios, frascos de Erlenmeyer e garrafas de Roux, incubados a 37°C em atmosfera normal, durante 24 h. Após verificação do crescimento e de pureza das culturas concentrou-se a suspensão, após filtração em gase estéril, a 12.000 G durante 40 min. O sedimento foi ressuspensão em salina formolada a 0,5%, e incubado a 37°C por 24 h. Sua padronização foi feita de forma que uma diluição 1:200 obtivesse 0,30 T em 525 mn. Adicionaram-se em partes iguais, a massa bacteriana padronizada e o adjuvante oleoso⁷. A homogeneização foi feita a 10.000 G durante 30 min, em mixador "Lourdes"⁸. O envasamento foi realizado em frascos contendo 5 ml da suspensão.

A vacina, uma vez preparada, foi submetida ao teste de esterilidade semeando-a em meios aeróbios, anaeróbios e meios seletivos para fun-

⁷ 50% de marcol e 50% de montanide, gentilmente cedido pelo Instituto Pan-Americano de Febre Aftosa, RJ.

⁸ "Lourdes Homogeinizg" M.T. 10.000. Thomas Co, U.S.A.

gos, e incubados a 37°C por cinco dias. Para o teste de inocuidade inocularam-se, subcutaneamente, seis cobaios. Para o teste de eficiência em animais de laboratório, empregaram-se seis coelhos e seis cobaios, fêmeas adultas, que foram inoculadas com três doses de 0,5 ml por via subcutânea, com intervalos de três dias entre as doses. Decorridos sete dias da última inoculação e aos 14 e 21 dias, os animais foram sangrados por punção cardíaca, sendo os soros testados pelas técnicas de soro-aglutinação e imunofluorescência, em diluições a partir de 1:2 até 1:4096.

O teste da eficiência em bovinos contou com 24 novilhas virgens mestiças de holandês, com idade acima de 2 anos e peso superior a 300 kg pertencentes ao rebanho leiteiro da Pesagro-Rio e mantidas na Estação Experimental de Itaguaí, situada no km 47 da antiga Rodovia Rio-São Paulo, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. Essas novilhas permaneceram sob o regime usual de manejo do rebanho, em pastagens nas dependências da referida Estação.

Os animais foram submetidos ao exame ginecológico através de palpação retal e por vaginoscopia e procedidos os testes de brucelose, leptospirose, campilobacteriose, tuberculose e tricomonose.

Todos os animais foram observados diariamente durante os seis meses anteriores à vacinação para detecção da periodicidade do estro, comprovado por palpação retal.

As novilhas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos de 8 animais. O grupo I, controle, não foi vacinado. Os animais do grupo II foram vacinados com dose única de 5,0 ml por via subcutânea na região cervical, e os do grupo III, com duas doses de 5,0 ml, intervaladas de 14 dias.

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Campylobacter fetus* pós-vacinais aplicou-se a técnica de micro-aglutinação com diluições de 1:2 até 1:4096.

O soro dos animais foi colhido aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 59 e 63 dias após a vacinação.

A imunofluorescência indireta foi realizada empregando-se a globulina anti-bovina marcada⁹. Usou-se o processo de titulação sucessiva dos soros, partindo da diluição de 1:10 até 1:5120. Como suporte foram empregadas lâminas para microscopia fluorescente e como esfregão, uma suspensão de *Campylobacter fetus* fixada em acetona e lavada em solução tampão a pH 7,2. O título do soro foi determinado pela maior diluição em que ocorria fluorescência nítida.

Dois meses após à primeira vacinação foi feita a inseminação com semen em "peillet", após cessação dos sinais visíveis do estro. Cada novilha, minutos após a inseminação, foi infectada com 1 ml, da suspensão bacteriana de desafio (Smibert, 1970), descongelada em água fria a 4°C e a seguir depositado diretamente na vagina próximo do colo uterino, com pipeta plástica de inseminação artificial. Nesse teste de desafio da imunidade foi usada a amostra RJ 14 (Quadro 1) tipificada por Ramos et al. (1983), a qual, estocada liofilizada e reativada em caldo tripticase ágar em tubos de ensaios e multiplicada em caldo tripticase em tubos de ensaio, frascos de Erlenmeyer e garrafas de Roux, foi concentrada a 12.000 G, ressuspensa em caldo tripticase acrescido de 15% de glicerol e congelado a -20°C (Smibert, 1970). A padronização foi feita de modo que, em uma diluição a 1:200, se obtivessem 0,30 T em 525 mn, correspondentes à concentração de 4 x 10⁶ bactérias por ml de material inoculado.

Decorridos 14 dias da inseminação e do desafio da imunidade, coletou-se muco cérvico-vaginal com pipetas de vidro e pera de borracha acoplada a uma das suas extremidades. Foram depositados 0,8 ml de muco em cada frasco esterilizado contendo 0,2 ml de acetilcisteína (Fluimucil)¹⁰ a 20% sendo as amostras congeladas a -20°C e examinadas posteriormente.

O muco cérvico-vaginal para isolamento do *Campylobacter fetus* foi semeado diretamente em meio de cultivo (Neill et al. 1980) e levado ao laboratório imediatamente após a colheita para ser processado. As colheitas foram realizadas aos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 e 91 dias após o desafio da imunidade.

⁹O conjugado foi preparado no Depto de Virologia do Instituto de Microbiologia, UFRJ.

Para a imunofluorescência direta utilizou-se como fluidificante do muco acetilcisteína, na proporção de 4:1. Foram preparadas quatro lâminas com esfregaços de aproximadamente 2 cm² de área secados ao ar.

Após fixação com acetona, lavagem e secagem, adicionou-se o soro anti-*Campylobacter fetus*, incubando-se à 37°C em câmara úmida durante 30 min., seguida de lavagem com tampão por 20 min., secagem e adição de globulina anti-bovina conjugada contendo duas unidades fluorescentes. Após nova incubação, lavagem em tampão, secagem, procedeu-se a cobertura com glicerina alcalina e lamínula.

Quadro 1. Amostras de *Campylobacter fetus* usadas para elaboração da vacina

Amostra	Tipo ^(a)	Biotipo	Subespécie	Diagnóstico
RJ 1	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 2	B	1	<i>intestinalis</i>	Aborto
RJ 3	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 4	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 5	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 6	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 7	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 8	A2	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade, aborto
RJ 9	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 10	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 11	A2	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade, aborto
RJ 12	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 13	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade
RJ 14	A	1	<i>venerealis</i>	Infertilidade

(a) Amostras isoladas e tipificadas por Ramos et al. (1983).

No exame ao microscópio epifluorescente foi considerado teste positivo o caso em que havia fluorescência nítida das bactérias contidas no muco. Nesse teste utilizou-se microscópio Zeiss, com lâmpada de vapor de mercúrio HB0-200, filtro anticalórico, filtro de barreira amarelo e filtro BG-12 com 3 mm de espessura.

O muco cérvico-vaginal para isolamento foi semeado assepticamente em 2,0 ml de meio semi-sólido segundo Neill et al. (1980) e incubado a 37°C. Após o crescimento característico abaixo do nível do meio por 48h, procedeu-se o exame em campo escuro e em microscopia de contraste de fase.

A etapa seguinte compreendia o envolvimento das culturas em meio seletivo, constituído de infuso cérebro-coração¹¹, ágar¹², 1,5 a 2,0% com 10% de sangue desfibrinado de bovino, 15 unidades por ml de bacitracina¹³, uma unidade por ml de sulfato de polimixina B¹⁴, cinco microgramas por ml de novobiocina¹⁵, e 0,1 ml por ml de verde-brilhante¹⁶ a 0,33%. Alíquotas de 0,1 ml de muco de cada animal eram inoculado em três placas de Petri. As placas eram incubadas em atmosfera com 10% de CO₂ por 96h, sendo examinadas, portanto, após o quarto dia de incubação.

¹⁰Zambon Laboratórios Farmacêuticos S.A., São Paulo.

¹¹Difco, Rio de Janeiro.

¹²BBL, Rio de Janeiro.

¹³Laboratório Frumtost S.A., São Paulo.

¹⁴Pfizer Química Ltda., São Paulo.

¹⁵Upjohn Produtos Farmacêuticos, São Paulo.

¹⁶Merck Sharp & Dohme Ltda., Rio de Janeiro.

Partindo de colônias suspeitas foram identificadas as culturas de *Campylobacter fetus* com base nos caracteres morfológicos e tintoriais, utilizando-se os métodos de Gram, Ziehl-Nielsen modificado, cristal violeta e a motilidade em campo escuro e em contraste de fase e provas bioquímicas incluindo a produção de catalase, oxidase e negatividade para produção de H²S.

O delineamento experimental para avaliar a eficácia da vacina em novilhas foi inteiramente casualizado com nove tratamentos e oito repetições e a comparação entre médias foi feita através do teste t.

O modelo matemático adotado foi $Y_{ijK} = M + D_i + G_j + e_{ijK}$, no qual M = média, D_i = efeito dos dias de colheita de amostra de soro (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 53 e 63) e G = efeito das doses de vacinação. O ponto máximo da produção de anticorpos foi determinado através de análise de regressão. A eficácia da vacinação com base no desempenho reprodutivo do rebanho experimental foi calculada de acordo com Newhall (1966).

RESULTADOS

O resultado da análise de variância (Quadros 2 e 3) e do teste de Turkey (Quadro 4) da aglutinação com soros de novilhas demonstrou que houve diferença significativa (P < 0,05) entre os valores médios de titulação semanal após vacinação. O ponto máximo de produção de anticorpos para o grupo tratado com apenas uma dose de vacina foi em torno do 30º dia após a inoculação, enquanto que o ponto máximo para o grupo vacinado com duas doses se situou em torno do 36º dia, de acordo com a análise de regressão e com as Figuras 1 e 2. Os coeficientes de variação e desvios padrões foram de 14,09%

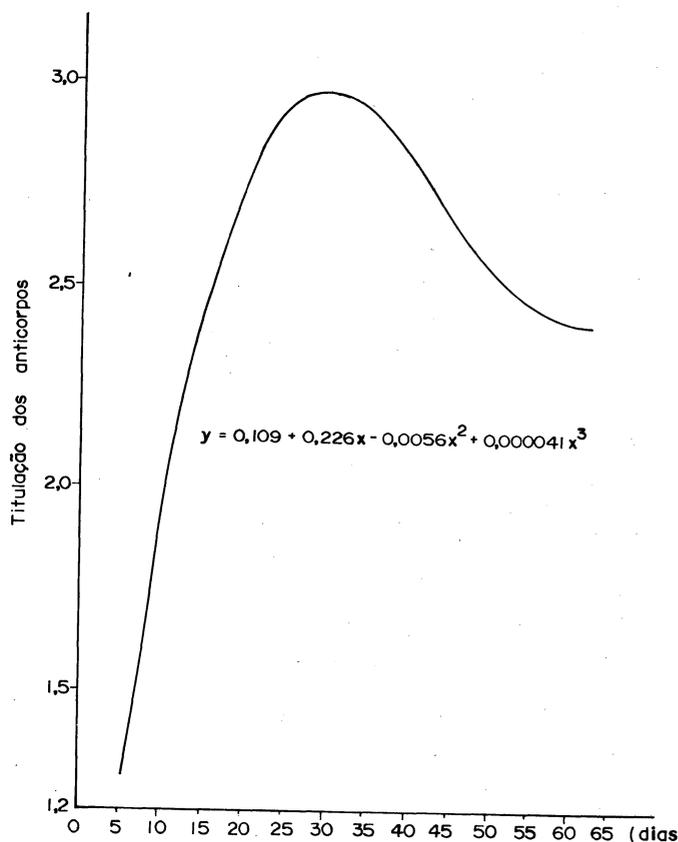


Fig. 1. Níveis de anticorpos no grupo II (uma vacinação).

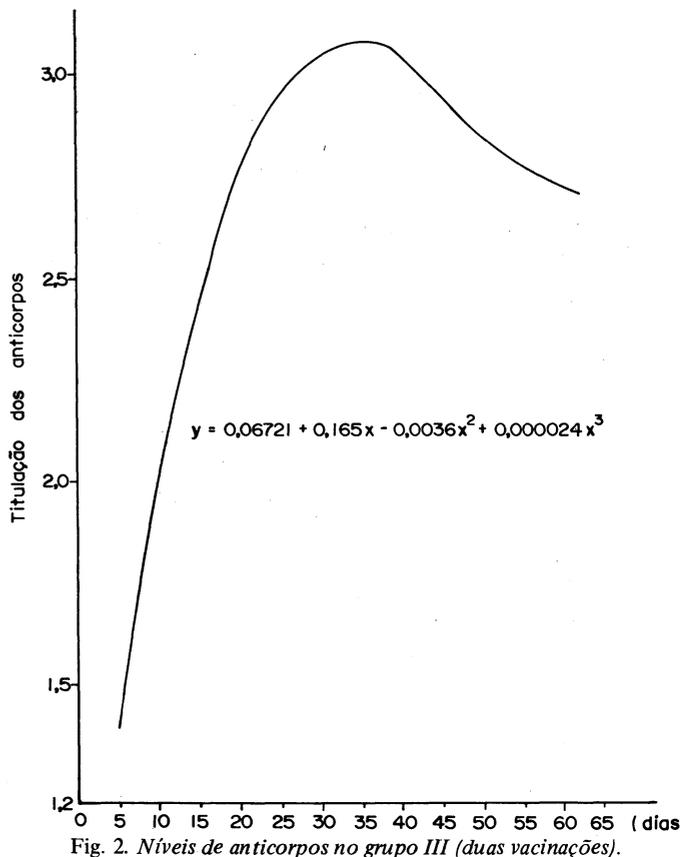


Fig. 2. Níveis de anticorpos no grupo III (duas vacinações).

Quadro 2. Análise de variância da produção de anticorpos aglutinantes do grupo II

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	8	14,21	1,78	14,19*
Resíduo	63	7,88	0,12	
Total	71	22,09	1,90	

* = P < 0,05.

Quadro 3. Análise de variância da produção de anticorpos aglutinantes do grupo III

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	8	12,35	1,54	20,63*
Resíduo	63	4,71	0,07	
Total	71	17,06	1,61	

* = P < 0,05.

e ± 0,36 para o grupo vacinado com dose única (grupo II) e 10,14% e ± 0,27 para o grupo vacinado com duas doses (grupo III), respectivamente.

Nos testes de imunofluorescência, os resultados foram equivalentes aos da soro-aglutinação.

A pesquisa de anticorpos aglutinantes no soro de coelhos e cobaias vacinados, indicou que havia elevação dos títulos de

anticorpos aos 7, 14 e 21 dias após a primeira inoculação, o que demonstrou a imunogenicidade da vacina preparada, conforme mostra o Quadro 5.

A eficiência do desafio da imunidade experimental das novilhas trabalhadas, utilizando-se a imunofluorescência direta após 14 dias da inseminação artificial e contaminação simultânea, é demonstrada no Quadro 6.

O teste do desempenho reprodutivo avaliado pelo número de animais gestantes por inseminação, demonstrou que, das oito novilhas que compunham o grupo II, vacinado com uma única dose, duas necessitaram de uma inseminação, cinco de

Quadro 4. Valores médios de titulação de aglutinantes nos grupos estudados, de acordo com o período experimental

Dias ^(b) de coleta	Títulos ^(a)	
	Vacinação com 1 dose ^(c)	Vacinação com 2 doses ^(c)
7	A 1,4139 d	B 1,6773 f
14	A 2,3330 c	A 2,2577 e
21	A 2,7470 b	A 2,8597 c
28	A 2,9350 a	A 2,8597 c
35	A 3,1030 a	A 3,0855 a
42	A 2,6340 b	B 2,9350 b
49	A 2,6716 b	A 2,9350 b
56	A 2,4458 c	B 2,7093 d
63	A 2,4082 c	B 2,7093 d
\bar{X}	2,5110	2,6699

- (a) Os títulos originais foram transformados em logaritmos decimais.
- (b) Prazo decorrido entre a inoculação da vacina e a colheita de amostra de sangue para titulação.
- (c) Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que médias diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem significativamente pelo teste t ($P < 0,05$).

Quadro 5. Controle de anticorpos pré e pós-vacinação de coelhos e cabaos

Animal	Produção de anticorpos			
	1 ^(a)	Após 7 dias	Após 14 dias	Após 21 dias
Coelho 1	0	1:640	1:4096	1:4096
Coelho 2	0	1:320	1:1024	1:4096
Coelho 3	0	1:160	1:1024	1:1024
Coelho 4	0	1:640	1:4096	1:4096
Coelho 5	0	1:640	1:1024	1:1024
Coelho 6	0	1:320	1:1024	1:1024
Cobaio 1	0	1:320	1:1024	1:1024
Cobaio 2	0	1:320	1:4096	1:4096
Cobaio 3	0	1:320	1:4096	1:1024
Cobaio 4	0	1:320	1:4096	1:1024
Cobaio 5	0	1:320	1:4096	1:4096
Cobaio 6	0	1:320	1:4096	1:1024

- (a) Dia da inoculação da vacina.

Quadro 6. Resultado da imunofluorescência direta e isolamento do *Campylobacter fetus* no muco cérvico-vaginal

Grupo	Número de animais			
	Imunofluorescência		Isolamento	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
I (controle)	6	2	8	—
II (1 vacinação)	5	3	3	5
III (2 vacinações)	7	1	5	3
Total	18	6	16	8

duas inseminações e uma de três inseminações, resultado em uma eficácia de 100% para esse método de vacinação. Tal resultado foi superior ao do grupo III, vacinado com duas doses, no qual, dentre oito novilhas, sete ficaram gestantes, sendo duas na primeira inseminação, uma na segunda e quatro na terceira; uma permaneceu não gestante. Com este segundo método de vacinação a eficácia alcançou 75%.

O grupo controle apresentou apenas quatro novilhas gestantes sendo uma na primeira inseminação e três na segunda inseminação. Os animais não gestantes foram inseminados em cinco estros sucessivos sem ocorrência de gestação e foram considerados com a infecção tendo inclusive apresentado corrimento mucopurulento no momento da inseminação. Uma novilha do grupo III (vacinação com uma dose) abortou aos quatro meses de gestação, não tendo sido isolado o *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* do conteúdo endometrial e nem foi encontrado o feto abortado. Por outro lado, para as oito novilhas que compunham o grupo II, foram necessárias 15 inseminações para se obter a eficiência de 100%, ou seja, 1,8 dose de sêmen por fecundação. Tal resultado foi superior ao do grupo III, no qual, dentre oito novilhas, sete ficaram gestantes, sendo necessárias 16 inseminações para se obter uma eficiência de 75%, ou seja, 2,2 dose por fecundação.

O grupo controle apresentou quatro novilhas gestantes e requerem 19 inseminações, ou seja, 4,7 dose de sêmen por fecundação.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A vacina elaborada com bactérias inativadas pelo formol a 0,5% e normalizada pelo calor a 37°C por 24h em adjuvante oleoso produziu uma imunização contra a doença nas novilhas vacinadas. Todos os animais responderam à administração da vacina com o desenvolvimento de anticorpos que foram determinados pela soro-aglutinação e imunofluorescência indireta, fato observado também por Te Punga (1962), Hoerlein et al. (1965). O óleo mineral provou ser um eficiente adjuvante proporcionando níveis altos de anticorpos circulantes, apesar de provocar uma reação local sob a forma de tumefação com 8 a 10 cm de diâmetro aproximadamente, também verificada nos estudos de Hoerlein et al. (1964, 1965), Clark et al. (1968) e Leite et al. (1980). Houve um pique na produção de anticorpos em torno do 30º dia após inoculação para o grupo vacinado com uma dose e ao 36º dia após o grupo vacinado com

duas doses. Em contrapartida, Lincoln & Trout (1967), usando vacinas com hidróxido de alumínio com uma ou duas doses, observaram um pique na produção de anticorpos no 35º dia, após inoculação, e afirmaram ser o hidróxido de alumínio melhor que o óleo mineral para este tipo de vacinação, usando uma ou duas doses.

Quanto à eficácia da vacina, os resultados do teste do desempenho reprodutivo, de 100% para o grupo II (uma dose) e de 75% para o grupo III (duas doses) indicaram que uma dose da vacina produziu melhor imunidade, sendo mais eficiente que duas doses, o que vem concordar com os achados de Hoerlein & Carrol (1970), ao deduzirem que a imunidade máxima é obtida entre 30 a 120 dias após vacinação, época em que se deve introduzir novilhas em rebanhos infectados, porém, que sejam imunizadas através de vacinas com adjuvante adequado. Por outro lado, Clark et al. (1968) também verificaram que a vacinação bem sucedida prevenia o estabelecimento da infecção após contaminações, conseqüentemente, aumentava o desempenho reprodutivo, o que também foi verificado por Amell & Stockton (1956) e Firehammer & Berg (1966). Hoerlein & Kramer (1964) também observaram, em seus experimentos com vacinas inativadas pelo formol, fenol, congelamento e descongelamento, índices de gestação variáveis entre 80 e 100% requerendo uma, duas ou três coberturas por gestação, enquanto que o grupo controle necessitou número de serviços bem maiores por concepção. Já Clark et al. (1968) obtiveram melhor proteção e eficiência reprodutiva satisfatória com o uso de duas doses de vacina inativada pelo formol.

A ocorrência de aborto em uma novilha do grupo II, coincide com as observações de Safford (1969) e Clark (1971), que relatam que o aborto produzido pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* ocorre aos 4-5 meses de gestação, o que, nos nossos achados poderia ser um indício de ter sido provocado pelo germen em estudo, apesar do não isolamento do agente causal e da não obtenção do feto abortado. Outros fatores alheios aos nossos controles poderiam também ter produzido o aborto.

O grupo controle apresentou quatro novilhas gestantes entre as oito inseminadas, possivelmente, tratavam-se de novilhas resistentes à infecção, fato este também observado por Vandeplassche et al. (1963), que relatam a ocorrência, em um rebanho, de 25% de animais resistentes à doença.

As novilhas não gestantes foram consideradas portadoras da doença, o que explica o número relativamente elevado de inseminações inférteis. Houve repetições de estro possivelmente, associadas a abortamentos na fase embrionária, parecendo-nos que cabe considerar que houve concepções com posterior morte precoce do zigoto por infecção vibrionica, fato também descrito por Adler (1959). A verificação do intervalo entre as inseminações efetuadas no grupo, constatou a irregularidade da frequência de estros, sendo a média dos mesmos superior, à "moda", isto é, 19-21 dias. Esse período de infertilidade verificado no presente estudo pode estar relacionado com endometrites, associada ou não a salpingites, conforme tem sido registrado por Dozsa et al. (1962), Vandeplassche et al. (1963), Peterson & Newsam (1964), Wilkie et al. (1972) e Schurig et al. (1974).

O teste do desempenho reprodutivo foi o melhor parâmetro para avaliação da imunidade vacinal, assim como para a dosagem satisfatória da vacina, o que nos faz concordar com Carrol & Hoerlein (1972) ao mencionarem ser o desempenho reprodutivo o fator de maior importância na avaliação da imunidade após a vacinação. Discordamos, porém, de Berg & Firehammer (1978), que afirmam serem os resultados sorológicos suficientes para se determinar a imunidade. Apesar de se poder correlacionar os títulos de anticorpos no soro com o desempenho reprodutivo, deve-se lembrar que, embora as novilhas tivessem nível elevado de anticorpos no soro, elas podem contrair a infecção se houver deficiência na infiltração de fagócitos e de anticorpos específicos no muco cérvico-vaginal no período da exposição ao *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, fato também assinalado por Border & Firehammer (1980).

Os resultados positivos para o isolamento do *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* no muco cérvico-vaginal de novilhas vacinadas indicaram que, embora existindo o agente etiológico em suas vaginas, elas não tiveram problemas quanto à sua eficiência reprodutiva, o que vem corroborar os achados de Hoerlein & Kramer (1963), Frank et al. (1967), Mitchell (1968) e Hoerlein & Carrol (1970). O resultado negativo para o isolamento de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em certas novilhas vacinadas pode ser devido à eficiência da opsonização pela IgG no conteúdo endometrial, visto que nos animais contaminados durante o estro, a infiltração normal de neutrófilos junto com as opsoninas IgG poderia ser o suficiente para neutralizar todos os microrganismos usados no inóculo, o que concorda com Dozsa et al. (1962), Vandeplassche et al. (1963), Peterson & Newsam (1964), Carrier & Kramer (1971), Wilkie & Winter (1972), Duncan et al. (1972), Corbeil et al. (1974, 1975) e Border & Firehammer (1980). O fato de se ter alcançado com base na eficiência reprodutiva dos animais 100% da eficácia com dose única de 5 ml e 75% quando a aplicação de duas doses de 5 ml da mesma vacina sugere, uma possível interferência da concentração de anticorpos obtidos com a primeira dose na resposta antigênica da segunda inoculação. Cabe especular se um maior intervalo entre as vacinações não poderia ter influência no sentido de uma resposta melhor.

Embora os bons resultados alcançados com o tipo de vacina e com o esquema adotado, recomenda-se a continuação dos estudos visando a obtenção de mais dados confirmatórios.

Agradecimentos. - Os autores agradecem a todos os funcionários do Setor de Patologia da Reprodução da Embrapa, Itaguaí, Rio de Janeiro, à Pesagro-Rio, Estação Experimental de Itaguaí, Rio de Janeiro e ao Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que de uma forma ou de outra contribuíram para o bom êxito deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Adler H.C. 1959. Genital vibrioses in the bovine; an experimental study on the influence on early embryonic mortality. Acta Vet. Scand. 1:1-11.
- Amell V.H. & Stockton, J.J. 1956. Serological response of cattle to

- Vibrio fetus* vaccine as measured by the complement-fixation test and tubeaglutination test. Am. J. Vet. Res. 17(65):626-9.
- Beckenhauer W.H. 1967. Vaccination in the control of bovine vibriosis. Iowa Vet., Ames, 38:6-13.
- Berg R.L. & Firehammer B.D. 1978. Effect to interval between booster vaccination and time of breeding on protection against campylobacteriosis (vibriosis) in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173:467-471.
- Border M.N. & Firehammer B.D. 1980. Antigens of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* eliciting vaccinal immunity in heifers. Am. J. Vet. Res. 41(5):746-750.
- Carrier S.P. & Kramer T.T. 1971. Bactericidal effect and serological response of blood and secretions in bovine vibriosis. Infect. Immunity 3:405-410.
- Carrol E.J. & Hoerlein A.B. 1972. Current recommendation for vibrio vaccination in cattle. Norden News 47(2):24-34. (Reprint)
- Carrol E.J. & Hoerlein A.B. 1972. Diagnosis and control of bovine genital vibriosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 161(11): 1359-1364.
- Clark B.L., Dufty J.H. & Monsbrough M.J. 1968. Experimental *Vibrio fetus* (*venerealis*) infection in heifers; The immunizing properties of killed organisms injected subcutaneously. Aust. Vet. J. 44(3): 110-114.
- Clark B.L., Dufty J.H. & Monsbrough M.J. 1970. Vaccination of heifers with *Vibrio fetus* (intestinal type) against infection with *Vibrio fetus* (genital type). J. Comp. Path. 80:47-52.
- Clark B.L. 1971. Review of bovine vibriosis. Aust. Vet. J. 47(3):103-107.
- Corbeil L.B., Duncan J.R., Schurig G.D., Hall C.E. & Winter A.J. 1974. Bovine venereal vibriosis. Variation in immunoglobulin class secretions and serum. Infect. Immunity 10(5):1084-1090.
- Corbeil L.B., Corbeil R.R. & Winter A.J. 1975. Bovine venereal vibriosis: activity of inflammatory cells in protective immunity. Am. J. Vet. Res. 36(4):403-406.
- Dozsa L., Mitchell R.G. & Olson N.O. 1962. Histological changes of the uterine mucosa following the duration of vibrio infection and the subsequent development of immunity. Am. J. Vet. Res. 25:776.
- Duncan J.R., Wilkie B.N. & Winter A.J. 1972. Natural and immune antibodies for *Vibrio fetus* in serum and secretions of cattle. Infect. Immunity 5(5):728-733.
- Firehammer B.D. & Berg R.L. 1966. Bacterins for immunization against bovine vibriosis, J. Am. Vet. Med. Ass. 149(12):1640-1642.
- Frank A.H. 1956. Vibriose in cattle. Vet. Scope, Kalamazoo, U.S.A., 1(12):2-6.
- Frank A.H., Bryner J.H. & O'Berry P.A. 1967. The effect of *Vibrio fetus* vaccination on the breeding efficiency of cows bred to *Vibrio fetus* infected bulls. Am. J. Vet. Res. 28:1237-1242.
- Hoerlein A.B. & Kramer T. 1963. Artificial stimulation of resistance to bovine vibriosis. Am. J. Vet. Res. 24:951.
- Hoerlein A.B. & Kramer T. 1964. Artificial stimulation of bovine vibriosis: use of bacterins. Am. J. Vet. Res. 25(105): 371-373.
- Hoerlein A.B., Kramer T. & Carrol E.J. 1964. Vibriosis in range cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 144: 146-151.
- Hoerlein A.B., Carrol, E.J., Kramer T. & Beckenhauer W.N. 1965. Bovine vibriosis immunization. J. Am. Vet. Med. Assoc. 146(8): 828-835.
- Hoerlein A.B. & Carrol E.J. 1970. Duration of immunity to bovine genital vibriosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 15(6): 775-778.
- Leite R.C., Reis R. & Rivera F.E.B. 1980. Controle da vibriose bovina através da vacinação. Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 32(2):259-264.
- Lincoln G.N. & Trout K.J. 1967. Evaluation of a new trivalent bovine vibriosis bacterium using fluorescent antibody technic. Amour Baldwin Laboratories Omaha, Nebraska. Vet. Med. Small Anim. Clinician, p. 561-564.
- Madoux J.N. & Williams D.J. 1975. Influence of *Vibrio fetus* on reproductive efficiency an milk production in a Georgia dairy herd. J. Dairy. Sci. 58(1):143-144.
- Mies Filho A. 1960. Incidência da vibriose bovina em alguns rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. Revta Fac. Agron. Vet., Porto Alegre, 3:195-199.
- Mitchell D. 1968. Some effects of experimental *Vibrio fetus* (*venerealis*). Infection on cattle inoculated with a commercial bacterin. Can. J. Comp. Med. Sci. 32:474-479.
- Neill S.D., O'Brien I.J. & Ellis W.A. 1980. The isolation of aerotolerant *Campylobacter*. Vet. Rec. 106:152-153.
- Newhall J.H. 1966. Results of fields trials and controlled laboratory studies on bovine vibriosis bacterins. J. Am. Vet. Med. Assoc. 149(12): 1643-1647.
- Peterson J.E. & Newsam I.D.B. 1964. The histopatology of genital vibriosis in virgin heifers. Brit. Vet. J. 120:229-245.
- Ramos A.A., Guida H.G. & Andrade V.L.B. 1983. Isolamento e tipificação de *Campylobacter fetus*, no Estado do Rio de Janeiro. Pesq. Agropec. Bras. 18(5): 551-556.
- Safford J.W. 1969. Bovine vibriosis and regulatory veterinary medicine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 155(12): 2178-2181.
- Schurig G.D., Hall C.E., Burda K., Corbeil L.B., Duncan J.R., Winter A.J. 1974. Infection patterns in heifers following cervicovaginal or intrauterine instillation of *Campylobacter Vibrio fetus venerealis*. Cornell Vet. 64:533-548.
- Schurig G.D., Hall C.E., Corbeil L.B., Duncan J.R. & Winter A.J. 1975. Bovine venereal vibriosis. Course of infection in females by systemic immunization. Infect. Immunity 11(2):245-251.
- Scott J.A. 1966. Vaccination in the control of vibriosis in beef cattle. Norden News 41(4):7-8.
- Smibert R.M. 1970. Cell wall composition in the classification of *Vibrio fetus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 20:407-412.
- Te Punga W.A. 1962. Vibriosis in cattle. Part 3. Studies on control by vaccination. N.Z. Vet. J. 10:89-91.
- Vandeplassche M., Florent A., Bouters R., Huysman A., Brone E. & Dekeyser P. 1963. The pathogenesis epidemiology and treatment of *Vibrio fetus* infection in cattle. Compt. Rend. Rech. Sci. Ind. Agric. 29:1-90.
- Wilkie B.N. & Winter A.J. 1971. Location of *Vibrio fetus* var. *venerealis* within the endometrium of the cow. Infect. Immunity 3(6):854-856.
- Wilkie B.N. & Winter A.J. 1972. Bovine vibriosis The distribution and specificity of antibodies induced by vaccination and infection and the immunofluorescent localization of the organism in infected heifers. Can. J. Comp. Med. 35:301-312.
- Zemjanis R. 1974. Vaccination for reproductive efficiency in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 165(8): 689-692.