

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA
CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Cláudia Mello Groff

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA

por

Ana Cláudia Mello Groff

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Agueda Castagna de Vargas

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL
BOVINA**

elaborada por
Ana Cláudia Mello Groff

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Agueda Castagna de Vargas, Dr
(Presidente/Orientador)

Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, Dr. (UFRGS)

Rudi Weiblen, PhD. (UFSM)

Santa Maria, 26 de setembro 2005.

À Joana e Maria Fernanda,
razões de eu querer saber mais...

AGRADECIMENTOS

À professora Agueda Castagna de Vargas, pela oportunidade e disponibilidade de orientação, confiança, amizade, paciência e exemplo profissional.

Ao Mateus Matiuzzi da Costa, pelo auxílio na discussão do projeto e inestimável colaboração em todas as etapas deste trabalho.

À professora Fernanda Vogel, pelo incentivo em começar o mestrado.

Ao professor Rudi Weiblen, pela disposição em ajudar.

À Carolina Greig, pela ajuda na tradução do artigo.

Às colegas de mestrado Mariana e Cristina pelo apoio e amizade.

À Luciane, Jacqueline, Franciele, Dênis, Silvana, Clarissa, Sônia, e a todos aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Bacteriologia, auxílio imprescindível na realização das pesquisas e na rotina do laboratório.

Às funcionárias do Laboratório de Bacteriologia, Niura Witt e Daniele Rodrigues, pela convivência diária.

Aos meus pais, Carlos e Francisca, pelo estímulo, apoio, carinho, constante boa vontade e pela dedicação às minhas filhas neste período do mestrado.

Ao Fernando, por compreender os momentos mau-humorados, pela paciência, incentivo e amor.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA

AUTOR: ANA CLÁUDIA MELLO GROFF
ORIENTADOR: AGUEDA CASTAGNA DE VARGAS
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de setembro de 2005.

A campilobacteriose genital bovina, caracterizada principalmente por infertilidade, é uma doença de difícil diagnóstico, devido à natureza microaerófila do seu agente etiológico, o *Campylobacter fetus*, tendo assim sua prevalência subestimada. Este trabalho teve por objetivo avaliar a utilização da técnica de PCR para o diagnóstico da campilobacteriose genital bovina, utilizando amostras de aspirado prepucial, muco cervical e conteúdo abomasal de fetos abortados, coletadas em meio de transporte e enriquecimento; bem como comparar seu desempenho com a técnica do isolamento bacteriano. Foram testados cinco diferentes protocolos de extração de DNA de *Campylobacter fetus*: termo extração, lise com proteinase K, lise com isotiocianato de guanidina, lise com DNazol[®] e lise com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Também foram avaliadas a especificidade, a sensibilidade e a aplicação da técnica da PCR em amostras clínicas. Os resultados indicaram que o CTAB foi o protocolo de extração mais eficiente; o par de primers utilizado mostrou-se específico; e o limite de detecção foi 63 unidades formadoras de colônias (UFC) de *C. fetus*. A PCR encontrou 24% (68/277) das amostras clínicas positivas para *C. fetus*, enquanto a cultura encontrou 2,8% (8/277). A técnica da PCR é específica e sensível, e mostra-se superior a cultura no diagnóstico da campilobacteriose genital bovina.

Palavras-chave: *Campylobacter fetus*, diagnóstico, isolamento.

ABSTRACT

MS Dissertation in Veterinary Medicine
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

PCR FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE GENITAL CAMPYLOBACTERIOSIS

AUTHOR: ANA CLÁUDIA MELLO GROFF
ADVISER: AGUEDA PALMIRA CASTAGNA DE VARGAS
Santa Maria, September, 26th, 2005

Bovine genital campylobacteriosis is a disease of difficult diagnostic because of the microaerophilic nature of its etiologic agent, *Campylobacter fetus*, thereby causing the prevalence related to this disease to be underestimated. The purpose of this study was to evaluate the utilization of PCR for the diagnosis of genital campylobacteriosis, using samples obtained from bull prepuce aspirate, cow cervical mucus, and abomasum contents obtained from aborted fetuses, collected in transport and enrichment medium. Five different DNA extraction protocols were tested: thermal extraction, lyses with proteinase K, lyses with guanidine isothiocyanate, lyses with DNAzol[®], and lyses with CTAB. The specificity, sensitivity and technical application of PCR assay were also evaluated with clinical samples. The PCR performance was compared to the culture technique for bacterial isolation. The CTAB was the most efficient extraction protocol; the pair of primers used was shown to be specific; and the limit of detection was of 63 CFU of *Campylobacter fetus*. PCR demonstrated that 24% (68/277) of the clinical samples were positive for *Campylobacter fetus*, while only 2.8% (8/277) of samples were positive by culture technique. These results indicate that the PCR technique is specific and sensitive, and is superior to the culture for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis.

Key words: *Campylobacter fetus*, diagnostic, culture.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
SUMÁRIO	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. Revisão de Literatura.....	10
2.1 - Campilobacteriose genital bovina....	10
2.1.1 - Etiologia.....	10
2.1.2 - Epidemiologia.....	11
2.1.3 - Patogênese.....	12
2.1.4 - Sinais clínicos.....	13
2.1.5 - Patologia.....	14
2.1.6 - Controle e profilaxia.....	14
2.2 - Diagnóstico da campilobacteriose genital bovina.....	15
3.CAPÍTULO 1 - PCR for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis.....	17
4. CONCLUSÃO.....	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

A Campilobacteriose Genital Bovina (CGB), caracterizada por infertilidade e aborto, apesar de acarretar muitos prejuízos, tem passado completamente despercebida, devido à natureza subclínica e à dificuldade de diagnóstico. A CGB é causada pelo *Campylobacter fetus* (*C. fetus*) subespécie *fetus* e *C. fetus* subespécie *venerealis*, um gênero bacteriano microaerófilo, de crescimento fastidioso e inatividade bioquímica, que requer condições especiais para o transporte e cultura.

A prevalência da CGB nos rebanhos é subestimada, devido à baixa sensibilidade dos testes existentes para o diagnóstico. Considerando as limitações das técnicas utilizadas tradicionalmente no diagnóstico, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos com essa finalidade. A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) vem sendo utilizada na identificação de bactérias de difícil isolamento e classificação, pela sua capacidade de amplificar fragmentos específicos do DNA bacteriano, que se mantêm íntegros, mesmo com o agente inviável.

A detecção e diferenciação de seqüências específicas de DNA pela PCR oferece uma alternativa simples e de alta sensibilidade, especialmente para bactérias fastidiosas, com poucas características bioquímicas diferenciais. A PCR se apresenta como uma técnica de grande utilidade no diagnóstico e diferenciação das espécies e subespécies do gênero *Campylobacter*, tendo em vista a grande dificuldade no isolamento e caracterização bioquímica dessas espécies.

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a utilização da técnica da PCR para diagnóstico da campilobacteriose genital bovina, utilizando amostras de aspirado prepucial, muco cervical e conteúdo abomasal de fetos abortados;
- Comparar os diferentes métodos de extração de DNA de *Campylobacter fetus*;
- Comparar o desempenho da PCR com a técnica da cultura para isolamento bacteriano em amostras clínicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Campilobacteriose genital bovina

A campilobacteriose genital bovina (CGB), chamada anteriormente de vibriose, é uma enfermidade de transmissão venérea que afeta bovinos, caracterizada principalmente por infertilidade (CATENA et al., 2003). É considerada de relevância econômica para a indústria pecuária mundial (BROOKS et al., 2004). Apesar do número de casos da CGB ter diminuído nos países onde a inseminação artificial, vacinação e programas de controle foram adotados, ela permanece como um dos maiores causadores de problemas reprodutivos em muitos países (EAGLESOME & GARCIA, 1992; CAMPERO et al., 2005). Devido aos longos intervalos entre partos e a diminuição do número de terneiros produzidos, ocasiona baixa eficiência reprodutiva, o que leva a perdas econômicas significativas e afeta a produtividade da pecuária leiteira e de corte (COBO et al., 2003).

A prevalência da CGB é subestimada, pelo seu caráter subclínico e por ser uma doença de difícil diagnóstico (HUM et al., 1994). Na Austrália a CGB é uma das mais importantes doenças venéreas de bovinos e a maior causa de infertilidade e aborto, sendo detectada em 46% dos rebanhos com problemas reprodutivos (HUM & WORSLEY, 1999). Na Argentina é relatada a ocorrência de 2,5 a 22% de touros positivos para *C. fetus* (EAGLESOME & GARCIA, 1992; CIPOLLA, 1997). No Brasil, trabalhos em diferentes estados apontam dados de prevalência para CGB que vão de 9 a 52% dos animais analisados (GOMES et al., 1997; LAGE et al., 1997; PELLEGRIN et al., 1997; JESUS et al., 1999; STYNEN et al., 2003).

2.1.1. Etiologia

A campilobacteriose genital bovina é causada pelo *Campylobacter fetus*, uma bactéria capaz de infectar biungulados e humanos (EAGLESOME & GARCIA, 1992). *Campylobacter fetus* são bacilos gram-negativos, finos, espiralados e curvados, móveis, oxidase positivos, microaerófilos, que requerem para crescimento 3 a 5% de gás carbônico e 3 a 15% de oxigênio (QUINN et al., 2005; SONGER & POST, 2005). A espécie é dividida em duas

subespécies, *C. fetus* subesp. *fetus* e *C. fetus* subesp. *venerealis*, muito semelhantes genomicamente, mas que diferem quanto à epidemiologia (MULLER et al., 2003).

2.1.1.1. *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*

O *C. fetus* subesp. *venerealis* é plenamente adaptado ao aparelho reprodutivo bovino, sem sobreviver no intestino destes animais (WAGENAAR et al., 2001). Contudo, cepas intermediárias pertencentes ao biotipo *intermedius*, conhecidas por causar a mesma infecção, podem ocorrer tanto no aparelho reprodutivo como no intestinal. Nas fêmeas bovinas, coloniza a vagina, cérvix, útero e ovidutos, produzindo infertilidade, morte embrionária e abortamento. Nos machos, a bactéria está confinada à mucosa do pênis, prepúcio e porção distal da uretra (EAGLESOME & GARCIA, 1992). Essa subespécie não é considerada como um patógeno humano de importância (CASADEMONT et al., 2000).

2.1.1.2. *Campylobacter fetus* subespécie *fetus*

O *C. fetus* subesp. *fetus* é um patógeno zoonótico, responsável por bacteremia e outras infecções sistêmicas oportunistas em humanos, principalmente em gestantes e pacientes imunossuprimidos (FUJIMOTO, 2003). É encontrado no aparelho intestinal de bovinos e ovinos, podendo ser encontrado na cavidade prepucial de touros, tipicamente como resultado de contaminação fecal (CAMPERO et al., 2005). O microrganismo é transmitido via oro-fecal e induz, esporadicamente, abortamento em vacas e ovelhas, não sendo normalmente associado com infertilidade (ON & HARRINGTON, 2001). Na Argentina, o *C. fetus* subesp. *fetus* é frequentemente isolado em abortamentos, sendo mais prevalente que o *C. fetus* subesp. *venerealis* (CAMPERO et al., 2003).

2.1.2. Epidemiologia

O *C. fetus* subesp. *venerealis* é introduzido na fêmea susceptível por um touro infectado durante o coito, ou através de inseminação artificial com sêmen contaminado (SONGER & POST, 2005). Os touros são portadores e principais disseminadores da doença (EAGLESOME & GARCIA, 1992). A possibilidade de transmissão da bactéria de touros

infectados para vacas é de aproximadamente 100%. Transmissão direta entre fêmeas é rara, mas entre machos agrupados em grande número pode ocorrer através da monta (GARCIA & BROOKS, 1993). Também há indicações que os touros possam ser contaminados através da cama contaminada (SCHUTTE et al., 1994).

Touros podem ser permanente ou transitoriamente infectados, sendo que os jovens podem curar-se da infecção, enquanto que touros com mais de três anos usualmente permanecem portadores. Acredita-se que a razão seja o maior número e desenvolvimento das criptas prepúciais, que albergam o agente (CORBEIL, 1999). Adicionalmente, como o *C. fetus* fica restrito a superfície epitelial do pênis e prepúcio durante a infecção, não há estimulação antigênica suficiente, o que pode explicar a ausência de formação de anticorpos e prolongada sobrevivência desse microrganismo (SCHUTTE et al., 1994).

O *C. fetus* subesp. *fetus* causa aborto esporádico em bovinos. O microrganismo tem sido isolado da vesícula biliar e intestino de animais saudáveis. Os ovinos provavelmente servem como fonte primária de infecção por *C. fetus* subesp. *fetus*. A transmissão da infecção pode ocorrer por ingestão de água e alimentos contaminados com o agente, que após bacteremia, chega ao útero. Outros animais e pássaros podem servir como reservatórios secundários de *C. fetus* subesp. *fetus* (GARCIA & BROOKS, 1993).

2.1.3. Patogênese

Após a transmissão pelo coito, o *C. fetus* subesp. *venerealis* permanece na junção cervico-vaginal até o final do estro, provavelmente como consequência do maior aporte sanguíneo e ativação de leucócitos polimorfonucleados durante este período. O microrganismo multiplica nesse sítio e posteriormente invade o útero, resultando em endometrite e interrupção da gestação. (HIRSH, 1999). Após várias semanas ou meses, vacas infectadas podem eliminar o *C. fetus* subesp. *venerealis* dos órgãos genitais superiores, mas o agente pode persistir na vagina por anos (WANG et al., 1993). Isto se deve ao fato da resposta humoral à infecção por *C. fetus* ser predominantemente mediada por imunoglobulinas da classe IgA na vagina e IgG no útero. A IgA pode imobilizar, mas não opsonizar o *C. fetus*, enquanto as IgG desempenham as duas funções, facilitando a fagocitose (CORBEIL, 1999).

O aborto esporádico, causado pelo *C. fetus* subesp. *fetus*, é resultado da disseminação deste agente a partir do intestino e fígado para o útero, placenta e feto. O microrganismo se localiza nos placentomas, induzindo placentite e causa abortamento devido à inflamação e

necrose dos cotilédones (GARCIA & BROOKS, 1993). Grande proporção de animais, após sofrerem bacteremia por *C. fetus* subesp. *fetus*, permanecem como portadores, portanto, ambas subespécies podem causar colonização crônica das superfícies epiteliais do hospedeiro, apesar das defesas contra o parasitismo microbiano (WANG et al., 1993).

A habilidade da espécie *C. fetus* em produzir infecções crônicas está associada com a presença de uma camada de proteínas de superfície (SAP – surface array protein), também chamada *S-layer*, que esse microrganismo expressa na sua camada celular mais externa (TUMMURU & BLASER, 1992; GARCIA et al., 1995). Esta *S-layer* é o maior fator de virulência do *C. fetus*, conferindo-lhe resistência a fagocitose e a ação bactericida do soro, impedindo a ligação com o fator C3b do complemento (WANG et al., 1993; PENN, 2001; TU et al., 2005). Cada *S-layer* é composta por proteínas de alto peso molecular (SLPs), e cada célula de *C. fetus* varia a SLPs expressa (TU et al., 2003).

As cepas de *C. fetus* podem produzir três diferentes *S-layer*, com estrutura e epítomos diferentes. A mudança no tamanho da *S-layer* produzida resulta em mudança na antigenicidade e possível evasão da resposta imune do hospedeiro (TUMMURU & BLASER, 1992; DWORKIN et al., 1995; TU et al., 2003). A persistente colonização da vagina das vacas pelo *C. fetus* subesp. *venerealis* é devido a variação antigênica das *S-layers*, e esta variação acontece muito freqüentemente durante a infecção (GARCIA et al., 1995; VARGAS et al., 2002). GROGONO-THOMAS et al. (2003) afirmam que as *S-layers* são essenciais para a indução de abortamento por *C. fetus* subesp. *fetus* em ovelhas.

2.1.4. Sinais clínicos

Na fêmea bovina a campilobacteriose genital se caracteriza por uma infecção aguda, que gradualmente torna-se crônica. A infertilidade é usualmente associada à fase aguda, e abortamento à fase crônica. Abortamentos podem ocorrer em todos os períodos da gestação, mas são mais comuns entre o quinto e sexto mês (EAGLESOME & GARCIA, 1992). Outros sinais associados com a infecção incluem endometrite, salpingite, repetição de cio, ciclos longos, prolongado intervalo entre partos, com os rebanhos apresentando baixa produtividade (HIRSH, 1999).

Nenhum sinal de infecção é evidente nos touros. O *C. fetus* subesp. *venerealis* é um parasita que não induz qualquer modificação funcional ou estrutural no sistema genital,

também não há alterações no sêmen e na fertilidade dos machos (EAGLESOME & GARCIA, 1992; SCHUTTE et al., 1994).

2.1.5. Patologia

As lesões microscópicas associadas com a campilobacteriose genital bovina não são específicas, porém todos os fetos infectados com *C. fetus* apresentam lesões histopatológicas, sendo que as mais comumente encontradas são: broncopneumonia supurativa, serosite e pericardite fibrinosa, hepatite necrótica multifocal e gastroenterite não supurativa. Na placenta relata-se a ocorrência de placentite necrosupurativa (CAMPERO et al., 2003; CAMPERO et al., 2005).

2.1.6. Controle e profilaxia

A campilobacteriose genital é bem controlada pela prevenção. Recomenda-se o uso de touros jovens com certificação negativa para a doença e a aquisição de animais de reposição em propriedades livres da infecção. A utilização de inseminação artificial é considerada uma medida eficaz para controle e prevenção da CGB (HIRSH, 1999). A vacinação com bacterinas é usada terapêutica e profilaticamente (QUINN et al., 2005). Sugerem-se duas doses com intervalo de 4 – 6 semanas, quatro semanas antes do período de monta no primeiro ano, e após uma dose anualmente (HUM & WORSLEY, 1999). Vacinas em adjuvante oleoso são consideradas eficazes para prevenir a infecção, perdas reprodutivas e também para curar animais infectados (COBO et al., 2003). O tratamento com antimicrobianos é utilizado para touros, vacas e sêmen. Penicilina e estreptomicina são os mais indicados (SONGER & POST, 2005).

2.2. Diagnóstico da campilobacteriose genital bovina

O isolamento e a identificação do organismo pela cultura é o teste padrão e confirmatório para o diagnóstico da infecção por *C. fetus*. No entanto a cultura é dificultada pela reduzida viabilidade do agente nas amostras coletadas e o rápido crescimento de contaminantes que competem com o *C. fetus*, além de ser trabalhosa, demorada e dispendiosa (MONKE et al., 2002; BROOKS et al., 2004). O desenvolvimento de meios de transporte e formas de coleta das amostras tem permitido uma maior eficiência no isolamento destes microrganismos (LANDER, 1990). A coleta de aspirado prepucial com bainha de inseminação artificial tem sido amplamente empregada, sendo essa técnica mais eficiente que as técnicas de lavado prepucial e *swab* para isolamento de *Campylobacter fetus* (RAMOS et al., 1986). Os meios seletivos, desenvolvidos para o transporte e enriquecimento de *Campylobacter fetus*, facilitaram o diagnóstico dessa enfermidade. Entre os meios conhecidos, o meio de Lander's ou Weybridge modificado é o mais recomendado (HUM et al., 1994; MONKE et al., 2002), entretanto, para aumentar a probabilidade de isolamento do agente, o tempo de transporte da amostra deve ser inferior a 24 horas após a coleta (MONKE et al., 2002).

Além da cultura e isolamento bacteriano, a imunofluorescência direta, aglutinação em muco cervical e testes imunoenzimáticos também têm sido utilizados para o diagnóstico, porém limitações relativas à sensibilidade e à especificidade desses procedimentos têm sido reportados (HUM et al., 1994; BROOKS et al., 2004; McFADDEN et al., 2005).

A imunofluorescência direta pode ser usada como um rápido método de triagem, embora alguns autores recomendem utilizá-la como teste confirmatório, devido aos resultados inespecíficos que reduzem a eficácia da técnica para triagem. Na imunofluorescência realizada rotineiramente, utilizam-se conjugados comerciais, muitas vezes pouco disponíveis. Isolados positivos na cultura e negativos na imunofluorescência sugerem que os anticorpos empregados na produção do conjugado são contra as *S-layer*, portanto, passíveis de falha na detecção pela variação antigênica desse componente celular (EAGLESOME & GARCIA, 1992). Além disso, a imunofluorescência direta para *C. fetus* subesp. *venerealis* apresenta baixo limite de detecção, entre 10^4 e 10^2 UFC/ml (FIGUEIREDO et al., 2001).

Os anti-soros policlonais tradicionalmente utilizados para a detecção de *C. fetus*, contêm anticorpos para vários componentes da célula bacteriana, muitos dos quais tem reação cruzada

com outras bactérias, resultando em falsos-positivos (BROOKS et al., 2002). Um teste ELISA com quatro anticorpos-monoclonais foi desenvolvido para ser utilizado como triagem para a detecção de *C. fetus* em lavado prepucial e muco vaginal, com boa especificidade, porém foi necessária uma concentração de 10^5 a 10^7 UFC/ml para haver resultado positivo (BROOKS et al., 2004).

A técnica da PCR é uma grande aliada na identificação de bactérias cujo isolamento e classificação são problemáticos, sendo teoricamente capaz de detectar apenas uma cópia de DNA. Uma das principais vantagens desta técnica é que não necessita de grandes cuidados na colheita e transporte das amostras, uma vez que o DNA bacteriano mantém-se íntegro, mesmo que o agente esteja inviável. A rapidez, um bom limite de detecção e especificidade são outras vantagens da PCR, que tornam a técnica uma eficiente alternativa aos métodos tradicionais de diagnóstico (MALORNY et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004).

A habilidade da PCR para amplificar regiões específicas do DNA tem sido utilizada para o gênero *Campylobacter*. Embora BASTYNS et al. (1994) tenham relatado a dificuldade no desenho de *primers* para diferenciação das subespécies do *C. fetus*, devido a grande semelhança nas seqüências de nucleotídeos das subunidades do DNA ribossomal, HUM et al. (1997) desenvolveram um teste de PCR altamente específico para identificação das duas subespécies de *C. fetus*. Muitos outros procedimentos baseados na PCR foram desenvolvidos para a identificação de *C. fetus* (BASTYNS et al., 1994; BLOM et al., 1995; OYARZABAL et al., 1997) e suas subespécies (HUM et al., 1997; ON & HARRINGTON, 2001; WAGENAAR et al., 2001; VARGAS et al., 2003; MULLER et al., 2003), porém esses autores não avaliaram o uso da técnica para o diagnóstico em amostras clínicas.

3. CAPÍTULO 1

PCR for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis

A ser submetido, como artigo científico, à revista *Veterinary Microbiology*.

PCR for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis

A.C.M. Groff^a, M.M. Costa^{b,c}, J.K. Kirinus^a, L.R. Viana^a, M.S. Silva^d, A.C. Vargas^{a*}

^aDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^bUniversidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Xanxerê, SC, Brazil

^cCentro de Biotecnologia, CBIOT, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^dPontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Toledo, PR, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55-55-3220-9391; fax: +55-55-3220-8257. E-mail address: agueda@ccr.ufsm.br

Abstract

Bovine genital campylobacteriosis is a disease of difficult detection because of the microaerophilic nature of its etiologic agent, *Campylobacter fetus*, thereby causing the prevalence related to this disease to be underestimated. The purpose of this study was to evaluate the utilization of the PCR for the diagnosis of genital campylobacteriosis, using samples obtained from bull prepuce aspirate, cow cervical mucus, and abomasum contents of aborted fetuses, collected in transport and enrichment medium. Five different DNA extraction protocols were tested: thermal extraction, lyses with proteinase K, lyses with guanidine isothiocyanate, lyses with DNAzol[®], and lyses with CTAB. The specificity, sensitivity and technical application of PCR assay were also evaluated with clinical samples. The PCR performance was compared to the culture technique for bacterial isolation. The CTAB was the most efficient extraction protocol; the pair of primers used was shown to be specific; and the limit of detection was of 63 CFU of *Campylobacter fetus*. PCR demonstrated that 24% (68/277) of the clinical samples were positive for *Campylobacter fetus*, while only 2.8% (8/277) of samples were positive by the culture technique. These results indicate that PCR is specific, sensitive, and is superior to the culture for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis.

Key-words: *Campylobacter fetus*, diagnosis, isolation.

1. Introduction

Bovine genital campylobacteriosis (BGC) is a venereal disease, caused by *Campylobacter fetus*, which affects bovines and is characterized mainly by infertility (Catena et al., 2003). Due to long parturition intervals and the reduced number of offspring, the disease causes low reproductive efficiency resulting in significant economic losses that affects both the dairy and beef cattle industries (Cobo et al., 2003).

C. fetus is a gram-negative spiral-shaped bacterium capable of infecting biungulates and humans (Eaglesome and Garcia, 1992). The species is divided in two subspecies genomically related, but epidemiologically distinct (Muller et al., 2003). *C. fetus* subsp *fetus* is found in the intestinal tract of bovine and ovine, sporadically causes abortions, but is also responsible for bacteremia and other systemic infections in humans (On and Harrington, 2001). *C. fetus* subsp. *venerealis* is totally adapted to the bovine reproductive tract, but does not survive in the intestinal tract of these animals (Wagenaar et al., 2001). Consequently, this subspecies is not considered an important human pathogen (Casademont et al., 2000).

In cows, *C. fetus* colonizes the genital tract causing temporary infertility, irregular estrous cycles, embryonic death, and abortions. Bulls are carriers and the main source of infection. In these animals, the bacterium is confined to the mucosa of the penis, prepuce, and the distal part of the urethra (Eaglesome and Garcia, 1992).

The prevalence of BGC is underestimated, due to its subclinical character and difficult diagnosis. *C. fetus* is a strictly microaerophilic bacterium, that do not persist in an oxygen rich atmosphere, hence need special medium and conditions for transport and culture (Lander, 1990; Hum et al., 1994).

The isolation and identification of the organism by culture is considered the standard test to confirm a diagnosis of a *C. fetus* infection. However, culture is problematic due to the reduced viability of the agent in collected samples, additionally, it is difficult, time consuming, and expensive method (Brooks et al., 2004). Direct immunofluorescence, cervical mucus agglutination, and ELISA assays are also used for diagnosis; however limitations relating to sensitivity and specificity of these procedures have been reported (Hum et al., 1994; Brooks et al., 2004; McFadden et al., 2005).

The PCR assay is a useful tool for the identification of problematic isolation and classification of bacteria. One of the advantages of this technique is that sample collection and transporting is easy, as the viability of the bacteria is not necessary. The excellent detection limit, specificity, sensitivity, and time required to obtain the results are other advantages of the PCR method that make the technique an efficient alternative to the traditional diagnostic methods. (Malorny et al., 2003; Rodrigues et al., 2004). Many procedures based on PCR have been developed for the identification of *C. fetus* (Bastyns et al., 1994; Blom et al., 1995; Oyarzabal et al., 1997) and subspecies (Hum et al., 1997; On and Harrington, 2001; Wagenaar et al., 2001; Muller et al., 2003), but these authors did not evaluate the use of the PCR for the diagnosis of clinical samples.

The purpose of this study was to evaluate the utilization of PCR for the diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis using bull prepuce aspirate, cow vaginal mucus, and aborted fetal abomasum contents. The performance of this assay was also evaluated and compared with the bacterial isolation method.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains

The control strains used in the experiments were: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* (ATCC 27374) and subsp. *venerealis* (ATCC 19438), as well as other bacterium normally found in the bovine genital tract: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas* sp. (ATCC 27853), *Proteus* sp. (ATCC 29906), *Bacillus* sp. (Routine-SB 177/94), *C. sputorum* subsp. *bubulus* (ATCC 33562), and *C. sputorum* subsp. *sputorum* (ATCC 35980). The *Campylobacter* sp. strains were cultivated in blood agar base n° 2 and 10 % sheep blood, incubated for 48 h at 37 °C, in microaerophilic conditions (5 % oxygen, 8 % carbon dioxide, 87 % nitrogen); the remaining strains were incubated in aerobiosis for 48 h at 37 °C in blood agar.

2.2. DNA extraction of *Campylobacter fetus*

To evaluate DNA extraction methods, ten different cultures of the reference strain of *C. fetus* subsp. *venerealis* were re-suspended in ultrapure water (Milli-Q®, Millipore Corp.), adjusted to 0.5 of the MacFarland scale, logarithmically diluted (from 10^9 to 10^{-7}) and cultivated (10 %1) for bacterial counting. From these dilutions, 100 %1 were inoculated in 500 %1 of ultrapure water and submitted to five DNA extraction protocols: 1) thermal extraction; 2) proteinase K lyses (Rapley and Walker, 1998); 3) guanidine isothiocyanate lysis (Pitcher et al., 1989); 4) lysis with DNAzol® Reagent (GibcoBRL); and 5) lysis with CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) (Sambrook & Russel, 2001), the last preceded by a digestion with 5 %1 of proteinase K (20 mg/ml) for 60 minutes at 37 °C.

2.3. PCR technique

DNA extracted by the five different protocols was used as a template during the PCR reaction. The amplification conditions were those described by Hum et al. (1997), and

modified by Vargas et al. (2003). The primers used were MG3F - 5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3' and MG4R - 5'-TAGCTACAATAACGACAACT-3' (Hum et al., 1997). 5 μ l of template was mixed with 48 μ l of PCR mix: 200 μ M of dNTPs, 10 x PCR buffer containing 10 μ M Tris-HCl (pH 8.4), 50 μ M KCl, 2.5 μ M MgCl₂, 5 U of Taq DNA polymerase (Cenbiot) and 30 pmol of primers (Life Technologies). The mixture was submitted to a initial denaturation step at 95 °C for 3 min and cycled 30 times as follows: denaturing at 95 °C for 20 s, annealing at 52 °C for 20 s, and extension at 72 °C for 2 min. The PCR results were observed in 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

2.4. Specificity and sensibility evaluation

DNA samples listed in item 1 and extracted by CTAB were submitted to the PCR technique to analyze PCR specificity; while southern blot was used to confirm the product identity, (Sambrook and Russel 2001). The sensitivity of the PCR technique was measured considering the number of colony forming units (CFU) necessary to obtain a positive PCR result. The strain *C. fetus* subsp. *venerealis* (ATCC 19438) was logarithmically diluted (from 10⁻¹ to 10⁻⁷), DNA extracted by CTAB, and was submitted to PCR after bacterial count.

The sensitivity of the technique was evaluated using the DNA extracted from the dilutions in ultrapure water and after the dilutions were inoculated in transport enriched medium (TEM) prepared according to Lander (1990), to which prepuce mucus, cervical mucus, and fetus abomasums content negative for campylobacteriosis were added. The prepucial and cervical mucosal samples used as controls were made up from a pool of mucus obtained from various virgin animals that were tested negative to infection by *C. fetus*. The abomasal content was obtained from fetuses at a slaughterhouse.

2.5. Clinical samples

A total of 545 bovine clinical samples were collected from 71 farms, located in 35 different counties in the State of Rio Grande do Sul – Brazil, with history of infertility. Of these, 94 were obtained from the cervical mucus of cows, 447 from the prepuce mucus of bull, and four from aborted fetal abomasum content. In five farms, samples were collected from males and females with the objective to evaluate the differences in sensitivity of the technique relative to the sex of the animals.

The samples were obtained through aspiration, using (new sterile) artificial insemination sheath, connected to 60 ml sterile syringes. The aspirated content was stored in (new sterile) 4 ml tubes, containing 3 ml of TEM, and maintained at room temperature until arrival at the laboratory. The abomasal liquid from the fetuses was aseptically collected with a syringe and transported chilled to the laboratory where it was added to TEM. Upon arrival at the laboratory all samples were maintained in TEM and incubated at 37 °C.

2.6. Isolation of *C. fetus* from field samples

After an incubation period of three days, 30 µl of the sample in TEM was placed in a filter of 0.45-0.65 µm porosity, over plates with blood agar base nº 2 with 10% sheep blood, and supplemented with antimicrobials (5 UI of Polimixin B, 10 µl of Trimethoprin and 20 µl of Vancomicine/ml of medium). After 30 minutes, the filter was removed; the plates were streaked and incubated at 37 °C in microaerophilic conditions. Culture and identification tests were realized based on OIE (2004) and Lander descriptions (1990).

2.7. The application of PCR technique on clinical samples

The 545 samples collected (item 5) were incubated in TEM, at 37°C during 5 days, submitted to CTAB protocol for DNA extraction, and then to the PCR technique. 10% of all

negative PCR samples were redone using an internal amplification control that consisted of the addition of 5 % of the positive PCR product to the negative samples.

2.8. Comparison between the PCR and bacteria isolation technique

To evaluate the sensitivity of PCR of detecting campylobacteriosis with comparison to isolation, 277 clinical samples were submitted to both techniques (191 males, 85 females, and one fetal sample). The Kappa (κ) test was used to determine the statistical analysis of agreement of the results obtained.

3. Results

Table 1 summarizes the results of the five different DNA extraction protocols used. The results demonstrate that the CTAB protocol was the most efficient method for DNA extraction of *C. fetus* by PCR, detecting 63 CFU.

The primers used during this study amplified only the DNA from *C. fetus* standard strains (ATCC 19438 and 27374); while the identity of the products amplified was confirmed by Southern blot.

When the technique detection limit was evaluated, the PCR reactions over logarithmic dilutions in ultra-pure water showed the necessity of 63 CFU for the detection, the same as when the dilutions were inoculated with TEM added to prepuce and cervical mucus and abomasum content.

The PCR results for the clinical samples collected demonstrated that 12.5% (68/545) of the animals tested were positive for *C. fetus*. All negative samples submitted to the internal amplification control were PCR positive. 40.8% (29/71) of the farms evaluated were positive for *C. fetus*. Of the cervical mucus, 34% (32/94) were positive; while only 7.8% (35/447) of

the prepuce mucus were positive by PCR. In all five farms where males and females were tested, only females were detected as positive.

The results of the comparison between the PCR and isolation techniques are shown at Table 2. PCR was more efficient (8.5 x fold) to detect *C. fetus* when compared with isolation. The kappa value found in the statistical analysis was 0.2. From the farms analyzed by both techniques, 61.3% (19/31) were PCR positive, while only 6.4% (02/31) were positive by culture isolation.

4. Discussion

When the DNA extraction methods were evaluated, CTAB was the most efficient. This is because this detergent produces a high-quality DNA, by reducing inhibitor potentials in the reaction (Sambrook and Russel, 2001; Honoré-Bouakline et al., 2003).

The primers set used were specific for *C. fetus*; similar results were already described (Hum et al., 1997; Muller et al., 2003; Vargas et al., 2003). These primers did not amplify the DNA of other bacteria that may be present in the genital tract of bovines, indicating the accuracy of this technique in obtaining a diagnosis of infections caused by *C. fetus*.

The detection limits of the technique demonstrate the sensitivity of PCR for *C. fetus*; similar data were reported for *Campylobacter mucosalis* (Bastyns et al., 1994). The same detection limits observed for both dilutions inoculated with ultra-pure water and TEM added with prepuce/cervical mucus and abomasums content, suggest that the possible inhibitors of the PCR reaction present in the inoculated transport medium did not influence the result of the technique. Although the clinical samples may contain urine or other substances known to inhibit the enzyme *Taq* polymerase (McPherson and Moller, 2000), in this study this inhibition was not observed; this could be explained by the bacteria DNA extraction. The

method applied (CTAB) is efficient for the purification of the DNA template, removing possible inhibiting substances (Hernandez et al., 1995; Honoré-Bouakline et al., 2003).

From the total clinical samples examined, 12.5% of the animals and 40.8% of the farms examined were PCR positive for *C. fetus*. Since BGC is a herd disease, only one infected animal is necessary to consider the farm as disease-positive (Pellegrin, 1999). The PCR results from the prepuce samples and cervical aspirate demonstrated that females are probably more susceptible for *C. fetus* detection than males. However, the number of samples used to compare the differences between males and females was relatively small, therefore, a larger sample group is necessary to obtain a definite conclusion about sexual differences.

The fact that more females than males were positive to *C. fetus* could be related to the larger volume of mucus collected, principally during the estrus cycle, this being easily induced by the use of hormones. These findings are conflicting with most of the actual BGC diagnostic recommendations, where bulls are considered as the ideal source for sampling (Pellegrin, 1999). The low performance in the detection of *C. fetus* in bulls could be related to the difficulties of mucus collecting, absence of material, mainly in *Bos indicus* breeds and in young bulls, where the preputial folds and crypts of these animals are less developed (Eaglesome and Garcia, 1992).

The five days of sample incubation prior to DNA extraction and PCR testing used in this study, was based on data obtained from a previous study (unpublished data) that indicated that the period of pre-enrichment in TEM provide a multiplication of the CFU, thus favoring PCR detection. However, during this study bacterial culture was realized on the third day, as recommended (Lander, 1990; OIE, 2004); additionally, after this period, the isolation of *C. fetus* is more difficult due to the increased growth of contaminating bacteria. In this study, the PCR diagnosis was obtained within five days, while the results of the final identification by the culture technique took at least ten days.

When PCR and isolation techniques were compared a greater sensitivity was observed in the proposed PCR technique relative to the conventional method of BGC diagnosis. In the statistical analysis the kappa value of 0.02 depicts a very small agreement between the techniques; this occurs because the isolation show reduced sensitivity to *C. fetus*. The kappa statistical test is used when there is no standard reference (Smith, 1995).

During the PCR evaluations 500 μ l samples were used, while only 30 μ l were used during bacterial isolation. This larger volume may turn PCR more sensitive than bacterial culture, but should be considered as a technical defect of culture, since it is not possible to inoculate 500 μ l in a bacterial plate.

Although the objective of this study was not to determine the prevalence of BGC, since samples were only obtained from farms with a history of infertility, when the results of this study were compared (based on the PCR and isolation techniques evaluated), more farms were positive by PCR (61.3%; 19/31) relative to culture isolation (6.4%; 02/31). Therefore, the use of the isolation technique as the only method of diagnosis would not identify 54.8% of the positive farms, compromising the disease control.

5. Conclusions

The hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol is a more efficient method for extracting the DNA of *C. fetus*. The PCR technique is sensitive and specific for the detection of *C. fetus*. This specificity, sensitivity, feasibility, and speed relative to the culture identification make PCR a more efficient alternative for the diagnosis of genital campylobacteriosis in cattle.

References

- Bastyns, K., Chapelle, S., Vandamme, P., Goossens, H., Wachter, R., 1994. Species-specific detection of *Campylobacters* important in veterinary medicine by PCR amplification of 23rDNA areas. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, 563-568.
- Blom, K., Patton, C.M., Nicholson, M.A., Swaminathan, B., 1995. Identification of *Campylobacter fetus* by PCR-DNA probe method. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1360-1362.
- Brooks, B.W., Devenish, J., Lutze-Wallace, C.L., Milnes, D., Robertson, R.H., Berlie-Surujballi, G., 2004. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Vet. Microbiol.* 103, 77-84.
- Catena, M., Callejas, S., Soto, P., Aba, M., Echevarria, H., Monteavaro, C., Mazzolli, A. 2003. Efectos de la infección experimental con *Campylobacter fetus venerealis* sobre la preñez temprana en vaquillonas. *InVet.* 5, 37-44.
- Casademont, I., Bizet, C., Chevrier, D., Guesdon, J.L. 2000. Rapid detection of *Campylobacter fetus* by polimerase chain reaction combined with non-radioactive hybridization using an oligonucleotide covalently bound to microwells. *Mol. Cell. Probes.* 14, 233-240.
- Cobo, E.R., Cipolla, A., Morsella, C., Cano, D., Campero, C. 2003. Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. *J. Vet. Med. B.* 50, 75-80.
- Eaglesome, M.D., Garcia, M.M., 1992. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomas foetus*. *Vet. Bull.* 62, 743-775.

- Hernandez, J., Alonso, J.L., Fayos, A., Amoros, I, Owen, R.J., 1995. Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *C. jejuni* in estuarine surface waters. FEMS Microbiol. Lett. 127, 201-206.
- Honoré-Bouakline, S., Vincensini, J.P., Gracuzzo, V., Lagrange, P.H., Hermann, J.L., 2003. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: Impact of sample preparation and DNA extraction. J. Clin. Microbiol. 41, 2323-2329.
- Hum, S., Quinn, C., Kennedy, D., 1994. Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. Aust. Vet. J. 71, 140-142.
- Hum, S., Quinn, K., Brunner, J., On, S.L., 1997. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. Aust. Vet. J. 75, 827-831.
- Lander, K.P., 1990. The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. Br. Vet. J. 146, 327-333.
- Malorny, B., Tassios, P.T., Randström, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. Int. J. Food Microbiol. 83, 39-48.
- McFadden, A.M., Heuer, C., Jackson R., West, D.M., Parkinson T.J. 2005. Investigation of bovine venereal campylobacteriosis in beef cow herds in New Zealand. N. Z. Vet. J. 53, 45-52.
- McPherson, M.J., Moller, S.G. 2000. PCR. Springer/Bios, New York, pp. 276.
- Muller, W., Hotzel, H., Schulze, F. 2003. Identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies by PCR. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 110, 55-59.
- OIE, 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (Mammals, Birds and Bees). Paris: Office International Des Epizooties.

- On, S.L.W., Harrington, C.S., 2001. Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. J. Appl. Microbiol. 90, 285-293.
- Oyarzabal, O.A., Wesley, I.V., Harmon, K.M., Schroeder-Tucker, L., Barbaree, J.M., Lauermann, L.H., Backert, S., Conner, D.E., 1997. Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. Vet. Microbiol. 58, 61-71.
- Pellegrin, A.O., 1999. A campilobacteriose e tricomonose são doenças reemergentes? Rev. Bras. Reprod. Anim. 23, 523-531.
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. App. Microbiol. 8, 151-156.
- Rapley, R., Walker, J.M. 1998. Molecular Biomechanics Handbook. Humana Press, New Jersey, pp. 725.
- Rodrigues, M.A., Serafini, A.B., Pereira, M de S., da Silva, T.D., Rabahi, M.F., Alves, S.L., Kipnis, A. 2004. Standardization of in-house polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* at the reference Tropical Disease Hospital in the State of Goiás, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99, 415-419.
- Sambrook, R., Russel, D.W. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3v.
- Smith, R.D. 1995. Veterinary Clinical Epidemiology: A problem-oriented approach. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Vargas, A.C., Costa, M.M., Vainstein, M.H., Kreutz, L.C., Neves, J.P., 2003. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. Vet. Microbiol. 93, 121-132.
- Wagenaar, J.A., Van Bergen, M.A.P., Newell, D.G., Grogono-Thomas, R., Duim, B. 2001. Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR

genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. J. Clin. Microbiol. 39, 2283-2286.

Table 1 – *Campylobacter fetus* colony forming unit (CFU) detected by PCR using different protocols for DNA extraction.

DNA extraction	Colony Forming Unit
Thermal	7.20×10^5 ^a
Proteinase K	2.46×10^4
Gu-SCN ^b	1.70×10^2
DNAzol? ^c	1.70×10^2
CTAB ^d	6.30×10

^aThe data represent average of the CFU obtained for each DNA extraction protocol

^bGuanidine isothiocyanate, ^cGibcoBRL, ^dHexadecyltrimethylammonium bromide

Table 2 – Comparison between PCR and isolation methods for *Campylobacter fetus* diagnostic.

	Positive ISOLATION	Negative ISOLATION	Total
Positive PCR	8	60	68
Negative PCR	0	209	209
Total	8	269	277

4. CONCLUSÕES

O protocolo CTAB é mais eficiente para a extração de DNA de *C. fetus*. A amostragem de fêmeas é mais propícia para o diagnóstico do rebanho infectado. A técnica da PCR é sensível e específica na detecção de *C. fetus*. A especificidade, a sensibilidade, a praticidade, e a rapidez em relação à cultura, tornam a PCR uma alternativa mais eficiente para o diagnóstico da campilobacteriose genital bovina, assim permitindo uma melhor estimativa da prevalência desta enfermidade em nossos rebanhos, para a adoção de medidas de controle, visando aumentar a produtividade dos mesmos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTYNS, K. et al. Species-specific detection of *Campylobacters* important in veterinary medicine by PCR amplification of 23rDNA areas. **Systematic Applied Microbiology**, v.17, p.538-568, 1994.

BLOM, K. et al. Identification of *Campylobacter fetus* by PCR-DNA probe method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.5, p. 1360-1362, 1995.

BROOKS, B.W. et al. Monoclonal antibodies specific for *Campylobacter fetus* lipopolysaccharides. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.37-49, 2002.

BROOKS, B.W. et al. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. **Veterinary Microbiology**, v.103, p.77-84, 2004.

CAMPERO, C.M. et al. Aetiology of bovine abortion in Argentina. **Veterinary Researchs Communications**, v.27, n.5, p.359-369, 2003.

CAMPERO, C.M. et al. Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. **Journal Veterinary Medicine B**, v.52, p.138-141, 2005.

CATENA, M. et al. Efectos de la infección experimental con *Campylobacter fetus venerealis* sobre la preñez temprana en vaquillonas. **InVet**, v.5, n.1, p.37-44, 2003.

CASADEMONT, I. et al. Rapid detection of *Campylobacter fetus* by polimerase chain reaction combined with non-radioactive hybridization using an oligonucleotide covalently bound to microwells. **Molecular and Cellular Probes**, v.14, p.233-240, 2000.

CIPOLLA, A.L. Enfermedades venereas. **Informe**. Asociacion Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnostico. 11p. 1997.

COBO, E.R. et al. Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.50, p.75-80, 2003.

CORBEIL, L.B. Immunization and diagnosis in bovine reproductive tract infections. **Advances in Veterinary Medicine**, v. 41, p.217-239,1999.

DWORKIN, J.; TUMMURU, M.K.R.; BLASER, M.J. A lipopolysaccharide-binding Domais of the *Campylobacter fetus* S-layer protein resides within the conserved N terminus of a family of silent and divergent homologs. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.8, p. 1734-1741, 1995.

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomas foetus*. **Veterinary Bulletin**, v.62, n.8, p. 743-775, 1992.

FIGUEIREDO, J.F. et al. Avaliação da imunofluorescência direta no diagnóstico da campilobacteriose genital bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p.192.

FUJIMOTO, S. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infection. **Fukuoka Igaku Zasshi**, v. 94, n. 7, p. 225-234, 2003.

GARCIA, M.M.; BROOKS, B.W. *Campylobacter*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 2nd ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. Cap.22. p.262-272.

GARCIA, M.M. et al. Protein shift and antigenic variation in the S-layer of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of *sapA* homologs. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n.8, p.1976-1980, 1995.

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: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, SBMV, 1997. p.175.

GROGONO-THOMAS, R. et al. Role of S-layer protein antigenic diversity in the immune responses of sheep experimentally challenged with *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 147-154, 2003.

HIRSH, D.C. *Campylobacter – Arcobacter* (Reproductive Tract) In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary Microbiology**. Malden: Blackwell Science, 1999. Cap. 36, p. 192-195.

HUM, S. et al. Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. **Australian Veterinary Journal**, v.71, n.5, p.140-142, 1994.

HUM, S. et al. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 11, p. 827-831, 1997.

HUM, S.; WORSLEY, A. Vibriosis of Cattle. **Agfact**, A2.9.7, 2nd edition, Armidale, Austrália, 1999. Disponível em: <http://www.agric.nsw.gov.au/QA/health/a_297.htm>. Acesso em: 15 jun. 1999.

JESUS, V.L.T. et al. Campilobacteriose genital bovina: ocorrência nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 6, n. 3, p. 133-136, 1999.

LAGE, A.P. et al. Campilobacteriose genital bovina: diagnóstico na Escola de Veterinária da UFMG de 1976 a 1996. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p.164-166, 1997.

LANDER, K.P. The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. **The British Veterinary Journal**, v. 146, n.4, p. 327-333, 1990.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.39-48, 2003.

McFADDEN, A.M. et al. Investigation of bovine venereal campylobacteriosis in beef cow herds in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.53, n.1, p.45-52, feb, 2005.

MONKE, H.J. et al. Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subs. *venerealis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 35-39, 2002.

MULLER, W. et al. Identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies by PCR. **Deutsche Tierarztl Wochenschrift**, v.110, n.2, p.55-59, feb, 2003.

ON, S. L. W.; HARRINGTON, C. S. Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.285-293, 2001.

OYARZABAL, O.A. et al. Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. **Veterinary Microbiology**, v.58, p.61-71, 1997.

PELLEGRIN, A.O. et al. Prevalência de *Campylobacter fetus* em touros do Pantanal Matogrossense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25., 1997, Gramado, RS. **Anais...** Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, SBMV, 1997. p.176.

PENN, C.W. Surface components of *Campylobacter* and *Helicobacter*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 25S-35S, 2001.

QUINN, P.J. et al. Gênero *Campylobacter*. In: _____. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap.29, p. 172-176.

RAMOS, A.A. et al. Comparação de três técnicas de coleta de amostra de material prepucial para diagnóstico da campilobacteriose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 303-309, 1986.

RODRIGUES, M.A et al. Standardization of in-house polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* at the reference Tropical Disease Hospital in the State of Goiás, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.4, p.415-419, 2004.

SCHUTTE, A.P. et al. Genital campylobacteriosis in cattle. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R; TUSTIN, R.C. **Infectious Diseases of Livestock**. Cape Town: Oxford, 1994. Cap. 117, p.1010-1015. 2v.

SONGER, J.G.; POST, K.W. The genera *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Arcobacter*. In: _____. **Veterinary Microbiology: Bacterial and fungal agents of animal disease**. Missouri: Elsevier Saunders, 2005. Cap. 28, p. 223-231.

STYNEN, A.P.R. et al. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha – Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p.766-769, 2003.

TU, Z.C., et al. Structure and genotypic plasticity of the *Campylobacter fetus* sap locus. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 3, p.685-698, 2003.

TU, Z.C., et al. Mechanisms underlying *Campylobacter fetus* pathogenesis in humans: surface-layers protein variation in relapsing infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 12, p. 2082-2089, 2005.

TUMMURU, M.K.R.; BLASER, M.J. Characterization of the *Campylobacter fetus* *sapA* promoter: evidence that the *sapA* promoter is deleted in spontaneous mutant strains. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.18, p. 5916-5922, 1992.

VARGAS, A.C. et al. *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* surface array protein from bovine isolates in Brazil. **Current Microbiology**, v.45, p.111-114, 2002.

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.

WAGENAAR, J.A. et al. Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. **Journal of Clinical Microbiology**, p.2283-2286, 2001.

WANG, E. et al. Shift in S-layer protein expression responsible for antigenic variation in *Campylobacter fetus*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 16, p. 4979-4984, 1993.