

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

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
QUIMERA RECOMBINANTE DE PROTEÍNA DE
SUPERFÍCIE DE *Campylobacter fetus***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cláudia Balzan

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA QUIMERA
RECOMBINANTE DE PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE
*Campylobacter fetus***

Cláudia Balzan

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientadora: Prof^a Agueda Castagna de Vargas, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**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**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA QUIMERA
RECOMBINANTE DE PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE *Campylobacter*
*fetus***

elaborada por
Cláudia Balzan

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a Agueda Castagna de Vargas, Dr^a.
(Presidente/Orientador)

Prof^o Fabricio Rochedo Conceição, Dr. (UFPeI)

Prof^a Fernanda Flores Vogel, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino disponibilizado e pelas oportunidades de aprendizado e convívio com professores excelentes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro.

À professora e orientadora Agueda Castagna de Vargas, pelos momentos de aprendizado, de diversão e pela influência na minha formação.

À toda a minha família, principalmente meus pais, Daniel e Ivanete, por nunca medirem esforços para dar educação às filhas, sempre com muito amor, dedicação, incentivo e paciência. À minha irmã Caroline pela cumplicidade e amizade.

Aos pós-graduandos Ananda Kowalski, Felipe Libardoni, Gustavo Moreira, Leticia Gressler, Letícia Matter e Luana Farias pelo auxílio durante a realização do trabalho.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia, tanto aos que já passaram pelo LABAC quanto os mais novos, por toda a paciência e apoio em toda a trajetória, bem como os vários momentos de aprendizados e diversão.

À equipe do Laboratório de Imunologia Aplicada e professor Fabricio Rochedo Conceição pelo enorme conhecimento adquirido e pelo auxílio nas análises.

Às minhas amigas Cibele, Carla, Caroline Simeoni, Caroline Oliveira, Gabriela, Giovana, Paula Roberta e Rosangela pela compreensão, amizade, ensinamentos e diversão nessa trajetória.

À todos o meu agradecimento.

RESUMO

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE DE PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE *Campylobacter fetus*

AUTORA: Cláudia Balzan
ORIENTADORA: Agueda Castagna de Vargas
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de Fevereiro de 2015.

A campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma importante enfermidade de caráter venéreo, causada por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e que acarreta perdas econômicas por causar problemas reprodutivos nos rebanhos bovinos. Esse patógeno possui proteínas de superfície (SapA), as quais são consideradas importantes na patogenia desta enfermidade por apresentar variação antigênica e serem responsáveis pela persistência da infecção no trato genital bovino. O diagnóstico laboratorial da CGB envolve procedimentos fastidiosos de colheita de material e de seu processamento. Com o intuito de facilitar as análises laboratoriais, este estudo objetivou a padronização dos processos de produção e caracterização de uma proteína quimérica recombinante. Desenhou-se um gene sintético quimérico, denominado sapAN78 a partir de sequências da Sap de *C. fetus* disponíveis publicamente. O fragmento foi clonado no plasmídeo pAE e expresso em *Escherichia coli* BL21(DE3) pLySs. A quimera recombinante de aproximadamente 60 kDa foi obtida como corpos de inclusão, solubilizada em tampão contendo ureia e purificada por cromatografia de afinidade ao níquel (Ni²⁺). Após a proteína foi submetida à diálise lenta e realizada a sua caracterização. Esta foi reconhecida por *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-polihistidina, por anticorpos presentes no soro de bovinos vacinados para CGB e por *Dot blot* a rSapAn78 foi reconhecida por soros de bovinos e soro hiperimune produzido em coelho. Assim, expressão e caracterização de uma proteína de superfície na sua forma recombinante para o diagnóstico desta enfermidade torna a análise das amostras mais prática e acessível. Considerando tais resultados, essa nova proteína possui potencial aplicação em métodos menos laboriosos de diagnóstico para a detecção de campilobacteriose em bovinos.

Palavras-chave: Campilobacteriose genital bovina, proteína recombinante, purificação.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT CHIMERA OF SURFACE PROTEIN OF *Campylobacter fetus*

AUTHOR: Cláudia Balzan

ADVISER: Agueda Castagna De Vargas

Defense Place and Date: Santa Maria, February 23rd, 2015.

Bovine genital campylobacteriosis (BGC) is an important venereal disease, caused by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and related economic losses since it cause reproductive problems in cattle herds. SapA is a surface protein important for the pathogenesis of this bacterium by presenting antigenic variation and be responsible for the persistence of the infection in bovine genital tract. In order to facilitate the laboratory diagnosis of BGC, which involves labor - intensive procedures for collecting and processing the samples, this study aimed to standardize the production of a recombinant chimeric protein and also evaluate their potential as a tool for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of BGC in herds. The conserved region of nine homologous sequences of *C. fetus sapA* gene publicly available was used to design a chimeric synthetic gene, called sapAN78, with 1587 base pairs. The fragment was cloned into pAE plasmid and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. The recombinant chimera (≈60 kDa) was obtained as inclusion bodies, solubilized in a buffer containing urea and purified by nickel affinity chromatography (Ni⁺²). The protein was recognized by Western blotting with monoclonal polyhistidine antibodies and with sera from CGB vaccinated cattle and by Dot blotting using bovine sera and hyperimmune serum produced in rabbits. Indirect ELISA based on the recombinant protein purified has been standardized and tested 219 sera samples from cattle. The sensitivity and specificity of this assay were 90.91% and 89.78%, respectively. Therefore, rSapAn78 has potential as antigen for indirect ELISA for serological diagnosis of *C. fetus* in cattle.

Key words: Bovine genital campylobacteriosis, recombinant protein, purification.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 (Fig.1) - A) Características estruturais e comparação de sequências de DNA de oito *sapA* homólogos completos e um homólogo parcial. A estrutura de cada homólogo está representada esquematicamente pelos retângulos alinhados. Caixas coloridas identificam as regiões homólogas compartilhadas entre as proteínas de superfície do tipo A de *C. fetus*. Caixas brancas indicam sequências não conservadas. Fonte: TU et al. (2003). B) Construção do gene e representação de seus produtos proteicos. A – construção do gene com as enzimas de restrição e os códons da sequência flexível de glicinas e serinas. B – representação do produto da expressão das duas regiões unidas. C e D – representação dos produtos proteicos das regiões 1 e 2, respectivamente, quando expressas individualmente.....35

FIGURA 2 (Fig.2) - A) Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo com resultado da digestão para a confirmação do inserto de pAE-*sapAn78*. Linhas 1-3- clone 2, 3 e 17, respectivamente, digeridos com *XhoI* e *EcoRI*; linha 4- pAE linear; 5- pUC18-*sapAn78* linear; 6- marcador 1 kb (Thermo Scientific). B) Gel de SDS 12% corado com *Coomassie blue*. Linha 1: Marcador de massa molecular; linha 2: extrato de *E. coli* BL21(DE3) pLysS não transformada; linha 3: *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformada com rSapAn78 não induzida; linha 4: *E. coli* pLysS transformada com rSapAn78 induzida por 3 h com IPTG; linha 5: rSapAn78 purificada. C) *Western Blot* com anticorpo monoclonal anti-histidina. Linha 1: Marcador de massa molecular; linha 2: extrato de *E. coli* BL21(DE3) pLysS não transformada; linha 3: *E. coli* pLysS transformada com pAE-*SapAn78* após 3h de indução com IPTG; linha 4: rSapAn78 purificada.....35

FIGURA 3 (Fig.3) - A) *Dot blot* de análise da rSapAn78 purificada utilizando soro hiperimune produzido em coelho a partir da cepa padrão de *C. fetus* subsp. *venerealis* (ATCC 19.438). Linha 1: membrana com rSapAn78 purificada incubada com soro hiperimune do dia 0; linha 2: membrana com rSapAn78 purificada incubada com soro hiperimune do dia 36 do experimento; linha 3: membrana com *E.coli* BL21(DE3) pLySs não transformada com soro hiperimune do dia 36 do experimento, controle negativo. B) *Dot blot* de análise da rSapAn78 purificada utilizando soros de bovinos. Linha 1: membrana com rSapAn78 purificada incubada com soro fetal bovino; linha 2: membrana com *E.coli* BL21(DE3) pLySs não transformada incubada com soro fetal bovino, controle negativo; linha 3: membrana com rSapAn78 purificada incubada com soro de bovino vacinado para CGB; linha 4: membrana com *E.coli* BL21(DE3) pLySs não transformada incubada com soro de bovino vacinado para CGB. C) *Western Blot* de análise da rSapAn78 com soros bovinos e anticorpo secundário anti-IgG de bovinos conjugado com peroxidase. Linha 1: Marcador de massa molecular; linhas 2 e 3: soros de bovinos vacinados para CGB ; linhas 4 a 7: soro de bovinos negativos para CGB.....36

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C Graus Celsius
AUC *area under the ROC curve* (área sob a curva ROC)
CGB campilobacteriose genital bovina
CaCl₂ Cloreto de cálcio
DAB diaminobenzidina
DNA Ácido Desoxirribonucléico
EBI *European Bioinformatics Institute*
EDTA Ácido etileno diamino
ELISA *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)
h Hora
H₂S Sulfeto de hidrogênio
IFD Imunofluorescência Direta
IgA Imunoglobulina A
IgG Imunoglobulina G
IPTG isopropil-tio-β-D-galactosídeo
kDa QuiloDalton
LB Luria Bertani
mg Miligrama
mL Mililitro
mM Milimolar
M Molar
Níquel Ni⁺²
nm nanômetros
OD *Optical density* (Densidade óptica)
OPD *o-phenylenediamine*
PBS *Phosphate buffered saline* (Salina tamponada em fosfato)
PBS-T *Phosphate buffered saline- Tween*
PCR *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH Potencial hidrogeniônico
rpm rotações por minuto
s Segundos
Sap *Surface array protein* (proteína de superfície)
UFC Unidade Formadora de Colônia
µg Micrograma
µL Microlitro
µm Micromêtro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 <i>Campylobacter fetus</i>	11
2.1.1 Fatores de virulência.....	12
2.1.1.1 Proteínas de superfície.....	13
2.2 Campilobacteriose genital bovina	15
2.3 Resposta imune à CGB	17
2.4 Diagnóstico da CGB	18
2.4.1 Isolamento e identificação do agente.....	20
2.4.2 Imunofluorescência direta.....	21
2.4.3 Identificação molecular de <i>C. fetus</i>	21
2.4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	23
2.5 Diagnóstico Diferencial	24
3 CAPÍTULO 1 - PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE DE PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE <i>Campylobacter fetus</i>	25
Abstract.....	26
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Material e Métodos.....	27
Resultados.....	29
Discussão.....	29
Conclusões.....	30
Referências.....	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino do mundo, com 217 milhões de cabeças (FAO, 2013) e ocupa as posições de terceiro produtor mundial de carne bovina (FAO, 2012), além de estar entre os maiores produtores mundiais de leite e exportadores de carne bovina. A produção de leite no Brasil também é destaque, com 32 milhões de litros em 2013 (FAO, 2012). Sendo assim, a pecuária bovina no Brasil apresenta uma grande importância econômica, contudo elevados índices produtivos nem sempre são alcançados devido às falhas reprodutivas decorrentes de problemas nutricionais, de manejo, genéticos e sanitários.

Segundo Bellows, Ott e Bellows (2002), as doenças reprodutivas resultam em perdas econômicas na criação de bovinos, principalmente causadas pela diminuição da produção e retardo na reprodução, bem como pelo aumento nos custos dos tratamentos preventivos. Algumas dessas enfermidades são causadas por agentes patogênicos exclusivamente venéreos, nesta categoria se encaixa a campilobacteriose genital bovina (CGB). A CGB é responsável por extensos problemas reprodutivos em países onde a doença é endêmica (MSHELIA et al., 2012), por ocasionar infertilidade e abortos (GIVENS, 2006).

Em rebanhos de corte, quando não há controle dos índices zootécnicos, as perdas reprodutivas com a CGB podem ficar despercebidas inicialmente (BONDURANT, 2005). Já em bovinos de leite, Roberts (1986 apud AKHTAR et al., 1993) afirma que a primeira indicação de doenças venéreas no rebanho é o aumento de intervalos entre partos-concepção ou do repasse com touro até a prenhez, além da produção de leite reduzir 7% em vacas positivas para *C. fetus* quando comparadas com vacas negativas (AKHTAR et al., 1993).

A CGB é uma doença infecciosa de transmissão sexual, causada pela bactéria *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*, apresenta distribuição mundial e pertence à lista de doenças de notificação obrigatória ao comércio internacional de animais ou produtos de origem animal da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2015).

Conforme a OIE as técnicas para o diagnóstico de *C. fetus*, são o seu isolamento em meio de cultura e

identificação por testes bioquímicos; imunofluorescência; ensaios imunoenzimáticos (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e identificação molecular (OIE, 2008). Uma vez que o habitat natural do *C. fetus* subsp. *venerealis* é o trato genital bovino, as amostras preconizadas para estes diagnósticos são muco vaginal, esmegma prepucial e sêmen, placenta e fetos abortados (OIE, 2008). Devido às dificuldades na coleta desse material e no armazenamento correto, assim como a baixa disponibilidade de laboratórios capazes de realizar o diagnóstico recomendado para *C. fetus*, poucas amostras são encaminhadas para diagnóstico e a prevalência da CGB é subestimada (HUM et al. 1997, BONDURANT 2005, VAN BERGEN et al. 2005a, ALVES et al. 2011). Além disso, o diagnóstico convencional da CGB normalmente é laborioso e demorado. Uma particularidade da CGB é a persistência de *C. fetus* no aparelho genital de bovinos infectados por longos períodos e esta é associada às falhas nos mecanismos de defesa e estas se devem principalmente pela variação nas proteínas de superfície do micro-organismo (CORBEIL et al., 1975; FAGAN & FAIRWEATHER, 2014). Essas proteínas de superfície (Surface Array Proteins - Sap) compõem externamente o envelope celular do *C. fetus* com importante papel na patogênese da CGB (MCCOY et al., 1975; WINTER & CAVENEY, 1978; FAGAN & FAIRWEATHER, 2014).

Devido às dificuldades envolvidas no diagnóstico convencional da CGB, métodos alternativos para diagnóstico, baseados em amostras de mais fácil colheita vêm sendo estudados nos últimos anos. ZHAO e colaboradores (2010) desenvolveram um ELISA indireto com proteína recombinante, obtendo bons resultados. Esta técnica é simples, de rápida execução e de baixo custo, bem como pode ser utilizada em larga escala (Crowther 2001).

A disponibilidade de métodos sorológicos para detecção da CGB pode facilitar o diagnóstico convencional da enfermidade e com base no conhecimento das características da proteína SapA, o presente estudo objetiva a produção, caracterização e verificação do potencial de uma nova proteína recombinante tendo em vista o desenvolvimento de um teste diagnóstico sorológico para CGB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Campylobacter fetus*

Ao gênero *Campylobacter* pertencem espécies de bactérias causadoras de enfermidades em humanos e animais, sendo que nos animais domésticos são encontradas no trato genital e intestinal (VÉRON & CHATELAIN, 1973; SKIRROW, 1994; QUINN et al., 2011). Esses micro-organismos são bacilos Gram-negativos curvos com 0,2 a 0,5 µm de largura, móveis com flagelos polares, oxidase positiva e com reações de catalase variáveis (VAN BERGEN, 2005; QUINN et al., 2011). Microaerófilos, geralmente requerem concentrações de oxigênio entre 3 e 15% e concentrações de dióxido de carbono de 3 a 5%; apenas algumas espécies são aerotolerantes e podem crescer na presença de oxigênio (HOLT et al., 1994). Geralmente *Campylobacter fetus* cresce em temperaturas entre 25 °C e 37 °C, mas não em 42 °C (VAN BERGEN, 2005) e são fastidiosos.

Dentre as espécies do gênero *Campylobacter*, *C. fetus* é bastante estudado como patógeno em bovinos e ovinos e subdivide-se em duas subespécies pelas características de habitat, transmissão, manifestação clínica e identificação fenotípica laboratorial, *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* (VÉRON & CHATELAIN, 1973). Estes são fenotipicamente diferenciados, conforme Holt et al. (1994), com testes de tolerância a glicina 1% e produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), sendo *C. fetus* subsp. *fetus* positivo em ambos os ensaios (isto é, são tolerantes à glicina e produzem H₂S), e *C. fetus* subsp. *venerealis* é negativo em ambos os testes. *C. fetus* subsp. *venerealis* ainda apresenta um biovar, classificado por características bioquímicas, denominado *C. fetus* subsp. *venerealis* biovar Intermedius (VÉRON & CHATELAIN, 1973).

C. fetus subsp. *fetus* é comensal do trato gastrointestinal, sendo agente de aborto em ovinos e abortos esporádicos em bovinos (FLORENT, 1959 apud SKIRROW, 1994), enquanto *C. fetus* subsp. *venerealis* é encontrado exclusivamente no trato genital de bovinos e relacionado com infertilidade e abortos, sendo de transmissão exclusivamente venérea (HUM, QUINN & KENNEDY, 1994).

A variação no antígeno O do lipopolissacarídeo (LPS) é a base do esquema de sorotipagem de *C. fetus* e dois principais sorotipos, denominados A e B, são reconhecidos (DWORKIN, TUMMURU & BLASER, 1995; PEREZ-PEREZ, BLASER & BRYNER, 1986; TU, HUI & BLASER, 2004; VAN BERGEN, 2005). *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* possui os sorotipos A e B e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* somente o sorotipo A.

2.1.1 Fatores de virulência

As pesquisas atuais sobre a patogenicidade de espécies de *Campylobacter* concentram-se em análise genômica para a identificação de genes de virulência (FOUTS et al., 2005; MOOLHUIJZEN et al., 2009). Nas subespécies de *C. fetus*, conforme Moolhuijzen et al. (2009), estes fatores de virulência foram claramente identificados como classes de genes codificadoras de proteínas que correspondem à fatores de virulência, tais como de proteínas de superfície, aderência bacteriana, motilidade, toxina e resistência, sistemas de regulação e secreção.

A ligação de patógenos bacterianos às células epiteliais é um pré-requisito para a invasão de células hospedeiras e subsequente translocação para as camadas mais profundas da mucosa. A forma espiral da célula e a motilidade saca-rolhas conferida pelo flagelos de *C. fetus* são necessários para colonizar e atravessar a barreira de muco que cobre o epitélio (SPRENGER, ZECHNER & GORKIEWICZ, 2012). O flagelo foi demonstrado ser um importante adesina de *C. jejuni* e pode ter uma função semelhante em *C. fetus*. Os genomas das duas subespécies de *C. fetus* alberga homólogos da adesina PEB1, que é um proteína de membrana exterior e importante na aderência às células epiteliais (SPRENGER, ZECHNER & GORKIEWICZ, 2012).

C. fetus subsp. *venerealis* tem um tropismo particular por células de bovinos, o que pode ser devido à uma ilha genômica original nesta subespécie que contém os genes que codificam os componentes de um sistema de secreção de tipo IV (GORKIEWICZ et al., 2010). Supõe-se que esta ilha foi originalmente adquirida

como um elemento genético móvel e esta aquisição pode ter sido importante para o desenvolvimento do tropismo de *C. fetus* subsp. *venerealis* pelo trato genital bovino.

Abril e colaboradores (2007) relataram a presença de uma sequência de inserção original (*ISCef1*), altamente conservada em *C. fetus* subsp. *venerealis* e relacionada com a tolerância à glicina, com potencial para se diferenciar as subespécies e auxiliar no entendimento da evolução e patogênese.

McCoy e colaboradores (1975) foram os primeiros a descrever a presença de uma microcápsula denominada camada S, que é formada por arranjos de subunidade de peptídeos conhecidos como proteínas Sap (*Surface array proteins*). Estas compõem externamente o envelope celular do *C. fetus* e são reconhecidas como importantes na patogênese da CGB (MCCOY et al., 1975; WINTER & CAVENEY, 1978; FAGAN & FAIRWEATHER, 2014). Devido a isso são candidatas potenciais para o desenvolvimento de métodos sorológicos de diagnóstico e, segundo Pei et al. (1988), para utilização em vacinas.

2.1.1.1 Proteínas de superfície

As proteínas de superfície (camada S) são algumas das proteínas mais abundantes na célula bacteriana (SLEYTR & BEVERIDGE, 1999) e compõem externamente o envelope celular (VAN BERGEN, 2005). São subunidades proteicas, em arranjos regulares e que recobrem o LPS da bactéria, tornando-o inacessível às defesas do hospedeiro (GARCIA et al., 1995). As subunidades da Sap são secretadas na ausência de uma sequência sinal N-terminal e ligam-se especificamente ao tipo A ou B do LPS de *C. fetus* (YANG et al., 1992; VAN BERGEN, 2005), sendo esta também uma forma de classificação da espécie.

As proteínas de superfície (*Surface array protein* - Sap) de *C. fetus*, também conhecidas como *S-layer*, demonstram ser responsáveis pela resistência deste micro-organismo à atividade bactericida e fagocítica do hospedeiro (MCCOY et al., 1975; BLASER, 1993; RAY et al., 2000), além de sua localização superficial sugerir que é um importante mediador na interação com o hospedeiro (BLASER & GOTSCHLICH, 1990) e na persistência do patógeno no trato reprodutivo (CORBEIL

et al., 1975). Algumas espécies de bactérias apresentam variação genética na expressão da Sap e o melhor exemplo desta situação é *C. fetus*, no qual a variação de camada S é muito bem caracterizada (FAGAN & FAIRWEATHER, 2014).

Um aspecto particular das proteínas de superfície em *C. fetus* é o fato de que uma única bactéria pode produzir até três proteínas, com massa molecular variando de 97 a 149 kDa, sendo normalmente uma destas dominante (PEI et al., 1988; DUBREUIL et al., 1990; FUJIMOTO et al., 1991; DWORKIN, TUMMURU & BLASER, 1995a; DWORKIN, TUMMURU & BLASER, 1995b). As proteínas preditas demonstram altos níveis de identidade nos aminoácidos na região aminoterminal, mas apresentam variação na região carboxiterminal, a ligação ao LPS ocorre na região conservada (SPRENGER, ZECHNER & GORKIEWICZ, 2012).

Em estudos recentes, TU et al. (2003) determinaram a existência de oito cópias homólogas completas do gene *sapA* e uma cópia homóloga parcial no cromossomo bacteriano. Conforme Tummuru & Blaser (1992), a expressão dos homólogos de *sap* ocorre a partir de um único promotor e este tem sua atividade reduzida em 32°C quando comparada com 37°C, sugerindo que a expressão da Sap seja mais eficiente nas condições ambientais do hospedeiro (SPRENGER, ZECHNER & GORKIEWICZ, 2012; KIENESBERGER et al., 2010).

Durante a infecção ocorrem amplos rearranjos cromossômicos de alta frequência no DNA, que envolvem inversão e recombinação para a mudança fenotípica e expressão de Sap homólogas alternadas na superfície da célula, o que resulta em uma camada S antígenicamente distinta (TUMMURU & BLASER, 1993; BLASER et al., 1994; TU, HUI & BLASER, 2001; VARGAS et al., 2002). Vargas e colaboradores (2002) encontraram variações de exibição nos padrões eletroforéticos de Sap após diferentes amostragens em todos *C. fetus* subsp. *venerealis* isolados de bovinos com infecções persistentes. Isso decorre da modificação em epítomos dominantes durante a persistência da bactéria no aparelho genital (WANG et al., 1993; GARCIA et al., 1995).

Assim, denota-se a importância das proteínas de superfície para *C. fetus* subsp. *venerealis* e para a manutenção da CGB nos rebanhos bovinos.

2.2 Campilobacteriose Genital Bovina

A CGB é responsável por perdas econômicas com descarte e necessidade de reposição de animais subférteis (fêmeas repetidoras de cio e touros contaminados), custo de sêmen, queda na produção de bezerros e aumento do intervalo entre partos (BELLOWS, OTT & BELLOWS, 2002; BONDURANT, 2005). Na Nigéria, Mshelia e colaboradores (2012) afirmam que aproximadamente 520 mil bovinos são afetados pela CGB com prejuízo direto de 8,5 milhões de dólares pelos abortos e baixa fertilidade.

A enfermidade é de distribuição mundial, com incidência elevada nos países em desenvolvimento, onde a reprodução natural dos animais é amplamente praticada (MSHELIA et al., 2010). Dados recentes da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2014) mostram a presença da CGB em países como Argentina, Brasil, Colômbia, Uruguai, Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido, África do Sul e Irã.

No Brasil, a CGB é considerada uma importante causa de falhas reprodutivas nos rebanhos bovinos (FIGUEIREDO et al. 2002; VARGAS et al. 2002, LEAL et al., 2012), principalmente por ocasionar, segundo Givens (2006), infertilidade temporária e morte precoce do feto ou embrião (geralmente entre o 30º e 70º dias de gestação). A prevalência da CGB em bovinos de corte no ano de 2000 em 12 estados brasileiros com a maior produção de bovinos do país foi estimada como atingindo 19,7% dos animais em 50,8% das propriedades criadoras (MIRANDA, 2005). No entanto, esta doença permanece subdiagnosticada nos rebanhos, isto por causa da ausência de diagnóstico sistemático, associado às dificuldades de colheita, envio e análise laboratorial de amostras clínicas e ao pequeno número de laboratórios com capacidade técnica para a realização do diagnóstico (ALVES et al., 2011).

Os fatores de risco considerados mais importantes para a ocorrência de CGB são a utilização de monta natural como manejo reprodutivo (MSHELIA et al., 2012), uso de touros com idade superior a 4-5 anos de idade e presença de touros sem controle sanitário para CGB (HOFER, 1981; BONDURANT, 2005), a utilização de touros de repasse (STYNEN et al., 2003) e sêmen sem controle de qualidade (BONDURANT, 2005).

A história clínica é de rebanhos com baixas taxas de concepção, sendo que nos recentemente expostos à CGB estas podem ser 50% mais baixas do que a taxa esperada, conforme Dedie et al. (1982 apud BONDURANT, 2005). Novilhas e vacas recém introduzidas no rebanho são os principais grupos de risco, nas quais os sinais clínicos são mais acentuados devidos aos baixos níveis de imunidade (HOFFER, 1981).

Em criações de bovinos de corte, segundo Miranda (2005), o sistema extensivo de produção aliado ao sistema de monta o ano inteiro, constitui importante fator para manutenção da doença, pois a disseminação da CGB em propriedades que utilizam a monta natural é dependente da porcentagem de touros infectados utilizados na monta e da relação touro/vaca (número de coberturas realizadas).

Em bovinos leiteiros é mais difundido o uso da inseminação artificial, entretanto muitas propriedades utilizam touros para repasse e Bondurant (2005) afirma que nesses casos a primeira indicação de doenças venéreas no rebanho é o aumento de intervalos entre partos-concepção ou o aumento do intervalo entre a colocação de vacas no repasse com touro até a prenhez.

Em touros, a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* não está associada à manifestação de sinais clínicos, alterações na qualidade do sêmen ou anormalidades genitais (BIER et al., 1977b) e o micro-organismo abriga-se nas criptas epiteliais do prepúcio. A transmissão para as fêmeas é no momento da monta natural com touro infectado ou inseminação artificial com sêmen contaminado e a bactéria distribui-se na mucosa da vagina, cérvix, útero e tubas uterinas (BONDURANT, 2005). Cerca de um terço das vacas infectadas tornam-se portadoras (QUINN et al., 2011) e o macho se contamina através da monta com vacas doentes (HOFFER, 1981).

O micro-organismo coloniza persistentemente a cavidade prepucial do touro, impedindo-o de elaborar uma resposta imunitária eficaz e assim este permanece como portador assintomático (VAN BERGEN, 2005). Touros velhos (acima dos 5 anos), segundo Samuelson & Winter (1966 apud HOFFER, 1981), apresentam maior probabilidade de serem portadores pois têm pregas prepuciais mais profundas onde os agentes encontram condições favoráveis e se albergam. A infecção pode persistir por meses a anos em touros velhos (BIER et al., 1977b).

Após a monta estabelece-se uma infecção ascendente nas fêmeas e em 12 a 14 dias o micro-organismo distribui-se desde a vagina/cérvix até aos cornos uterinos (CORBEIL, 1999; BONDURANT, 2005; YAEGER & HOLLERY, 2007), com o desenvolvimento de endometrite e salpingite durante a fase progestacional do ciclo estral, quando ambos os números e a atividade de neutrófilos declinam (VAN BERGEN, 2005; QUINN et al., 2011). *C. fetus* subsp. *venerealis* não interfere com o processo de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, entretanto a endometrite impede a implantação do embrião (HOFFER, 1981), seguindo-se a mortalidade embrionária precoce. Após a invasão uterina, em um período de 3 a 6 meses, a vaca pode permanecer permanece infértil e fonte de infecção (VAN BERGEN, 2005) e após a imunidade natural pode se desenvolver.

2.3 Resposta imune à CGB

A imunidade predominante em animais infectados por *C. fetus* é local (CORBEIL et al., 1974b), sendo relatadas diferenças entre machos e fêmeas nos estudos imunológicos realizados.

Nas fêmeas, quarenta a 60 dias após a infecção inicia-se a produção de anticorpos na vagina e útero (CORBEIL et al., 1974b). Nas secreções prepuciais de touros sadios predomina IgG seguida de IgA (BIER et al., 1977a), mas em touros infectados com *C. fetus* subespécie *venerealis* a resposta de anticorpos séricos foi indetectável (VASQUEZ et al., 1983) e a infiltração de linfócitos e células plasmáticas subepiteliais é semelhante no prepúcio e pênis de touros infectados e não infectados (BIER et al, 1977a; SAMUELSON E WINTER, 1966 apud HOFFER, 1981).

Segundo Corbeil (1999), na vagina predomina a IgA e esta pode limitar a disseminação da infecção; já no útero são produzidas IgGs e estas opsonizam os organismos patogênicos, facilitando a fagocitose pelos neutrófilos e células mononucleares.

Como a CGB é causada por um agente patogênico extracelular seria esperado encontrar predominantemente uma resposta imune humoral a partir do

hospedeiro (CORBEIL et al., 1974b) e é provável que o tipo de resposta humoral é responsável pela curta duração da imunidade (BONDURANT, 2005).

A situação de vacas portadoras se deve à evasão da resposta imune local, a qual Corbeil (1999) atribui à fatores como a relativa falta de resposta espontânea de IgG na vagina, possível bloqueio dos efeitos da IgG vaginal por ligação de IgA nos micro-organismos e também pela variação dos antígenos de superfície do micro-organismo frente à resposta imune local. Nos touros as infecções são persistentes e este é um portador assintomático, indicando que a imunidade durante a inflamação não elimina os micro-organismos da mucosa (COBO, CORBEIL & BONDURANT, 2011).

Uma vez determinado o estado de portador vaginal prolongado para *C. fetus* subsp. *venerealis*, a vaca permanece com a vagina infectada, mas o útero estará livre da infecção (BONDURANT, 2005). Isso possibilita o retorno da fertilidade na vaca, em muitos casos, e pode ter a duração de até 2 anos, na ausência de maior estimulação antigênica (CORBEIL et al., 1974b). Nos touros, a persistência da bactéria no trato genital inferior também é atribuída à evasão da resposta imune (CORBEIL et al., 1975; VARGAS et al., 2002).

A redução de fertilidade no rebanho não é visível de imediato e a sua suspeita só se verifica depois de calculada a taxa de gestação ou durante a época de partos, quando estes se estendem por um longo período (BONDURANT, 2005).

2.4 Diagnóstico da CGB

As subespécies de *C. fetus* mostram diferentes adaptações ao tecido hospedeiro, no entanto, em nível genético elas são praticamente indistinguíveis (MOOLHUIJZEN et al., 2009). Poucos genes alvos foram definidos para a diferenciação das subespécies de *C. fetus*, com membros das subespécies mostrados com 86% de semelhança com base em perfis de PFGE-DNA (ON & HARRINGTON, 2001). Outra maneira de diferenciar as subespécies é com a utilização de genes de rRNA 16S, uma vez que estas são sensíveis a pequenas mutações, permanecem focos para variações e são reguladores evolutivos úteis

para estimar as relações entre organismos (HANSSON et al., 2008; RASKIN et al., 2006). Alinhamento de sequências revelou que o genoma das subespécies de *C. fetus* são altamente sintênicos, com 92,9% de identidade média (KIENESBERGER et al., 2014).

Para o diagnóstico laboratorial da CGB é necessário a colheita de material dos animais suspeitos. Conforme manual da OIE (2008), em touros são preconizadas amostras de esmegma ou lavado/raspado prepucial e do sêmen e das fêmeas amostras do muco cérvico-vaginal. Além destes, amostras de fetos abortados e placenta também podem ser colhidos.

Nas fêmeas, pode ser colhido muco cervico-vaginal com pipeta de inseminação ou tampão absorvente (STYNEN et al. 2003; OIE, 2008). As amostras prepuciais dos touros podem ser obtidas por raspagem, aspiração ou lavagem com solução salina estéril (OIE, 2008). Um aspecto importante a ser observado, conforme Skirrow e Bondurant (1988), é a manutenção dos touros em repouso sexual por 7 a 15 dias antes da colheita do material e que três coletas, com os mesmos intervalos e ainda com o animal em descanso sexual, devem ser realizadas para se aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

Segundo a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2008), a utilização de um meio de transporte é essencial para que as amostras que não serão processadas em laboratório no mesmo dia da coleta possam permanecer viáveis. Meios de transporte enriquecidos (Lander, Foley e Clark) são indicados para transportar as amostras e quando não há disponibilidade destes meios deve-se colocar o material colhido em recipiente isolado (temperaturas 4-10°C) e protegidas da luz.

As técnicas para o diagnóstico de *C. fetus*, conforme a Organização Mundial da Saúde Animal (2008), são o isolamento em meio de cultura e identificação do agente, imunofluorescência, testes imunoenzimáticos (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Ensaio imunoenzimático) e identificação molecular.

2.4.1 Isolamento e identificação do agente

O isolamento e identificação de *C. fetus* por cultivo microbiológico é considerado padrão para diagnóstico da infecção (BROOKS et al., 2004). Entretanto, o mesmo depende da qualidade de colheita da amostra, da forma como a mesma é enviada ao laboratório e da viabilidade do micro-organismo. Espécies de *Campylobacter*, segundo Quinn et al. (2011), são estritamente microaerófilas e *C. fetus* é de crescimento fastidioso, exigindo condições atmosféricas estritas para o cultivo e também meios seletivos e de enriquecimento.

A discriminação de isolados nas subespécies, conforme Quinn et al. (2011), é baseada na morfologia colonial e em certas propriedades bioquímicas e suscetibilidade à antimicrobianos. Conforme van Bergen et al. (2005a), coloração de Gram, teste de catalase e atividade de oxidase são os testes mais frequentemente utilizados nos laboratórios de diagnóstico, seguidos pelo teste de motilidade. Ainda, a diferenciação bioquímica de subespécies de *C. fetus* conforme o Manual Bergey's (HOLT et al., 1994), é principalmente pela sensibilidade aos antimicrobianos (cefalotina e ácido nalidíxico), o crescimento em 25°C e 42°C e na presença de cloreto de sódio 3,5%, pela produção de H₂S e a tolerância à glicina 1%, sendo esta última a prova padrão para diferenciação das subespécies (VAN BERGEN et al., 2005a).

Entretanto, vários pesquisadores relatam dúvidas quanto à diferenciação pelos testes fenotípicos acima citados (VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS et al., 2014). Primeiramente, *C. fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius* é tolerante à glicina (característica antes atribuída somente à *C. fetus* subsp. *fetus*). Chang e Ogg (1971) mostraram que a resistência da glicina pode ser influenciada pela transdução de tolerância à glicina por fagos. Quanto à resistência aos antimicrobianos, Vargas e colaboradores (2003) afirmam que este caráter pode ser adquirido através de transdução ou mutações.

Como o isolamento e identificação são difíceis e exigem meios de cultivo e atmosfera especiais, são poucos os laboratórios de diagnóstico rotineiro de *C. fetus*. Além disso, van der Graaf-van Bloois (2014) e colaboradores relatam em seu estudo a inconsistência entre fenótipos e características genômicas de amostras de *C.*

fetus, estimulando uma avaliação crítica da relevância clínica de identificação de subespécie de *C. fetus* por testes fenotípicos. Por isso, algumas técnicas como imunofluorescência direta (IFD) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são também utilizadas para detecção da CGB combinadas com isolamento microbiológico (VAN BERGEN et al., 2005a).

2.4.2 Imunofluorescência direta

A IFD pode ser aplicada para diagnóstico direto do micro-organismo a partir de amostras ou para confirmar a identificação de micro-organismos após o isolamento (VAN BERGEN et al., 2005a; OIE, 2008). É utilizada geralmente como teste de triagem em amostras prepuciais (CIPOLLA et al., 2001).

No estudo de Figueiredo et al. (2002), a IFD demonstrou bom limite de detecção (100 UFC/mL) em lavados prepuciais, boa sensibilidade e especificidade. Estes resultados provam o uso de IFD como uma importante técnica de suporte para o controle da CGB. Na Argentina, devido à implantação de um plano sanitário nacional para controlar doenças venéreas em bovinos a partir de 1983, há em torno de 30 laboratórios que utilizam principalmente IFD para diagnosticar a CGB a partir de amostras de touros (CIPOLLA et al., 2001). Esse plano sanitário obteve êxito no controle da enfermidade, dada a redução na percentagem de CGB em rebanhos de carne de cerca de 50% em 1983 para cerca de 15-18% no período 1997-1999 (CIPOLLA et al., 2001).

A IFD não foi amplamente avaliada e os problemas relatados são quanto à resultados falso-positivos devido à fluorescência inespecífica, pouca disponibilidade de conjugado e a incapacidade para diferenciar as subespécies de *C. fetus*. Além disso, os técnicos devem ser treinados e experientes para que o desempenho do teste não seja prejudicado pela subjetividade (FIGUEIREDO et al., 2002).

2.4.3 Identificação molecular de *C. fetus*

Os métodos de polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados para tipagem (AFLP) (WAGENAAR et al., 2001) e Tipagem de Sequências Multilocus (MLST) (VAN BERGEN et al. 2005b) diferenciam as duas subespécies (*fetus e venerealis*) de forma confiável, mas estes testes são trabalhosos e pouco práticos para uso rotineiro (VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS et al., 2013).

Uma plataforma preferida para o diagnóstico de rotina é a técnica de PCR, uma vez que este tipo de ensaio é rápido, simples e confiável. Uma série de ensaios de PCR tem sido desenvolvidos para identificar *C. fetus* (HUM et al., 1997; WANG et al., 2002; TU et al., 2005; VAN BERGEN et al., 2005b; MCMILLEN et al., 2006; ABRIL et al., 2007). Avaliação destas várias PCRs (VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS et al., 2013) demonstrou que só duas são válidas para identificação de *C. fetus* em termos de sensibilidade e especificidade, entretanto necessitam do isolamento da bactéria ou do cultivo da amostra em meio de enriquecimento para extração do DNA.

Também foram desenvolvidos e são utilizados ensaios de PCR multiplex (HUM et al., 1997) e PCR em tempo real com sondas específicas (MCMILLEN et al., 2006), capazes de diferenciar as duas subespécies.

Chaban e colaboradores (2012) utilizaram os iniciadores do PCR convencional de Hum et al. (1997) aplicados à uma plataforma de PCR em tempo real quantitativo para processamento direto de amostras prepuciais, visando melhorar o ensaio original que tinha como fatores a baixa sensibilidade analítica. O teste desenvolvido demonstrou-se sensível e de baixo custo, entretanto o processamento das amostras prepuciais para detecção direta é laborioso.

Visando a diferenciação das subespécies de *C. fetus*, McGoldrick e colaboradores (2013) adequaram alguns métodos de PCR já publicados (HUM et al., 1997; CASADEMONT, CHEVRIER & GUESDON, 1998; MCMILLEN et al., 2006; ABRIL et al., 2007) para PCR em tempo real e aprovaram dois destes como complementares na rotina de caracterização das subespécies quando há dúvidas nos ensaios recomendados pela OIE (2008).

2.4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Estudos anteriores para melhorias no diagnóstico da CGB contavam com ELISA para detecção de IgA em amostras como muco cervical, aspirado prepucial e conteúdos de fetos abortados (HEWSON, LANDER & GILL, 1985; HUM et al., 1994; DEVENISH et al., 2005; MSHELIA et al., 2010; PELLEGRIN et al., 2011). Esses anticorpos foram escolhidos porque persistem por mais tempo e sua concentração permanece constante no trato genital por muitos meses (HUM et al. 1994). Entretanto, problemas com sensibilidade e especificidade foram relatados por Hum e colaboradores (1994) com ELISA para detecção de IgA, no qual utilizou o muco vaginal de fêmeas bovinas com suspeita de infecção pelo *C. fetus*.

Brooks et al. (2004) e Devenish et al. (2005) utilizaram anticorpos monoclonais contra o antígeno O do LPS de *C. fetus*, em ELISA de captura, mas não obtiveram bom limite de detecção (10^5 a 10^7 UFC/mL), tornando esta técnica com anticorpos monoclonais viável somente com um período de enriquecimento da amostra de 4 a 5 dias.

Os antígenos utilizados para sensibilizar as placas eram a bactéria íntegra ou obtidos por extração ácida dos cultivos de *C. fetus* com a utilização de tampão glicina. Entretanto, essas amostras não são de fácil obtenção e há resultados falso-positivos. Os principais problemas relativos às técnicas de ELISA desenvolvidas são limitações na sensibilidade e/ou especificidade.

Zhao et al. (2010) desenvolveram e avaliaram um ELISA indireto altamente específico (94,3%) e sensível (88,6%) para a detecção de anticorpos IgG contra *C. fetus* em soros de bovinos validando como antígeno proteínas recombinante SapA-N e SapA-C codificadas. Estes pesquisadores obtiveram sucesso na escolha da região N-terminal da proteína SapA de uma cepa de campo, constatando sua imunodominância e a presença de múltiplos epítomos antigênicos relatados por Wang et al. (1993).

2.5 Diagnóstico Diferencial

Outros agentes transmitidos por contato sexual ocasionam problemas reprodutivos nos rebanhos e devem ser considerados para finalizar o diagnóstico. O protozoário *Tritrichomonas foetus*, responsável pela tricomonose genital bovina, causa doença com aspectos semelhantes à CGB e deve ser investigado como diagnóstico diferencial (BONDURANT, 2005). Além deste, Bondurant (2005) e Givens (2006) citam que há *Haemophilus somnus*, *Ureaplasma* e outros *Mycoplasmas* e em algumas condições especiais, *Leptospira* spp, *Brucella abortus* e doenças víricas como Diarreia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina causando infertilidade e/ou abortos em rebanho bovinos. Nestes casos, sinais clínicos e características epidemiológicas devem ser levados em consideração com os resultados de análises laboratoriais (GIVENS, 2006). Outro micro-organismo bastante semelhante ao *Campylobacter* no cultivo microbiológico, porém com crescimento em aerobiose, é o *Arcobacter* sp. (ETONSI, 2013) Este último agente, embora tenha sido isolado algumas vezes a partir de casos de aborto bovino (NEILL et al., 1985; FERNANDEZ et al., 1995), também foi recuperado a partir de lavados prepuciais de bovinos (GILL, 1983 apud ETONSI, 2013) e de suabes vaginais de vacas sem problemas reprodutivos observáveis (KABEYA et al., 2004). Portanto, em situações de cultivo microbiológico de amostras de animais suspeitos de CGB deve-se incluir *Arcobacter* sp. como diagnóstico diferencial.

3 CAPÍTULO 1

Produção e caracterização de uma quimera recombinante de proteína de superfície de *Campylobacter fetus*

Cláudia Balzan; Gustavo Moreira, Fabricio Rochedo Conceição, Agueda Castagna de Vargas

Artigo a ser submetido para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira

(ISSN 0100-736X)

Produção e caracterização de uma quimera recombinante de proteína de superfície de *Campylobacter fetus*

Cláudia Balzan, Gustavo Marçal Schmidt Garcia Moreira, Fabricio Rochedo Conceição, Agueda Castagna de Vargas

ABSTRACT.- Balzan C & Vargas A.C. 2014. [**Production and characterization of a recombinant chimera protein of *Campylobacter fetus*.**] Produção e caracterização de uma quimera recombinante de proteína de superfície de *Campylobacter fetus*. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, prédio 44, sala 5137, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: agueda.vargas@gmail.com

Bovine genital campylobacteriosis (BGC) is an important venereal disease, caused by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and related economic losses since it cause reproductive problems in cattle herds. In order to facilitate the laboratory diagnosis of BGC, which involves labor - intensive procedures for collecting and processing the samples, this study aimed to standardize the production of a recombinant chimeric protein and also evaluate its use as a tool for diagnosis of BGC in herds. SapA is a surface protein important for the pathogenesis of this bacterium by presenting antigenic variation. The conserved region of nine homologous sequences of *C. fetus sapA* gene publicly available was used to design a chimeric synthetic gene, called sapAN78, with 1587 bp. The fragment was cloned into pAE plasmid and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. The recombinant chimera (≈ 60 kDa) was obtained as inclusion bodies, solubilized in a buffer containing urea and purified by nickel affinity chromatography (Ni^{+2}). The protein was recognized by Western blotting with monoclonal polyhistidine antibodies and with sera from CGB vaccinated cattle and by Dot blotting using bovine sera and hyperimmunesera produced in rabbits. Thus, the expression and characterization of the surface protein, recognized as important in the development and maintenance of the BGC in herds, in the recombinant form and use it to diagnose may become more practical and accessible. Considering these results, this new protein has potential application in less laborious diagnostic methods for the detection of bovine campylobacteriosis.

INDEX TERMS: Bovine venereal campylobacteriosis, surface array protein, prokaryotic expression, purification.

RESUMO.- [Produção e caracterização de uma quimera recombinante de proteína de superfície de *Campylobacter fetus*.] A campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma importante enfermidade de caráter venéreo, causada por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, que acarreta perdas econômicas por causar problemas reprodutivos nos rebanhos bovinos. Com o intuito de facilitar o diagnóstico laboratorial da CGB, que envolve procedimentos fastidiosos de coleta de material e de seu processamento, este estudo objetivou a padronização dos processos de produção de uma proteína quimérica recombinante e avaliação de seu potencial como ferramenta para um diagnóstico menos laborioso e que permita a detecção da CGB nos rebanhos. Esse patógeno possui proteínas de superfície (SapA), as quais são consideradas importantes na patogenia desta enfermidade por apresentar variação antigênica. Utilizando as sequências dos nove genes homólogos de *sapA* de *C. fetus* publicamente disponíveis, as regiões mais conservadas entre elas foram determinadas. Tais sequências foram usadas para desenhar um gene sintético quimérico, denominado *sapAN78*, de 1587 pb. O fragmento foi clonado no plasmídeo pAE e expresso em *Escherichia coli* BL21(DE3) pLySs. A quimera recombinante (≈ 60 kDa) foi obtida como corpos de inclusão, solubilizada em tampão contendo ureia e purificada por cromatografia de afinidade ao níquel (Ni^{+2}). Esta foi reconhecida por *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-polihistidina, por anticorpos presentes no soro de bovinos vacinados para CGB e por *Dot blot* a rSapAn78 foi reconhecida por soros de bovinos e soro hiperimune produzido em coelho. Assim, expressão e caracterização de uma proteína de superfície na sua forma recombinante para o diagnóstico desta enfermidade torna a análise das amostras mais prática e acessível. Considerando tais resultados, essa nova proteína possui potencial aplicação em métodos menos laboriosos de diagnóstico para a detecção de campilobacteriose em bovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: campilobacteriose genital bovina, expressão procariótica, purificação.

INTRODUÇÃO

A campilobacteriose genital bovina (CGB), causada pela bactéria *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*, é uma doença de transmissão venérea, responsável por grandes perdas econômicas em várias partes do mundo devido aos problemas reprodutivos (McCool et al. 1988, Pefanis et al. 1988, Caldwell & Taylor 1997, Pellegrin et al. 2002, Mshelia et al. 2012, Ziech et al. 2014). Em países com grandes rebanhos bovinos como o Brasil, onde o uso da monta natural é uma prática corrente, a CGB é considerada uma importante causa de falhas reprodutivas (Figueiredo et al. 2002, Vargas et al. 2002), principalmente por ocasionar infertilidade temporária e morte precoce do embrião ou feto (Givens 2006).

As técnicas para o diagnóstico de *C. fetus*, conforme a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE 2012) são o seu isolamento em meio de cultura e identificação; imunofluorescência; ensaios imunoenzimáticos (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e identificação molecular. As amostras preconizadas para estes diagnósticos são muco vaginal, esmegma prepucial e sêmen, placenta e fetos abortados, uma vez que o habitat natural do *C. fetus* subsp. *venerealis* é o trato genital bovino. Devido às dificuldades na coleta, bem como armazenamento incorreto e baixa disponibilidade de laboratórios capazes de realizar o diagnóstico recomendado para *C. fetus*, poucas amostras são encaminhadas para diagnóstico e a prevalência da CGB é subestimada (Hum et al. 1997, Bondurant 2005, van Bergen et al. 2005a, Alves et al. 2011). Além disso, o diagnóstico convencional da CGB normalmente é laborioso e demorado.

A persistência desta bactéria no aparelho genital de bovinos infectados é associada a falhas nos mecanismos de defesa contra *C. fetus*. As imunoglobulinas de classe G predominam no útero e debelam a infecção neste local, já as imunoglobulinas de classe A (IgA) predominam na cavidade vaginal não são eficientes no combate à bactéria (Corbeil et al. 1975). Assim, o micro-organismo permanece na cavidade vaginal por mais tempo e podem evadir-se do sistema imune através da alteração no perfil de expressão da proteína de superfície, possibilitando nova infecção no útero.

Essas proteínas de superfície (*Surface Array Proteins* - Sap) são subunidades proteicas com peso molecular que variam de 97 a 149 kDa, as quais compõem externamente o envelope celular do *C. fetus* com importante papel na patogênese da CGB (McCoy et al. 1975, Winter et al. 1978, Fagan & Fairweather 2014), uma vez que esta camada demonstra ser responsável pela resistência do micro-organismo à atividade bactericida e fagocítica do hospedeiro (Winter et al. 1978, Blaser 1993, Ray et al. 2000). Além disso, o perfil antigênico das Sap é alterado com alta frequência durante a infecção, dificultando a ação do sistema imune (Garcia et al. 1995, Vargas et al. 2002, Tu et al. 2003) e contribuindo para que esses antígenos sejam imunodominantes (Dubreuil et al. 1988, Dworkin & Blaser 1997).

Com base no conhecimento das características da proteína SapA, o presente estudo objetiva a produção, caracterização e verificação do potencial de uma nova proteína quimérica recombinante tendo em vista o desenvolvimento de um teste diagnóstico para CGB.

MATERIAL E MÉTODOS

Construção do gene sintético *sapAn78* e clonagem

O gene *sapAn78* foi elaborado tendo como base as sequências das proteínas SapA de *C. fetus*, depositadas no banco de dados *GenBank* (código de acesso: 28974206). Essas sequências foram alinhadas pela ferramenta *Clustal Omega* (EBI). Com o alinhamento, foram identificadas duas regiões de interesse para a construção do gene sintético: uma da porção N-terminal, comum a 8 das 9 variantes disponíveis no banco de dados, denominada região 1; e outra comum às variantes SapA7 e SapA8, denominada região 2 (Tu et al. 2003, Fig.1A). Entre a região codificadora dessas duas regiões, adicionou-se uma sequência que codifica um peptídeo flexível de 15 aminoácidos (Gly₄-Ser)₃. Além disso, foram incluídos os sítios de restrição *XhoI* e *EcoRI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente (Fig.1B). O desenho e avaliação das construções foram feitas utilizando o programa *VectorNTI*® 11.0 (Invitrogen®).

A sequência codificadora do gene construído foi sintetizada pela empresa Epoch Life Science (Missouri City, Texas, EUA) contendo códons preferenciais para expressão em *E. coli*, bem como os sítios de restrição já descritos. A partir do plasmídeo pUC18-*sapAn78* realizou-se a subclonagem no vetor de expressão pAE (Ramos et al. 2004) após a clivagem do gene e do vetor com as enzimas *XhoI* e *EcoRI* e ligação com T4 DNA ligase (Thermo Scientific), formando o plasmídeo pAE-*sapAn78*. Em sequência, a cepa *E. coli* TOP10 competente foi transformada por choque-térmico (Sambrook & Russel 2001) com pAE-*sapAn78* e cultivada em placa de Luria Bertania (LB) ágar com ampicilina (100 µg/mL) *overnight* a 37°C para triagem. Os clones bacterianos foram selecionados como recombinantes e o DNA plasmídeo foi extraído pelo método de lise alcalina (Sambrook & Russel 2001).

Expressão e purificação da proteína quimérica recombinante

O plasmídeo pAE-*sapAn78* purificado foi utilizado para transformar a cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS por choque-térmico, a qual foi cultivada em caldo LB com ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL) a 37°C sob agitação até atingir a densidade óptica relativa à metade da fase *log* ($DO_{600}=0,5-0,8$). Nesse ponto, a expressão foi induzida com IPTG para uma concentração final de 0,5 mM por 3 h a 37°C e 150 rpm. Inicialmente testou-se a expressão da quimera recombinante em 10 mL de LB caldo nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C. Após, o cultivo foi centrifugado (16.000g; 4°C; 10 min), o *pellet* foi suspenso em 20 mL de tampão de lise (NaH₂PO₄ 0,02 M; NaCl 0,5 M; Imidazol 20 mM) com 100 µg/mL de lisozima e incubado por 1 h a 4°C. As células foram rompidas por sonicação em três ciclos de 20 s e centrifugadas do mesmo modo. O sobrenadante foi recuperado por centrifugação (16.000g; 4°C; 15 min), o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de solubilização I (tampão de lise + 0,2% de N-lauril-sarcosina) e incubado em agitação por 12 h a 4°C. Repetiu-se esta etapa com tampão de solubilização II (tampão de lise + Ureia 8 M). Em cada processamento foi retirada uma alíquota dos sobrenadantes e estas amostras, juntamente com os extratos celulares totais da expressão, foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE).

As frações contendo a proteína rSapAn78 foram purificadas por cromatografia de afinidade com Ni⁺², em sistema manual, utilizando colunas *HisTrap™ FF crude* de 1mL (GE Healthcare). A quimera recombinante foi eluída com gradiente linear de 10 a 500 mM de imidazol e alíquotas de 3 mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 12% quanto a presença da mesma. Após a purificação, as frações que continham a rSapAn78 foram reunidas e submetidas à diálise. Optou-se por uma diálise lenta, realizada por um período de 5 dias a 4 °C contra tampão de lise com concentrações decrescentes de ureia (6-0 M), finalizando com a aplicação de PBS + Triton X-100 0,05% (v/v).

As amostras obtidas na purificação foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), comparando com uma curva padrão com albumina sérica bovina.

Análise por *Dot blot*

Soro hiperimune produzido em coelho a partir da cepa padrão de *C. fetus* subsp. *venerealis* (ATCC 19.438), soros de bovinos vacinados para CGB e soro de bovinos negativos para CGB foram utilizados para análise da rSapAn78 por *Dot blot*. Em membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, tamanho de poro 0,45 µm) foram colocados 7 µL do cultivo de *E. coli* pLysS como controle negativo e 7 µL da proteína purificada. Deixou-se a membrana secar e após esta foi incubada em 5% de leite desnatado em tampão fosfato solução salina com 0,05% de Tween 20 (PBS -T) por uma hora sob agitação em temperatura ambiente. Após lavagens com PBS-T, a membrana foi incubada com o anticorpo primário: soro hiperimune de coelho (dia 0 e dia 36 após inoculação); soro de bovinos (dois animais positivos para CGB e um animal negativo para CGB), ambos na diluição 1:100 por uma hora, sob agitação e em temperatura ambiente. Aplicou-se novamente as lavagens com PBS-T e após adicionou-se o anticorpo anti-IgG de coelho (Sigma, Estados Unidos) na diluição de 1:4000 ou anti-IgG de bovinos conjugado com peroxidase (Sigma, EUA) na diluição 1:15000, por uma hora sob agitação em temperatura ambiente. Lavou-se a membrana com PBS-T e a reação foi revelada com substrato diaminobenzidina (DAB; Sigma, Estados Unidos).

Análise por *Western blot*

Após eletroforese (SDS-PAGE), as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, tamanho de poro 0,45 µm) sob voltagem constante de 15 V por 1 h usando sistema semi-seco Trans-blot (Bio-Rad, EUA) e tampão de transferência Tris-glicina (Tris 25 mM, Glicina 0.2 M, metanol 20% [v/v]). A membrana foi então bloqueada por 1 h com 5% (m/v) de leite desnatado diluído em solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Em seguida, incubou-se a membrana por 4 h com os anticorpos primários: anticorpo monoclonal anti-polihistidina produzido em camundongo diluído 1:6000 em PBS-T (Sigma, EUA); soro de dois bovinos vacinados para CGB e soro de quatro bovinos negativos para CGB ambos diluídos 1:100 em PBS-T. Logo, os anticorpos secundários, anti-IgG de camundongos conjugado com peroxidase (Sigma, EUA) na diluição 1:4000 ou anti-IgG de bovinos conjugado com peroxidase (Sigma, EUA) na diluição 1:15000, foram incubados por 1 h. A reação foi revelada utilizando solução de diaminobenzidina (DAB). A etapa de bloqueio, bem como as de incubação com os anticorpos, foi seguida de 3 lavagens da membrana com PBS-T. Todo o procedimento foi conduzido a temperatura ambiente.

Amostras de soro

As amostras de soro de bovinos originaram-se de propriedades do Rio Grande do Sul e estavam armazenados no banco de soros do Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Santa Maria. A escolha destes soros foi de acordo com o histórico da propriedade disponível nos registros

do LABAC, observando-se o relato da CGB no rebanho, o manejo reprodutivo aplicado (monta natural e inseminação artificial) e a utilização ou não de vacina contra a CGB. O soro hiperimune produzido em coelho com a cepa ATCC 19.438 de *C. fetus* subsp. *venerealis* também faz parte do banco de soros do LABAC (Viana & Vargas 2006, dados não publicados). Todos os soros utilizados no trabalho haviam sido testados por soroaglutinação para *C. fetus* subsp. *venerealis* (Firehammer & Border 1986).

RESULTADOS

Clonagem, expressão e purificação da proteína quimérica recombinante

Após a digestão do plasmídeo pUC18-*sapAn78* com as enzimas *XhoI* e *EcoRI* foi possível observar uma banda de altura correspondente ao do gene desenhado (1600 pb).

Após purificar o gene e o vetor pAE da reação, ambos foram quantificados, ligados por T4 DNA ligase, usados para transformação por choque térmico *E. coli* TOP10 e triados quanto à presença de clones recombinantes contendo pAE-*sapAn78*. Desse modo, clones identificados como possíveis recombinantes foram cultivados para extração dos plasmídeos, os quais foram digeridos com *XhoI* e *EcoRI* para verificar a presença do inserto (Fig.2A, linhas 1, 2 e 3).

Utilizou-se a *E. coli* BL21(DE3) pLysS para expressão da proteína quimérica recombinante. Esta foi realizada inicialmente em 10 mL de LB caldo e analisou-se a influência de três diferentes temperaturas nesse processo, sendo as temperaturas de 25°C e 37°C as mais adequadas e nas quais obteve-se grande quantidade de proteína expressa. O processo foi repetido em 500 mL de LB caldo em 37°C e a 150 rpm. A expressão da proteína foi avaliada por SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie e verificou-se uma banda com massa de ≈60 kDa correspondente a esperada nos clones induzidos com IPTG (Fig.2B, linha 4).

Os sobrenadantes e *pellets* obtidos após a expressão foram processados e avaliados quanto à presença da proteína quimérica recombinante. A rSapAn78 foi obtida como corpos de inclusão e eficientemente solubilizada em tampão de lise contendo 8 M de ureia. A rSapAn78 foi purificada por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺ e nas frações coletadas, uma única banda com ≈60 kDa correspondente a rSapAn78 foi obtida (Fig.2B, linha 5). O processo de diálise foi eficiente na remoção dos resíduos, não ocorrendo precipitação da proteína. A quantidade de proteína quimérica recombinante gerada ao fim deste processo foi de 190 mg/L.

Análise por *Dot blot* e *Western blot*

A confirmação da expressão da quimera foi realizada por WB utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina, no qual foi possível observar uma banda reativa única equivalente a uma proteína de ≈60 kDa de massa molecular (Fig.2C, linha 4).

A reatividade da proteína purificada foi determinada por *Dot blot* com soro hiperimune de coelho e soro de bovinos e por *Western blot* com soro de bovinos. Reação positiva da rSapAn78 purificada foi observada tanto com a proteína não desnaturada (*Dot blot*) quanto com a proteína desnaturada (*Western blot*) e tanto com o soro hiperimune de coelhos produzido a partir da cepa padrão *C. fetus* subsp. *venerealis* (Fig.3A, linha 2) quanto com soros de bovinos (Fig.3B, linha 3; Fig.3C, linhas 2 e 3), não havendo marcação com os soros controles negativos (Fig.3A, linha 1; Fig.3B, linha 1; Fig.3C, linhas 4 a 7).

DISCUSSÃO

A CGB causa inúmeros prejuízos econômicos mundialmente (Mshelia et al. 2012), no entanto a frequência da mesma permanece subestimada devido as falhas no processo de detecção. van Bergen et al. (2005a), em um levantamento global sobre o diagnóstico desta enfermidade, relataram discrepâncias em relação a parâmetros envolvidos na identificação da CGB em rebanhos, desde a colheita e transporte de amostras até o processamento laboratorial. Esta falta de padronização pode resultar em redução da sensibilidade dos testes e da confiabilidade dos resultados.

Ainda que recomendados pela OIE (2012), tanto os métodos microbiológicos, quanto os moleculares (Hum et al. 1997, Wang et al. 2002, Tu et al. 2005, van Bergen et al. 2005b, McMillen et al. 2006, Abril et al. 2007) e os ensaios imunoenzimáticos (Hewson et al. 1985, Hum et al. 1994, Brooks et al. 2004, Devenish et al. 2005, Mshelia et al. 2010, Pellegrin et al. 2011) muitas vezes são descritos como laboriosos ou inadequados para uso na rotina diagnóstica (OIE, 2012, van der Graaf-van Bloois et al. 2013). Quer para extração do DNA, quer para detecção da IgA, há necessidade da coleta e transporte de amostras de difícil obtenção como muco cervical, aspirado prepucial e conteúdos de fetos abortados, além de muitas vezes a necessidade do cultivo da bactéria que é de crescimento fastidioso. Neste sentido, a padronização de um teste imunoenzimático para detecção de IgG a partir de amostras de soro, tal como

descrito por Zhao et al. (2010) pode efetivamente facilitar o diagnóstico, bem como auxiliar em estudos epidemiológicos (Mshelia et al. 2010).

Zhao et al. (2010) obtiveram sucesso na escolha da região N-terminal da proteína SapA de uma cepa de campo, constatando sua imunodominância e a presença de múltiplos epítomos antigênicos relatados por Wang et al. (1993). Portanto, neste estudo para a construção da proteína quimérica recombinante SapAn78, foram unidas duas regiões distintas, a região 1 e a região 2. Com base no descrito por Zhao (2010), a primeira região (região 1) selecionada compreende uma porção N-terminal conservada entre oito sequências SapA homólogas. A segunda (região 2) é uma região comum somente entre duas das 9 sequências disponíveis (*sapA7* e *sapAp8*), no entanto não possui a região 1 e está entre os perfis de proteína encontrados nos rebanhos bovinos (Vargas et al., 2002).

Logo, a proteína SapAn78 foi construída com o intuito de ser mais sensível as variações antigênicas da SapA, uma vez que Vargas et al. (2002) verificaram a presença da proteína de superfície com 97kDa, a qual provavelmente corresponda à *sapAp8* descrita por Tu et al. (2003), em 19,4% das amostras analisadas.

O sucesso na clonagem da sequência nucleotídica de interesse, a qual resultou na expressão de grande quantidade da proteína quimérica recombinante em *E. coli*, justifica o uso do sistema de expressão em *E. coli* como dominante entre os sistemas existentes e permanece como o preferido pelos laboratórios de pesquisa e de desenvolvimento inicial de atividades comerciais (Chen 2012). Além disso, o polipeptídeo (Gly₄-Ser)₃ foi escolhido para ligação entre as duas regiões do gene sintético por conferir flexibilidade entre os domínios, permitindo o correto dobramento de cada uma das proteínas. Embora Sakamoto et al. (2011) tenham relatado a influência dessa sequência ligante e dobrável sobre a funcionalidade de cada domínio de uma quimera recombinante, neste trabalho o polipeptídeo cumpriu a sua função, pois não observou-se alterações no desempenho da proteína.

Neste estudo, a proteína expressa em *E. coli* foi obtida como corpos de inclusão e em grande quantidade, mesmo nos testes com indução da expressão em temperaturas mais baixas, embora a redução da temperatura durante a fase de indução e expressão possa levar a um aumento de rendimentos de proteínas heterólogas e redução da formação de corpos de inclusão (Schein & Noteborn 1988).

A formação de corpos de inclusão é vista como um grande obstáculo na expressão de proteínas heterólogas na forma solúvel e funcional (Baneyx & Mujacic 2004, Ventura 2005), entretanto a rSapAn78 mostrou-se funcional após o processo de lise do cultivo bacteriano. Conforme alguns autores como Demain e Vaishnav 2009, e Chen 2012, a necessidade do uso de agentes desnaturantes (uréia) no processo de solubilização dos corpos de inclusão pode levar a perda de epítomos conformacionais, influenciar na imunorreatividade, além de dificultar a purificação e a diálise devido às altas concentrações destes desnaturantes (Hannig e Makrides, 1998). No entanto, a proteína manteve sua atividade antigênica após solubilização e diálise, evidenciando que não houve alterações consideráveis na sua conformação durante esse processo e isso foi fundamental para a realização dos demais testes de caracterização da proteína. Logo, neste caso, a expressão da proteína como corpos de inclusão se mostrou vantajosa por apresentar benefícios citados por Clark (2001) e Singh & Panda (2005) como a produção de elevados níveis de proteína, baixo custo, homogeneidade da proteína alvo, resistência à proteólise e consequentemente baixos níveis de degradação da proteína expressa e fácil isolamento e purificação.

O êxito na purificação da proteína quimérica recombinante obtida por cromatografia de afinidade com N²⁺, mediada pela cauda de histidina, permitiu a confirmação da expressão da rSapAn78 por *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-polihistidina. Esse processo, amplamente utilizado, facilita a purificação usando íons metálicos imobilizados por serem reconhecidas como de fácil interação com estes e ainda proporcionam níveis mais altos de expressão quando comparadas à proteínas recombinantes sem cauda de histidina (Svensson et al. 2006).

O reconhecimento da proteína quimérica recombinante purificada por anticorpos presentes no soro de bovinos vacinados e no soro de coelhos hiperimunizados, tanto na sua forma desnaturada quanto não desnaturada, demonstra seu potencial de imunorreatividade, além da capacidade de distinguir soros controle positivos e negativos, especialmente os da espécie alvo,

Portanto, o potencial para o diagnóstico da CGB obtido com a caracterização da rSapAn78 vai ao encontro da necessidade do desenvolvimento de metodologias de fácil disseminação e acessíveis entre os laboratórios.

CONCLUSÕES

Obteve-se êxito na produção de uma grande quantidade da rSapAn78 em *E. coli* e na constatação do seu potencial para uso no desenvolvimento de testes imunodiagnósticos.

REFERÊNCIAS

Abril C., Vilei E.M., Brodard I., Burnens A., Frey J. & Miserez R. 2007. Discovery of insertion element ISCfe1: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clin. Microbiol. Infect.* 13:993-1000.

- Alves T.M., Stynen A.P.R., Miranda K.L. & Lage A.P. 2011. Campilobacteriose genital bovina e tricomose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):336-344.
- Baneyx F. & Mujacic M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Rev. Biotechnol.* 22(11):1399-1408.
- Bondurant R.H. 2005. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 21:383-408.
- Blaser M.J. 1993. Role of the S-Layer proteins of *Campylobacter fetus* in serum-resistance and antigenic variation: a model of bacterial pathogenesis. *Am. J. Med. Sci.* 306:325-329.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brooks B.W., Eaglesome M. & Garcia M.M. 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.
- Caldow G.L. & Taylor D.W. 1997. Experiences with venereal *Campylobacter* infection in suckler herds. *Cattle Pract.* 5:327-334.
- Chen R. 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotech. Adv.* 30:1102-1107.
- Clark E.D B. 2001. Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12(2):202-7.
- Corbeil L.B., Schurig G.G.D., Bier P.J. & Winter A.J. 1975. Bovine venereal vibriosis: Antigenic variation of the bacterium during infection. *Infect. Immun.* 11(2):240-244.
- Demain L. & Vaishnav P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27:297-306.
- Devenish J., Brooks B., Perry K., Milnes D., Burke T., McCabe D., Duff S. & Lutze-Wallace C. L. 2005. Validation of a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(11):1261-1268.
- Dubreuil J.D., Logan M. S., Cabbage S., Nieidhin D., McCubbin W.D., Kay C.M., Beveridge T.J., Ferris F.G. & Trust T.J. 1988. Structural and biochemical analyses of surface array protein of *Campylobacter fetus*. *J. Bacteriol.* 170(9):4165-4173.
- Dworkin J. & Blaser M.J. 1997. Molecular mechanisms of *Campylobacter fetus* surface layer protein expression. *Mol. Microbiol.* 26(3):433-440.
- Fagan R.P. & Fairweather N.F. 2014. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nature Rev. Microbiol.* 12:211-222.
- Figueiredo J.F., Pellegrin A.O., Foscolo C.D., Machada R.P., Miranda K.L. & Lage A.P. 2002. Evaluation of the direct fluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital *Campylobacteriosis*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 44: 118-123.
- Firehammer B.D. & Border M.M. 1986. Bulk growth procedures and a button agglutination test for *Campylobacter*. *Am. J. Vet. Res.* 47(7): 1415-1418.
- Garcia M.M., Lutze-Wallace C. L., Denes A.S., Eaglesome M.D., Holst E. & Blaser M.J. 1995. Protein shift and antigenic variation in the S Layer of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of *sapA* homologs. *J. Bacteriol.* 177(8):1976-1980.
- Givens M. D. 2006. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology.* 66:648-654.
- Hannig G. & Makrides S.C. 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Tibtech.* 16:54-60.
- Hewson P.I., Lander K.P. & Gill K.P.W. 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *C. fetus* in bovine vaginal mucus. *Res. Vet. Sci.* 38: 41-45.
- Hum S., Quinn C. & Kennedy D. 1994. Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. *Aust. Vet. J.* 71: 140-143.
- 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.
- McCool C.J., Townsend M.P., Wolfe S.G., Simpson M.A., Olm T.C., Jayawardhana G.A. & Carney J.V. 1988. Prevalence of bovine venereal disease in the Victoria River district of the northern territory: Likely economic effects and practical control measures. *Aust. Vet. J.* 65:153-156.
- McCoy E.C., Doyle D., Burda K., Corbeil L.B. & Winter A.J. 1975. Superficial antigens of *Campylobacter (Vibrio) fetus*: characterization of an antiphagocytic component. *Infect. Immun.* 11(3):517-525.
- McMillen L., Fordyce G., Doogan V.J. & Lew A.E. 2006. Comparison of culture and a novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *J. Clin. Microbiol.* 44: 938-945.

- Mshelia G.D., Amin J.D., Woldehiwet Z., Murray R.D. & Egwu G.O. 2010. Epidemiology of Bovine Venereal Campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reprod. Domestic Anim.* 45:221-230.
- Mshelia G.D., Amin J.D., Egwu G.O., Woldehiwet Z. & Murray R.D. 2012. The prevalence of bovine venereal campylobacteriosis in cattle herds in the Lake Chad basin of Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:1487-1489
- OIE - World Organization for Animal Health. 2012. Bovine genital campylobacteriosis, p. 661-670. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 7^a ed., OIE, Paris. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.05_BGC.pdf. Acesso em 15 abr 2014.
- Palomares L.A., Estrada-Mondaca S. & Ramírez O.T. 2004. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol. Biol.* 267:15-52.
- Pefanis S.M., Herr S., Venter C.G., Kruger L.P., Queiroga C.C. & Amaral L. 1988. Trichomoniasis and campylobacteriosis in bulls in the Republic of Transkei. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 59:139-140.
- Pellegrin A.O., Lage A.P., Sereno J.R.B., Ravaglia E., Costa M.S. & Leite R.C. 2002. Bovine Genital Campylobacteriosis in Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 55 (3):169-173.
- Pellegrin A.O., Miranda K.L., Figueiredo J.F., Barbosa E.F. & Lage A.P. 2011. The use of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting for the detection of *Campylobacter fetus* immunoglobulins in the cervico-vaginal mucus of female cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):247-254.
- Ramos C.R. R., Abreu P.A.E, Nascimento A.L.T.O & Ho P.L. 2004. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(8):1103-1109.
- Ray K.C., TU Z.C., Grogono-Thomas R., Newell D.G., Thompson S.A. & Blaser M.J. 2000. *Campylobacter fetus* sap inversion occurs in the absence of RecA function. *Infect. Immun.* 68 (10):5663-5667.
- Sambrook J. & Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sakamoto S., Tanizaki Y., Pongkitwitoon B., Tanaka H. & Morimoto S. 2011. A chimera of green fluorescent protein with single chain variable fragment antibody against ginsenosides for fluorescence-linked immunosorbent assay. *Protein Expr. Purif.* 77:124-130.
- Schein C.H. & Noteborn M.H.M. 1988. Formation of soluble recombinant proteins in Escherichia coli is favored by lower precursor expressed in Escherichia coli in the form of inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* 229:533-539.
- Singh S.M. & Panda A.K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 99(4):303-310.
- Svensson J., Andersson C., Reseland J.E, Lyngstadaas P. & Bülowa L. 2006. Histidine tag fusion increases expression levels of active recombinant amelogenin in Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.* 48:134-141.
- Tu Z.C., Wassenaar T.M., Thompson S.A. & Blaser M.J. 2003. Structure and genotypic plasticity of the *Campylobacter fetus* sap locus. *Mol. Microbiol.* 48(3):685-698.
- Tu Z.C., Eisner W., Kreiswirth B.N. & Blaser M.J. 2005. Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *J. Clin. Microbiol.* 43:3334-3340.
- van Bergen M.A.P., Linnane S., van Putten J.P.M. & Wagenaar J.A. 2005a. Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24(3):1017-1026.
- van Bergen M.A.P., Simons G., van der Graaf-van Bloois L., van Putten J.P., Rombout J., Wesley I. & Wagenaar J.A. 2005b. Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *J. Med. Microbiol.* 54:1217-1224.
- van der Graaf-van Bloois L., van Bergen M.A.P., van der Wal F.J., de Boer A.G., Duim B., Schmidt T. & Wagenaar J.A. 2013. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *J. Microbiol. Meth.* 95: 93-97.
- Vargas A. C., Costa M. M., Vainstein M. H., Kreutz L. C. & Neves J. P. 2002. *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* surface array protein from bovine isolates in Brazil. *Curr. Microbiol.* 45:111-114.
- Ventura S. 2005. Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microb. Cell Fact.* 4:11.
- Wang E., Garcia M.M., Blake M.S., Pei Z. & Blaser M.J. 1993. Shift in S Layer protein expression responsible for antigenic variation in *Campylobacter fetus*. *J. Bacteriol.* 175(16):4979-4984.
- Wang G., Clark C.G., Taylor T.M., Pucknell C., Barton C., Price L., Woodward D.L. & Rodgers F.G. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 40:4744-4747.

- Winter A.J. & Caveney N.T. 1978. Evaluation of a transport medium for *Campylobacter (Vibrio) fetus*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173(5):472-474.
- Zhao H., Liu H., Du Y., Liu S., Ni H., Wang Y., Wang C., Si W., Yang J. & Ling J. 2010. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle. Res. Vet. Sci. 88:446-451.
- Ziech R.E., Machado G., Kirinus J.K., Libardoni F., Kessler J.D., Pötter L. & Vargas A.C. 2014. *Campylobacter fetus* em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. Cienc. Rural. 44(1):141-146.

Fig.1. A) Características estruturais e comparação de seqüências de DNA de oito *sapA* homólogos completos e um homólogo parcial. A estrutura de cada homólogo está representada esquematicamente pelos retângulos alinhados. Caixas coloridas identificam as regiões homólogas compartilhadas entre as proteínas de superfície do tipo A de *C. fetus*. Caixas brancas indicam seqüências não conservadas. Fonte: TU et al. (2003). B) Construção do gene e representação de seus produtos proteicos. A – construção do gene com as enzimas de restrição e os códons da seqüência flexível de glicinas e serinas. B – representação do produto da expressão das duas regiões unidas. C e D – representação dos produtos proteicos das regiões 1 e 2, respectivamente, quando expressas individualmente.

Fig.2. A) Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo com resultado da digestão para a confirmação do inserto de pAE-*sapAn78*. Linhas 1-3- clone 2, 3 e 17, respectivamente, digeridos com *XhoI* e *EcoRI*; linha 4- pAE linear; 5- pUC18-*sapAn78* linear; 6- marcador 1 kb (Thermo Scientific). B) Gel de SDS 12% corado com Coomassie blue. Linha 1: Marcador de massa molecular; linha 2: extrato de *E. coli* BL21(DE3) pLysS não transformada; linha 3: *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformada com rSapAn78 não induzida; linha 4: *E. coli* pLysS transformada com rSapAn78 induzida por 3 h com IPTG; linha 5: rSapAn78 purificada. C) *Western Blot* com anticorpo monoclonal anti-histidina. Linha 1: Marcador de massa molecular; linha 2: extrato de *E. coli* BL21(DE3) pLysS não transformada; linha 3: *E. coli* pLysS transformada com rSapAn78 após 3h de indução com IPTG; linha 4: rSapAn78 purificada.

Fig.3. A) *Dot blot* de análise da rSapAn78 purificada utilizando soro hiperimune produzido em coelho a partir da cepa padrão de *C. fetus* subsp. *venerealis* (ATCC 19.438). Linha 1: membrana com rSapAn78 purificada incubada com soro hiperimune do dia 0; linha 2: membrana com rSapAn78 purificada incubada com soro hiperimune do dia 36 do experimento; linha 3: membrana com *E.coli* BL21(DE3) pLySs não transformada com soro hiperimune do dia 36 do experimento, controle negativo. B) *Dot blot* de análise da rSapAn78 purificada utilizando soros de bovinos. Linha 1: membrana com rSapAn78 purificada incubada com soro fetal bovino; linha 2: membrana com *E.coli* BL21(DE3) pLySs não transformada incubada com soro fetal bovino, controle negativo; linha 3: membrana com rSapAn78 purificada incubada com soro de bovino vacinado para CGB; linha 4: membrana com *E.coli* BL21(DE3) pLySs não transformada incubada com soro de bovino vacinado para CGB. C) *Western Blot* de análise da rSapAn78 com soros bovinos e anticorpo secundário anti-IgG de bovinos conjugado com peroxidase. Linha 1: Marcador de massa molecular; linhas 2 e 3: soros de bovinos vacinados para CGB ; linhas 4 a7: soro de bovinos negativos para CGB.

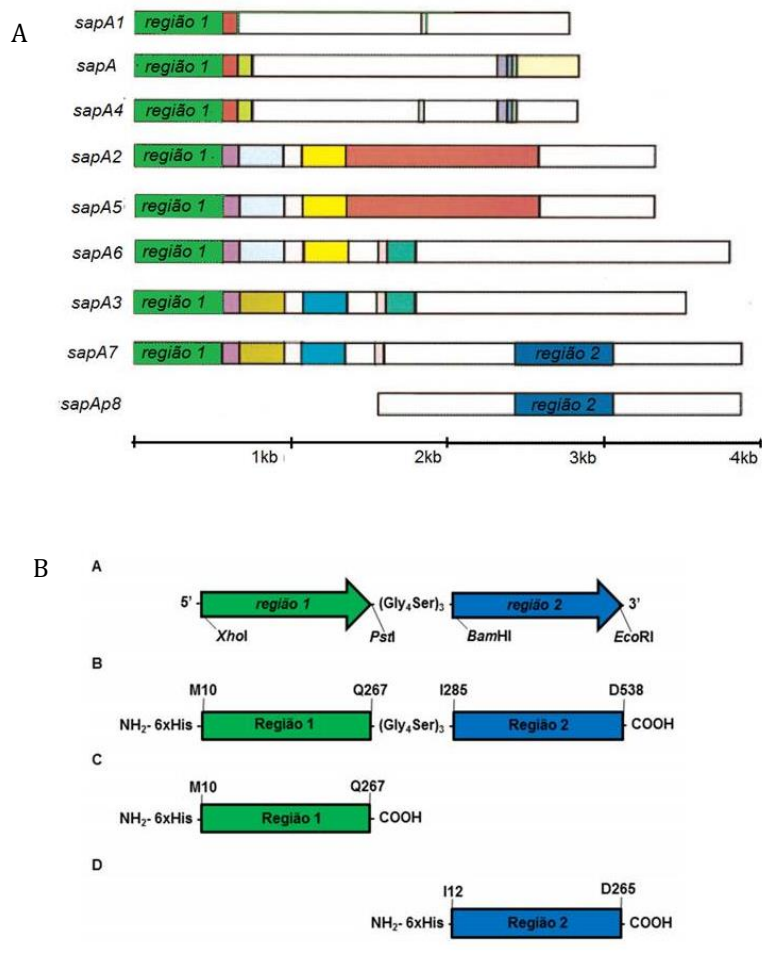


Figura 1

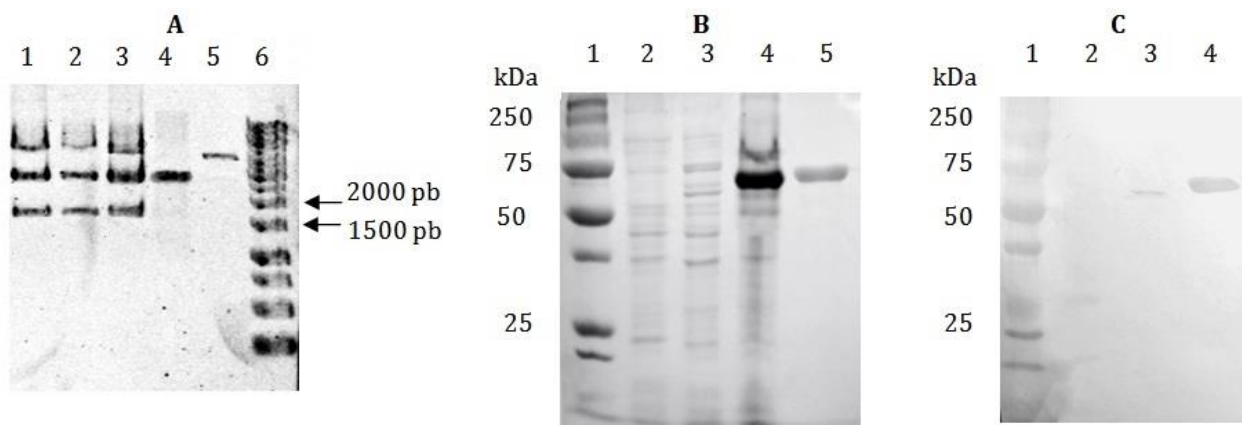


Figura 2

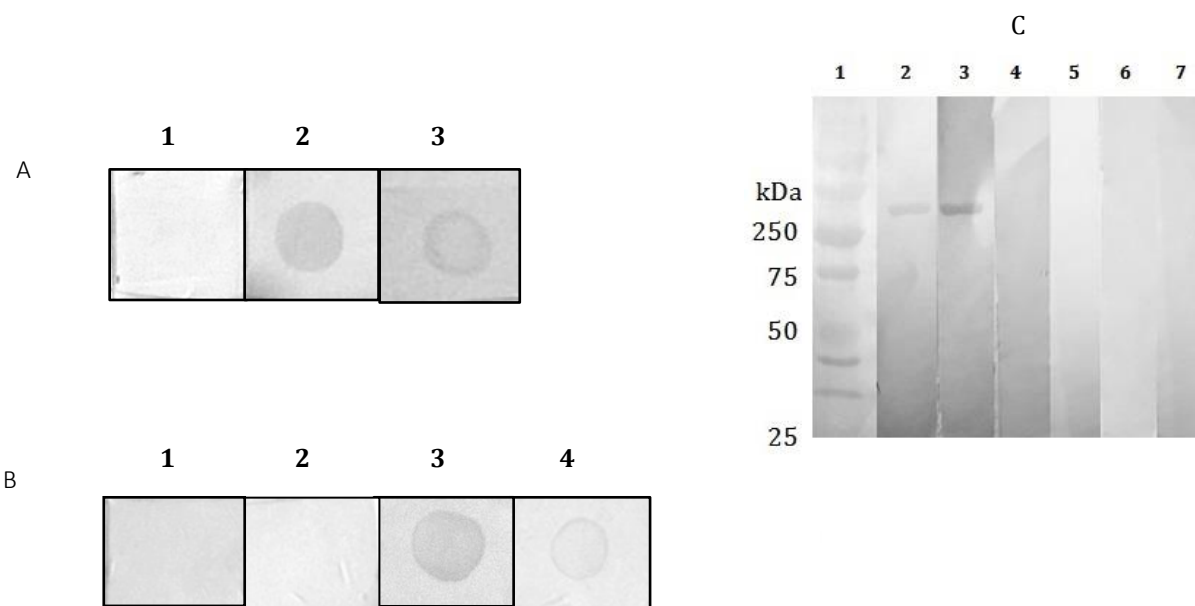


Figura 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que pelo processo de clonagem e expressão em *E. coli* foi possível obter uma proteína quimérica recombinante com aproximadamente 60 kDa. A rSapAn78 manteve as suas propriedades imunorreativas e foi reconhecida por anticorpos presentes nos soros de animais vacinados para CGB e de coelhos hiperimunizados com *C. fetus*.

Deve ser testado o potencial de imunorreatividade desta proteína recombinante e sua avaliação como um imunobiológico.

REFERÊNCIAS

ABRIL, C. et al. Discovery of insertion element ISCfe1: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, p. 993-1000, 2007.

AKHTAR, S. et al. The association between antibody titres against *Campylobacter fetus* and milk production efficiency in dairy cattle. **Veterinary Research Communications**, v.17, n.3, p.183-191, 1993.

ALVES, T. M. et al. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n.4, p.336-344, 2011.

BELLOWS, D. S., OTT, S. L.; BELLOWS, R. A. Review: Cost of Reproductive Diseases and Conditions in Cattle. **The Professional Animal Scientist**, v. 18, n.1, p.26-32, 2002.

BIER, P.J. et al. Measurement of immunoglobulins in reproductive tract fluids of bulls. **Veterinary Microbiology**, v. 2, p. 1-11, 1977a.

BIER, P.J. et al. Experimental infections with *Campylobacter fetus* in bulls of different ages. **Veterinary Microbiology**, v. 2, p. 13-27, 1977b.

BLASER, M.J. et al. High-frequency S-layer protein variation in *Campylobacter fetus* revealed by sapA mutagenesis. **Molecular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 453-462, 1994.

BLASER, M.J. Role of the S-Layer proteins of *Campylobacter fetus* in serum-resistance and antigenic variation: a model of bacterial pathogenesis. **American Journal of the Medical Science**, v. 306, p. 325-329, 1993.

BLASER, M.J.; GOTSCHLICH, E.C. Surface Array Protein of *Campylobacter fetus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 24, p. 14529-14535, 1990.

BONDURANT, R.H.. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice Survey**, v. 21, p. 383-408, 2005.

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.

CALDOW, G.L.; TAYLOR, D.W. Experiences with venereal *Campylobacter* infection in suckler herds. **Cattle Practice**, v. 5, p. 327-334, 1997.

CASADEMONT, I.; CHEVRIER, D., GUESDON, J.L. Cloning of a sapB homologue (sapB2) encoding a putative 112-kDa *Campylobacter fetus* S-layer protein and its use for identification and molecular genotyping. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p. 269-281, 1998.

CHABAN, B. et al. Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 76, p. 166-173, 2012.

CHANG, W.; OGG, J.E. Transduction in *Vibrio fetus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 31, p.919-24, 1970.

CIPOLLA, A. et al. *Campylobacter fetus* Diagnosis: Direct Immunofluorescence Comparing Chicken IgY and Rabbit IgG Conjugates. **Alternatives to animal experimentation (ALTEX)**, v. 18, n. 3, p.165-170, 2001.

COBO, E.R.; CORBEIL, L.B.; BONDURANT R.H. Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 89, p. 55-61, 2011.

CORBEIL, L.B. et al. Immunoglobulin classes and biological functions of *Campylobacter (Vibrio) fetus* antibodies in serum and cervicovaginal mucus. *Infection and Immunity*. V. 10, n.3, p.422-429, 1974a.

CORBEIL, L.B. et al. Bovine venereal vibriosis variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infection and Immunity*. V. 10, n. 5, p.1084-1090, 1974b.

CORBEIL, L.B. et al. Bovine venereal vibriosis: antigenic variation of the bacterium during infection. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 2, p. 240-244, 1975.

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

CROWTHER, J.R. The ELISA Guidebook. New Jersey: Humana Press, 1^a ed., 2001.

DEVENISH, J. et al. Validation of a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 11, p. 1261-1268, 2005.

DUBREUIL, J.D. et al. Structural and biochemical analyses of surface array protein of *Campylobacter fetus*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 9, p. 4165-4173, 1988.

DUBREUIL, J.D. et al. Antigenic differences among *Campylobacter fetus* S-Layer proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 9, p. 5035-5043, 1990.

DWORKIN, J., TUMMURU, M.K.R., BLASER, M.J. A lipopolysaccharide-binding domain 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. 7, p. 1734-1741, 1995a.

DWORKIN, J., TUMMURU, M.K.R., BLASER, M.J. Segmental conservation of sapA sequences in type B *Campylobacter fetus* cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 25, p. 15093-15101, 1995b.

DWORKIN, J.; BLASER, M.J. Molecular mechanisms of *Campylobacter fetus* surface layer protein expression. **Molecular Microbiology**, v. 26, n.3, p. 433-440, 1997.

ETONSI, M.A. **Studies on Arcobacter species, their isolation and pathogenicity.** 211f. Tese (Doctor of Philosophy) - Heriot-Watt University, Reino Unido, 2013.

FAGAN, R.P.; FAIRWEATHER, N.F. Biogenesis and functions of bacterial S layers. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 211-222, 2014.

FAO. Food And Agriculture Organization Of The United Ations – Livestock primary 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

FAO. Food And Agriculture Organization Of The United Ations – Live Animals 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 23 jan. 2015.

FERNANDEZ, H. et al. Toxigenic and invasive capacities: possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 633-634.

FIGUEIREDO J.F. et al. Evaluation of the direct fluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital *Campylobacteriosis*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 44, p. 118-123, 2002.

FIREHAMMER, B.D.; BORDER, M.M. Bulk growth procedures and a button agglutination test for *Campylobacter*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 7, p. 1415-1418, 1986.

FLOWER, P.J. et al. An immunopathologic study of bovine prepuce. **Veterinary Pathology**, v. 20, p. 189-202, 1982.

FOUTS, D.E. et al. Major Structural Differences and Novel Potential Virulence Mechanisms from the Genomes of Multiple *Campylobacter* Species. **Plos Biology**, v. 3, n. 1, p. 72-85, 2005.

FUJIMOTO, S. et al. Correlation between molecular size of the surface array protein and morphology and antigenicity of the *Campylobacter fetus* S layer. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 6, p. 2017-2022, 1991.

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 sap A homologs. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 1976-1980, 1995.

GIVENS, M. D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 66, p.648-654, 2006.

GORKIEWICZ, G. et al. A Genomic Island Defines Subspecies-Specific Virulence Features of the Host-Adapted Pathogen *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 502-517, 2010.

HANSSON, I. et al. Identification of nine sequence types of the 16S rRNA genes of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from broilers. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 10, 2008.

HEWSON P.I.; LANDER K.P.; GILL K.P.W. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *C. fetus* in bovine vaginal mucus. **Research in Veterinary Science**, v. 38, p. 41-45, 1985.

HOFFER, M.A. Bovine *Campylobacteriosis*: A Review. **The Canadian Veterinary**

Journal, v. 22, n. 11, p. 327-330, 1981.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

HUM, S.; QUINN, C.; KENNEDY, D. 1994. Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. **Australian Veterinary Journal**, v.71, n.5, 140-143, 1994.

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

KABEYA, H. et al. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 303-308, 2004.

KIENESBERGER, S. et al. Interbacterial Macromolecular Transfer by the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* Type IV Secretion System. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 3, p. 744-758, 2010.

KIENESBERGER, S. et al. Comparative Genome Analysis of *Campylobacter fetus* Subspecies Revealed Horizontally Acquired Genetic Elements Important for Virulence and Niche Specificity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2014.

LEAL, D.R. et al. Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal e em seu entorno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 256-259, 2012.

MCCOOL, C.J. et al. Prevalence of bovine venereal disease in the Victoria River district of the northern territory: Likely economic effects and practical control measures. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, p. 153-156, 1988.

MCCOY, E.C., et al. Superficial antigens of *Campylobacter (Vibrio) fetus*: characterization of an antiphagocytic component. **Infection and Immunity**, v.11, n.3, p. 517-525, 1975.

MCGOLDRICK, A. et al. Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, p. 199-204, 2013.

MCMILLEN, L. et al. Comparison of culture and a novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 938-945, 2006.

MIRANDA, K.L. **Prevalência da infecção por *Campylobacter fetus* em bovinos de corte no Brasil – 2000**. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

MOOLHUIJZEN, P.M. et al. Genomic analysis of *Campylobacter fetus* subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 86, p. 1-11, 2009.

MSHELIA, G.D. et al. Epidemiology of Bovine Venereal *Campylobacteriosis*: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 221-230, 2010.

MSHELIA G.D. et al. The prevalence of bovine venereal campylobacteriosis in cattle herds in the Lake Chad basin of Nigeria. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p.1487-1489, 2012.

NEILL, S.D. et al. Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, p. 342-356, 1985.

ON, S.L.; 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, n. 2, p. 285-293, 2001.

Organização Internacional da Saúde Animal. Bovine genital campylobacteriosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: OIE, 7^a ed., 2008, capítulo 2.4.5, p. 661-670. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.05_BGC.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2014.

Organização Internacional de Epizootias. Bovine genital campylobacteriosis – disease distribution maps. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap>. Acesso em: 05 dez. 2014.

Organização Internacional de Epizootias. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>>. Acesso em 29 de jan. 2015.

PALOMARES, L.A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O.T. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. **Methods in Molecular Biology**, v. 267, p.15-52, 2004.

PEFANIS, S.M. et al. Trichomoniasis and campylobacteriosis in bulls in the Republic of Transkei. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 59, p. 139-140, 1988.

PEI, Z. et al. Purification and characterization of a family of high molecular weight surface array proteins from *Campylobacter fetus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 13, p. 6416-6420, 1988.

PELLEGRIN, A.O. et al. Bovine Genital Campylobacteriosis in Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, v. 55, n. 3, p. 169-173, 2002.

PEREZ-PEREZ, G. I.; BLASER, M. J.; BRYNER, J. H. Lipopolysaccharide structures of *Campylobacter fetus* are related to heat-stable serogroups. **Infection and Immunity**, v.51, p. 209-212, 1986.

QUINN, P.J. et al. **Veterinary microbiology and microbial disease**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2a ed., 2011, capitulo 34.

RAMOS, C.R. R. et al. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

RASKIN, D.M. et al. Bacterial genomics and pathogen evolution. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 703-714, 2006.

RAY, K.C. et al. *Campylobacter fetus* sap inversion occurs in the absence of RecA function. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5663-5667, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SKIRROW, M.B. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. **Journal of Comparative Pathology**, v. 3, p. 113-149,1994.

SKIRROW, S.Z.; BONDURANT, R.H. Bovine trichomoniasis. **Veterinary Bull**, v. 58, p. 591-603, 1988.

SLEYTR, U.B.; BEVERIDGE, T.J. Bacterial S-layers. **Trends Microbiology**, n. 6, p. 253–260, 1999.

SPRENGER, H.; ZECHNER, E.L.; GORKIEWICZ, G. So Close And Yet So Far – Molecular Microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v.2, p. 66-75, 2012.

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, p. 766-769, 2003.

TU, Z.C., RAY, K.C., THOMPSON, S.A., BLASER, M.J. *Campylobacter fetus* uses multiple loci for DNA inversion within the 5' conserved regions of sap homologs. *Journal of Bacteriology*. V. 183, p. 6654-6661, 2001.

TU, Z.C.; HUI, J.; BLASER, M.J. Conservation and diversity of *sap* homologues and their organization among *Campylobacter fetus* isolates. **Infection and Immunity**, v.72, n. 3, p. 1715-1724, 2004.

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. Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *J. Clin. Microbiol.* 43:3334-3340, 2005.

TUMMURU, M.K.; 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, p. 5916-5922, 1992.

TUMMURU, M. K.; BLASER, M. J. Rearrangement of *sapA* homologs with conserved and variable regions in *Campylobacter fetus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, p. 7265-7269, 1993.

VAN BERGEN, M.A.P. **Subspecies differentiation and typing of *Campylobacter fetus***. 1.ed. Houten: Atalanta Drukwerkbemiddeling, 2005.

VAN BERGEN, M.A.P. et al.. Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 24, n.3, p. 1017-1026, 2005a.

VAN BERGEN, M.A.P et al. Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 1217-1224, 2005b.

VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L. et al. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, p. 93-97, 2013.

VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L. et al. Inconsistency of Phenotypic and Genomic Characteristics of *Campylobacter fetus* subspecies requires reevaluation of current diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4183-4188, 2014.

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. 19, p. 121-132, 2003.

VASQUEZ, L.A. et al. Bovine genital campylobacteriosis (vibriosis): vaccination of experimentally infected bulls. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, p. 1553-1557, 1983.

VÉRON, M.; CHATELAIN, R. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Vkon and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Vkon. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, n. 2, p. 122-134, 1973.

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**, v. 39, n. 6, 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.

WANG, G. et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4744-4747, 2002.

WINTER A.J.; CAVENEY N.T. Evaluation of a transport medium for *Campylobacter (Vibrio) fetus*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 5, p. 472-474, 1978.

YAEGER, M. J.; HOLLERY, L. D. Bacterial Causes of Bovine Infertility and Abortion. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall (eds.), **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, 2^a ed. Saint Louis, Estados Unidos: Saunders Elsevier, p. 391-393, 2007.

YANG, L. et al. Reattachment of surface array proteins to *Campylobacter fetus* cells. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p.1258–1267, 1992.

ZHAO, H. et al. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle. **Research in Veterinary Science**, v .88, p.446-451, 2010.

ZIECH, R.E. et al. *Campylobacter fetus* em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 44, n.1, p. 141-146, 2014.