



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Pesquisa de *Campylobacter fetus* em
amostras prepuciais de touros da região do
Alentejo**

Madalena Burnay Pinto Coelho

Orientação: Doutora Cristina Queiroga

Co-orientação: Doutora Eduarda Potes

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação de natureza científica

Évora, 2013

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram a realizar o estágio e esta tese de mestrado integrado.

À Professora Doutora Cristina Queiroga, minha Orientadora, pela simpatia demonstrada, pela sua disponibilidade, pelo rigor e pela grande partilha de experiência e conhecimentos durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Eduarda Potes pela aceitação da co-orientação deste trabalho e por toda a ajuda durante o meu estágio.

À Guilhermina e à Esperança, pela disponibilidade, simpatia e auxílio durante a execução do trabalho laboratorial.

À Dra. Sónia Germano, pela possibilidade de efetuar este trabalho, que sem ela não seria possível, pelo auxílio na colheita de amostras e pela disponibilidade e grande ajuda.

Ao Dr. João Fragoso e ao enfermeiro António pela grande ajuda nas colheitas de sangue.

À Joana Santos, companheira de curso e uma grande amiga, pela motivação e ajuda preciosa em todos os momentos.

Aos meus pais, por me terem ajudado e apoiado em tudo ao longo da minha vida, pela confiança, apoio incondicional que me concederam, até porque, sem eles nada disto seria possível; à minha mãe pela paciência e pela grande ajuda na escrita da dissertação e ao meu pai pelo encorajamento.

Ao meu irmão pela sua ajuda no inglês e por se interessar e à minha irmã por toda a ajuda que me deu.

Quero também agradecer a todos os meus amigos, e em especial ao Manel e à Monica, que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

A todos os que me ajudaram e acompanharam durante a elaboração do presente trabalho.

Resumo

A bactéria *Campylobacter fetus* divide-se em duas subespécies *C. fetus fetus* (Cff) e *C. fetus venerealis* (Cfv). Cfv é o agente patogénico responsável pela campilobacteriose genital bovina (CGB), uma doença que provoca infertilidade em vacas. Cff pode provocar abortos esporádicos, mas não provoca CGB. Neste trabalho procedeu-se à pesquisa de *C. fetus* por imunofluorescência direta (IFD) em 117 amostras prepuciais, recolhidas por raspagem, de touros pertencentes a 25 explorações na região do Alentejo. A prevalência real de CGB na amostra, considerando a sensibilidade e especificidade do teste, foi de 52,89% de animais e 80% de explorações.

Foi também realizada uma comparação entre dois testes de diagnóstico de CGB, a IFD e o isolamento bacteriológico. O isolamento bacteriológico foi difícil de executar e a presença de bactérias contaminantes foi bastante problemática, levando a resultados falso-negativos. A sua correlação com a IFD foi muito baixa, tendo esta revelado ser muito mais sensível.

Palavras-chave: Campilobacteriose genital bovina; imunofluorescência direta; infertilidade; isolamento bacteriano; prevalência.

Abstract

Search for *Campylobacter fetus* in preputial samples of bulls from Alentejo region

The bacteria *Campylobacter fetus* comprises two subspecies, *C. fetus fetus* (Cff) and *C. fetus venerealis* (Cfv). Cfv is the pathogen responsible for bovine genital campylobacteriosis (BGC), a disease that causes infertility in cows. Cff may lead to sporadic miscarriages, but does not cause BGC. In this work we searched for *C. fetus* by direct immunofluorescence (DIF) in 117 preputial samples, collected by scraping, from bulls from Alentejo region. The actual prevalence of BGC, considering the sensitivity and specificity of the test was 52.89% of animals and 80 % of farms.

It was also performed a comparison between two BGC diagnostic tests, bacterial isolation and DIF. The bacterial isolation was difficult to perform and the presence of bacterial contaminants was very problematic, leading to false-negative results.

The presence of bacterial contaminants in bacterial isolation was problematic, leading to false-negative results. Its correlation with DIF was quite low, and DIF proved to be much more sensitive.

Keywords: Bacterial isolation; bovine genital campylobacteriosis; direct immunofluorescence; infertility; prevalence.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica - Campilobacteriose genital bovina (CGB)	4
2.1. Contexto histórico e classificação do agente etiológico.....	4
2.2. Epidemiologia	7
2.3. Transmissão	10
2.4. Fisiopatologia	11
2.5. Sinais clínicos.....	17
2.6. Métodos de diagnóstico.....	18
2.6.1. Colheita de amostras.....	19
2.6.2. Isolamento bacteriológico.....	21
2.6.3. Imunofluorescência direta (IFD)	27
2.6.4. Reação em cadeia da polimerase.....	31
2.6.5. Aglutinação do muco cérvico-vaginal.....	36
2.6.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	38
2.7. Tratamento e profilaxia	39
2.8. Impacto económico	46
3. Objetivos do trabalho	48
3.1. Objetivo Geral.....	48
3.2. Objetivos Específicos	48
4. Material e métodos.....	49
4.1. Imunofluorescência direta (IFD)	49

4.1.1. Recolha de amostras.....	49
4.1.2. Preparação do conjugado	50
4.1.3. Técnica de imunofluorescência direta	50
4.2. Isolamento bacteriológico.....	51
4.2.1. Recolha de amostras.....	51
4.2.2. Técnica do isolamento bacteriológico	52
4.2.3. Identificação e Testes fenotípicos	52
4.3. Análise estatística.....	55
5. Resultados.....	56
5.1. Imunofluorescência direta	56
5.2. Isolamento bacteriológico.....	61
6. Discussão de resultados	65
7. Conclusão.....	71
Bibliografia.....	72
Anexo	89

Índice de figuras

Figura 1 <i>Campylobacter fetus</i> , microscopia eletrónica (Cattaneo, 2004)	5
Figura 2 Mapa de distribuição mundial da campilobacteriose genital bovina, entre julho a dezembro de 2012. A branco – sem informação; a verde claro – sem reporte; a verde escuro – não reportado no período; a cor-de-laranja – suspeito; a castanho – infeção; a vermelho – doença clínica; a roxo – doença limitada a uma ou mais zonas (OIE, 2013).....	8
Figura 3 <i>Campylobacter fetus</i> , coloração de Gram (400x) (Encyclopedia of Life, 2013).	24
Figura 4 Teste para a produção de H ₂ S com tira de acetato de chumbo (<i>Campylobacter jejuni</i>) (De la Maza <i>et al.</i> , 1999).....	26
Figura 5 Esquema da IFD (Saunders, 2007)	28
Figura 6 Imunofluorescência direta - <i>Campylobacter fetus</i> (400x)	29
Figura 7 Raspadores (<i>Laboratorio Azul</i>)	50
Figura 8 Exemplo de duas amostras prepuciais submetidas a IFD: A – exemplo de uma amostra em que se observavam muitas bactérias pequenas marcadas com fluoresceína (400 x); B – exemplo de uma amostra em que se observavam muitas bactérias com morfologia típica de <i>C. fetus</i> (400 x).	60
Figura 9 Teste da oxidase - o primeiro <i>stick</i> corresponde ao controlo negativo, os restantes <i>sticks</i> pertencem às três estirpes isoladas.	63
Figura 10 Placa com cultura identificada como <i>Campylobacter fetus fetus</i>	63

Índice de tabelas

Tabela 1 Nomenclaturas utilizadas para o <i>Campylobacter fetus</i>	4
Tabela 2 Resumo dos dados publicados sobre a prevalência de Cfv em diferentes países.	9
Tabela 3 Características diferenciadoras das espécies de <i>Campylobacter</i> potencialmente isoladas a partir do trato genital bovino ou de fetos abortados (Quinn <i>et al.</i> , 2002; Garrity <i>et al.</i> , 2005; Wagenaar & van Bergen, 2012).	25
Tabela 4 Diferentes pares de <i>primers</i> utilizados para identificar <i>C. fetus</i> e as suas subespécies.	32
Tabela 5 Resultados da imunofluorescência direta realizada em amostras prepuciais	56
Tabela 6 Resultados da imunofluorescência direta e do isolamento bacteriológico realizados em amostras prepuciais.....	61
Tabela 7 Comparação dos resultados obtidos pelo isolamento bacteriológico e imunofluorescência direta	64

Lista de abreviaturas

- AFLP – *Amplified fragment length polymorphism*, polimorfismo de fragmento amplificado
- AN – Ácido nalidíxico
- BVD – Diarreia viral bovina
- CDC – *Centers for disease control and prevention*, centros de controlo e prevenção de doenças
- CDT – *Cytolethal distending toxin*
- Cff – *Campylobacter fetus* subs. *fetus*
- Cfv – *Campylobacter fetus* subs. *venerealis*
- Cfvi - *Campylobacter fetus* subs. *venerealis* biovar *intermedius*
- Cfvv – *Campylobacter fetus* subs. *venerealis* biovar *venerealis*
- C. – *Campylobacter*
- CGB – Campilobacteriose genital bovina
- CN – Cefalotoína
- CTAB – *Hexadecyltrimethylammonium bromide*, brometo de hexadeciltrimetilamónio
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ensaio imunoenzimático
- IA – Inseminação artificial
- IBR – Rinotraqueíte infecciosa bovina
- IC – intervalo de confiança
- IF – Imunofluorescência
- IFD – Imunofluorescência direta
- IFI – Imunofluorescência indireta
- IgA – Imunoglobulina A
- IgG – Imunoglobulina G
- IgM – Imunoglobulina M
- MLST – *Multilocus sequence typing*, tipificação multilocular de sequências
- OIE – *Office international des épizooties*, Organização mundial de saúde animal

pb – pares de bases

PBS – *Phosphate buffer saline*, solução tampão fosfato

PCR – *Polimerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase

PFGE - *Pulsed-field gel electrophoresis*, electroforese em gel pulsado

PMN – Neutrófilos polimorfonucleares

qPCR – *Quantitative polimerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase quantitativa

RT-PCR – *Real-time polimerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase em tempo real

sap – *Surface array proteins*, proteínas de superfície

spp. – Espécies

TEM – *Transport enrichment medium*, meio de transporte e enriquecimento

TSI – *Triple sugar iron*

1. Introdução

A rentabilidade de uma exploração de bovinos, quer de aptidão leiteira, quer para produção de carne, é fortemente afetada por fatores reprodutivos, que por sua vez estão ligados a fatores nutricionais, genéticos, sanitários, de manejo, entre outros (Pellegrin, 2002; Junqueira & Alfieri, 2006; Gomes, 2012).

O diagnóstico de problemas reprodutivos de bovinos é uma tarefa difícil, sendo que a avaliação dos parâmetros nutricionais, ambientais e de manejo são muito importantes para se diferenciar afeções de origem infecciosa, das afeções resultantes de deficiências nutricionais ou de falhas de manejo (Junqueira & Alfieri, 2006). As afeções de origem infecciosa são responsáveis por mais de 50% das falhas reprodutivas verificadas quer por elevadas taxas de aborto, quer por outras causas que levam à infertilidade, temporária ou até mesmo permanente (Pellegrin, 2002).

As alterações reprodutivas, como o aumento no intervalo entre partos, são pouco perceptíveis em vacadas criadas em extensivo sem o acompanhamento zootécnico devido, o que dificulta a suspeita e identificação de doenças que possam estar a provocar prejuízos aos produtores. Assim, a análise dos dados reprodutivos das vacadas deverá ser o primeiro passo para o diagnóstico de problemas reprodutivos. Esta análise deverá passar pela avaliação de algumas variáveis, como por exemplo: número de beneficiações por concepção, intervalo entre partos, intervalo entre parto e concepção, intervalo entre parto e primeira beneficiação, taxa de não retorno ao cio e taxa de partos (Pellegrin, 2002). Por sua vez, estes dados deverão ser associados ao histórico da exploração e aos sinais clínicos apresentados, para que se definam diagnósticos diferenciais e se proceda à colheita de amostras clínicas e exames a serem requisitados (Hoffer, 1981).

Diversas doenças poderão afetar o nível de eficiência reprodutiva, tais como a leptospirose, diarreia viral bovina (BVD), rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), brucelose, neosporose, entre outros (Pellegrin, 2002). Contudo, as doenças que apresentam sinais clínicos mais exuberantes como o aborto, são aquelas que despertam mais a atenção dos técnicos e produtores, levando deste modo à implementação de programas de controlo. Por sua vez, algumas doenças, como a Campilobacteriose Genital Bovina (CGB), podem não apresentar sinais clínicos tão evidentes, como a repetição de cios, ficando assim por diagnosticar em muitas explorações, apesar de provocarem grandes prejuízos económicos (Pellegrin, 2002).

A espécie *Campylobacter fetus* é dividida em duas subespécies, *Campylobacter fetus* subs. *fetus* (Cff) e *Campylobacter fetus* subs. *venerealis* (Cfv). A divisão da espécie *C. fetus* foi baseada na diferença entre as doenças causadas e nos nichos ecológicos das duas subespécies. A subespécie Cff é um agente patogénico zoonótico, responsável por provocar

aborto esporádico em ovinos e bovinos (Smibert, 1978). Este agente patogénico pode ser encontrado no trato gastrointestinal de ovinos e bovinos e é de transmissão feco-oral, através da ingestão de alimentos ou água contaminada com fezes, fetos abortados ou corrimentos vaginais de animais que abortaram (Penner, 1988).

A subespécie Cfv é responsável por uma doença de transmissão venérea, a CGB, anteriormente conhecida como Vibriose Bovina (Eaglesome & Garcia, 1992). O habitat natural deste agente microaerófilo é o trato reprodutivo dos bovinos, nomeadamente a superfície das mucosas. A CGB acomete bovinos em idade reprodutiva, em que o macho é apenas um portador assintomático da bactéria, não provocando neste infeção, mas na fêmea a doença provoca infertilidade (Hoffer, 1981; Molina, 2012). A infertilidade deriva de morte embrionária e fetal, resultando num maior intervalo entre partos, queda na produção de vitelos nascidos e produção de leite e presença de piómetra em alguns animais. Outro fator importante para o impacto económico desta doença é um aumento na frequência da reposição de touros. Nos países onde ocorre, esta doença causa grande impacto económico, uma vez que leva a uma média de 60% de taxa de retorno ao cio e que apenas 35% das novilhas cobertas fiquem prenhas (McCool *et al.*, 1988).

A CGB faz parte da lista de doenças de declaração obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (*Office International des Épizooties* - OIE). Esta organização classifica a CGB como uma doença transmissível de importância sócio-económica e / ou de importância para a saúde pública e que é significativa no comércio internacional de animais e produtos de origem animal (OIE, 2013a).

O diagnóstico laboratorial é fundamental para a confirmação da infeção por *Campylobacter fetus*, sendo que os sinais clínicos e o histórico da exploração são meramente indicadores da infeção por este agente. O isolamento e identificação do agente etiológico podem ser realizados através da análise de amostras recolhidas de fetos e invólucros fetais, secreções uterinas ou vaginais e esmegma ou sémen de animais suspeitos. Preferencialmente, as amostras devem ser recolhidas de machos, dado que estes se encontram em menor número na exploração e por serem os principais disseminadores da doença no rebanho (Miranda, 2005).

Esta é uma doença de distribuição mundial e é responsável por importantes percas económicas. Segundo dados da OIE, a CGB está presente em países como a África do Sul, Argentina, Brasil, Canadá, Estados Unidos da América, França, Inglaterra, Nova Zelândia, entre outros (OIE, 2013b).

Principalmente em países desenvolvidos, onde a produção é predominantemente intensiva, a inseminação artificial (IA) tem substituído em larga escala a monta natural, o que tem permitido a prevenção da transmissão de algumas doenças reprodutivas, tais como a CGB, devido ao maior controlo que se tem na qualidade do sémen. A CGB foi a razão original para a adição de antibióticos ao sémen, sendo que se este procedimento for corretamente executado há a certeza de que o sémen está livre de Cfv (Shisong *et al.*, 1990).

Em locais onde a monta natural prevalece sobre a IA, a prevalência de CGB pode atingir níveis altos (BonDurant, 2005). Contudo, a prevalência desta doença poderá ser também elevada se a IA não for realizada com os cuidados de higiene necessários ou se for utilizado sémen contaminado (Claessens, 2010).

Atualmente as vacinas desenvolvidas estão ainda aquém das necessidades, pois ainda não produzem a imunidade desejada para o controlo eficaz desta doença. Pelo que a implementação de planos de controlo com recurso a regras de manejo torna-se preponderante.

Neste trabalho pretende-se estimar a prevalência de infeção por *Campylobacter fetus* na região do Alentejo. Para isso foram recolhidas amostras pelo método da raspagem prepucial de touros presentes nesta região. Existem diferentes técnicas de diagnóstico para esta doença, todavia neste caso a pesquisa de *Campylobacter fetus* foi feita por Imunofluorescência Direta (IFD). Foi também realizado o isolamento desta espécie bacteriana a partir das amostras recolhidas de alguns animais.

2. Revisão bibliográfica - Campilobacteriose genital bovina (CGB)

2.1. Contexto histórico e classificação do agente etiológico

Desde há muito tempo que os microrganismos hoje em dia classificados no género *Campylobacter* têm sido um problema para médicos veterinários. Um “vibrião” foi designado como causa de aborto em ovelhas em 1909 e em bovinos em 1913 (McFadyean & Stockman, 1913). Em 1918, um “espirilo” foi isolado a partir de bezerros abortados, e mais tarde classificado como *Vibrio fetus* por Smith e Taylor (1919). Em 1957, King reportou 11 isolados diferentes a partir de sangue humano, sendo que sete dos quais eram *V. fetus* e os outros quatro eram de estirpes estreitamente relacionadas com *V. fetus*, as quais designou de “*related vibrios*” (King, 1957). King relatou que estes últimos cresciam a 42°C, mas não a 25°C e que eram antigenicamente diferentes em estudos serológicos. Estes “*related vibrios*” eram também possíveis responsáveis por gastroenterites. Em 1959, Florent dividiu a espécie *Vibrio fetus* em duas subespécies consoante a tolerância à glicina, o *Vibrio fetus intestinalis* (tolerante à glicina) e o *Vibrio fetus venerealis* (intolerante à glicina) (Florent, 1959).

Só em 1963, Sebald e Véron, com base na fermentação da glicose e conteúdo em guanina e citosina no DNA de algumas bactérias do género *Vibrio*, propuseram a criação do género *Campylobacter* (Sebald & Véron, 1963). Em 1973, Véron e Chatelain reclassificaram a bactéria *Vibrio fetus* em *Campylobacter fetus* e os “*related vibrios*” em *C. coli* e *C. jejuni* (Véron & Chatelain, 1973).

Em 1974, o nome destas duas espécies foi novamente modificado, passado a denominar-se por *Campylobacter fetus intestinalis* o anteriormente chamado *Campylobacter fetus fetus*, e o *Campylobacter fetus venerealis* passava-se a chamar *Campylobacter fetus fetus* (Smibert, 1974). Porém esta denominação não perdurou muito tempo, pois uns anos mais tarde Skerman e colaboradores (1980) voltaram a intitular estas duas subespécies do mesmo modo que Véron e Chatelain (1973) as tinham classificado (Tabela 1).

Tabela 1 Nomenclaturas utilizadas para o *Campylobacter fetus*

Autor	Nomenclatura	
Smith e Taylor (1919)	<i>Vibrio fetus</i>	
Florent (1959)	<i>Vibrio fetus intestinalis</i>	<i>Vibrio fetus venerealis</i>
Véron e Chatelain (1973)	<i>Campylobacter fetus fetus</i>	<i>Campylobacter fetus venerealis</i>
Smibert (1974)	<i>Campylobacter fetus intestinalis</i>	<i>Campylobacter fetus fetus</i>
Skerman e colaboradores (1980)	<i>Campylobacter fetus fetus</i>	<i>Campylobacter fetus venerealis</i>

O nome *Campylobacter* deriva da palavra grega para bastonete curvado (Penner, 1988). O género *Campylobacter* pertence à classe *Epsilonbacteria*, à ordem *Campylobacterales* e à família *Campylobacteraceae*. Este género é composto por um grupo de bactérias que vivem em diferentes habitats e produzem diversas doenças em diferentes hospedeiros (On, 2001). Neste estudo será abordada a espécie *Campylobacter fetus* composta por duas subespécies, *Campylobacter fetus* subs. *fetus* (Cff) e *Campylobacter fetus* subs. *venerealis* (Cfv).

As espécies deste género são bactérias bastonadas, Gram-negativas, móveis, pequenas, com a forma de vírgula ou em forma de “S” ou asa de gaivota (Figura 1) e possuem um ou dois flagelos polares simples (Alves *et al.*, 2011). O seu comprimento é de 0,5 a 10 µm e o diâmetro varia entre 0,2 e 0,5 µm. Os polos da bactéria são normalmente pontiagudos (Smibert, 1978). Este género é composto por bactérias microaerófilas, que necessitam de uma concentração de oxigénio entre 3 a 15%. No caso do Cff e Cfv necessitam de uma atmosfera rica em dióxido de carbono e uma concentração de oxigénio entre 5 e 6% (Alves, 2010; Fernandes, 2009). Estas são bactérias muito fastidiosas e que não formam esporos. Nas amostras procedentes de animais infetados apresentam-se sob a forma de “S” ou de vírgulas pequenas e apenas raramente sob a forma alongada. Nas culturas mais antigas podem apresentar formas cocoídes (Ng *et al.*, 1985), que aparentemente parece ser uma forma degenerativa, visto que as culturas compostas maioritariamente por estas formas, não são viáveis (Smibert, 1978).



Figura 1 *Campylobacter fetus*, microscopia eletrónica (Cattaneo, 2004)

A sua motilidade pode ser observada em microscopia de contraste de fase ou de campo escuro (Miranda, 2005), e é caracterizada por um movimento rápido em saca-rolhas (Smibert, 1978; Hoffer, 1981; Figueiredo, 2001). O flagelo é duas a três vezes mais comprido

que o comprimento da célula. Algumas células podem apresentar mais que um flagelo em cada polo (Smibert, 1978). Os flagelos são de grande importância para esta espécie, visto que estão envolvidos na motilidade, quimiotaxia e secreção de proteínas e evasão à resposta imune inata (Guerry, 2007).

As bactérias pertencentes a este género são não-proteolíticas, não fermentam ou oxidam carboidratos e não podem fosforilar ou transportar a glicose. A energia utilizada para o crescimento é derivada do ciclo de Krebs. Assim sendo, apenas um pequeno número de características morfológicas e fisiológicas podem ser utilizadas para a identificação e classificação deste género. A espécie *Campylobacter fetus* é catalase e oxidase positivos e tem um crescimento ótimo a 37 °C, contudo podem também crescer a 25 °C (Schmidt, 2009).

Campylobacter fetus classifica-se em dois serotipos, de denominação de A e B, com base na composição do lipopolissacarídeo da parede celular, correspondendo ao tipo de proteínas de superfície (*sap a* ou *sap b*). Cff apresenta ambos os serotipos (A e B), já Cfv apresenta apenas o serotipo A (Thompson & Blaser, 2000). Cfv é, ainda, composto por duas biovariedades, *Campylobacter fetus venerealis* biovar *venerealis* (Cfvv) e *Campylobacter fetus venerealis* biovar *intermedius* (Cfvi) (Hum *et al.*, 2009).

Apenas a subespécie Cfv provoca CGB, sendo que Cff é responsável por infertilidade enzoótica em ovinos e aborto esporádico em bovinos, não estando normalmente associado a infertilidade nesta última espécie (Groff, 2005). *Campylobacter fetus* pode ser isolado a partir de ruminantes, possuindo uma localização intestinal (Cff) ou extraintestinal, mais propriamente genital (Cfv). Cff poderá ser encontrado na cavidade prepucial de touros, como resultado da contaminação fecal desta zona (Wagenaar *et al.*, 2001). Cff pode ainda ser isolado a partir de outras fontes, tais como outros ungulados, répteis, galinhas e humanos. Em relação a Cfvi, apesar de este apresentar características semelhantes a Cfvv, é ainda questionável se este ocorre apenas no trato genital ou se também no trato intestinal (Gomes, 2012; Iraola *et al.*, 2012).

Cfv é de transmissão estritamente venérea, sendo que não consegue sobreviver no intestino. Pelo contrário, Cff é um habitante comum da flora intestinal de bovinos e ovinos (Groff *et al.*, 2010), mas poderá infetar o trato genital por via sanguínea e visto que é capaz de sobreviver na cérvix e vagina até 12 meses, poderá provocar o aborto (Romero, 2008).

Entre estas duas subespécies, apenas Cff poderá constituir uma zoonose, apesar de não ser muito frequente (Salama *et al.*, 1992). No Homem, esta espécie pode causar enterite ou infeções extraintestinais, como aborto, bacteriémia, endocardite e meningite (On & Harrington, 2001), nomeadamente em pacientes com doenças subjacentes, tais como cirrose, imunossupressão, neoplasias ou válvula cardíaca danificada. As mulheres grávidas podem também ser afetadas, mesmo que não possuam nenhuma das doenças subjacentes anteriormente citadas (Kwon *et al.*, 1994). Segundo Kalka-Moll *et al.*, (2005), Cff é um agente zoonótico subdiagnosticado em humanos, devido às suas características fastidiosas que requerem a utilização de meios de cultura que diferem das restantes espécies de

Campylobacter, visto que para estas os meios utilizados contém antibióticos como a cefalotoína e a cefoperazona, para os quais *Campylobacter fetus* pode ser suscetível. Guerrant e outros (1978) relatam que nunca foram reportadas infecções em humanos por Cfv.

Apesar destas duas subespécies habitarem nichos ecológicos distintos e de possuírem diferentes características fenotípicas, o seu DNA possui uma homologia de aproximadamente 98% (Pellegrin, 2001). A divisão da espécie *C. fetus*, que foi baseada nas doenças causadas pelas duas subespécies em questão, foi sustentada por um estudo de On e Harrington (2001) que combinaram diferentes métodos de identificação (identificação fenotípica, PCR e electroforese em gel pulsado – PFGE). Segundo estes autores para a diferenciação das subespécies é necessária a utilização de mais que um método. Porém, o *gold standard* para a diferenciação entre Cff e Cfv continua a ser a prova de crescimento em meio contendo 1% de glicina, em que a subespécie Cff apresenta um resultado positivo, enquanto a subespécie Cfv não apresenta crescimento (Lage & Leite, 2000). Esta é uma característica essencial na caracterização fenotípica de estirpes isoladas, contudo a biovariedade Cfvi apresenta uma tolerância intermédia à glicina, adquirida por transmutação genética, o que traz alguns problemas na diferenciação correta das subespécies (Chang & Ogg, 1971).

Para uma mais correta diferenciação, diversos estudos têm sido elaborados com o objetivo de aprimorar as técnicas moleculares na diferenciação das subespécies (Salama *et al.*, 1992; Wagenaar *et al.*, 2001; Schulze *et al.*, 2006; Moolhuijzen *et al.*, 2009; Stynen *et al.*, 2011).

Com a disponibilidade de técnicas de genotipagem extremamente sensíveis, como a tipificação multilocus de sequências (*multilocus sequence typing* – MLST) verificou-se que, através da avaliação de uma coleção internacional de isolados de *C. fetus*, os isolados classificados fenotipicamente como Cfvi deveriam ser reclassificados como uma nova subespécie, pois apesar de serem homólogos genéticos, há diferenças fenotípicas (van Bergen, 2005, referido por: Schmidt, 2009).

2.2. Epidemiologia

A CGB é prevalente onde não há plano sanitário ou onde este é imperfeito (Gomes, 2012). Na década de 70 já se tinha registado a presença desta doença em 41% dos países pertencentes à OIE (Stoessel, 1982). Como se pode ver na Figura 2, esta doença tem uma prevalência considerável principalmente na América do Norte, na América do Sul, na Austrália, em alguns países europeus e no sul do continente africano. Contudo, não há dados de muitos países, e nos países onde a doença não foi relatada no período, pode apenas não ter havido pesquisa do agente, não significando assim que não existam casos clínicos nesse país. Este é o caso de Portugal onde não há vigilância ativa da doença, pelo que não se sabe a prevalência da doença no país (OIE, 2013b).

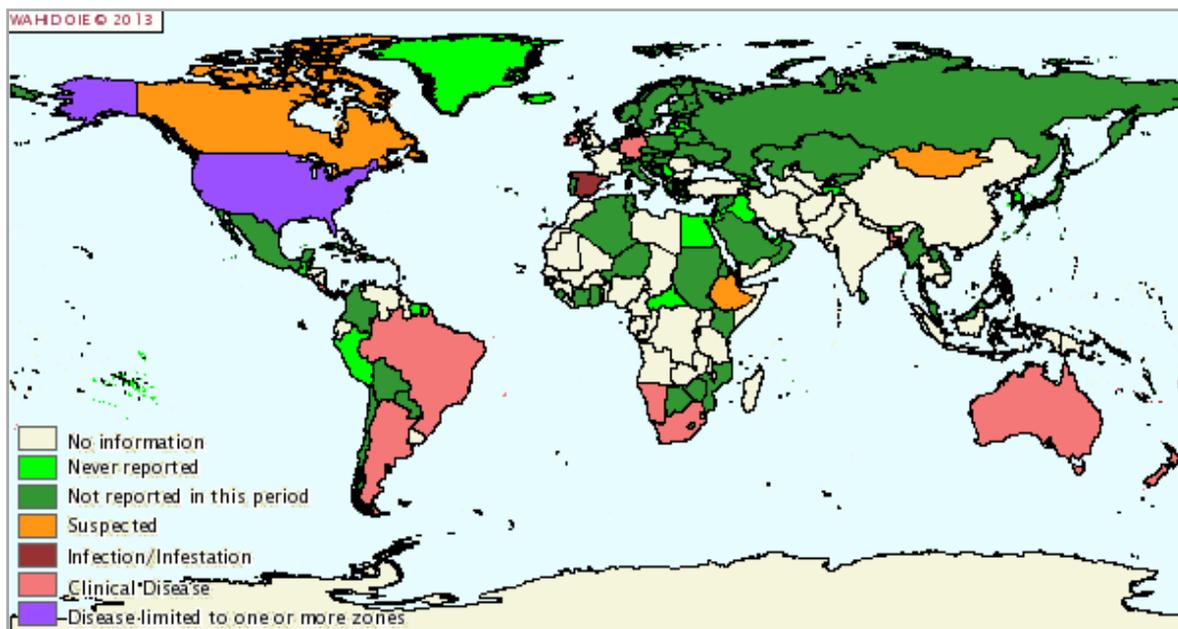


Figura 2 Mapa de distribuição mundial da campilobacteriose genital bovina, entre julho a dezembro de 2012. A branco – sem informação; a verde claro – sem reporte; a verde escuro – não reportado no período; a cor-de-laranja – suspeito; a castanho – infecção; a vermelho – doença clínica; a roxo – doença limitada a uma ou mais zonas (OIE, 2013).

Por ser uma doença de carácter subclínico e de difícil diagnóstico, a prevalência de CGB tende a ser subestimada. Num estudo com o objetivo de determinar quais as metodologias utilizadas na deteção e identificação de Cfv, van Bergen e colaboradores (2005a) enviaram questionários a vários países da OIE e constataram que há uma grande diversidade nos métodos de diagnóstico da CGB utilizados, o que leva a uma variação na sensibilidade dos testes usados. É importante minimizar a variação, e, por conseguinte, é recomendado que os laboratórios realizem testes de acordo com os procedimentos padrão. Na Tabela 2 está resumida a prevalência em diferentes zonas do mundo, que foi avaliada com diferentes métodos e, por isso, com diferentes sensibilidades.

Como já foi referido, esta doença faz parte da lista de doenças de declaração obrigatória da OIE, pois é considerada uma doença com implicações socioeconómicas e de saúde pública, e que tem especial importância no que diz respeito às trocas internacionais de animais e dos seus subprodutos (McMillen *et al.*, 2006). Por exemplo, as diretrizes internacionais para a exportação de sêmen de touros, requerem que estes sejam negativos para a CGB (OIE, 2012a).

Tabela 2 Resumo dos dados publicados sobre a prevalência de Cfv em diferentes países.

País	Tipo de amostra	Tamanho da amostra	Prevalência	Método de diagnóstico	Bibliografia
África do Sul	Touros (raspagem ou lavagem prepucial)	1 912 animais	1,78%	Reação em cadeia da polimerase	Madoroba <i>et al.</i> , 2011
África do Sul (Gauteng)	Touros (lavagem prepucial)	143 animais 19 explorações	1,4% (animais) 5,3% (explorações)	Bacteriologia e reação em cadeia da polimerase	Njiro <i>et al.</i> , 2011
África do Sul (Transkei)	Touros (lavagem prepucial)	87 animais	28,7%	Bacteriologia	Pefanis <i>et al.</i> , 1988
Argentina (La Pampa)	Touros (raspagem ou lavagem prepucial)	29 178 animais 3 278 explorações	1,50% (animais) 2,28% (explorações)	Imunofluorescência direta	Molina, 2012
Austrália (Território do Norte)	Touros (aspiração prepucial)	41 explorações	87%	Imunofluorescência direta	McCool <i>et al.</i> , 1988
Brasil	Touros (lavagem prepucial)	1191 animais 120 explorações	19,7% (animais) 50,8% (explorações)	Imunofluorescência direta	Miranda, 2005
Brasil	Touros, vacas e fetos	942 animais 114 explorações	27,92% (animais) 50,88% (explorações)	Imunofluorescência direta	Lage <i>et al.</i> , 1997
Brasil	Touros e vacas	248 animais 21 explorações	28,63% (animais positivos) 13,31% (animais suspeitos) 95,2% (explorações)	Bacteriologia (touros) e aglutinação do muco cérvico-vaginal (vacas)	Jesus <i>et al.</i> , 1999
Brasil (Distrito Federal)	Touros e vacas	398 animais	11,1%	Imunofluorescência direta	Leal <i>et al.</i> , 2012
Brasil (Mato Grosso do Sul)	Touros (lavagem prepucial)	327 animais 19 explorações	52,3% (animais) 89,5% (explorações)	Imunofluorescência direta	Pellegrin <i>et al.</i> , 2002

País	Tipo de amostra	Tamanho da amostra	Prevalência	Método de diagnóstico	Bibliografia
Brasil (Varginha)	Vacas (muco cervico-vaginal)	157 animais	25,5%	Imunofluorescência direta	Stynen <i>et al.</i> , 2003
Escócia	Touros	109 animais	0%	Bacteriologia	McGowan & Murray, 1999
Malawi	Touros e vacas	349 machos 351 fêmeas	11,46% (machos) 13,96% (fêmeas)	s.i.	Klastrup & Halliwell, 1977
Namíbia	Touros (raspagem ou lavagem prepucial)	1 201 animais	2,08%	Reação em cadeia da polimerase	Madoroba <i>et al.</i> , 2011
Nigéria	Touros e vacas	689 animais	1,9%	Bacteriologia	Bawa <i>et al.</i> , 1991
Nigéria	Touros e vacas	270 animais	2,2%	Bacteriologia	Mshelia <i>et al.</i> , 2012
Nova Zelândia	Touros e Vacas	54 machos 9 explorações 1 230 fêmeas 125 explorações	0% (machos) 0% (explorações - machos) >20% (fêmeas) 70% (explorações - fêmeas)	Bacteriologia (touros) e Ensaio imunoenzimático (vacas)	McFadden <i>et al.</i> , 2005
Tanzânia	Touros (raspagem ou lavagem prepucial)	58	5,1%	Bacteriologia	Swai <i>et al.</i> , 2005
Zâmbia	Touros (raspagem ou lavagem prepucial)	41 animais	2,44%	Reação em cadeia da polimerase	Madoroba <i>et al.</i> , 2011

s.i.- sem informação

2.3. Transmissão

Como já foi referido, Cfv é um microrganismo microaerófilo e muito sensível à desidratação, não resistindo assim por longos períodos de tempo no meio ambiente. Assim, o meio de transmissão ocorre sobretudo pelo contacto direto entre touros e vacas (Fernandes, 2009). Esta faz-se venerealmente, ou seja através do coito. A transmissão de Cfv de machos infetados para fêmeas suscetíveis pode chegar a 100% (Pellegrin *et al.*, 2003a). Por sua vez,

os touros adquirem a infecção através da cópula com fêmeas infetadas. Segundo Fraser e colaboradores (1996), a suscetibilidade à infecção nos touros é variável, enquanto alguns ficam portadores permanentes da doença, outros permanecem resistentes a esta. Foi também já descrita a transmissão através de fomites, nomeadamente por utensílios usados na recolha de sémen, utilização de sémen contaminado ou quando touros infetados e não infetados são mantidos na mesma baia, havendo transmissão através da cama (Fernandes, 2009). Por fim a transmissão pode ainda ocorrer quando machos montam outros machos (Wagner *et al.*, 1965; Eaglesome & Garcia, 1997; Lage & Leite, 2000). A transmissão entre fêmeas nunca foi documentada (Gomes, 2012).

A utilização de touros infetados, pelo sistema de empréstimo entre as pequenas propriedades rurais representa um risco à difusão da doença (Gomes, 2012). A principal forma de introdução de CGB numa vacada é pela aquisição de touros infetados ou, menos frequente, de fêmeas infetadas (Hum *et al.*, 2009).

Quanto à subespécie Cff, esta é habitante da flora intestinal que, ocasionalmente, por via hemática coloniza a cérvix e a vagina da vaca e possivelmente o útero, invadindo o endométrio e colonizando também a placenta e o feto. A sua transmissão é realizada por via feco-oral, através da contaminação do alimento e da água com material fecal, mas também por material proveniente de fetos abortados, membranas fetais e corrimentos vaginais de animais que abortaram (Penner, 1988; Garcia *et al.*, 1983). Embora raros, já foram registados surtos alimentares de Cff em humanos, em consequência do consumo de carne, leite cru e queijo-fresco. Num estudo de vigilância de dois anos, de 1987 a 1989, nos Estados Unidos da América, os Centros de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) relataram 122 casos humanos de infecção por Cff (Mishu *et al.*, 1992, referido por: Oyarzabal *et al.*, 1997).

2.4. Fisiopatologia

Como é observado na maioria das doenças venéreas das espécies domésticas, a infecção no macho é limitada, assumindo assim este a condição de portador assintomático (Rae & Crews, 2006). Nos touros infetados, Cfv localiza-se na cavidade prepucial, mais propriamente no esmegma (Romero, 2008), sendo a sua maior concentração na fórnix do prepúcio e no pénis (Hoffer, 1981). Esta bactéria não provoca lesões no macho e a qualidade do sémen não é afetada, daí que os touros sejam considerados portadores assintomáticos. Sabe-se ainda que o número de microrganismos presentes na cavidade prepucial varia consideravelmente consoante a atividade sexual do animal (Figueiredo, 2001).

É ainda incerto se a infecção genital com Cfv é influenciada pela idade dos touros. Bier e outros (1977) não encontraram diferenças na duração da infecção entre touros de 3,5-4 anos e 5,5-6 anos. Por outro lado, num estudo de Wagner e outros (1965) verificou-se que existia uma maior incidência da infecção por Cfv em touros com idade superior a 6 anos.

Os touros mais velhos têm criptas prepuciais mais profundas, em maior número e com maior produção de secreções, o que proporciona um meio ideal para a multiplicação de *Cfv* (Romero, 2008; Alves, 2010), dadas as suas características microaerófilas (Clark, 1971; Stoessel, 1982). Em touros novos, com menos de 3 a 4 anos, as criptas ainda não estão bem desenvolvidas, pelo que as infeções tendem a ser passageiras (Garcia *et al.*, 1983), durando entre 67 dias a três meses (Figueiredo, 2001). A presença de poucas criptas e de pouca profundidade na mucosa prepucial está na origem da recuperação espontânea destes animais. Concomitantemente, em touros jovens é comum a contaminação fecal do prepúcio e pênis, o que resulta numa mudança na flora microbiana na zona, que irá competir com a multiplicação do *C. fetus* (Figueiredo, 2001). Contudo, estes animais podem servir como vetores mecânicos e não deixam de ser importantes vetores da doença.

Quanto às alterações histológicas provocadas pela infeção de *Cfv* em touros, as opiniões dividem-se. Segundo Bier e colaboradores (1977) e Samuelson e Winter (1966), a infiltração de linfócitos e plasmócitos na zona subepitelial é semelhante no prepúcio e no pênis dos touros infetados e não-infetados. Por sua vez, Hoffer (1981) refere que podem ser encontradas algumas alterações em touros infetados, nomeadamente uma infiltração difusa de células mononucleadas na lâmina própria e a localização de plasmócitos em aglomerados no ápex das papilas dérmicas no epitélio da glândula, prepúcio e uretra, principalmente em touros mais velhos.

A falta de estimulação antigénica pelo microrganismo, visto que este está restrito à superfície epitelial, pode justificar a ausência de resposta imunitária. Bier e colaboradores (1977) verificaram que não existia diferença na concentração de imunoglobulinas anti-*C. fetus* no esmegma em touros, antes e após a infeção, permanecendo os seus títulos baixos. A baixa concentração de imunoglobulinas pode ser a explicação para que os touros permaneçam portadores da doença. As alterações antigénicas da bactéria, que mais à frente serão explicadas, contribuem também para a falta de resposta imunitária local (Hoffer, 1981). Nos touros mais velhos, dado que o epitélio tem uma maior espessura, a transdução de imunoglobulinas é ainda menor, pelo que a recuperação da infeção é menos provável (Romero, 2008).

A infeção por *Cfv* nos machos não provoca alterações comportamentais, na qualidade do sêmen ou na fertilidade dos machos infetados. Contudo, há uma escassez de estudos realizados de forma a avaliarem os efeitos de *Cfv* na qualidade e viabilidade do sêmen bovino. Shisong e outros (1990) incubaram amostras de sêmen, experimentalmente infetadas com *Cfv*, com um conjunto de antibióticos, e concluíram que não havia alterações significativas na motilidade espermática. De forma a determinar o efeito da infeção por *C. fetus* no sêmen, Zan Bar e colaboradores (2008) incubaram sêmen de ovino com *Cff*, o que provocou uma alteração na motilidade e viabilidade espermática.

Embora se estime que 10 a 15% das fêmeas sejam naturalmente resistentes à infeção, qualquer primoinfetada é considerada suscetível (Romero, 2008). Por exemplo, num estudo de

Cobo e colaboradores (2003), em que se procurava avaliar o efeito da vacinação, uma novilha do grupo de controlo que foi coberta por um touro infetado, verificou-se que esta não foi infetada e teve uma gestação normal. Este fenómeno de resistência natural à infeção, apesar da exposição repetida a touros infetados ou da deposição de grandes quantidades de organismos viáveis no trato reprodutivo, já havia sido descrito anteriormente por Dufty e Vaughan (1993) (referido por: Cobo *et al.*, 2003). A transmissão venérea ocorre na fase folicular do ciclo éstrico, o que leva a uma colonização inicial praticamente restrita à vagina, pois no útero abundam as imunoglobulinas (embora não específicas), os neutrófilos e outras células fagocitárias. Assim, apenas as bactérias que evitem a fagocitose vão conseguir colonizar, nesta fase, o útero (Romero, 2008; Fernandes, 2009). Nos primeiros 20 dias após a infeção, ocorre infiltração na mucosa por parte da bactéria e fagocitose por polimorfonucleares. Durante a fase luteínica do ciclo éstrico ou no início da gestação, o número de anticorpos no útero é menor, o que facilita muito o desenvolvimento de Cfv. Em cerca de 25% das novilhas há também a colonização dos ovidutos (Fernandes, 2009), o que poderá provocar esterilidade.

O processo de infeção é um fenómeno multifatorial, que depende da interação de características do microrganismo e do hospedeiro. Para que ocorra a infeção, um dos primeiros passos é a adesão do microrganismo à célula do hospedeiro. Após esta ligação, inicia-se a sinalização celular, que irá desencadear o processo de resposta imune do hospedeiro. Fatores como motilidade do microrganismo, capacidade de adesão, produção de toxinas, proteases e fatores quimiotáticos estão envolvidos na patogenia de Cfv e podem colaborar para a evasão ao sistema imune por estes microrganismos (Johnson & Lior, 1988; Kania *et al.*, 2001). Entre os vários fatores de virulência de Cfv, já foi descrita a secreção de citotoxinas, sendo uma das mais importantes e estudada a *Cytolethal Distending Toxin* (CDT) que é codificada por três genes adjacentes, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, que podem causar distensão celular seguida de morte celular (Johnson & Lior, 1988).

O género *Campylobacter* spp. possui proteínas imunogénicas que são importantes para a colonização do hospedeiro. Segundo Dunn e outros (1987), as principais proteínas imunogénicas encontradas em *C. fetus* são: proteínas da membrana externa, de baixo peso molecular (entre 43 e 44 kDa), o flagelo, com um peso molecular de 63 kDa, glicopolissacarídeos, com um peso molecular de 100 kDa e as proteínas da camada S. O flagelo é de elevada antigenicidade e é mais facilmente atacado por anticorpos, pelo que é considerado o ponto vulnerável para a resposta imune (Romero, 2008).

Sabe-se também que o género *Campylobacter* se encontra extremamente adaptado à sobrevivência em superfícies mucosas do trato genital no hospedeiro, sendo a motilidade muito importante neste contexto. O flagelo é de grande importância para Cfv, estando envolvido na motilidade, quimiotaxia, secreção de proteínas e a evasão da resposta imune inata (Guerry, 2007). Esta estrutura parece desempenhar um papel vital na aderência a células epiteliais (Bhavsar & Kapadnis, 2007).

Por sua vez, a camada S, que se localiza na cápsula desta bactéria, é também de elevada antigenicidade. Esta camada possui diferentes proteínas de elevado peso molecular (97 a 149 kDa) denominadas de proteínas *sap* (*Surface Array Proteins*) (Garcia *et al.*, 1995). Pei e Blaser (1990) demonstraram que as proteínas *sap* não são tóxicas, mas a sua presença na superfície celular, aumenta a virulência da bactéria.

Cada proteína da camada S é codificada por um dos vários homólogos do gene *sapA* (Blaser *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1995). Tu e colaboradores (2005) concluíram que a deleção do gene *sap* resulta numa acentuada redução da virulência da bactéria. A alternância do promotor único entre as diversas cópias homólogas do gene *sap*, por recombinação, leva à tradução de diferentes proteínas de superfície, o que se traduz em diferentes epítomos dominantes durante a persistência da bactéria no trato genital (Wang *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1995). Estas proteínas cristalinas podem mudar a sua conformação, adquirindo padrões hexagonais, tetragonais ou oblíquos. Pensa-se que as formas específicas que estas podem adquirir estão relacionadas com o tamanho molecular e com a antigenicidade. Uma única célula pode expressar diferentes formas das proteínas *sap*, sendo sempre uma delas a mais predominante (Gomes, 2012). Garcia e outros (1995) demonstraram a variação antigénica de uma proteína de 100 kDa, ao longo da infeção, através de um reordenamento dos genes que codificavam essa proteína. Porém, pouco é conhecido sobre os mecanismos regulatórios genéticos que envolvem a capacidade de *C. fetus* produzir múltiplas formas da camada S, bem como o mecanismo de iniciação e suspensão da sua produção (Gomes, 2012).

A presença da camada S evita a aderência da fração C3 do complemento, o que impede a opsonização (Lage & Leite, 2000; Romero, 2008). Blaser e colaboradores (1994) demonstraram que *C. fetus* tinha a capacidade de modificar antigenicamente estas proteínas, e após passagens sucessivas em meio de cultura, observava-se a diminuição da virulência da bactéria em camundongos inoculados. A capacidade de mutação antigénica destas proteínas constitui um meio de fugir à resposta imune.

Em resultado da infeção com Cfv, as mudanças histológicas na mucosa uterina iniciam-se após o 5º dia, ficando mais evidentes entre o dia 15 e 20, e atingem o pico entre o 30º e o 60º dia (Alves, 2010). Embora, normalmente, não se observem lesões macroscópicas, pois a infeção apenas se estabelece na superfície da mucosa, há um aumento da inflamação com infiltração de, primeiramente, neutrófilos e eosinófilos e depois por monócitos, linfócitos e macrófagos (Romero, 2008).

A subespécie Cfv é um agente patogénico extracelular não invasivo, de modo que os anticorpos são críticos para a proteção (Corbeil *et al.*, 2003). As imunoglobulinas que aparecem inicialmente em fêmeas infetadas são as imunoglobulinas M (IgM), seguidas das IgA, e por último das IgG (Corbeil *et al.*, 1974). Estas imunoglobulinas são sintetizadas a nível local, uma vez que não são detetadas no soro sanguíneo após a infeção (Hoffer, 1981). Há uma grande produção destas imunoglobulinas, sendo as mais importantes as da classe G (IgG), predominantemente no útero, e da classe A (IgA), essencialmente na vagina (Groff, 2005).

Uma a duas semanas após a infecção, as concentrações da imunoglobulina M (IgM) contra Cfv aumentam no muco cérvico-vaginal, e persistem por oito a dezoito semanas. Por sua vez, a IgA específica contra Cfv aparece no muco cérvico-vaginal por volta das três a cinco semanas após a infecção, e pode persistir durante cerca de 40 semanas (Lage & Leite, 2000). Como não têm uma grande capacidade de opsonização, as IgA atuam imobilizando as bactérias no muco cérvico-vaginal e limitam a entrada das bactérias no útero, facilitando assim a expulsão de Cfv, principalmente durante o estro (Lage & Leite, 2000). As concentrações de IgG são mais elevadas no útero e na vagina, que na cérvix, e aparecem no muco cérvico-vaginal por volta da oitava semana após a infecção, podendo persistir durante 24 a 36 semanas (Lage & Leite, 2000). Assim, é nesta fase que há uma maior transudação de IgG, o que permite a eliminação da infecção, pois as IgG são excelentes opsoninas, facilitando a fagocitose da bactéria por macrófagos e neutrófilos. Visto que não são detetados títulos de imunoglobulinas sistemicamente durante ou após a infecção (Corbeil *et al.*, 1981), parece evidente que a produção destas é realizada a nível local (Hoffer, 1981).

Num estudo de Corbeil e colaboradores (1975), a capacidade dos fagócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) e mononucleares de bovinos para eliminar Cfv foi testada sob várias condições, a fim de julgar o papel destas células na imunidade. Os PMN têm a capacidade de eliminar Cfv na presença de IgG, mas não na presença de IgA. Os fagócitos mononucleares também conseguem eliminar Cfv na presença de opsoninas, tornando este um provável fator de proteção durante as fases posteriores de inflamação, quando predominam as células mononucleares. A presença de numerosos linfócitos nesta infiltração mononuclear e a capacidade dos antigénios de Cfv para induzir uma hipersensibilidade retardada são consistentes com a possibilidade de que a imunidade celular também possa estar envolvida na imunidade contra Cfv.

Estudos indicam que os efeitos negativos observados na fertilidade das fêmeas se devem à ação da bactéria no ambiente uterino e não diretamente no embrião. Bielanski e outros (1994) concluíram que a contaminação com Cfv não interferia na fertilização, clivagem ou taxa de blastocistos. Por sua vez, Catena e colaboradores (2008) não observaram alterações no desenvolvimento inicial dos embriões de rato na presença de Cfv.

Pensa-se que nestas condições, aquando da fase luteínica, a tensão de oxigénio baixa no ambiente uterino o suficiente para afetar a implantação do embrião, antes do reconhecimento da gestação (Romero, 2008; Fernandes, 2009). O que explicaria que, mesmo sem ocorrer um processo inflamatório significativo, pode ocorrer morte embrionária precoce. Após alguns dias, a inflamação aumenta e verifica-se hiperémia nas glândulas endometriais e, ocasionalmente, formação de exsudado mucopurulento, o que explica o facto da inflamação local poder impedir a nidificação e formação da placenta.

Em média, a primeira infecção é eliminada ao fim de 120 a 180 dias e as infecções seguintes ao fim de cerca de 20 dias, o que indica uma resposta anamnésica, ou seja, revela a existência de memória imunitária. Esta resposta anamnésica apenas ocorre se as infecções

subsequentes surgirem até 15 meses após a primeira (Peter, 1997). Há que ter em atenção que enquanto dura a infeção, esta evita que a vaca volte a ficar gestante, pois impede a implantação ou leva a um aborto precoce (Schmidt, 2009; Gomes, 2012).

Caso a gestação perdue, a infeção uterina permanece, podendo a bactéria, posteriormente, colonizar a placenta e o próprio feto, o que leva ao aborto. O aborto, que tende a ocorrer por volta do quarto ou quinto mês de gestação, poderá dar-se devido a uma reação alérgica aos lipopolissacarídeos da parede celular da bactéria (Lage & Leite, 2000; Gomes, 2012), e à restrição no suprimento de oxigénio ao feto (Figueiredo, 2001). Já foi demonstrado que quando os animais são inoculados com amostras de Cfv, recentemente isoladas ou inativadas pelo calor, o choque anafilático pode ser provocado (Gomes, 2012). O aborto ocorre em menos de 10% das fêmeas infetadas (Newsam, 1960; Garcia & Brooks, 1993).

Em raras ocasiões, a gravidez é mantida até ao final, designadamente quando a infeção ficou limitada à zona da vagina, onde a imunidade humoral impede o progresso desta em direção ao útero. Contudo, neste caso a vaca poderá ser portadora da bactéria até ao ciclo reprodutivo seguinte (Romero, 2008), constituindo assim um meio de prolongar a doença na exploração.

A doença é normalmente autolimitante em fêmeas, pelo que ao fim de cerca de quatro ou cinco meses, ou seja, por volta de três a seis ciclos éstricos, as vacas que não voltem a ter contacto com machos infetados, conseguem, normalmente, eliminar a infeção (Gomes, 2012). Porém algumas podem permanecer como portadoras durante um tempo indeterminado, mantendo colónias especialmente na cérvix. Alguns estudos relataram a persistência da infeção por mais de dois anos (Ware, 1980; Hoffer, 1981; Garcia & Brooks, 1993; Bhavsar & Kapadnis, 2007). Estima-se que cerca de 10% dos animais possam permanecer como portadores da doença por períodos mais prolongados, e em alguns casos podem mesmo tornar-se portadores permanentes (Irons *et al.*, 2004). Estes casos poderão estar relacionados com as variações antigénicas, já descritas, que a bactéria sofre para resistir à resposta imune do animal (Romero, 2008).

Apesar desta doença normalmente só provocar infertilidade, caso se esteja perante uma infeção severa em que há salpingite bilateral, esta poderá provocar esterilidade (Irons *et al.*, 2004).

Relativamente a Cff, este é responsável por provocar aborto esporádico em bovinos e aborto epizoótico em ovinos. É raro encontrar este microrganismo num útero não grávido (Gomes, 2012). Normalmente, o progresso da infeção por esta subespécie é mais lento, pelo que o aborto tende a ocorrer mais tardiamente, geralmente entre os 100 e 150 dias de gestação (Gomes, 2012). No caso de ocorrer o aborto, pode-se observar edema da placenta e necrose dos cotilédones (Penner, 1988). A patogénese deste agente é muito semelhante à descrita para Cfv (Timoney *et al.*, 1988). Contrariamente a Cfv, Cff não provoca infertilidade (Schmidt, 2009).

2.5. Sinais clínicos

Como já foi referido, nos machos a infeção está limitada à cavidade prepucial, não apresentando alterações clínicas. Contudo, poderá haver uma diminuição do líbido por excesso de atividade sexual decorrente da elevada taxa de repetição de cios (Jesus *et al.*, 1999).

Nas fêmeas, os sinais clínicos irão depender da dose infetante e da taxa de multiplicação da bactéria. Ou seja, uma alta taxa de replicação leva a que ocorra a morte do embrião ou feto 15 a 80 dias após a infeção, e, por sua vez uma replicação mais lenta predispõe ao aborto no segundo trimestre de gestação (Peter, 1997; Yaeger & Holler, 2007). Inicialmente, a infeção nas vacas e novilhas é aguda, estando nesta fase associada a infertilidade. A aquisição de resistência parcial à infeção permite a passagem da fase aguda à fase crónica (Gomes, 2012).

Na maioria dos casos, esta doença passa despercebida até que no exame de gestação de rotina, o veterinário encontre várias vacas não gestantes, bem como diferenças relevantes na idade do feto (Hoffer, 1981). Nas fêmeas, não existem sinais clínicos evidentes, verificando-se normalmente apenas um retorno ao cio tardio ou cios irregulares, em torno dos 30 a 35 dias (Hum *et al.*, 2009). Uma vaginite catarral com secreção mucosa é encontrada no exame vaginal, podendo durar 3 a 4 meses. Normalmente, o muco é claro, mas poderá também ser ligeiramente turvo, e em casos raros, purulento (Gomes, 2012). Por vezes, a mucosa vaginal apresenta-se avermelhada, nomeadamente na zona da cérvix, indicando cervicite catarral. Contudo estes sinais não são patognomónicos e podem ser negligenciados (Hum *et al.*, 2009). Por outro lado, poderá haver endometrite mucopurulenta subaguda difusa, com acumulação de exsudado no lúmen das glândulas uterinas e infiltração periglandular de linfócitos, que nem sempre se consegue detetar clinicamente (Gomes, 2012). A retenção dos invólucros fetais é uma ocorrência comum na CGB (Clark, 1971; Stoessel, 1982).

A suscetibilidade de vacas que nunca estiveram em contacto com o agente é bastante elevada. Segundo Clark (1971) a suscetibilidade não depende da idade da vaca, porém Jimenez e outros (2011) referem que as novilhas e as vacas mais velhas são mais suscetíveis, visto que apresentam níveis de imunidade mais baixos. Por sua vez, as vacas que já contraíram a doença, desenvolvem imunidade durante 15 meses (Peter, 1997), mas que pode durar até 3 a 4 anos, após a infeção inicial (Hum *et al.*, 2009).

A placenta e o feto apresentam lesões inespecíficas. Normalmente, a placenta encontra-se em autólise, o que indica que a morte fetal ocorre antes da expulsão. O grau de placentite é muito variável, podendo mesmo ser impercetível em alguns casos. Devido à infiltração celular, maioritariamente de histiócitos, a zona entre os cotilédones pode encontrar-se edematosa e opaca, por sua vez, os cotilédones apresentam-se amarelados, espessados, ásperos e edemaciados (Moynihan & Stovell, 1955). Quanto às lesões no feto, podem-se observar sufusões subcutâneas e nas cavidades corporais, e depósitos de fibrina nas serosas. Por vezes, observam-se alterações como broncopneumonia supurativa, serosite

fibrinosa e gastroenterite não supurativa. Mais raramente, aparecem zonas pálidas de lesão hepática (Campero *et al.*, 2003; Campero *et al.*, 2005; Yaeger & Holler, 2007). Esta bactéria pode ser facilmente isolada das vias respiratórias e sistema gastrointestinal do feto (Peter, 1997). A infecção por Cfv pode originar fetos mumificados (Stoessel, 1982).

Diversos índices de fertilidade são afetados aquando da introdução de CGB numa propriedade. Apenas 15 a 45% das vacas ficam gestantes após a primeira beneficiação (Gomes, 2012). Normalmente o período de tempo entre a primeira beneficiação e o estabelecimento da gestação, excede os 60 dias, o que leva a um prolongamento da época de partos. Em explorações, em que a infecção atingiu um estado crónico a taxa de partos é mais elevada e pode aparentar ser normal. Pois como a resistência à infecção vai aumentando, a partir do momento em que a doença se estabelece na exploração, o grau de infertilidade nesta irá depender das fêmeas suscetíveis e da taxa de reposição de novilhas (Hoffer, 1981; Hum *et al.*, 2009).

2.6. Métodos de diagnóstico

O primeiro passo para a implementação de medidas de controlo eficazes contra a CGB é a utilização de um meio de diagnóstico sensível e específico. O diagnóstico clínico desta enfermidade não é possível, contudo informações relevantes como a avaliação dos dados da propriedade e a presença dos sinais clínicos referidos anteriormente, podem sugerir a presença desta doença (Alves, 2010). Porém, apesar de todas as indicações de infecção por Cfv, o diagnóstico laboratorial é fundamental, pois apenas este pode confirmar a presença do agente responsável pelas alterações verificadas (Lage & Leite, 2000).

Uma correta deteção e identificação das subespécies são essenciais para o diagnóstico desta doença, visto que as duas subespécies de *C. fetus* possuem características clínicas e epidemiológicas bastante distintas (On & Harrington, 2001). É também necessário um método rápido para que sejam tomadas as medidas adequadas atempadamente, para que os animais não continuem a disseminar a doença.

O diagnóstico de CGB é atualmente realizado através de um dos quatro métodos seguintes: análises bacteriológicas, imunofluorescência direta (IFD), reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) e ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA). Contudo, cada um destes meios de diagnóstico tem mostrado diferentes limitações, pois por vezes não fazem a distinção das subespécies, requerem reagentes muito dispendiosos ou são muito laboriosos e demorados (Hoffer, 1981; Chaban *et al.*, 2012).

Van Bergen e outros (2005a) realizaram um estudo de modo a perceber que métodos de diagnóstico eram utilizados em diferentes países. Neste estudo apenas estavam contemplados os meios de diagnóstico descritos no manual da OIE (Wagenaar & van Bergen,

2012), o isolamento da bactéria a partir das amostras, a IFD e a detecção de anticorpos a partir do soro ou do muco vaginal. Segundo este estudo, o isolamento da bactéria foi reportado como o método mais utilizado a nível global, enquanto a IFD apenas é utilizada em combinação com o isolamento e nunca como teste único de diagnóstico. Contudo, como se pode ver pela tabela 2, a IFD é bastante utilizada como método único de diagnóstico em estudos de prevalência, não confirmando assim o que foi descrito por van Bergen e colaboradores (2005a).

Nas décadas iniciais, um dos métodos de diagnóstico utilizados era o teste da novilha virgem para a pesquisa da CGB. Neste teste, as novilhas virgens eram cobertas por touros suspeitos, confirmando-se depois a infeção pelo teste da aglutinação do muco cérvico-vaginal (Leite, 1977). Apesar de seguro, o teste da novilha virgem era dispendioso, bastante demorado e apenas avaliava a capacidade de transmissão do agente pelo touro portador, sofrendo influência de vários fatores (Philpott, 1968, referido por: Figueiredo *et al.*, 2002 ; Leite, 1977).

Na importação de animais vivos, sémen de bovino e embriões, cada país impõe diferentes requisitos em relação à infeção por *C. fetus*, sendo que em alguns casos se exige que estejam livres de Cfv e Cff e noutros apenas de Cfv. Assim sendo é importante que haja diferenciação das subespécies de *C. fetus* (van Bergen *et al.*, 2005a).

2.6.1. Colheita de amostras

A colheita do material clínico é um aspeto bastante importante para o correto diagnóstico da CGB, visto que a sensibilidade do meio de diagnóstico escolhido dependerá do método e frequência da amostragem e do acondicionamento e transporte do material. Sendo que colheitas repetidas no mesmo animal diminuem a probabilidade de um resultado falso-negativo (Stoessel, 1982; Skirrow *et al.*, 1985).

Diferentes materiais biológicos podem ser utilizados para o diagnóstico da CGB, nomeadamente esmegma ou sémen de touro, muco vaginal ou cérvico-vaginal das vacas e fetos abortados e placentas (van Bergen *et al.*, 2005a). Normalmente recorre-se à pesquisa da doença nos touros, pois estes são portadores assintomáticos do agente e os principais responsáveis pela disseminação da doença (Miranda, 2005). Para além disso, estes encontram-se em menor número nas explorações (Alves, 2006), e será mais fácil recuperar as bactérias a partir de amostras de touros do que de vacas (Schmidt, 2009).

Nos touros o material biológico ideal para a pesquisa de Cfv é o esmegma. Em relação à colheita deste, é necessário ter em atenção que o touro deverá estar em repouso sexual durante 7 a 15 dias antes da colheita, e que deverão ser feitas pelo menos três colheitas, com intervalo de 7 a 15 dias, para que o animal possa ser considerado negativo, (Pellegrin *et al.*, 2002 e 2003b). O esmegma poderá ser recolhido utilizando de três métodos principais: lavagem prepucial, raspagem com pipeta de inseminação artificial (IA) ou raspagem com raspadores próprios para a recolha de esmegma. Idealmente, a recolha de amostras clínicas

deverá ser feita antes da época de cobrição, de maneira a que os níveis de bactérias na cavidade prepucial sejam mais elevados e deste modo reduzir o número de animais falso-negativos. Por outro lado a realização deste diagnóstico antes da época de cobrição é importante para que se estabeleça o estado de saúde dos touros antes destes entrarem em contacto com as fêmeas, para que se reduza o número de fêmeas não gestantes (Molina, 2012).

Para a recolha da amostra, o touro é colocado na manga, o membro posterior mais próximo do operador é fixo com uma corda e, em alguns casos, a cabeça pode também ter de ser presa. Depois é realizada a assepsia da região apenas com papel, pois a utilização de antissépticos é desaconselhada por poder alterar a microflora. A limpeza com o papel vai estimular a micção, que é importante que aconteça antes da recolha para que a amostra não fique contaminada (Fernandes, 2009; Schmidt, 2009).

No caso da lavagem prepucial, são introduzidos 50 mL de solução tampão fosfato (PBS) esterilizada no prepúcio. Depois, o orifício prepucial é fechado com uma das mãos, enquanto com a outra se massaja vigorosamente o prepúcio. Após a massagem, o lavado prepucial é recolhido por gravidade para um frasco estéril. No caso da raspagem, é introduzido pelo orifício prepucial um raspador próprio ou uma pipeta de IA, que serão utilizados para escarificar a mucosa do prepúcio e do pénis. No caso do raspador, este é depois inserido num tubo com PBS, de forma a lavar o material que foi raspado. Por outro lado, a utilização de uma pipeta de inseminação pressupõe que se introduza, aquando da raspagem, um pequeno volume de PBS, que será no final recolhido, juntamente com material raspado pela pipeta, para a seringa acoplada a esta (Alves, 2010).

Num estudo de Tedesco e outros (1977), foram comparados três diferentes métodos de colheita de material prepucial, que foram depois submetidos a exame bacteriológico. O primeiro método utilizado recorria à utilização de um instrumento especialmente concebido para raspar a mucosa do prepúcio e pénis, no segundo método foram usadas pipetas de plástico para aspirar o material e o terceiro método envolveu a lavagem da cavidade prepucial com água peptonada estéril. A análise microbiológica das amostras demonstrou de forma conclusiva que a colheita com raspador próprio era o método de escolha, pois, através deste método, mais amostras positivas foram corretamente identificadas e houve uma menor interferência de organismos contaminantes.

É importante lembrar que *Campylobacter fetus* pode ser transmitido por fomites, pelo que deverão ser utilizadas luvas na recolha de material, de modo a evitar a transmissão iatrogénica para os touros subsequentes (Norman *et al.*, 2003).

O esmegma é mais indicado para a pesquisa de Cfv que o sémen, devido à maior concentração de microrganismos (Winter *et al.*, 1967). Segundo Clark (1971), o número de Cfv presentes numa amostra prepucial varia entre menos de 10^2 a mais de 2×10^5 microrganismos por mililitro. Até ao momento do exame, o esmegma recolhido deve ser conservado a 4°C (Miranda, 2005).

A espécie *C. fetus* não sobrevive mais de 6 a 8 horas em PBS, pelo que se o método de diagnóstico for o isolamento bacteriano, deverá ser utilizado um meio de transporte (Schmidt, 2009), que será conservado à temperatura ambiente até ao momento do exame.

O muco cérvico-vaginal pode ser recolhido através de uma pipeta de IA ou de um tampão absorvente (Pellegrin *et al.*, 2003b). A pipeta de IA é introduzida no fundo vaginal, acoplada a uma manga descartável e a uma seringa descartável e estéril de 10 mL. Poder-se-á introduzir primeiro um pequeno volume de solução fisiológica estéril e depois recolher o muco, nomeadamente quando não sabemos em que fase do ciclo éstrico a vaca se encontra, ou este pode ser diretamente aspirado. Para a recolha com um tampão absorvente, este é amarrado a um cordel de 40 a 50 cm e colocado numa das extremidades do espéculo, que é depois introduzido na cavidade vaginal. De seguida, o tampão é introduzido no fundo vaginal com o auxílio de uma pipeta de IA, para que este entre em contacto com a mucosa vaginal, para que absorva o muco cérvico-vaginal. O espéculo é então retirado, ficando o cordão de fora da abertura vaginal, deixando-se o tampão no interior durante cerca de 20 minutos. Cuidadosamente, este é depois retirado, corta-se o cordão e coloca-se num recipiente esterilizado. Este material deve ser enviado para o laboratório o mais rapidamente possível, refrigerado ou congelado (Pellegrin, 2001; Gomes, 2012).

Em relação aos tecidos fetais devem recolher-se, o mais assepticamente possível, amostras de pulmão, fígado, baço, cérebro e líquido abomasal, que devem ser enviadas para o laboratório o mais rapidamente possível sob refrigeração, ou inoculados em meio de transporte para Cfv (Fernandes, 2009). Quando enviado sob refrigeração, o material deve chegar ao laboratório num máximo de 6 horas após a recolha; quando enviado em meio de transporte, a amostra deve ser mantida à temperatura ambiente e a análise no laboratório deve ocorrer até três dias após a colheita (Lage & Leite, 2000). Também se poderá utilizar o líquido amniótico e os placentomas para a pesquisa de Cfv (Gomes, 2012).

2.6.2. Isolamento bacteriológico

O método de diagnóstico de CGB aceite como *gold standard* é o isolamento e identificação de Cfv. Contudo, a reduzida viabilidade do agente nas amostras clínicas poderá levar a que muitos animais sejam erradamente considerados negativos (Brooks *et al.*, 2004). Este é um método muito laborioso, dispendioso e difícil, porém permite a diferenciação das subespécies, daí que seja ainda bastante utilizado (van Bergen *et al.*, 2005a).

A contaminação é normalmente menor no muco vaginal, do que nas amostras prepuciais. Porém, o número de microrganismos presentes no muco vaginal varia ao longo do ciclo éstrico e durante a gestação este é bastante baixo, pelo que as técnicas bacteriológicas são muito pouco sensíveis nas fêmeas. Os fetos abortados constituem o material de onde é mais fácil recuperar a bactéria em questão, visto que esta não é exposta às condições

atmosféricas normais e as amostras podem ser recolhidas sem que haja contaminação (Hum *et al.*, 2009).

Para o diagnóstico bacteriológico, como já foi referido, as amostras devem ser transportadas em meio de transporte e enriquecimento. Este proporciona uma atmosfera microaerófila e, através dos antibióticos que contém, controla os microrganismos contaminantes (Lander, 1990). Após a colheita de material para PBS, deve-se deixar sedimentar a amostra durante 15 a 20 minutos. Seguidamente, 1 mL do sobrenadante é retirado e inoculado no fundo do tubo que contém o meio de transporte, evitando a introdução de ar. As amostras em meio de transporte devem ser transportadas entre 18 e 24 °C e ao abrigo da luz. Aquando da chegada ao laboratório os tubos devem ser incubados durante três dias a 37 °C (Hum & McInnes, 1987).

Existem diferentes meios de transporte, como o meio de Clark e Dufty e o meio de Weybridge, sendo que o último é o mais utilizado e recomendado (Monke *et al.*, 2002). O meio de Clark e Dufty é composto por 1 mL de soro bovino, 300 µg/mL de 5-fluoruracil, 100 UI/mL de sulfato de polimixina B, 50 µg/mL de verde brilhante, 3 µg/mL de ácido nalidíxico e 100 µg/mL de cicloheximida. O meio de Weybridge é composto por caldo Mueller-Hinton com adição de carvão bacteriológico (5 g/L), 7% de sangue de equino desfibrinado, suplemento de crescimento para *Campylobacter* (piruvato de sódio, metabissulfito de sódio e sulfato de ferro (II)) e adição de antimicrobianos tais como: vancomicina (40 µg/mL), trimetoprim (20 µg/mL), 5-fluoruracil (500 µg/mL), ciclohexamida (100 µg/mL) e polimixina B (10 UI/mL) (Lander, 1990).

Após a incubação no meio de transporte, inocula-se 100 µL da amostra em meio seletivo. O meio mais utilizado é o agar modificado de Skirrow, que é composto por agar sangue, ao qual se adiciona asepticamente 7% de sangue desfibrinado, 20 µg/mL de vancomicina, 10 µg/mL de trimetoprim, 5 UI/mL de sulfato de polimixina B e 100 µg/mL de cicloheximida (Hum & McInnes, 1987). Existem outros meios seletivos para *C. fetus*, contudo este é o que apresenta melhores resultados, pois tem uma maior capacidade de reduzir os microrganismos contaminantes (Schmidt, 2009). Alternativamente pode-se filtrar a amostra com um filtro de 0,65 µm de porosidade. As placas são incubadas a 37 °C, numa atmosfera microaerófila (10% de CO₂, 85% de N₂ e 5% de O₂) (Dekeyser, 1984), e ao fim de três e de sete dias serão inspeccionadas para a presença de colónias características de *C. fetus*. As colónias de *C. fetus* têm 1 a 3 mm de diâmetro, são lisas, com bordos regulares, convexas, cinzentas ou ligeiramente cor-de-rosa e não hemolíticas (Wagenaar & van Bergen, 2012).

Um dos antimicrobianos frequentemente incorporados nos meios seletivos para *Campylobacter* é a polimixina B. Jones e colaboradores (1985, referido por: Schmidt, 2009) e Hum e outros (1994) relatam que foram encontradas estirpes de Cfv sensíveis à polimixina B. Porém, esta descoberta não resultou na pesquisa de alternativas à polimixina B, pelo que há a possibilidade de se estarem a perder isolados de Cfv e a obter resultados falso-negativos devido a esta questão (Schmidt, 2009).

A atmosfera de microaerofilia (5-10% de oxigênio, 5-10% de dióxido de carbono e, de preferência, 5-9% de hidrogênio) pode ser criada numa jarra usando um *kit* gerador de gás ou através de uma vela (*candle jar*). Postula-se que as bactérias microaerófilas são mais sensíveis do que outras bactérias oxigênio-dependentes a formas tóxicas de oxigênio (radical superóxido, peróxido, entre outros) que ocorrem em meios de cultura, e que os compostos que aumentam a aerotolerância das bactérias microaerófilas procuram extinguir estas formas tóxicas de oxigênio. Considera-se que a adição de 0,025% de piruvato de sódio, metabissulfato de sódio e sulfato de ferro (II) aumente a aerotolerância de *Campylobacter jejuni*. A adição destes compostos, como suplemento ao meio de cultura, permite um mais rápido e fácil isolamento de estirpes de *Campylobacter* spp. sensíveis ao oxigênio, permitindo uma maior tolerância à atmosfera de incubação proporcionada. Isto significa que, na ausência de condições atmosféricas precisas, a probabilidade de se isolar estirpes de *Campylobacter* spp. aumenta consideravelmente. Os laboratórios em que se utiliza *candle jars* beneficiarão especialmente da adição do suplemento de crescimento (Kiggins & Plastridge, 1956; George *et al.*, 1978).

O controlo dos microrganismos contaminantes é muito importante, estando diretamente relacionado com a capacidade de isolamento do *C. fetus*. Os géneros *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. são os que mais frequentemente são detetados nas culturas de material prepucial, devido à sua ubiquidade, crescimento rápido em relação ao *C. fetus* e resistência a alguns antibióticos (Lander, 1990).

Como já foi referido, as bactérias do género *Campylobacter* são gram-negativas, com forma de S ou de vírgula, com um comprimento de 2 a 10 µm e um diâmetro de 0,3 µm (Figura 3). A coloração de Bryner e Frank permite observar ao microscópio a motilidade das bactérias. A solução corante utilizada é composta por: 0,1 g de cristal violeta, 0,5 g de azul-de-metileno, 0,2 g de oxalato de amónio, 5 mL de álcool etílico a 95%, 120 mL de água destilada e 187 mL de solução salina estéril. Os ingredientes são dissolvidos no álcool e na água destilada e no final adiciona-se a solução salina. Para a observação, numa lâmina, junta-se uma colónia com uma gota de solução de corante e mistura-se bem. Observa-se entre lâmina e lamela em imersão, em campo escuro ou contraste de fase (Gomes, 2012).



Figura 3 *Campylobacter fetus*, coloração de Gram (400x) (Encyclopedia of Life, 2013).

Após o isolamento de *C. fetus* é necessário saber de que subespécie se trata. O método de eleição para esta diferenciação é o crescimento num meio com 1% de glicina. Segundo a OIE (Wagenaar & van Bergen, 2012), as estirpes que toleram o crescimento num meio com 1% de glicina são classificadas como Cff, enquanto as que não conseguem crescer neste meio são classificadas como Cfv. O meio é preparado adicionando-se a glicina ao agar Mueller-Hinton antes de este ser fundido a 100 °C, a que depois se adicionará 10% de sangue desfibrinado. Avalia-se o crescimento após três dias de incubação a 37 °C em atmosfera microaerofílica. Contudo, a biovar Cfv consegue crescer num meio com 1% de glicina, o que dificulta a sua classificação, pelo que o crescimento deverá ser testado em quatro concentrações de glicina diferentes, 0,6, 1,0, 1,3 e 1,9%. Assim, as estirpes que só crescerem a uma concentração inferior a 1% são Cfv, as que conseguem crescer até 1% de glicina são Cfv e as que conseguem crescer nas concentrações mais altas serão Cff (Salama *et al.*, 1992). Segundo On e Harrington (2001), algumas estirpes de Cff podem ser sensíveis à glicina, pelo que é aconselhável fazer diferentes testes fenotípicos.

Existem também outras técnicas como a produção de sulfeto de hidrogénio (H₂S), crescimento a 25 e a 42 °C, redução de nitratos, redução de selenito, suscetibilidade ao ácido nalidíxico, cefalotoína, cefoperazona, fucsina básica e permanganato de potássio (Tabela 3) (Schmidt, 2009). Todavia, os resultados são contraditórios em alguns casos, pelo que estes métodos devem ser considerados apenas indicativos (Schulze *et al.*, 2006). Num estudo de Schulze e outros (2006), em que se testaram diferentes testes fenotípicos, concluiu-se que o Cfv era corretamente identificado pelos testes da redução de selenito e suscetibilidade à cefoperazona e ao metronidazol (100% de correspondência com o teste da glicina). Mas a identificação de Cff pelos mesmos testes não teve resultados tão bons, visto que a redução de selenito apresentava uma correspondência com o teste da glicina de 81,8%, e os testes da suscetibilidade ao metronidazol e à cefoperazona de 40,9 e 86,4%, respetivamente. Neste estudo verificou-se também que os testes da fucsina e do permanganato de potássio não permitiam a identificação destas subespécies, pois não são reproduzíveis.

Tabela 3 Características diferenciadoras das espécies de *Campylobacter* potencialmente isoladas a partir do trato genital bovino ou de fetos abortados (Quinn *et al.*, 2002; Garrity *et al.*, 2005; Wagenaar & van Bergen, 2012).

	<i>C. fetus fetus</i>	<i>C. fetus venerealis</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C. sputorum</i>
Crescimento a 25°C	+	V	-	-	-
Crescimento a 42°C	V	-	V ^(a)	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Catalase	+	V	V ^(b)	+	V
Crescimento com 3,5% de NaCl	-	-	-	-	+
Glicina 1%	+	-	V	V	+
Produção de H₂S	CM	+	-	+	+
	TSI	-	-	-	V
Suscetibilidade ao ácido nalidíxico	-	V	+	-	V
Suscetibilidade à cefalotoína	+	+	V ^(c)	+	+
Redução de nitratos	+	V	V ^(a)	+	+
Redução de selenito	V	-	V ^(a)	+	+

CM – meio de cisteína (*cysteine medium*); TSI – meio de TSI (triple sugar iron); (+) = reação positiva ao teste ou crescimento; (-) = reação negativa ao teste ou ausência de crescimento; (V) = resultado variável; (a) *C. jejuni* subs. *jejuni* é positivo e *C. jejuni* subs. *doylei* é negativo; (b) *C. jejuni* subs. *jejuni* é positivo e *C. jejuni* subs. *doylei* é variável; (c) *C. jejuni* subs. *jejuni* é negativo e *C. jejuni* subs. *Doylei* é positivo

Todos os testes para determinação das características diferenciadoras devem ser realizados em cultura pura. Para a verificação do crescimento a 25 e a 42°C, deve ser preparada uma suspensão bacteriana (com turvação aproximada ao número 1 da escala de McFarland) que será inoculada em duas placas de agar sangue; cada placa será incubada sob microaerofilia a 25 ou a 42°C. Os testes da oxidase e da catalase são realizados segundo um protocolo *standard* bacteriológico.

Para o teste do crescimento na presença de cloreto de sódio (NaCl), uma suspensão bacteriana deve ser inoculada numa placa com agar sangue suplementado com 3,5% de NaCl (15mL de agar sangue + 2,04 mL de uma solução de NaCl com 5 M) e numa placa com agar sangue sem suplementação de NaCl, em microaerofilia a 37°C.

A produção de H₂S pode ser testada por dois métodos diferentes que produzem resultados distintos, nomeadamente num meio que contenha cisteína ou no meio de TSI (*triple sugar iron*). Para o teste da produção de H₂S num meio que contenha cisteína, utiliza-se um caldo para crescimento de *Brucella* com 0,02% de cisteína, e a produção de H₂S é detetada através de uma tira de acetato de chumbo colocada no interior da parte superior do tubo (Figura 4). Mais uma vez, é preparada uma suspensão bacteriana aproximadamente no número 1 da escala de McFarland, que é inoculada no meio. O escurecimento da tira de acetato de chumbo é considerado o resultado positivo ao teste. Por sua vez, o teste da produção de H₂S em meio TSI a suspensão bacteriana é inoculada no meio em profundidade e à superfície; a mudança da cor do meio de vermelho para preto indica a formação de H₂S.



Figura 4 Teste para a produção de H₂S com tira de acetato de chumbo (*Campylobacter jejuni*) (De la Maza *et al.*, 1999).

A suscetibilidade ao ácido nalidíxico (AN) e à cefalotoína (CN) é testada através de discos impregnados com AN (30 µg) ou com CN (30 µg). Para o teste, culturas com 72 horas são suspensas em PBS a uma concentração de 10⁹ UFC/mL, e inocula-se 100 µL em agar sangue. Depois da colocação dos discos na superfície do agar, as placas são incubadas a 37 °C em microaerofilia e examinadas ao fim de 48 e 72 horas. Um halo de inibição de pelo menos 3 mm é indicativo de resistência ao antibiótico impregnado no disco (Wagenaar & van Bergen, 2012).

Num estudo recente, verificou-se que a utilização de agar Mueller-Hinton nos testes de sensibilidade à glicina e no teste de produção de H₂S em meio de cisteína era o principal fator para a identificação errada das estirpes, pelo que este meio foi substituído por agar sangue o que diminuiu significativamente as discrepâncias entre a biotipagem e o PCR (McGoldrick *et al.*, 2013).

A diferenciação das subespécies pode ser difícil ou até controversa, pois para além do facto inerente de que o isolamento da bactéria é difícil, pensa-se que a capacidade de crescer num meio com glicina poderá ser transmitida por transdução por bacteriófagos ou dever-se a mutação espontânea, levando assim a resultados erróneos (Chang & Ogg, 1971). Foram

também descritas estirpes de *C. fetus* atípicas, que crescem a 42°C, não produzem H₂S e resistentes à cefalotoína (Edmonds *et al.*, 1985). Uma complicação adicional nos métodos de identificação de Cfv é a grande variação na execução dos testes fenotípicos, de laboratório para laboratório (van Bergen *et al.*, 2005a), o que aumenta o risco potencial de erro de identificação.

São várias as limitações deste método de diagnóstico. Por exemplo, frequentemente há crescimento de bactérias contaminantes que impossibilitam a recuperação de *C. fetus*, pois este apresenta um crescimento lento (Lander, 1990), como *Pseudomonas* spp. (Schmidt *et al.*, 2010), e a baixa sensibilidade aos testes bacteriológicos, que leva a muitos resultados falso-negativos (McMillen *et al.*, 2006).

2.6.3. Imunofluorescência direta (IFD)

A imunofluorescência (IF) é uma reação antigénio-anticorpo, em que os anticorpos são marcados com um corante fluorescente e o complexo antigénio-anticorpo é visualizado ao microscópio através de luz ultravioleta (Odell & Cook, 2013). Os corantes fluorescentes, ou fluorocromos, absorvem a radiação ultravioleta a um determinado comprimento de onda, sendo por ela excitados, o que lhes permite emitir luz visível. Estes possuem grupos químicos capazes de formar ligações covalentes com moléculas proteicas, emitindo alta fluorescência no espectro visível com coloração distinta da emitida pelos tecidos, o que lhes permite funcionar como marcadores. Para que a atividade do anticorpo não seja afetada e se verifique a estabilidade do conjugado fluorescente, os fluorocromos devem ter uma conjugação relativamente simples. O isotiocianato de fluoresceína é um dos fluorocromos mais utilizados. Este fluorocromo tem um pico de absorção de 495 nm e de emissão de 519 nm, e emite uma luz de cor verde. Por sua vez, outro agente utilizado na IF é o isotiocianato de tetrametil-rodamina, que possui picos distintos de absorção e de emissão (520 nm e 610 nm) e é de cor encarnada (Mohan *et al.*, 2008; Aoki *et al.*, 2010).

Existem dois métodos de imunofluorescência: a imunofluorescência direta (IFD) e a imunofluorescência indireta (IFI).

A IFD é utilizada para detetar o antigénio em amostras clínicas utilizando anticorpo específico marcado com um fluorocromo. As etapas envolvidas nesta técnica são a fixação do antigénio na lâmina, incubação com o anticorpo marcado, lavagem de forma a remover o excesso de anticorpo marcado não ligado e, por fim, visualização em microscópio de fluorescência (Mohan *et al.*, 2008) (Figura 5).

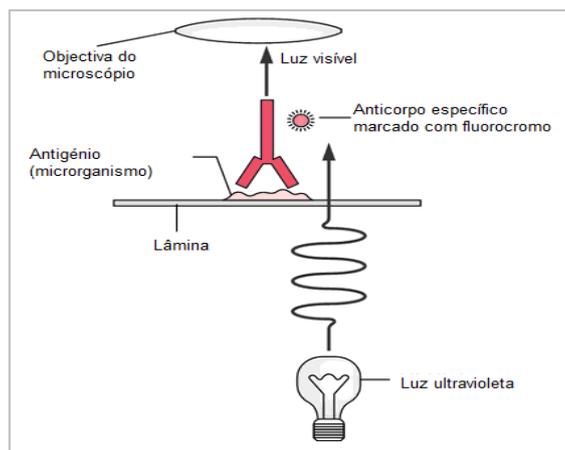


Figura 5 Esquema da IFD (Saunders, 2007)

A IFI, em que se pesquisa anticorpos séricos, envolve duas etapas básicas. Em primeiro lugar, o antigénio específico é fixado num esfregaço e incubado com a amostra. Depois o esfregaço é lavado, de forma a remover os anticorpos não ligados. A presença de anticorpos específicos, da amostra, ligados ao antigénio no esfregaço é detetada por adição de um segundo anticorpo. Este consiste num anticorpo anti-espécie, contra a espécie de onde é proveniente a amostra, que está marcado com o fluorocromo. O segundo anticorpo liga-se à porção Fc do primeiro anticorpo, persistindo mesmo após a segunda lavagem. Por observação ao microscópio fluorescente é detetada a presença do segundo anticorpo (Mohan *et al.*, 2008).

A IFD tem como vantagens o menor tempo de coloração de amostras e a maior simplicidade dos procedimentos utilizados. Contudo, esta técnica é a menos utilizada pois emite um sinal mais baixo, o custo é normalmente mais elevado e a técnica é menos flexível. Por vezes o conjugado não é comercializado, pelo que se tem de recorrer à IFI para pesquisa de antigénio, utilizando um anticorpo de uma espécie animal contra o antigénio em pesquisa e depois um anticorpo anti-espécie marcado com um fluorocromo (Robinson *et al.*, 2009).

Por sua vez, as vantagens da IFI consistem numa maior sensibilidade do que a IFD, porque pode haver uma amplificação do sinal na IFI, pois mais que um anticorpo secundário pode ser ligado a cada anticorpo primário. Por outro lado, o custo é geralmente mais baixo, pois os anticorpos secundários produzidos comercialmente são relativamente baratos e têm a sua qualidade controlada. Esta técnica permite a utilização simultânea de diferentes anticorpos primários específicos para diversos tipos de antigénios. Porém, como desvantagem há a potencial reação cruzada (Mohan *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2009).

Para a leitura das reações de IF, para além de se poder utilizar um microscópio de epiluminescência, pode ser também utilizado um microscópio confocal (Aoki *et al.*, 2010).

Três formas diferentes de fluorescência podem ser observadas: a específica, a não específica e a autofluorescência. A fluorescência específica, como o nome indica, resulta da reação entre o antigénio que se está a pesquisar e o anticorpo marcado com o fluorocromo.

Contrariamente, a fluorescência não específica é a consequência da coloração errática de tecidos por corante livre e/ou anticorpos marcados. Por fim, a autofluorescência deve-se à fluorescência natural dos tecidos quando estes são expostos à luz ultravioleta (Aoki *et al.*, 2010).

A IFD tem sido utilizada desde os anos 60 para a detecção de *C. fetus* (Herschler, 1963, referido por: Leite, 1977). É considerada uma técnica sensível, de fácil utilização, económica, praticável na maioria dos laboratórios e o seu resultado pode ser emitido pelo laboratório em apenas doze horas (Leite, 1977; Fernandes, 2009). Esta técnica é aconselhada pela OIE para o diagnóstico de CGB nos touros antes da sua exportação (Wagenaar & van Bergen, 2012). Em comparação com a bacteriologia, o diagnóstico por IFD é bastante mais rápido, mais sensível, a presença de contaminantes não constitui um problema (Figueiredo *et al.*, 2002), não requer a utilização de testes bioquímicos para a diferenciação de *C. fetus* de outras espécies de *Campylobacter* e possibilita a identificação de bactérias não viáveis (Ruckerbauer *et al.*, 1974). Esta técnica pode ser aplicada às amostras clínicas provenientes de raspados prepuciais, fetos e placentas (Fernandes, 2009), bem como às culturas isoladas (Wagenaar & van Bergen, 2012).

A IFD é apenas específica para a identificação da espécie *C. fetus*, não conseguindo distinguir as duas subespécies devido às suas similaridades antigénicas (Figura 6). Assim, a contaminação fecal poderá provocar falso-positivos devido à presença de Cff (Hoffer, 1981). Visto que o conjugado é preparado a partir de Cfv, que apenas apresenta o sorotipo A, as bactérias Cff do sorotipo B não irão reagir com o conjugado (Figueiredo, 2001).

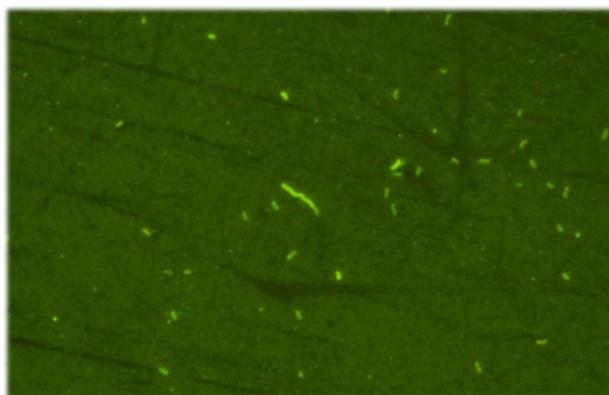


Figura 6 Imunofluorescência direta - *Campylobacter fetus* (400x)

Para a realização da IFD, em primeiro lugar, as amostras são submetidas a duas centrifugações, a primeira a 600 g, durante 10 minutos, da qual se aproveita o sobrenadante, a segunda a 13 000 g, durante 30 minutos. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante é descartado, e o depósito é ressuspenso em solução tampão fosfato (*phosphate buffer*

solution – PBS). A primeira centrifugação tem como objetivo eliminar restos de células e outros detritos e a segunda centrifugação permite a concentração das bactérias num volume menor, o que melhora a detecção de *C. fetus*. A partir desta suspensão, realiza-se um esfregaço numa lâmina, que depois de seco é fixado com acetona a -20°C. Depois, adiciona-se o conjugado fluorescente anti-*Campylobacter fetus*, de forma a cobrir o material fixado, e incubam-se as lâminas em câmara húmida a 37 °C. Posteriormente, as lâminas são lavadas com solução PBS e com água corrente e são montadas com solução tamponada de glicerol. Por fim, observam-se as lâminas ao microscópio de epifluorescência, para identificação das formas microbianas fluorescentes com morfologia típica de Cff e Cfv (Figueiredo *et al.*, 2002).

Num estudo de Figueiredo e colaboradores (2002), em que se avaliou o limite de detecção da IFD em amostras prepuciais centrifugadas e não centrifugadas, verificou-se que os resultados da IFD melhoravam bastante quando as amostras eram submetidas a duas centrifugações. O limite de detecção da IFD, com centrifugação, estimado neste estudo foi de 10² UFC/mL. Num estudo de Philpott (1968, referido por: Figueiredo *et al.*, 2002), em que se utilizaram amostras recolhidas por lavagem prepucial, o valor estimado para o limite de detecção de IFD foi semelhante ao registado no estudo de Figueiredo e colaboradores (2002), sendo de 50 a 100 UFC/ml.

A sensibilidade descrita para esta técnica é de 92,59%, o que se traduz num total de 92 animais identificados como positivos entre 100 animais positivos (Figueiredo *et al.*, 2002), portanto apenas 8% são falso-negativos.

Devido à variabilidade antigénica da camada S poderá haver resultados positivos na cultura que são negativos na imunofluorescência, visto que os anticorpos utilizados para a produção do conjugado são contra estas proteínas (Groff, 2005). Foi descrito que como o conjugado é preparado a partir de um antissoro policlonal, poderá haver resultados falso-positivos por poder haver uma reação cruzada com outras bactérias, nomeadamente com outras espécies de *Campylobacter* (Andrews & Frank, 1974; Brooks *et al.*, 2002). A especificidade do conjugado fluorescente utilizado na IFD contra *C. fetus* foi também avaliada no estudo de Figueiredo e outros (2002), verificando-se que não existia reação cruzada com outras bactérias que podiam também ser recolhidas a partir de amostras prepuciais (Mellick *et al.*, 1965; Dufty, 1967; Philpott, 1968, referido por: Figueiredo *et al.*, 2002). Isto demonstra a eficiência da técnica, uma vez que algumas das bactérias avaliadas são muito semelhantes a Cfv, e podem ser encontradas na cavidade prepucial de touros saudáveis, mas também em fetos abortados e no trato intestinal de bovinos (Figueiredo *et al.*, 2002). Assim, a especificidade foi estimada em 88,89%, o que significa que em 100 animais negativos, 88 destes serão identificados como tal e 12 serão falso-positivos. Todavia, a sensibilidade e especificidade deste método de diagnóstico estão dependentes da utilização de um técnico treinado para a interpretação dos resultados (Figueiredo *et al.*, 2002).

Para a produção de soro hiperimune, em primeiro lugar prepara-se uma suspensão em PBS (pH 7,4) padronizada na escala 10 de McFarland com uma estirpe padrão de Cfv. Esta é

depois inoculada por via intramuscular (0,5 mL) num coelho, juntamente com 0,5 mL de adjuvante. Seis dias após da primeira inoculação, o coelho volta a ser inoculado endovenosamente, com a suspensão sem adjuvante, nas quatro semanas seguintes, com volumes de 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL, respetivamente. A sangria é realizada 15 dias após a última inoculação (Figueiredo, 2001) e é realizada a purificação das IgG. O conjugado é preparado pela ligação da IgG de coelho anti-*C.fetus venerealis* com isotiocianato de fluoresceína (Ruckerbauer *et al.*, 1974). Por fim, é determinada a diluição ótima para a utilização do conjugado, testando diluições seriadas deste, frente a uma suspensão Cfv na concentração de 10 UFC/mL (Figueiredo, 2001). O conjugado deve ser armazenado a -20°C e deve ser evitado o seu repetido descongelamento e congelamento.

2.6.4. Reação em cadeia da polimerase

Dada a dificuldade de isolamento de *C. fetus* e da inespecificidade em termos de subespécie da IFD, foi necessário procurar diferentes tipos de diagnóstico que pudessem ultrapassar estas dificuldades. A reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* – PCR) é um método que traz várias vantagens em relação aos métodos de diagnóstico utilizados no passado. A especificidade, sensibilidade, rapidez e capacidade de detetar bactérias não viáveis são algumas das vantagens desta técnica de biologia molecular (Willoughby *et al.*, 2005).

O PCR baseia-se na amplificação de uma zona específica de DNA que é delimitada por dois iniciadores oligonucleotídicos (em inglês *primers*). A amplificação é obtida através de repetidos ciclos de desnaturação do DNA, hibridação dos *primers* com as sequências de DNA e extensão dos *primers* hibridizados com DNA polimerase.

A primeira fase do PCR consiste na desnaturação, que separa as cadeias complementares de DNA que se encontram ligadas por pontes de hidrogénio. Apesar de existirem vários métodos físicos e químicos que permitem a sua separação, o aquecimento a 95-100 °C é um método eficiente e o mais simples. Seguidamente dá-se o processo de hibridação, em que os *primers* se ligam às cadeias de DNA desnaturadas. Cada *primer* é complementar com uma das cadeias de DNA, sofrendo hibridização com o lado oposto da sequência alvo. Os *primers* ficam orientados na cadeia de DNA de modo a que a síntese de DNA pela polimerase decorra na área delimitada pelos dois *primers*. Isto levará à duplicação a montante do segmento de DNA escolhido, por cada ciclo decorrido, o que resulta numa acumulação exponencial do fragmento alvo. Por fim, os produtos do PCR são separados por eletroforese em gel de agarose. (Saiki *et al.*, 1988; McPherson & Møller, 2006).

Recentemente, a partir da técnica convencional de PCR, desenvolveu-se uma nova técnica designada PCR em tempo real (RT-PCR) ou PCR quantitativo (qPCR), que procura minimizar as suas diversas limitações. O qPCR permite não só a deteção, mas também a

quantificação e amplificação simultânea do DNA, daí também ser designado de PCR quantitativo (qPCR). Este baseia-se na deteção e quantificação de um composto fluorescente (durante as primeiras fases do PCR), assentando num princípio básico de que o aumento significativo da quantidade de produto do PCR está correlacionado com a quantidade inicial do controlo. São várias as vantagens deste método em relação ao PCR convencional, desde uma maior rapidez, pelo facto de se tratar de uma técnica sem influência da amplificação não específica, de haver um menor risco de contaminação visto que não há processamento pós-PCR dos produtos resultantes, e de ter um limite de deteção bastante mais baixo que o PCR convencional. Contudo esta é uma técnica que requer equipamento de elevado custo, bem como elevadas exigências técnicas e científicas requeridas para o correto manuseamento e manutenção do equipamento (Oliveira, 2010).

São vários os protocolos de PCR descritos para a identificação de *C. fetus* e das suas subespécies (Hum *et al.*, 1997; Oyarzabal *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; McMillen *et al.*, 2006; Abril *et al.*, 2007; Yamazaki *et al.*, 2010; Iraola *et al.*, 2012). O protocolo de PCR mais avaliado foi o proposto por Hum e colaboradores (1997) que utiliza dois pares de *primers*, MG3F e MG4R e VenSF e VenSR (Tabela 4). Estes dois pares de *primers* foram inicialmente desenvolvidos por Panaccio e colaboradores (1993, referido por: Schmidt, 2009). Os *primers* MG3F e MG4R originariam, segundo Hum e colaboradores (1997) um amplicão de 960 pb apenas presente na espécie *C. fetus*, mas mais recentemente confirmou-se que se tratava de um erro e que o número de bases que o amplicão realmente tem é de 764 pb (Hum *et al.*, 2009). Este par de *primers* tem demonstrado em vários estudos uma sensibilidade e especificidade elevada (On & Harrington, 2001; Schmidt *et al.*, 2010). Para a diferenciação das subespécies é utilizado um segundo par de *primers*, VenSF e VenSR, que na subespécie *Cfv* origina um amplicão de cerca de 142 pb (Hum *et al.*, 1997).

Tabela 4 Diferentes pares de *primers* utilizados para identificar *C. fetus* e as suas subespécies.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>	Espécie detetada	Referência bibliográfica	
MG3F (<i>forward primer</i>)	5' – GGT AGC CGC AGC TGC TAA GAT – 3'	<i>C. fetus</i>	Hum <i>et al.</i> , 1997	
MG4R (<i>reverse primer</i>)	5' – TAG CTA CAA TAA CGA CAA CT – 3'			
VenSF (<i>forward primer</i>)	5' – CTT AGC AGT TTG CGA TAT TGC CATT – 3'	<i>C. fetus venerealis</i>		
VenSR (<i>reverse primer</i>)	5' – GCT TTT GAG ATA ACA ATA AGA GCTT – 3'			
CF441F (<i>forward primer</i>)	5' – GTT AGG GAA GAA CAA TGA CGG – 3'	<i>C. fetus</i>		Oyarzabal <i>et al.</i> , 1997
CF995R (<i>reverse primer</i>)	5' – TTA TCT CTA AGA GAT TAG TTG G – 3'	<i>C. fetus</i>		Oyarzabal <i>et al.</i> , 1997

<i>Primer</i>	<i>Sequência do Primer</i>	<i>Espécie detetada</i>	<i>Referência bibliográfica</i>
CFF (<i>forward primer</i>)	5' – GCA AAT ATA AAT GTA AGC GGA GAG – 3'	<i>C. fetus fetus</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002
CFV (<i>reverse primer</i>)	5' – TGC AGC GGC CCC ACC TAT – 3'		
CFVF (<i>forward primer</i>)	5' – CCC AGT TAT CCC AAG CGA TCT – 3'	<i>C. fetus venerealis</i>	McMillen <i>et al.</i> , 2006
CFVR (<i>reverse primer</i>)	5' – CGG TTG GAT TAT AAA TTT TAG CTT GGT – 3'		
CFVP1 (sonda RT-PCR)	5' – 6-FAM-CAT GTT ATT TAA TAC CGC AA – 3'		
CVEN-L (<i>forward primer</i>)	5' – ATT AGT ATT TGC AAT ATG TGA A – 3'	<i>C. fetus venerealis</i>	Abril <i>et al.</i> , 2007
CVEN-R2 (<i>reverse primer</i>)	5' – AAT TGA TAT TAA ATT TGA TTG A – 3'		
CFV-F3 (<i>forward primer</i>)	5' – GCT AAT AGA TGA GAT GAA AGA AGT – 3'	<i>C. fetus venerealis</i>	Yamazaki <i>et al.</i> , 2010
CFV-B3 (<i>reverse primer</i>)	5' – GAG TTG CAT ATT TAC TAA CAT CA – 3'		
nC1165g4F (<i>forward primer</i>)	5' AGG ACA CAA ATG GTA ACT GG 3'	<i>C. fetus venerealis</i>	Iraola <i>et al.</i> , 2012
nC1165g4R (<i>reverse primer</i>)	5' GAT TGT ATA GCG GAC TTT GC 3'		
CampF4 (<i>forward primer</i>)	5' GCG AGT TCG CTT TAG CTA T 3'	<i>C. fetus</i>	McGoldrick <i>et al.</i> , 2013
CampR4 (<i>reverse primer</i>)	5' GGC TAA ATG TCC GAT GTT TTT 3'		
CampF7 (<i>forward primer</i>)	5' AAA TGA TAA TTT AAA AAC CAT AGC 3'	<i>C. fetus venerealis</i>	McGoldrick <i>et al.</i> , 2013
CampR7 (<i>reverse primer</i>)	5' TTC ATT CCA CTA CCT AAG TCT 3'		

Num estudo posterior de Hum e outros (2009), é descrito que o par de *primers* VenSF e VenSR não são completamente homólogos para todas as sequências de Cfv presentes no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (AY750964, AY903214 e EU443150), pois há incompatibilidades numa das bases para o *primer* VenSR e em duas bases para o *primer* VenSF. Inicialmente pensou-se que a sequência envolvida na amplificação pelo par de *primers* VenSF e VenSR seria pertencente a um plasmídeo do Cfv, mas num estudo de Willoughby e outros (2005), a partir de DNA plasmidial isolado de Cfv, não foi possível obter um amplicão utilizando este par de *primers*, o que sugere que este amplicão será afinal pertencente a DNA cromossômico. Também neste estudo de Willoughby e outros, foi verificado que estirpes de Cfv

isoladas no Reino Unido, não amplificam a banda de 142 pb como seria suposto, revelando assim que a sensibilidade deste método poderá estar sobrestimada. Por sua vez, segundo um estudo de Schmidt e outros (2010), onde se avaliou a sensibilidade e especificidade destes *primers* frente a diferentes estirpes de Cff, Cfv e Cfvi, as estirpes de Cfvi não produziram o amplicão de 142 pb referente à subespécie Cfv, pelo que teriam sido erradamente identificadas como Cff. Assim, visto que este multiplex parece não identificar corretamente algumas estirpes de Cfv e o biovar Cfvi, a sua utilidade como método de diagnóstico poderá estar comprometida.

Abril e colaboradores (2007) descrevem a identificação de um novo elemento de inserção (ISCfe1) que consiste numa região altamente conservada e encontrada exclusivamente em estirpes Cfv. Os resultados publicados eram promissores, mas seria necessária uma avaliação mais aprofundada, utilizando um conjunto mais diversificado de isolados de *C. fetus*, pois neste estudo apenas foram avaliadas 26 estirpes de Cfv e nenhuma consideração foi dada à biovar Cfvi. Num estudo de Yamazaki e outros (2010), em que se avaliou um PCR baseado na sequência descrita por Abril e colaboradores (2007), uma das sete estirpes padrão de Cfv não sofreu amplificação. Mais recentemente, o protocolo de PCR proposto por Abril e outros (2007) foi novamente avaliado, e identificou corretamente 1071 estirpes, não se registando reações cruzadas com Cff ou com outras estirpes que não pertencem à espécie *C. fetus* (McGoldrick *et al.*, 2013).

Um qPCR para deteção de Cfv foi desenvolvido por McMillen e colaboradores (2006). Através de um par de *primers* e de uma sonda, este RT-PCR permite obter resultados rápidos e com uma sensibilidade e especificidade bastante elevadas, não havendo reação cruzada com a subespécie Cff (Tabela 4). O limite de deteção determinado para esta técnica foi de apenas uma célula por ensaio. Contudo esta técnica apenas permite a deteção de Cfv, pelo que a subespécie Cff origina um resultado negativo. Apesar de Cff não ser responsável pela CGB, é um agente causador de abortos em bovinos, pelo que a sua presença não deve ser negligenciada. Daí ser necessário e importante um método que identifique Cfv, bem como Cff.

A diferenciação destas duas subespécies é difícil dada a grande similaridade genética, de cerca de 86% segundo o perfil de eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE) (On & Harrington, 2001), pelo que são poucos os genes que permitirão esta diferenciação.

O PCR recentemente descrito por van Bergen e outros (2005b) mostrou total coerência com o Cfv, tal como definido por AFLP, pelo que seria considerado o melhor método de PCR, atualmente disponível, para a deteção de Cfv (Wagenaar & van Bergen, 2012). Todavia, Cfvi, definido por AFLP, não é identificado por este PCR (van Bergen *et al.*, 2005b). Num estudo de Yamazaki e colaboradores (2010), o PCR descrito por van Bergen e outros (2005b), falhou em identificar quatro de sete estirpes de Cfv. Pelo que serão necessários mais estudos com estirpes de referência e estirpes de campo de diferentes origens para avaliar a sensibilidade e especificidade deste protocolo de PCR.

Num estudo recente, de McGoldrick e outros (2013), foram desenhados dois pares de *primers* para um novo protocolo de RT-PCR. O primeiro, denominado CampF4/R4, permite a identificação da espécie *C.fetus*, com uma sensibilidade de 99,6% e uma especificidade de 100%. Para a identificação do Cfv foi desenhado um segundo par de *primers*, chamado CampF7/R7 com uma sensibilidade de 99,8% e especificidade de 98,7%. Neste estudo, em que foram testadas 1 071 estirpes de campo, foram utilizadas estirpes de Cfv, que foram identificadas como Cfv. No mesmo estudo foram também testados os protocolos de PCR de Hum e colaboradores (1997) e de McMillen e colaboradores (2006) em que se verificaram erros na identificação de algumas estirpes.

Outros estudos têm proposto diferentes protocolos para o diagnóstico de Cff e Cfv por PCR (Tabela 4) (Oyarzabal *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2010; Madoroba *et al.*, 2011; Iraola *et al.*, 2012), contudo nenhum foi ainda descrito que diferenciasse, para além das duas subespécies, as duas biovars de Cfv: Cfvv e Cfvi. Nomeadamente a distinção da biovar Cfv de outros *C. fetus* não foi ainda conseguida por PCR, o que poderá significar que esta biovar constitui um grupo heterogéneo dentro de *C. fetus* (Iraola *et al.*, 2012). Assim, a bacteriologia é ainda o único método que permite esta diferenciação, com as contrariedades que já foram referidas.

Poucos são ainda os estudos em que a deteção do agente por PCR é feita diretamente a partir das amostras clínicas, sendo normalmente realizado PCR às bactérias isoladas por técnicas bacteriológicas. Dada a sensibilidade, já descrita, destas técnicas para o isolamento de *C. fetus*, é importante uma abordagem do PCR utilizado diretamente nas amostras clínicas. Alguns estudos propõem a recolha do material clínico para meio de transporte de enriquecimento (*transport enrichment medium* – TEM), tal como seria utilizado para as técnicas bacteriológicas, sendo este depois incubado durante normalmente cinco dias antes da extração de DNA (Hum *et al.*, 1997; On & Harrington, 2001). O método de diagnóstico ideal será sempre um método rápido, fácil, sensível e específico, assim sendo o tempo de incubação no TEM irá prolongar o tempo de espera pelo resultado da análise. Para além disto, o tempo de incubação permite que algumas bactérias contaminantes se multipliquem em larga escala, podendo inibir o crescimento de *C. fetus*, e por sua vez, certas estirpes de *Pseudomonas*, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, são conhecidas por produzirem a enzima DNase, cuja atividade pode resultar na degradação do DNA presente na amostra (Monke *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2010).

O método de extração de DNA é importante para a obtenção de bons resultados no PCR. Groff e outros (2010) testaram cinco métodos de extração diferentes: método de aquecimento, lise com proteinase K, lise com isotiocianato de guanidina, lise com DNAzol (GIBCO, Invitrogen) e lise com brometo de hexadeciltrimetilamónio (hexadecyltrimethylammonium bromide - CTAB) pré-digerido com proteinase K. O limite de deteção utilizando o protocolo de PCR de Hum e colaboradores (1997) foi diferente consoante o método de extração utilizado. Assim sendo, para o método de aquecimento o limite de

deteção foi de $7,20 \times 10^5$ UFC/mL, para a lise com proteinase K foi de $2,46 \times 10^4$ UFC/mL, para as lises com isotiocianato de guanidina e com DNAzol foi de $1,7 \times 10^2$ UFC/mL e para a lise com CTAB foi de 63 UFC/mL. Assim, segundo o limite de deteção, o método de extração que mostrou ser mais eficaz foi o que utilizava o CTAB, que produziu um DNA de elevada qualidade e reduziu o efeito de potenciais inibidores no PCR, que são bastante comuns quando se utiliza material biológico como o raspado prepucial. Neste estudo o método de aquecimento teve resultados muito diferentes do estudo de McMillen e colaboradores (2006) onde se demonstrou que este método de extração seria um método com grande potencial, devido a permitir um limite de deteção inferior no qPCR em comparação com material extraído por um kit comercial de extração de DNA, e por ser um método bastante simples, rápido e barato.

Na recolha de amostras prepuciaes, é necessário ter em conta que as fezes constituem um potencial inibidor do PCR, sendo que apenas 1% de contaminação fecal poderá ter efeitos negativos importantes sobre a sensibilidade do método. Por sua vez, a urina, sangue e sémen, não influenciam os resultados deste método de diagnóstico, mesmo em concentrações tão elevadas como 50% (Schmidt *et al.*, 2010).

Uma comparação inicial dos genomas de *C. fetus* sugere que, provavelmente, a subespécie Cfv adquiriu DNA por mecanismos horizontais, responsável pela a principal diferença entre as duas subespécies (Kienesberger *et al.*, 2011). Diferentes métodos, como PFGE, impressão genética (*Fingerprinting*), caracterização molecular por polimorfismo de fragmento amplificado (*Amplified fragment length polymorphism* – AFLP) e amplificação por PCR foram utilizadas para a diferenciação das subespécies, mas os seus resultados foram contraditórios (van Bergen *et al.*, 2005c). Apesar da análise numérica dos perfis PFGE-DNA ser uma ferramenta valiosa para diferenciar as subespécies de *C. fetus*, este é um método demorado e difícil de interpretar, pelo que não é um método adaptado à utilização de rotina. Da mesma forma, o método de AFLP é útil para a diferenciação das subespécies de *C. fetus* (Wagenaar *et al.*, 2001), mas é trabalhoso, demorado e não está disponível em todos os laboratórios de diagnóstico. Assim, este tipo de técnicas de genotipagem por serem muito laboriosas e por requererem equipamento muito especializado e dispendioso (Schmidt, 2009), não estão presentes na maioria dos laboratórios de diagnóstico de rotina, pelo que a sua utilização como meio de diagnóstico está comprometida.

2.6.5. Aglutinação do muco cérvico-vaginal

O muco cérvico-vaginal foi utilizado pela primeira vez como amostra clinica para a pesquisa de aglutinas por Jepsen e Windekilde (1951), para o diagnóstico de brucelose. Este método foi depois modificado para se adaptar ao diagnóstico de CGB (Hughes, 1953).

O diagnóstico de CGB pelo teste da aglutinação do muco vaginal depende da demonstração de aglutininas específicas que aparecem no muco cérvico-vaginal de fêmeas bovinas após a infecção genital com Cfv. Esta técnica consiste na pesquisa de anticorpos específicos no muco cérvico-vaginal dos animais suspeitos, para isso utiliza-se como antigénio uma suspensão padronizada de Cfv que é incubada frente a diluições padronizadas do muco cérvico-vaginal.

A aglutinação do muco cérvico-vaginal é uma técnica para ser utilizada como diagnóstico de rebanho, pois não tem precisão para detetar portadores porque apenas demonstra a presença de anticorpos (Leite, 1977). Além disso, um resultado individual negativo não indica a ausência da infecção.

A sua sensibilidade e especificidade não são boas e esta técnica necessita que o muco seja muito bem recolhido, pois, a presença de sangue ou exsudado no material aumenta a proporção de resultados falso-positivos ao teste. Além disso, a aglutinação com muco cérvico-vaginal também possui vários inconvenientes como a demora no aparecimento de aglutininas no muco cérvico-vaginal e material de abortos (Groff, 2005).

Vários fatores devem ser considerados para a utilização deste método. Uma fêmea infetada apenas vai dar origem a um resultado positivo quando o muco for analisado, no mínimo, 60 dias após a infecção e até aproximadamente sete meses depois desta. Idealmente este teste deve ser realizado por volta dos 70 dias após a infecção. Assim, para a utilização deste método para diagnóstico individual dos animais, o estadio do ciclo éstrico e a data da exposição ao agente têm de ser conhecidos. O muco cérvico-vaginal não deve ser recolhido durante o estro, visto que o muco originado durante o ciclo éstrico promove a diluição das aglutininas, pelo que reações falso-negativas podem ocorrer. Por sua vez, o sangue libertado por manipulação incorreta da vagina durante a recolha da amostra pode levar a uma reação falso-positiva (Pellegrin, 2002).

Aquando do diagnóstico de CGB numa exploração com este meio de diagnóstico, se se cumprirem os requisitos anteriormente enumerados apenas é necessário recolher amostras de dez vacas; caso estes não possam ser cumpridos, o muco deve ser recolhido de vinte animais (Hoffer, 1981). De modo a se obter resultados reproduzíveis, a padronização dos antigénios é essencial, para isto são utilizados soros padronizados (Newsam & Monsbourhg, 1967).

Apesar dos inconvenientes anteriormente referidos, alguns investigadores consideram este método conveniente e preciso para o diagnóstico da CGB (Hoffer, 1981).

Quanto à soro-aglutinação, este não é um teste de confiança, pois a doença não é sistémica e raramente são encontrados anticorpos contra Cfv no soro sanguíneo, visto que a produção de anticorpos é local (Hoffer, 1981).

2.6.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) foi desenvolvido nos anos de 1970 e muito difundido a partir do ano de 1985, como ensaio para anticorpos anti-HIV. Esta técnica é utilizada para medir a concentração de uma substância a analisar, geralmente anticorpos ou antigénios, em solução (Andreotti *et al.*, 2003; Lima, 2010).

O teste de ELISA depende da interação específica entre um epítopo e o local de ligação do anticorpo correspondente, consistindo na imobilização de um dos componentes, antigénio ou anticorpo, em fase sólida (componentes fixados), e na utilização de um conjugado, que também pode ser um antigénio ou uma imunoglobulina, ligado a uma enzima. A adição de um substrato logo após leva a formação de um produto colorido, essa alteração de cor é avaliada pelo espectrofotómetro, que determina a relação entre a intensidade da cor e a quantidade do anticorpo ou antigénio que se está a analisar na amostra (Andreotti *et al.*, 2003; Lima, 2010).

Existem quatro formatos básicos de ELISA, direto, indireto, de captura e de competição; permitindo um certo grau de flexibilidade que pode ser ajustada com base nos anticorpos disponíveis, nos resultados pretendidos, ou na complexidade das amostras. Os anticorpos utilizados em ELISA podem ser monoclonais (derivados de células produtoras de anticorpos únicos chamados hibridomas e capazes de se ligar especificamente a um único epítopo) ou policlonais (um conjunto de anticorpos purificados a partir de soros de animais que são capazes de se ligar a múltiplos epítopos) (Andreotti *et al.*, 2003).

Para o diagnóstico de CGB, o teste de ELISA foi adaptado para a deteção de anticorpos da classe IgA no muco cérvico-vaginal de vacas com suspeita de infeção por *C. fetus*. A escolha deste tipo de anticorpos como alvo do teste de ELISA deve-se ao facto destes persistirem por mais tempo e a sua concentração permanecer constante no trato genital durante vários meses (Hewson *et al.*, 1985; Hum *et al.*, 1994). Este método de diagnóstico é também útil na deteção de IgA específicas em fêmeas bovinas que abortaram como resultado da infeção natural pelo Cfv (Hum *et al.*, 1991). A pesquisa apenas de anticorpos da classe IgA, permite que os animais vacinados não constituam falso-positivos no teste, visto que nestes animais o muco cérvico-vaginal apenas contém anticorpos da classe IgG (Hum *et al.*, 1991).

Entre as técnicas sorológicas usadas para a deteção da resposta imune, o ELISA é aceite como uma das técnicas mais sensíveis, pelo que se trata de um teste muito conveniente para utilização em laboratório. Segundo o estudo de Pellegrin (2001), a especificidade do teste de Elisa para IgA foi de 94,4%, valor semelhante ao observado por Hum e colaboradores (1994), de 98,5%. Segundo o estudo de Devenish e colaboradores (2005), a sensibilidade deste teste é de 100%.

A utilização do teste de ELISA para diagnóstico de CGB tem um grande inconveniente, visto que a maioria das novilhas infetadas, após descanso sexual, deixa de estar infetada por Cfv dentro de seis meses, pelo que ocorre uma redução dos anticorpos. Assim, devido às

características subclínicas desta doença, apenas no momento do diagnóstico da gestação ou no parto é que o proprietário toma conhecimento do problema, altura em que apenas um número limitado de fêmeas estão ainda infetadas, pelo que os anticorpos são difíceis de detetar (Andrews & Frank, 1974). Outro aspeto negativo deste meio de diagnóstico é o facto de não permitir distinguir a infeção causada pelas duas subespécies de *C. fetus* (Wagenaar & van Bergen, 2012).

O ELISA é indicado como mais sensível que o teste de muco-aglutinação para a deteção de imunoglobulinas da classe G anti-*Campylobacter fetus* em estadios recentes de infeção (Hewson, 1985). Este teste é de grande utilidade para avaliar a resposta imune após a vacinação (Pellegrin, 2001), através da pesquisa de IgG.

Brooks e outros (2004) utilizaram anticorpos monoclonais contra a camada LPS de *C. fetus*, em ELISA direto, mas não obtiveram um bom limite de deteção (10^4 a 10^6 UFC/mL), tornando inviável a utilização da técnica com estes anticorpos monoclonais (Alves, 2010).

Por sua vez, este meio de diagnóstico é inadequado para utilização no diagnóstico de touros, devido à falta de suficientes títulos de anticorpos no esmegma (Winter, 1982, referido por: McMillen *et al.*, 2006).

2.7. Tratamento e profilaxia

O controlo da CGB numa exploração deve basear-se em três pontos específicos, nomeadamente em prevenir a transmissão de Cfv, eliminar a infeção da vacada e evitar a introdução do microrganismo novamente na exploração (Pellegrin, 2002).

Os fatores de risco considerados mais importantes para a infeção pelo Cfv são a utilização de manejo reprodutivo com monta natural, uso de touros com idade superior a 4-5 anos no rebanho, presença de touros sem controlo sanitário para a CGB (Stoessel, 1982) e manejo reprodutivo que utiliza monta o ano inteiro (Ball *et al.*, 1987). Com vista a suprimir estes fatores de risco, devem ser adotadas medidas de profilaxia e controlo como o tratamento dos animais infetados, o tratamento do sémen contaminado, a vacinação, a implementação de um programa de IA, o estabelecimento de um período limitado de estação de monta, entre outros (Miranda, 2005; Gomes, 2012).

Como já foi referido, a recuperação espontânea da infeção nos machos raramente ocorre, provavelmente devido a pequenas variações antigénicas que a bactéria sofre no curso da infeção e por esta não ter um carácter invasivo nos machos, não induzindo uma grande produção de anticorpos. Assim, o macho permanece como portador assintomático, pelo que devem ser tomadas medidas de forma a minimizar a disseminação da infeção no rebanho (Stoessel, 1982).

A utilização de antibióticos pode ser aconselhado principalmente para o tratamento de touros infetados e, em menor escala, para vacas. Uma vez que este é um tratamento

dispendioso, é principalmente utilizado em animais de maior valor zootécnico (Alves *et al.*, 2011). A estreptomicina e a penicilina são os fármacos mais utilizadas para o controlo de infeções por *C. fetus* (Garcia *et al.*, 1983).

Entre os vários esquemas destinados ao tratamento da CGB, no estudo de Eaglesome e Garcia (1992) o protocolo que apresentava melhores resultados envolvia o uso de dihidroestreptomicina por via parenteral aplicado localmente. Assim, no primeiro, terceiro e quinto dias de tratamento era administrado dihidroestreptomicina por via parenteral (22-25 mg/kg); e no segundo e quarto dias de tratamento era aplicado uma solução com 5 g de dihidroestreptomicina, no pénis e prepúcio, seguido de uma massagem vigorosa do prepúcio (Eaglesome & Garcia, 1992). Um outro protocolo para tratamento tópico é a combinação dos antibióticos eritromicina (4 g) e neomicina (10 g) e de aproximadamente 30 mL de óleo vegetal, de forma a garantir um contacto prolongado desta mistura com o prepúcio. Sugere-se que o prepúcio seja lavado antes do tratamento e que o antibiótico permaneça em contacto com o prepúcio no mínimo 15 minutos. Assim, o orifício prepucial é encerrado com uma das mãos e a outra mão massaja vigorosamente a zona (Norman *et al.*, 2003). O animal é considerado como livre de Cfv após a realização de três testes negativos no lavado prepucial com intervalos de 15 dias de repouso sexual (Lage & Leite, 2000).

Embora o sucesso do protocolo de tratamento em que se utiliza uma combinação de penicilina e estreptomicina tenha sido relatado por Hum e colaboradores (1991), parece não haver nenhum estudo científico sobre a eficácia do tratamento local do prepúcio em infeções por Cfv em touros (Norman *et al.*, 2003).

Atualmente, o tratamento de machos infetados é desaconselhado, visto que os resultados são insatisfatórios, pois dificilmente há ação antimicrobiana nos locais de permanência do agente (criptas prepuciais), para além do elevado custo económico do tratamento (Gomes, 2012).

Relativamente às fêmeas, desde a descoberta que estas recuperavam espontaneamente da infeção ao fim de cerca de cinco meses e visto que o nível de imunidade do animal permite a proteção contra a reinfeção, a utilidade do tratamento de vacas infetadas é questionável (Schmidt, 2009). O repouso sexual das fêmeas por 120 a 180 dias leva à eliminação espontânea do Cfv do trato genital na maioria dos animais, o que resulta na sua recuperação. No entanto, a fertilidade destes animais pode não retornar aos níveis normais e alguns animais que tiverem salpingite bilateral apresentarão esterilidade (Fernandes, 2009). A recuperação pode ser melhorada através de infusões intrauterinas de estreptomicina e de penicilina (Drost & Thomas, 1996), contudo este é um tratamento dispendioso, principalmente se aplicado a um grande número de animais.

Com o aparecimento de resistências aos antibióticos, novos protocolos de tratamento têm sido testados. Este é um problema crescente, indicando assim a necessidade da adoção de medidas para reduzir esta resistência, assim como controlar mais eficazmente o uso de antibióticos, pesquisar os mecanismos genéticos de resistência, estudar a suscetibilidade

microbiana e desenvolver novos fármacos (Nascimento *et al.*, 2000). A resistência microbiana pode resultar da aquisição de genes com fatores de resistência. A escolha empírica do agente de tratamento, antes do teste de suscetibilidade favorece este fenómeno (Travers & Barza, 2002). O uso indiscriminado de antimicrobianos, as subdosagens e a adição de promotores de crescimento à dieta expõem os animais a pequenas concentrações de antibióticos durante longos períodos de tempo, o que contribui para a seleção e manutenção de organismos resistentes (McEwen & Fedorka-Cray, 2002). Num estudo de Vargas e colaboradores (2005), todas as amostras de Cfv foram suscetíveis a amicacina, ampicilina, cefalotoína, estreptomicina, gentamicina, penicilina e tetraciclina. Foi observada resistência de 42,86% à lincomicina, 4,76% à enrofloxacina e de 100% ao ácido nalidíxico. Ainda 4,76% apresentaram suscetibilidade intermédia à enrofloxacina, neomicina e polimixina B e 9,52% à lincomicina. Os resultados demonstraram a sensibilidade das amostras analisadas aos antimicrobianos normalmente utilizados para o tratamento clínico e do sémen.

A vacinação de bovinos é o método mais prático e rápido no controlo da CGB (Gomes, 2012). A imunização sistémica com antígenos de Cfv induz uma resposta de anticorpos, principalmente IgG, a nível sistémico e em secreções genitais (Wilkie *et al.*, 1972; Corbeil *et al.*, 1981). Estes anticorpos são dirigidos contra antígenos de superfície do organismo (Schurig *et al.*, 1975), visto que se identificaram proteínas capsulares de 35 kDa que reagiram com IgG de animais vacinados (Eaglesome & Garcia, 1992). As IgG impedem a aderência microbiana, ativam o complemento, opsonizam e imobilizam as bactérias (Cobo *et al.*, 2011). Para uma vacina ser eficaz contra o Cfv deve incorporar três tipos de antígenos desta bactéria, os antígenos flagelares termolábeis "H", os antígenos somáticos termoestáveis "O" e o antígeno capsular "K". O papel protetor de anticorpos IgG na CGB baseia-se na demonstração de que esta classe de anticorpos está presente nas secreções genitais de animais protegidos por imunização sistémica (Wilkie *et al.*, 1972), que estes anticorpos são eficazes opsoninas (Corbeil *et al.*, 1974) e que após a opsonização, o Cfv é eliminado mais eficazmente por fagocitose de polimorfonucleares ou mononucleares (Corbeil *et al.*, 1975).

Segundo Bouters e outros (1973), uma vacina experimental de Cff confere imunidade contra Cfv, pois estas duas subespécies partilham antígenos comuns. No entanto, a adição de uma segunda estirpe de Cfv à vacina é bastante praticada e fortemente sugerida. Para que haja uma boa proteção, o peso seco da vacina deve ser de aproximadamente 40 mg de proteína por dose (Wagenaar & van Bergen, 2012).

Os efeitos de utilização de vacinas contra a CGB em touros são controversos na literatura (Vasquez *et al.*, 1983; Fóscolo *et al.*, 2005). Clark e outros (1968, referido por: Gomes, 2012) utilizaram uma bacterina com adjuvante oleoso na vacinação de quatro touros infetados com o Cfv. Estes animais foram duas vezes inoculados num intervalo de cinco semanas. Quinze dias após a segunda imunização, constatou-se que todos os animais estavam livres da infeção, pelo que a vacina tinha um efeito terapêutico. Segundo um estudo de Fóscolo e outros (2005), a administração de duas doses de vacina nos touros, com um

intervalo de 23 dias, eliminaram a infecção por Cfv em mais de 55% dos touros, pelo que a vacinação de touros deve ser realizada, mas não como medida única do programa de controlo. Por sua vez, em condições de intensa atividade sexual, pode haver transmissão mecânica por touros imunizados, infetando assim vacas suscetíveis (Fivaz *et al.*, 1978).

Nos touros, de forma a ajudar a eliminação do agente patogénico, no momento do reforço vacinal é recomendada a realização de uma infusão de antibióticos ou antissépticos no prepúcio (Hum *et al.*, 1993).

Segundo o estudo de Schurig e colaboradores (1975), a imunização sistémica de novilhas com bacterinas de Cfv tem também um efeito terapêutico. Hoje em dia, a vacinação de vacas infetadas é considerada uma medida bastante eficaz na prevenção da CGB, mesmo em rebanhos que apresentem altas taxas de infecção (BonDurant, 2005; Stoessel, 1982).

Inicialmente, o controlo de CGB no rebanho envolvia principalmente a vacinação dos touros, mas, devido a falhas documentadas da vacinação em eliminar infeções em alguns touros (Hum *et al.*, 1993), este tipo de programa de vacinação podia permitir a permanência de animais portadores de Cfv no rebanho. Assim, atualmente, o programa de vacinação contra CGB nas explorações envolve inicialmente vacinar todas as novilhas, vacas e touros mais velhos, em conformidade com as instruções dos fabricantes das vacinas. No caso da primovacinação, os animais devem receber duas doses, uma em torno de 60 e outra em torno de 30 dias antes do início da cobertura). Nos anos seguintes, todos os touros e novilhas de reposição deverão ser vacinados, de preferência cerca de um mês antes da época de cobrição, de forma a garantir que a proteção está no seu pico durante o período de alto risco (BonDurant, 2005; Stoessel, 1982).

Devido à dificuldade em estimular uma resposta imunitária no prepúcio dos touros comparativamente ao trato reprodutor das fêmeas, a dose de vacinação de reforço para os touros é de 2,5 vezes a recomendada para vacas. Visto que a prevenção da infecção por CGB em touros é preferível ao tratamento, recomenda-se a vacinação de todos os novilhos antes destes saírem da exploração ou antes da sua primeira estação reprodutiva (Norman *et al.*, 2003).

As bacterinas com adjuvante à base de óleo têm demonstrado ser as mais eficazes e com a propriedade de proporcionar uma proteção mais prolongada, após uma única dose (Givens, 2006). Contudo, a administração de uma bacterina com adjuvante oleoso produz uma reação em forma de tumefação no local da inoculação, que pode variar de um a cinco centímetros de diâmetro, com duração de até um ano. Esta reação deve-se à lenta absorção imunologicamente desejável do adjuvante oleoso (Leite, 1977). Assim, devido a este inconveniente, sobretudo de aspeto estético, alguns produtores têm relutância em vacinar os touros antes da sua venda devido à depreciação da carcaça. Pelo que se devem escolher zonas menos nobres da carcaça para a vacinação. Até que uma vacina seja desenvolvida que não cause uma reação local tão severa, os nódulos devem ser considerados como um sinal

positivo de que o touro está protegido contra CGB para encorajar os produtores a vacinar os touros antes da exposição (Norman *et al.*, 2003).

Relativamente à imunidade conferida pela vacinação de vacas, as opiniões dividem-se em relação à eficácia deste procedimento. Num estudo de Clark e outros (1977), a administração subcutânea de uma única dose de vacina contra Cfv com adjuvante à base de óleo foi considerada eficaz na proteção contra perdas reprodutivas de novilhas infetadas com esta bactéria. Num estudo de Cobo e outros (2003), em que foram testadas duas bacterinas comerciais contendo Cfv, administradas por via subcutânea em vacas naturalmente infetadas, por cobrição com touros infetados, não houve proteção contra a infeção de Cfv. Apesar da vacinação, as vacas vacinadas e as de controlo demonstraram um pobre desempenho reprodutivo, o que indica uma baixa proteção das vacinas comerciais utilizadas. Neste estudo, constatou-se que a imunização sistémica, com duas vacinas comerciais com adjuvante de hidróxido de alumínio, não origina nenhum aumento significativo dos títulos de anticorpos sistémicos. Embora a imunidade local tenha sido estudada, Cobo e outros (2003) sugerem que a resposta imunitária estimulada pelas vacinas utilizadas não fornece proteção contra Cfv. Uma possibilidade para a ausência de imunidade é a utilização de hidróxido de alumínio como adjuvante, visto que geralmente este induz uma imunidade de curta duração, em comparação com as vacinas com adjuvante à base de óleo (Corbeil & BonDurant, 2001). Outro ponto crítico importante é que em ambas as vacinas não havia informações sobre a origem das estirpes utilizadas e sobre a massa celular de cada subespécie *C. fetus*. Além disso, há que ter em conta a diferença antigénica entre as estirpes locais e as internacionais e a mudança nas características de patogenicidade destas bactérias durante a infeção, que podem também ser as causas responsáveis pela falta de eficácia das vacinas (Schurig *et al.*, 1975).

Por outro lado, num estudo de Campero e colaboradores (2010) em que se avaliou o efeito de três vacinas comerciais (duas com adjuvante de hidróxido de alumínio e a terceira com adjuvante de óleo), aplicadas sistemicamente, não foi observado um aumento relevante de anticorpos sistémicos, pelo que houve dúvidas sobre a imunidade conferida por estas três vacinas. Assim sendo, mais estudos são necessários para avaliar a eficácia da vacinação.

Leite (1977) relata que a relação custo-benefício do controlo da CGB através da vacinação das vacas é muito promissora, sendo que o retorno económico é aproximadamente de 18 vezes o valor investido na vacinação, pois o ganho de apenas um bezerro desmamado equivale ao custo aproximado da vacinação de cem animais.

Nos últimos anos têm surgido vacinas polivalentes para a imunização contra agentes patogénicos do trato reprodutivo feminino. Uma área de estudo na produção de vacinas contra agentes patogénicos do trato reprodutivo é a vacinação na mucosa genital (Alves *et al.*, 2011). Cobo e outros (2004) testaram uma vacina contendo Cfv e *Tritrichomonas foetus* (protozoário responsável pela tricomonose bovina, uma patologia do trato genital de bovinos com sintomatologia semelhante à CGB), utilizando imunizações via sistémica e via vaginal. Os resultados mostraram melhor desempenho da vacina aplicada localmente, quando comparado

com vacinas disponíveis no mercado, que normalmente utilizam a via subcutânea de administração. A inoculação intravaginal da vacina é uma forma de incitar a produção de IgA no local onde ocorre a infecção, sendo IgA um anticorpo que perdura mais e é mais resistente que a IgG em infecções por agentes patogênicos do trato genital bovino (Corbeil, 1999).

Uma vez que os sinais clínicos da CGB passam muitas vezes despercebidos, uma outra medida de controlo desta doença é a manutenção de registos atualizados da exploração, de forma a haver um maior controlo dos índices reprodutivos. Assim, em propriedades em que o registo não é bem feito e o controlo não é tão minucioso, esta doença pode causar sérias perdas económicas e de uma forma silenciosa, sem que seja na maior parte dos casos diagnosticada (Miranda, 2005).

O correto diagnóstico da CGB é um fator-chave em programas de controlo e erradicação. A regulamentação do comércio deve ser baseada em métodos científicos internacionalmente acordados para o isolamento e identificação de Cfv. A OIE proporciona esses métodos no Manual Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres (OIE, 2012b) e no Código terrestre (OIE, 2012a) descreve as medidas sanitárias a serem utilizadas pelas autoridades veterinárias dos países importadores e exportadores. Estas diretrizes proporcionam uma maior conformidade no diagnóstico de CGB e um melhor controlo da doença.

Antes da entrada numa exploração ou num centro de IA, todos os touros devem ser testados para CGB. Segundo o Código Terrestre da OIE (OIE, 2012a) os touros devem ser mantidos numa instalação de isolamento pré-entrada pelo menos 28 dias e têm de ser testados para brucelose, BVD, IBR, vírus da língua azul, num mínimo de 21 dias depois de entrar na instalação de isolamento pré-entrada, exceto para Cfv e *Tritrichomonas foetus*, cujos testes podem ser iniciados após 7 dias em isolamento pré-entrada. Todos os resultados devem ser negativos, exceto no caso dos testes serológicos de anticorpos BVD. Quanto ao Cfv, os animais com menos de seis meses ou mantidos desde essa idade num grupo de touros antes do isolamento pré-entrada, devem ser testados uma vez e evidenciarem um resultado negativo. Por sua vez, animais com seis meses ou mais que possam ter tido contacto com fêmeas antes do isolamento pré-inscrição, devem ser testados três vezes em intervalos semanais, com um resultado negativo em cada teste.

A implementação de uma estação de monta é também um procedimento útil no controlo de CGB, sendo que se entende por estação de monta ou estação reprodutiva o período do ano em que as vacas são submetidas à reprodução. Para o controlo desta doença, a estação de monta deve consistir num período de 60 a 90 dias. Visto que a maioria das fêmeas consegue eliminar a infecção ao fim de 120 a 180 dias, a sujeição a repouso sexual durante este intervalo de tempo, pode constituir uma medida adicional ao controlo da CGB (Nunes, 2005). Porém, como muitas fêmeas persistem infetadas por vários meses e algumas mantêm mesmo a infecção por toda a gestação, a implementação de um regime de estação de

monta não propicia a erradicação da CGB dos rebanhos, apesar de auxiliar no seu controlo (Alves *et al.*, 2011).

Outra prática recomendada para o controlo da CGB é o refugio de touros mais velhos e reposição com touros mais novos e livres da doença. Apesar de esta medida ser difícil de implementar dado o seu carácter económico, o refugio e reposição de touros pode trazer outros benefícios para o produtor, nomeadamente o ganho genético representado pela introdução de um animal melhorador, com melhor líbido e elevada capacidade de cobrição e a diminuição do risco de transmissão de outras doenças para além da CGB (Pellegrin, 2002). A partilha de touros entre explorações deve ser evitada (Finlay *et al.*, 1985).

A separação dos animais jovens para a formação de um rebanho livre desta doença constituído apenas por novilhas virgens e touros não infetados seria o ideal. Contudo é difícil de se executar na prática, pois é necessário que ocorra segregação total dos animais livres da infeção, dos infetados. Na maioria dos sistemas de produção, a manutenção desta separação total não é possível ou é economicamente inviável, resultando na infeção do rebanho segregado após alguns meses da implantação do programa (Alves *et al.*, 2011).

A implementação de um programa de IA com sémen de qualidade é uma medida bastante eficaz, visto que elimina a mais importante via de transmissão desta doença, o coito (BonDurant, 2005). O tratamento do sémen é recomendado, sendo que a CGB foi a razão original da adição de antibióticos a este (Shisong *et al.*, 1990). O sémen destinado à comercialização deve ser processado de acordo com as recomendações do Código Terrestre da OIE, que prevê adição de gentamicina (250 µg), tilosina (50 µg), lincomicina-espectinomicina (150-300 µg) ou penicilina (500 UI), estreptomina (500 µg) e lincomicina-espectinomicina (150-300 µg) ou ampicilina (75 µg) e divexacina (25 µg) por mililitro de sémen congelado (OIE, 2012a). O trabalho de Vargas e colaboradores (2005) comprova que a utilização destas associações de antibióticos no tratamento do sémen é eficiente no controlo de Cfv. Assim, a IA poderia prevenir a disseminação da enfermidade pela adição dos fármacos recomendadas no sémen.

Em países em que a IA é uma prática comum, não se têm registado mais casos de CGB (Pellegrin, 2002). Porém, é difícil utilizar a IA em grandes rebanhos de bovinos de carne em que predomina o sistema de criação em extensivo, devido ao alto custo do procedimento e de dificuldades tecnológicas e de recursos humanos das propriedades.

No caso de se aplicar a IA é importante que não se utilize touros de repasse, pois estes podem constituir reservatórios da infeção (Stynen *et al.*, 2003; BonDurant, 2005). O touro de repasse é o animal de eleição quando se pretende investigar a prevalência de CGB num rebanho, visto que este se encontra invariavelmente contaminado, uma vez que cobre quase todas as fêmeas que regressam ao cio depois da segunda ou terceira inseminação (Pellegrin, 2002).

2.8. Impacto económico

A CGB é uma doença que apresenta sinais pouco evidentes, pelo que passa muitas vezes despercebida, principalmente em explorações com registos insuficientes. Geralmente, esta doença apenas é diagnosticada quando se deteta uma taxa de parto reduzida, pelo que nesta altura as perdas são já extensas (Schmidt, 2009).

Em 1963, o Laboratório de Pesquisa da RAY Foundation (Montana, EUA) conduziu uma pesquisa de Cfv num total de 41 000 bovinos, e conclui que 17% das fêmeas não estavam gestantes após a estação de monta, devido à infertilidade e ao aborto precoce. Neste caso o prejuízo provocado pela CGB, num ano, foi estimado em 225 mil dólares (Safford, 1969).

Akhtar e colaboradores (1993) concluíram que a infeção com Cfv em vacadas de leite influenciou negativamente a produção de leite. Por sua vez, Hum (2007) refere que a CGB provoca um impacto negativo significativo sobre os parâmetros reprodutivos em bovinos de carne e em bovinos de leite, o que representa uma grande perda económica para os produtores, especialmente no primeiro ano de infeção. As margens de lucro na presença desta doença na exploração podem ser reduzidas em 65% no primeiro ano de infeção. Quando a doença se estabelece numa exploração, o impacto económico já não é tão evidente, contudo as margens de lucro são geralmente 36% abaixo das explorações não infetadas.

As perdas económicas decorrentes da presença de CGB numa exploração devem-se ao refugo e necessidade de reposição de animais inférteis (as fêmeas repetidoras de cio, que abortam constantemente e os touros contaminados), ao custo do sémen e IA, queda na produção de bezerros e, no caso de bovinos de leite, à grande redução na produção de leite pelo aumento do intervalo entre partos (Goodger & Skirrow, 1986). Há ainda que considerar os custos no diagnóstico laboratorial da CGB (Gomes, 2012). Nos países onde ocorre, esta doença causa grande impacto económico, uma vez que leva a uma média de 60% de taxa de retorno ao cio e que apenas 35% das novilhas cobertas fiquem prenhas (McCool *et al.*, 1988).

Em explorações de bovinos de carne, o impacto da CGB resulta principalmente do aumento do intervalo entre partos, reflexo do grande número de vacas que falham em conceber ou concebem tardiamente no período de monta, e da produção de bezerros mais leves, que são desmamados mais tarde, e que compõem lotes pouco uniformes, o que influencia negativamente a sua comercialização (Kasari & Gleason, 1996).

O impacto económico, a curto prazo, pode ser reduzido quando se utiliza maior número de touros ou um período mais longo de estação de monta porque as fêmeas ao serem infetadas têm oportunidade de desenvolver imunidade, conceber e, posteriormente levar a gestação a termo (Ball *et al.*, 1987), contudo isto leva a que a doença permaneça mais tempo na exploração sem ser diagnosticada.

Outro parâmetro zootécnico também alterado na presença desta doença numa exploração, é o aumento da idade da vaca à primeira cria, como consequência das novilhas

serem mais suscetíveis à infecção por este agente, o que ocasiona maiores perdas nesta categoria animal (Stoessel, 1982).

3. Objetivos do trabalho

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi a pesquisa de *Campylobacter fetus* em amostras prepuciais. Estas foram recolhidas pelo método da raspagem prepucial, com raspador próprio, de touros presentes na região do Alentejo. Este trabalho procura determinar a prevalência de infecção genital por *Campylobacter fetus* na região e assim ressaltar a crescente importância desta patologia no âmbito da reprodução de bovinos de carne, proporcionando aos veterinários um conhecimento do que existe na região do Alentejo de forma a incentivar a sua pesquisa, controlo e prevenção.

3.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- A pesquisa de *Campylobacter fetus* por imunofluorescência direta;
- A pesquisa de *Campylobacter fetus* por isolamento bacteriológico;
- Correlacionar os resultados da imunofluorescência direta e do isolamento bacteriológico.

4. Material e métodos

4.1. Imunofluorescência direta (IFD)

4.1.1. Recolha de amostras

Neste trabalho foram recolhidas 118 amostras prepuciais de touros de 25 explorações diferentes, ao longo de oito meses. Apenas foi realizada uma colheita por animal. Os touros pertenciam à raça Limousine, na maioria, mas também às raças Alentejana, Charolês, Angus e Blonde D'Aquitaine. As recolhas variaram entre um e dez touros por exploração, com uma média de 4,72 touros por exploração.

Para este trabalho procurou-se selecionar apenas touros com mais de quatro anos, que já tinham sido utilizados como reprodutores. Antes da recolha da amostra, o touro permanecia em repouso sexual durante pelo menos sete dias.

Em primeiro lugar, o touro foi contido, ficando a perna mais próxima e cabeça presas com uma corda. Durante a recolha da amostra foram utilizadas luvas, de forma a evitar a infeção iatrogénica dos touros amostrados em seguida. Depois, foi realizada a tricotomia da zona em torno da abertura do prepúcio. Antes da raspagem foi estimulada a micção, de forma a evitar a contaminação da amostra com urina. Em caso de contaminação da amostra com urina, a amostra seria novamente recolhida (*Laboratório Azul*, 2013). Seguidamente a zona foi limpa com uma folha de papel absorvente, e em caso de estar demasiado conspurcada foi limpa com água, não se podendo utilizar qualquer tipo de antisséptico de forma a não alterar a microflora presente. (Schmidt, 2009). Um raspador (Figura 7), previamente esterilizado, foi inserido na abertura do prepúcio e, cuidadosamente raspou-se a superfície ao longo do pénis e face interna do prepúcio, em direção ântero-posterior, em sentido do fundo de saco, cerca de vinte vezes (*Laboratório Azul*, 2013). Em seguida, o raspador foi retirado do prepúcio e introduzido num tubo com 8,5 ml de PBS fenolado estéril, de forma a lavar o raspador e recolher o esmegma (McMillen *et al.*, 2006). A correta identificação dos tubos foi um fator importante a ter em conta. Estes foram transportados à temperatura de refrigeração, 4 °C.



Figura 7 Raspadores (*Laboratorio Azul*)

Após o uso, os raspadores foram cuidadosamente limpos e lavados com água morna e mergulhados durante a noite numa solução de água com hipoclorito de sódio (30 mL/L). No dia seguinte, os raspadores foram novamente lavados com água, para remover por completo o cloro, e guardados num recipiente adequado (Hum & McInnes, 1987).

4.1.2. Preparação do conjugado

O conjugado utilizado neste estudo foi adquirido no *Laboratorio Azul* (Argentina) e preparado conforme as recomendações deste laboratório. Assim, para a sua preparação mediram-se 25 μ L de conjugado anti-*Campylobacter fetus* (soro hiperimune de coelho anti-*Campylobacter fetus fetus* e *C. fetus venerealis* marcado com isotiocianato de fluoresceína – CAMPY-AZUL®, *Laboratorio Azul*), e distribuiu-se este volume em microtubos esterilizados. Até à sua utilização, os tubos foram conservados a -20 °C, para evitar congelar e descongelar o conjugado repetidas vezes. Aquando da utilização, foi realizada uma diluição de 1:30, adicionando-se 725 μ L de solução PBS pH 7,2 (1x) a um microtubo com conjugado. Uma vez diluído o conjugado, este foi utilizado imediatamente ou conservado ao abrigo da luz, a 4°C, até 24 horas.

4.1.3. Técnica de imunofluorescência direta

A técnica de imunofluorescência direta realizada neste estudo baseou-se no trabalho de Figueiredo e colaboradores (2002). Em primeiro lugar, os tubos com as amostras clínicas foram centrifugados a 600 *g*, a 4°C, durante 10 minutos, tendo-se em atenção que os tubos na centrífuga (Rotina 420R, Hettich®) em posições opostas deveriam conter o mesmo volume. De seguida o sobrenadante foi transferido para um novo tubo *falcon* de 15 mL, devidamente identificado, e foi novamente centrifugado, desta vez a 13 000 *g*, a 4°C, durante 30 minutos. A primeira centrifugação foi realizada com o objetivo de depositar as células epiteliais e outros detritos não relevantes para o estudo, e a segunda centrifugação teve como função concentrar

a amostra num volume menor. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado. Ao depósito adicionou-se 500 µL de PBS pH 7,2 e agitou-se o tubo no vórtex.

Desta suspensão, retiraram-se 20 µL que foram colocados numa lâmina, devidamente identificada, de forma a ficar uma gota pequena. Este procedimento foi realizado em duplicado. Para os controlos negativo e positivo, colocou-se, numa lâmina, 20 µL de solução PBS pH 7,2 e 20 µL de suspensão de *Campylobacter fetus* (*Cepa control positivo NCTC 10354 – SOP 7 300 104, Laboratorio Azul*), respetivamente. Depois de o material nas lâminas ser seco na estufa a 37°C, foi fixado com acetona a -20°C, durante 30 minutos.

Foi então adicionado 23 µL de conjugado fluorescente anti-*Campylobacter fetus* numa diluição de 1:30 anteriormente preparado, de forma a cobrir o material fixado. Seguidamente, as lâminas foram incubadas durante 30 minutos, a 37°C, em câmara húmida. As lâminas foram então lavadas três vezes com solução PBS pH 7,2 (1x), durante 10 minutos, e uma vez com água corrente, sem incidir diretamente sobre o material fixado. Depois, as lâminas foram montadas com solução tamponada de glicerol pH 9,2 (90% glicerol e 10% de PBS 1x) (Wagenaar & van Bergen, 2012).

Por fim, as lâminas foram examinadas ao microscópio de epifluorescência, para identificação das formas microbianas fluorescentes com morfologia típica de *Campylobacter fetus*. Nos casos em que, ao microscópio, a observação das lâminas estava comprometida pela presença de muitos detritos, o processo foi repetido desde a primeira centrifugação com o restante da amostra.

Os touros foram classificados como positivos, negativos ou suspeitos. Para uma amostra ser considerada positiva era apenas necessário a observação de uma só bactéria com morfologia típica de *Campylobacter fetus*. As leituras discordantes encontradas nos duplicados das amostras (uma positiva e outra negativa) foram consideradas positivas. Por sua vez, quando apenas eram observadas formas microbianas fluorescentes com uma morfologia duvidosa, os touros foram classificados como suspeitos. As explorações com pelo menos um touro positivo, foram classificadas como positivas.

4.2. Isolamento bacteriológico

4.2.1. Recolha de amostras

Para o isolamento bacteriano foram recolhidas 22 amostras prepúciais, de cinco explorações diferentes, pelo mesmo método de raspagem descrito anteriormente. Porém, o raspador depois de retirado do prepúcio do animal foi introduzido num tubo com 8,5 ml de PBS estéril, de forma a lavar o raspador e recolher o esmegma (McMillen *et al.*, 2006). Aguardaram-se vinte minutos, para que as células epiteliais sedimentassem, e foi retirado 1 ml

da camada superior do líquido com uma pipeta descartável estéril, que foi inoculado no meio de enriquecimento de transporte de Weybridge, sem permitir a formação de bolhas de ar. As amostras foram transportadas para o laboratório a uma temperatura de 18 a 37 °C, ao abrigo da luz (Garcia *et al.*, 1983).

4.2.2. Técnica do isolamento bacteriológico

Logo que chegaram ao laboratório, as amostras foram incubadas a 37 °C durante 72 horas. Não há necessidade de se incubar o meio de enriquecimento de transporte sob condições microaerófilas (Hum *et al.*, 2009). Após 72 horas, retiraram-se 100 µL da amostra, que foram inoculados com um semeador de vidro numa placa de agar de Skirrow modificado (Hum & McInnes, 1987). Este procedimento foi realizado em duplicado para cada amostra. Todas as placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia a 37 °C, durante sete dias (Schmidt, 2009). A atmosfera de microaerofilia (5-10% de oxigénio, 5-10% de dióxido de carbono e, de preferência, 5-9% de hidrogénio) foi criada numa jarra usando um *kit* gerador de gás (GENbox microaer, 96125 Biomérieux®) ou através de uma vela. Para a criação de uma atmosfera de microaerofilia com uma vela, esta foi colocada acesa dentro da jarra e a jarra foi cuidadosamente fechada, de forma a que a combustão consumisse o oxigénio e gerasse a atmosfera pretendida.

No terceiro e sétimo dia de incubação as placas foram examinadas quanto à presença de colónias pequenas (1-3 mm de diâmetro), lisas, brilhantes, ligeiramente cinzento-cor de rosa, redondas, convexas e brilhantes, com um bordo regular (Hum & McInnes, 1987; Wagenaar & van Bergen, 2012). Quando identificada uma colónia suspeita de ser *C. fetus*, esta foi inoculada numa nova placa por esgotamento por estria, e incubada em atmosfera de microaerofilia a 37 °C, durante sete dias, sendo examinada ao terceiro e sétimo dia de incubação.

4.2.3. Identificação e Testes fenotípicos

Após a identificação de colónias suspeitas de *C. fetus*, procedeu-se à sua identificação. Os testes preliminares utilizados para determinar se os isolados pertenciam ao género *Campylobacter* foram a coloração de Gram, o crescimento em atmosfera microaerófila a 37 °C, e os testes da produção de catalase e oxidase (Schmidt, 2009). Assim, em primeiro lugar realizou-se a coloração de Gram para verificar a morfologia das bactérias, bem como se estas eram gram-negativas. Depois verificou-se se as bactérias em questão eram microaerófilas, testando o seu crescimento em atmosfera aeróbica. Os testes da oxidase e catalase foram também realizados. Depois de se determinar que as bactérias pertenciam ao género

Campylobacter, o seu crescimento foi testado a 25 e a 42 °C, pois apenas a espécie *C. fetus* cresce a 25 °C e não a 42 °C. Caso se tratasse de *C. fetus*, seria necessário fazer a distinção entre as duas subespécies, realizando a prova do crescimento em meio com 1% de glicina. A imunofluorescência foi também realizada nas bactérias isoladas suspeitas de serem *C. fetus*.

Coloração de Gram

Com uma ansa esterilizada, retirou-se uma colónia isolada e colocou-se numa lâmina onde já se tinha adicionado uma gota de água destilada. A lâmina foi seca ao ar e fixada pelo calor. De seguida, corou-se a lâmina com cristal violeta durante um minuto. Posteriormente, escorreu-se o corante, lavou-se com o mordente, solução de lugol, e cobriu-se a lâmina com o mordente durante um minuto e meio. Depois de lavar a lâmina com água, diferenciou-se com uma solução de álcool-acetona, e voltou-se a lavar com água. Seguidamente, contrastou-se com safranina durante um minuto, lavou-se com água e deixou-se secar a lâmina. Neste caso, deixa-se contrastar com fucsina durante mais tempo que o normal, visto que o *C. fetus* não cora bem com a safranina. Por fim, observou-se ao microscópio ótico com a objetiva de imersão.

Como já foi referido, a espécie *C. fetus* é gram-negativa, e a morfologia das células é bastonada, com a forma de vírgula ou em forma de “S” ou asa de gaivota e o seu comprimento é de 0,5 a 10 µm e o diâmetro varia entre 0,2 e 0,5 µm.

Requisitos atmosféricos

Inoculou-se por esgotamento por estria uma colónia de *C. fetus* em duas placas de meio de agar sangue, e incubou-se a 37 °C uma placa em atmosfera aeróbica e a outra placa em atmosfera de microaerofilia, esta última servindo como controlo. Esta prova permite diferenciar as espécies microaerófilas, como *Campylobacter* spp., de outras espécies.

Teste da oxidase

A presença de citocromo C foi demonstrada usando um *stick* comercial para o teste da oxidase (06-119-025, Scharlau®). Para isso, com a ponta do *stick* tocou-se numa colónia bem individualizada, e após meio minuto o resultado positivo foi indicado pelo desenvolvimento de uma cor púrpura.

Teste da catalase

Em primeiro lugar, recolheu-se uma colónia bem isolada, tendo o cuidado de não arrastar meio de cultura, e colocou-se a colónia numa lâmina. De seguida, adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogénio (3%) (*Hydrogen peroxide* – 107209 Merck®) em cima da colónia. Se houvesse a libertação de bolhas de gás (O₂) o resultado era positivo, caso contrário se não houvesse produção de bolhas de gás, o resultado era negativo.

Crescimento a 25 e a 42 °C

Inoculou-se por esgotamento por estria uma colónia de *C. fetus* em três placas de meio de agar sangue, e incubou-se em atmosfera de microaerofilia a 25, 42 e 37 °C, esta última servindo como controlo. Esta prova permite diferenciar o *C. fetus* das restantes espécies de *Campylobacter*, visto que o crescimento a 25 e a 37 °C indica que se trata de *C. fetus*, enquanto o crescimento a 37 e 42 °C indica que se trata de uma outra espécie de *Campylobacter*.

Crescimento em meio de 1% de glicina

Numa placa de meio de 1% de glicina inoculou-se por esgotamento por estria uma colónia de *C. fetus*. Como controlo, a bactéria foi também inoculada numa placa de agar sangue. Ambas as placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia a 37 °C, durante 72 horas (Wagenaar & van Bergen, 2012). O crescimento no meio de 1% de glicina indica que se trata de Cff, por sua vez o não crescimento neste meio indica que se trata de Cfv.

Imunofluorescência direta

A técnica de imunofluorescência direta foi também utilizada na identificação de *C. fetus*, sendo semelhante à descrita anteriormente para a pesquisa em amostras prepuciais.

Neste caso, com uma ansa esterilizada, retirou-se uma colónia isolada e colocou-se numa lâmina onde já se tinha adicionado uma gota de água. O procedimento foi realizado em duplicado. Depois de as lâminas serem secas na estufa a 37°C, estas foram fixadas com acetona a -20°C, durante 30 minutos. O restante procedimento foi igual ao descrito anteriormente no ponto 4.1.4.

4.3. Análise estatística

Neste trabalho foi calculada a prevalência estimada e a prevalência real. A prevalência estimada foi calculada a partir dos resultados da IFD. A prevalência real foi calculada ajustando o resultado da prevalência estimada à sensibilidade e especificidade do teste utilizado, de 92,59% e 88,89% respectivamente (Figueiredo *et al.*, 2002), e com um intervalo de confiança de 95%.

Na análise estatística da concordância entre os resultados da IFD e do isolamento bacteriológico foi utilizado o teste kappa. Este é um teste de concordância inter e intra-observadores, ou testes de diagnóstico, que mede o grau de concordância, corrigindo o que seria esperado simplesmente pelo acaso. O valor kappa varia normalmente de 0 a 1, apesar dos números negativos serem possíveis, em que um número mais próximo de 1 significa uma maior confiabilidade e os valores próximos ou menores que zero sugerem que o acordo é atribuível ao acaso. Assim, se o valor de kappa se situar entre 0 e 0,20 a concordância é ligeira, entre 0,21 e 0,40 a concordância é considerável, entre 0,41 e 0,60 a concordância é moderada, entre 0,61 e 0,80 a concordância é substancial e entre 0,81 e 1 a concordância é excelente (Landis & Koch, 1977).

5. Resultados

5.1. Imunofluorescência direta

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 5. Das 118 amostras recolhidas, apenas uma não pôde ser avaliada por imunofluorescência, pois encontrava-se muito contaminada mesmo após as centrifugações, pelo que havia muita sobreposição de material nas lâminas. Assim, 117 amostras foram avaliadas, o que significa um aproveitamento de 99,15% das amostras.

Tabela 5 Resultados da imunofluorescência direta realizada em amostras prepuciais

Data	Exploração	Nº série da amostra	Resultado da amostra	Resultado da exploração
25.09.2012	1	1	-	Suspeito
		2	-	
		3	Suspeito	
		4	-	
		5	-	
		6	-	
		7	-	
		8	-	
01.10.2012	2	1	-	+
		2	+	
		3	-	
		4	-	
		5	+	
02.10.2012	3	6	+	+
		7	-	
		8	+	
		9	+	
10.10.2012	4	1	+	+
		2	-	
		3	-	
		4	-	
		5	+	
		6	+	
		7	+	
11.10.2012	5	8	+	+

Data	Exploração	Nº série da amostra	Resultado da amostra	Resultado da exploração
		9	+	
		10	-	
		11	-	
		12	+	
		13	-	
		14	-	
17.10.2012	6	1	+	+
		2	+	
		3	+	
		4	-	
		5	+	
		6	+	
		7	+	
		8	Suspeito	
		9	-	
		10	+	
22.10.2012	7	1	-	+
		2	+	
		3	-	
		4	+	
		5	+	
		6	-	
		7	+	
		8	+	
		9	-	
		10	+	
24.10.2012	8	11	-	-
		12	-	
		13	-	
25.10.2012	9	14	-	-
		15	-	
		16	-	
		17	-	
7.11.2012	10	1	-	+
		2	+	
	4	Suspeito		
11	11	3	+	+
		5	+	
21.11.2012	12	1	+	+
		2	+	
		3	+	

Data	Exploração	Nº série da amostra	Resultado da amostra	Resultado da exploração
21.11.2012	13	4	-	-
28.11.2012	14	1	-	+
		2	+	
		3	+	
		4	+	
		5	+	
4.12.12	15	1	-	+
		2	Suspeito	
		3	-	
		4	+	
		5	+	
		6	+	
		7	-	
		8	+	
		9	+	
30.1.13	16	1	+	+
	17	2	+	+
8.2.13	18	1	-	-
		2	-	
		3	-	
13.3.13	19	1	+	+
		2	+	
		3	+	
		4	-	
		5	+	
	20	6	-	+
		7	-	
		8	Suspeito	
		9	+	
		10	+	
17.4.13	21	1	Suspeito	+
		2	+	
		3	+	
		4	+	
		5	+	
		6	+	
10.5.13	22	1	-	+
		2	-	
		3	-	
		4	Suspeito	
		5	Suspeito	

Data	Exploração	Nº série da amostra	Resultado da amostra	Resultado da exploração
		6	-	
		7	+	
15.5.13	23	1	-	+
		2	-	
		3	Suspeito	
		4	+	
22.5.13	24	1	+	+
		2	+	
23.5.13	25	1	+	+
		2	+	
		3	-	
		Prevalência	51,28% (animais)	80,00% (explorações)

Dos 117 touros avaliados, 60 foram positivos, 7 suspeitos e 50 negativos. Assim, a prevalência estimada de infecção por *C. fetus* determinada neste estudo foi de 51,28% de touros positivos e 5,98% de touros suspeitos. A prevalência real de infecção por *C. fetus*, tendo em conta a sensibilidade e especificidade do teste de IFD (Figueiredo *et al.*, 2002), calculada foi de 52,89% (43,9 a 61,7%, com um intervalo de confiança de 95%), sem contar com os animais suspeitos, visto que o diagnóstico destes não foi confirmado.

Por sua vez, das 25 explorações incluídas neste trabalho 20 foram classificadas como positivas para a infecção por *C. fetus*, o que equivale a uma prevalência de 80,00%, e uma exploração foi classificada como suspeita (4,00%).

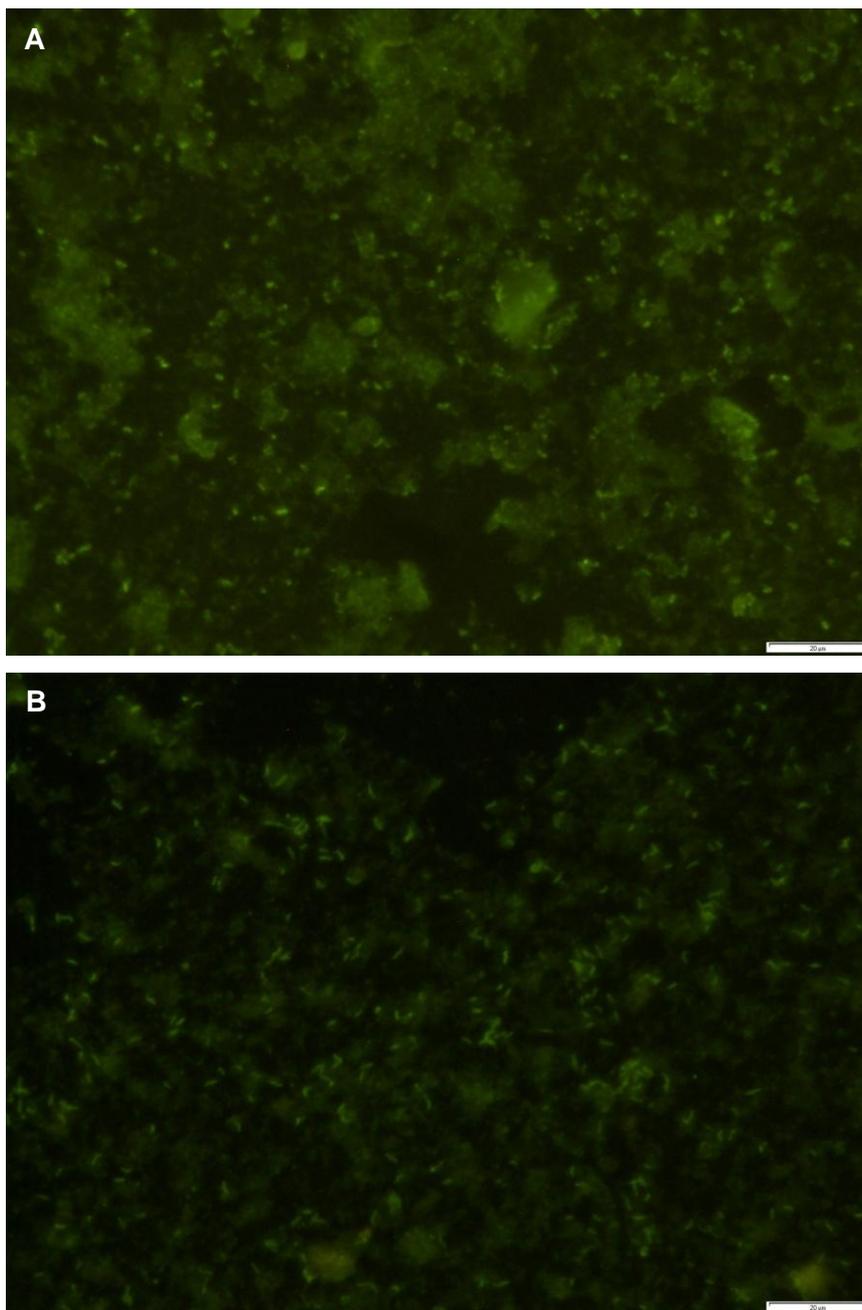


Figura 8 Exemplo de duas amostras prepuciais submetidas a IFD: A – exemplo de uma amostra em que se observavam muitas bactérias pequenas marcadas com fluoresceína (400 x); B – exemplo de uma amostra em que se observavam muitas bactérias com morfologia típica de *C. fetus* (400 x).

Verificou-se que para além das bactérias pertencentes à espécie *C. fetus*, mais material ficava marcado com fluoresceína, consistindo assim em fluorescência não específica. Em seis amostras prepuciais, em ambos os duplicados, observaram-se ao microscópio muitas bactérias marcadas com fluorescência, mas com morfologia distinta da do *C. fetus*, mais propriamente bactérias muito pequenas e curtas, juntamente com algumas bactérias um pouco

mais compridas. Na Figura 8 observa-se a diferença entre a morfologia observada nestes seis casos (A) e a morfologia típica correspondente ao *C. fetus* (B). Segundo o Dr. Alfredo Martínez, responsável pela parte do diagnóstico de CGB no *Laboratorio Azul* (Argentina), trata-se de *C. fetus*, pelo que as amostras que evidenciavam esta morfologia, foram re-classificadas como positivas.

5.2. Isolamento bacteriológico

Entre os 118 touros dos quais se recolheram amostras prepuciais para diagnóstico de infeção por *C. fetus* através de IFD, a 22 dos touros foi também recolhida, simultaneamente, uma amostra prepucial para isolamento bacteriológico. Como já foi referido, a amostra de um dos animais não foi possível ser utilizada para diagnóstico por IFD. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 Resultados da imunofluorescência direta e do isolamento bacteriológico realizados em amostras prepuciais

Data	Exploração	Nº série da amostra	Imunofluorescência Direta	Isolamento bacteriológico	
				Resultado	Observações
17.4.13	21	1	n.d.	+	Isolado <i>Campylobacter fetus fetus</i>
		2	+	-	
		3	+	+	Isolado <i>Campylobacter fetus fetus</i>
		4	+	-	
		5	+	+	Isolado <i>Campylobacter fetus fetus</i>
		6	+	-	
10.5.13	22	1	-	-	
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	+	-	Suspeito <i>Pseudomonas</i> spp.
		5	Suspeito	-	
		6	-	-	Suspeito <i>Pseudomonas</i> spp.
		7	+	-	Suspeito <i>Pseudomonas</i> spp.

Data	Exploração	Nº série da amostra	Imunofluorescência Direta	Isolamento bacteriológico	
				Resultado	Observações
15.5.13	23	1	-	-	Isolado <i>Pseudomonas</i> spp.
		2	-	-	Isolado <i>Pseudomonas</i> spp.
		3	Suspeito	-	Isolado <i>Pseudomonas</i> spp.
		4	+	-	Isolado <i>Pseudomonas</i> spp.
22.5.13	24	1	+	-	
		2	+	-	
23.5.13	25	1	+	-	Suspeito <i>Pseudomonas</i> spp.
		2	+	-	Suspeito <i>Pseudomonas</i> spp.
		3	-	-	Suspeito <i>Pseudomonas</i> spp.

n.d. – não determinado

Em algumas amostras em que se realizou o isolamento bacteriológico, verificou-se a presença de colónias macroscopicamente semelhantes às colónias de *C. fetus*. Todavia, através da coloração de Gram, verificou-se que a morfologia destas células não era correspondente à de *Campylobacter* spp., pelo que não se prosseguiu com os restantes testes de identificação bacteriológica.

As bactérias isoladas dos animais 1,3 e 5 da exploração 21, nos esfregaços corados revelaram-se gram-negativas bastonadas, com a forma de vírgula ou em forma de “S”. Não houve crescimento em aerobiose e os testes de oxidase (Figura 9) e catalase foram positivos, pelo que se considerou que as bactérias pertenceriam ao género *Campylobacter*. Por sua vez, foi testado o crescimento a 25 e a 42 °C, e como os três isolados cresceram a 25 °C e não a 42 °C foram identificados como *C. fetus*. Seguidamente foi testado o crescimento das três estirpes em meio de 1% de glicina, para a distinção entre Cff e Cfv. Como os três exemplares cresceram no meio em questão, foram identificados como Cff (Figura 10).

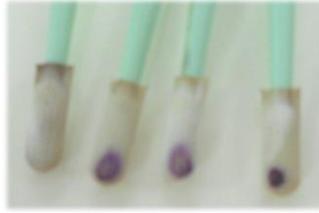


Figura 9 Teste da oxidase - o primeiro *stick* corresponde ao controlo negativo, os restantes *sticks* pertencem às três estirpes isoladas.

Depois de isoladas as estirpes, estas foram também submetidas a IFD. Contudo os resultados foram diferentes do que se esperava, sendo a visualização das bactérias difícil, pois estas encontravam-se pouco marcadas com fluoresceína.

Em dez das amostras (45,45%) verificou-se que havia um crescimento homogêneo de cor verde que cobria por completo a placa de agar de Skirrow modificado, impedindo assim a recuperação de outras bactérias que lá pudessem estar presentes. Quatro destas amostras foram analisadas (repicagem para os meios agar McConkey e Kligler e realização do API 20E) e identificadas como *Pseudomonas* spp.. Nas restantes placas, a bactéria contaminante tinha a morfologia colonial semelhante, porém não foi confirmada a sua identificação por testes bioquímicos.

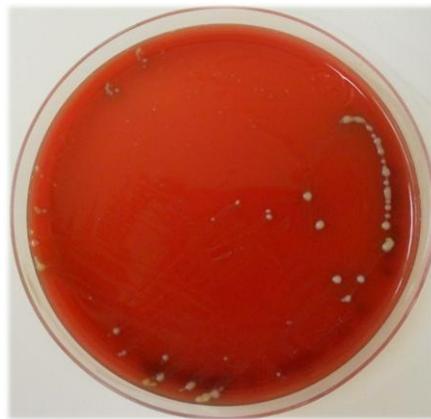


Figura 10 Placa com cultura identificada como *Campylobacter fetus fetus*

Assim, das 21 amostras analisadas por IFD, doze foram classificadas como positivas (57,14%) e duas como suspeitas (9,54%). Por sua vez, das 22 amostras em que se realizou o cultivo bacteriológico, apenas foram isoladas três estirpes, todas identificadas como *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

Como se pode ver pela Tabela 7, em doze das amostras identificadas pela IFD como positivas, apenas em duas foi possível confirmar o resultado por isolamento. Por outro lado, as sete amostras identificadas pela IFD como negativas, tiveram também um resultado negativo

no cultivo bacteriológico. Assim, sem considerar os animais suspeitos pela IFD, pois o seu diagnóstico não foi confirmado, temos que o isolamento bacteriano apenas conseguiu identificar corretamente nove dos dezanove animais, pelo que falhou na identificação de 52,6% dos casos. Por análise estatística calculou-se o valor kappa, que foi de 0,128, o que corresponde a uma concordância ligeira entre os dois métodos de diagnóstico.

Tabela 7 Comparação dos resultados obtidos pelo isolamento bacteriológico e imunofluorescência direta

		Imunofluorescência direta			Total
		Positivos	Negativos	Suspeitos	
Isolamento bacteriológico	Positivos	2	0	0	2
	Negativos	10	7	2	19
Total		12	7	2	21

6. Discussão de resultados

Neste trabalho pretendeu-se determinar a prevalência de infeção prepucial por *Campylobacter fetus* em touros na região do Alentejo. Assim, a 118 touros com mais de quatro anos, já utilizados como reprodutores, foram colhidas amostras de esmegma por raspagem, com raspador próprio, que foram posteriormente submetidas a diagnóstico por IFD.

A correta colheita de amostras é um aspeto primordial para o rigoroso diagnóstico de *C. fetus*, pois a sua fiabilidade está diretamente relacionada com o método, frequência de colheita e, principalmente, acondicionamento e transporte do material (Pellegrin, 2002; Pellegrin *et al.*, 2003b). Neste trabalho realizou-se a pesquisa da doença nos touros, pois estes são portadores assintomáticos do agente, os principais responsáveis pela disseminação da doença (Miranda, 2005) e encontram-se em menor número nas explorações (Alves, 2006), pelo que é mais fácil recuperar as bactérias a partir de amostras de touros do que de vacas (Schmidt, 2009). O material biológico ideal para a pesquisa de *C. fetus*, nos touros o é o esmegma (Winter *et al.*, 1967; Pellegrin, 2002; Pellegrin *et al.*, 2003b).

O período de repouso sexual durante 5 a 15 dias antes da colheita é essencial, visto que possibilita o aumento do número de microrganismos no prepúcio, permitindo um aumento da sensibilidade do teste de diagnóstico. Por sua vez, a realização de duas a três colheitas em intervalos de 7 a 15 dias é também importante (Noakes *et al.*, 2001; Pellegrin *et al.*, 2003b). Todavia, é perfeitamente compreensível que o produtor não possa prescindir do seu reprodutor por um período de 45 dias, mesmo que isto sacrifique a precisão de diagnóstico do seu rebanho. Assim, o mais frequente, é que se realize uma única colheita de material para o diagnóstico de CGB (Pellegrin, 2002), correndo-se o risco de haver falsos negativos. Neste trabalho, devido a razões logísticas, não foi possível repetir a colheita de amostras no mesmo animal, visto que esta envolve a separação dos touros novamente das vacas, o que não agrada aos produtores e, por outro lado, aquando da possível repetição muitos dos touros já não se encontravam na exploração.

A escolha deste método de colheita de esmegma deveu-se à praticabilidade e rapidez do método de raspagem, bem como ao facto deste método originar amostras que permitem um eficaz diagnóstico de infeção por *C. fetus*. Segundo Tedesco e outros (1977), o método de recolha de esmegma de eleição é a raspagem com raspador. Pois com esta metodologia, por isolamento bacteriológico, foram detetados mais animais como positivos, havendo também menos contaminação das amostras.

O meio de diagnóstico de infeção por *C. fetus* escolhido para realizar este estudo foi a IFD, pois este é um método aconselhado pela OIE para o diagnóstico de CGB e é considerado como uma técnica sensível, de fácil utilização, económica e praticável na maioria dos laboratórios (Leite, 1977; Fernandes, 2009). Por outro lado, as condições de colheita e tempo

de transporte não precisam de ser tão rigorosos como para o isolamento bacteriológico, pois a IFD possibilita a identificação de bactérias não viáveis (Ruckerbauer *et al.*, 1974). Esta é uma técnica bastante utilizada para a realização de estudos de prevalência, principalmente na América do Sul (McCool *et al.*, 1988; Lage *et al.*, 1997; Pellegrin *et al.*, 2002; Stynen *et al.*, 2003; Miranda, 2005; Leal *et al.*, 2012; Molina, 2012). A IFD tem sido extensamente usada para avaliar a prevalência de CGB, mas visto que o método não permite a diferenciação entre Cfv e Cff, deve-se falar em prevalência de infecção genital por *C. fetus*.

Como desvantagem, esta técnica é apenas específica para a identificação da espécie *C. fetus*, não sendo possível a distinção entre as duas subespécies devido às suas similaridades antigénicas (Hoffer, 1981), porém pode distinguir de outras espécies de *Campylobacter* (Hoffer, 1981; Noakes *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2002). A espécie *C. fetus* é constituída por dois serotipos, sendo que a subespécie Cff apresenta os dois sorotipos e a subespécie Cfv apenas apresenta o sorotipo A. Segundo o estudo de Figueiredo e colaboradores (2002), visto que o conjugado é preparado contra uma estirpe de Cfv, que possui apenas o sorotipo A, não existe reação do conjugado fluorescente contra Cff serotipo B. Portanto os nossos resultados positivos referem-se a touros infetados com Cfv e/ou Cff serotipo A, resultando as infecções causadas por Cff serotipo B como negativos.

O protocolo utilizado para a realização da IFD foi o descrito por Figueiredo e colaboradores (2002), pois neste estudo verificou-se um bom limite de detecção, de 10^2 UFC/mL, e boa sensibilidade e especificidade da técnica, de 92,59% e 88,89% respetivamente. Nesta técnica, realizam-se duas centrifugações com o objetivo de eliminar os detritos e concentrar as bactérias num menor volume, o que permite um limite de detecção substancialmente mais baixo. A presença de detritos dificulta a reação antigénio-anticorpo da IFD e a leitura por parte do técnico, daí a importância da sua eliminação (Figueiredo *et al.*, 2002).

No presente estudo, verificou-se que por vezes a realização de apenas um ciclo de centrifugações não era suficiente, sendo necessária a repetição das centrifugações para se conseguir estabelecer o diagnóstico. Todavia, numa amostra, a presença de detritos era de tal forma excessiva que mesmo após dois ciclos de centrifugação a sua observação não foi possível. Assim, apesar da contaminação das amostras não ser normalmente um problema associado à IFD verifica-se que a colheita cuidadosa das amostras é importante.

Em algumas amostras observou-se a presença de bactérias marcadas com fluoresceína que possuíam uma morfologia um pouco diferente da habitual da espécie *C. fetus*. A dúvida sobre a espécie destas, foi esclarecida pelo Dr. Alfredo Martínez, responsável pela parte do diagnóstico de CGB no *Laboratorio Azul* (Argentina), que confirmou que se tratava de *C. fetus*. Assim, se salienta a necessidade de um técnico especializado para a realização do diagnóstico de campilobacteriose por IFD.

Na observação de todas as amostras foi constatada a presença de fluorescência não específica na IFD, pois muitos detritos apareciam marcados com fluoresceína. Contudo,

pensa-se que não haveria a marcação de outras bactérias para além de *C. fetus*, pois segundo Mellick e outros (1965), Dufty (1967) e Figueiredo e colaboradores (2002), o conjugado fluorescente não reage contra *Escherichia coli*, nem contra outras bactérias da flora prepucial.

Segundo o presente estudo, a prevalência real nos animais de campilobacteriose na região do Alentejo é de 52,89% (43,9 a 61,7%, com um intervalo de confiança de 95%), sem abranger os animais que permaneceram suspeitos pois não foi possível repetir o seu diagnóstico. Relativamente às explorações, a prevalência de campilobacteriose é de 80,00%. Na revisão bibliográfica não foi encontrado nenhum estudo em Portugal sobre a prevalência desta doença. Segundo a OIE, em Portugal a doença não foi reportada no período entre Janeiro de 2005 e Junho de 2013 (OIE, 2013). Porém isto não indica que não exista a doença em Portugal, mas que não há uma pesquisa ativa da doença.

Noutros estudos em que se utilizou como método de diagnóstico a IFD, a prevalência de campilobacteriose nos touros variou entre 1,50% (Molina, 2012) e 52,3% (Pellegrin *et al.*, 2002) e nas explorações entre 2,28% (Molina, 2012) e 89,5% (Pellegrin *et al.*, 2002). Visto que em Portugal, e mais propriamente na região do Alentejo, não se realiza por rotina o diagnóstico e controlo da CGB, seria de esperar uma prevalência elevada desta doença.

Quanto à prevalência de CGB estimada neste estudo, há que ter em conta que a IFD pesquisa a infeção por Cfv e Cff sorotipo A, pelo que a prevalência apresentada poderá estar inflacionada, pois não inclui unicamente a infeção por Cfv. Por outro lado, apenas se efetuou uma colheita de material por animal, o que significa que se se tivesse realizado as três colheitas recomendadas a prevalência poderia ser maior. Assim, fica demonstrada a importância deste estudo, confirmando-se a presença de CGB na região do Alentejo, e salienta-se a importância da realização de mais estudos por forma a comprovar a prevalência desta doença na região.

Na segunda parte deste estudo pretendeu-se comparar dois métodos de diagnóstico de CGB, a IFD e o isolamento bacteriológico.

O método de diagnóstico de CGB aceite como *gold standard* é o isolamento bacteriológico, pois permite a diferenciação entre Cfv e Cff. A dificuldade no isolamento de Cfv é bastante reconhecida. Este microrganismo é frágil, de crescimento lento e requer condições microaerofílicas específicas para o crescimento e sobrevivência. A técnica de amostragem utilizada na colheita de amostras prepuciais foi a raspagem da mucosa do prepúcio e do pénis com um raspador próprio que é um método eficaz e permite a recolha de amostras com uma menor contaminação com outras técnicas (Tedesco *et al.*, 1977).

Como *C. fetus* é um microrganismo muito sensível e de difícil isolamento, ao invés das amostras serem transportadas em PBS, recorreu-se à utilização de um meio de transporte. A utilização de um meio de transporte diminui a possibilidade de resultados falso-negativos, pois permite a sobrevivência da bactéria durante mais tempo (Schmidt, 2009). Para este estudo foi escolhido o meio de transporte e enriquecimento de Weybridge devido à sua facilidade de preparação e ao seu bom desempenho. Num estudo de Hum e McInnes (1987), é referido que

o meio de Weybridge é preferível ao meio de Clark para o isolamento de *C. fetus*. Segundo os estudos de Hum e outros (1994) e Monke e colaboradores (2002), o meio de Weybridge é preferível em relação a outros meios de transporte, tais como o meio de Clark, o meio de Cary Blair, o meio SBL modificado e a solução salina a 0,85%. O Meio de Weybridge, para além de assegurar a viabilidade de Cfv durante o transporte, restringe ainda o crescimento de microrganismos comensais e contaminantes.

Para o cultivo das amostras foi escolhido o meio seletivo agar de Skirrow modificado. Existem diversos meios seletivos para a recuperação de *C. fetus* a partir de amostras, que recorrem a diferentes combinações de antibióticos de forma a impedir o crescimento de outras bactérias para além de *C. fetus*. Num estudo de Monke e colaboradores (2002) comparou-se a recuperação de Cfv através de três meios diferentes, agar de Skirrow modificado, meio Greenbriar Plus e agar sangue. Conclui-se que Cfv crescia igualmente bem nos três meios, mas o agar de Skirrow modificado era o mais eficaz na redução do crescimento de bactérias contaminantes presentes nas amostras. Segundo Hum e colaboradores (2009), o meio seletivo mais utilizado no isolamento de *C. fetus* é o agar de Skirrow modificado.

Contudo, um dos antimicrobianos frequentemente incorporados nos meios seletivos para *Campylobacter* é a polimixina B. Jones e colaboradores (1985, referido por: Schmidt, 2009) e Hum e outros (1994) relatam que foram encontradas estirpes de Cfv sensíveis à polimixina B. Assim, há a possibilidade de se ter falhado no isolamento de Cfv em alguns casos devido a este problema, pelo que é importante a pesquisa de alternativas à polimixina B.

Um dos problemas registados no isolamento bacteriológico foi o crescimento de bactérias contaminantes, mesmo com a utilização de meios seletivos. O crescimento de bactérias contaminantes durante o isolamento de *C. fetus* a partir de amostras prepuciais é um problema bastante comum, e o seu controlo muito importante, estando diretamente relacionado com a capacidade de isolamento de *C. fetus*. Os géneros *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. são os que mais frequentemente são detetados nas culturas de material prepucial, devido à sua ubiquidade, crescimento rápido em relação ao *C. fetus* e resistência a alguns antibióticos (Lander, 1990). Num estudo de Bettero e outros (2009) em 35,4% das amostras examinadas foi isolado *Pseudomonas aeruginosa*, e em 12,5% *Klebsiella* spp. Também no trabalho de Schmidt (2009) se registaram graves problemas com o crescimento de *Pseudomonas*.

No presente estudo, em dez das vinte e duas amostras (45,45%) observou-se um crescimento homogéneo de cor verde que cobria por completo a placa de agar de Skirrow modificado, impedindo assim a recuperação de outras bactérias que lá pudessem estar presentes. De modo a identificar qual a bactéria presente, quatro destas amostras foram analisadas por repicagem para os meios agar McConkey e Kligler e realização do API 20E, revelando tratarem-se de *Pseudomonas* spp. Como já foi referido, a contaminação com *Pseudomonas* impediu a recuperação de *C. fetus* mesmo com a utilização de meios seletivos, pelo que, em estudos seguintes, se sugere a aplicação de uma filtração antes da inoculação em agar de Skirrow modificado, com o objetivo de reduzir a presença de bactérias

contaminantes. A filtração de amostras através de filtros de membrana de 0,65 µm de porosidade é frequentemente utilizada (Irons e outros 2004), mas o valor desta técnica é questionável, pois os filtros poderão reter um número significativo de *Campylobacter*, para além das bactérias comensais e contaminantes, originando resultados potencialmente falso-negativos (Hum *et al.*, 1994).

O método de eleição para a diferenciação entre subespécies é o crescimento num meio com 1% de glicina. Segundo a OIE (Wagenaar & van Bergen, 2012), as estirpes que toleram o crescimento num meio com 1% de glicina são classificadas como Cff, enquanto as que não conseguem crescer neste meio são classificadas como Cfv. Visto que as três estirpes isoladas neste trabalho cresceram no meio de 1% de glicina, foram identificadas como Cff.

Todavia, a biovar Cfvi consegue crescer num meio com 1% de glicina, o que dificulta a sua classificação. Assim, Salama e outros (1992) sugerem que o crescimento deverá ser testado em quatro concentrações de glicina diferentes, 0,6, 1,0, 1,3 e 1,9%; em que as estirpes que só crescerem a uma concentração inferior a 1% são Cfv, as que conseguem crescer até 1% de glicina são Cfvi e as que conseguem crescer nas concentrações mais altas serão Cff (Salama *et al.*, 1992). Porém este é um método que não vem referenciado em mais artigos, nem no Manual da OIE (Wagenaar & van Bergen, 2012), pelo que serão necessários mais estudos sobre este método de diferenciação. Num estudo recente, verificou-se que a utilização de agar Mueller-Hinton nos testes de sensibilidade à glicina era o principal fator para a identificação errada das estirpes, devendo ser substituído por agar sangue (McGoldrick *et al.*, 2013).

Em relação a outras técnicas de diferenciação de Cff e Cfv, em alguns casos os resultados são contraditórios, pelo que estes métodos devem ser considerados apenas indicativos (Schulze *et al.*, 2006). A falta de reprodutibilidade é uma complicação adicional nos métodos de identificação de Cfv, devido à grande variação na execução dos testes fenotípicos, de laboratório para laboratório (van Bergen *et al.*, 2005a), o que aumenta o risco potencial de erro de identificação.

As estirpes isoladas foram também submetidas a IFD. Porém, a visualização das bactérias era difícil, encontrando-se estas pouco marcadas com fluoresceína. Segundo o Dr. Alfredo Martínez (*Laboratorio Azul*, Argentina), este fenómeno deve-se às sucessivas repicagens do agente, o que leva que este perca a cápsula, impossibilitando a reação antígeno-anticorpo e, conseqüentemente, resulte na falha da imunofluorescência.

Como já foi referido, das 22 amostras recolhidas para isolamento bacteriológico e IFD, não foi possível analisar por IFD uma amostra. Assim, apesar de se terem isolado três estirpes, apenas duas tinham correspondência com a análise por IFD. Quando as técnicas de IFD e isolamento bacteriológico foram comparadas, foi observada uma maior sensibilidade na IFD em relação ao isolamento bacteriológico. O isolamento bacteriológico apenas identificou como positivas duas das doze amostras positivas no diagnóstico por IFD, apresentando as restantes um resultado negativo. Por análise estatística foi determinado o valor de kappa, que foi de

0,128, o que representa uma concordância ligeira entre os métodos de diagnóstico, o que ocorreu porque o isolamento demonstrou uma sensibilidade reduzida para o diagnóstico de *C. fetus*.

Visto que não é possível realizar o diagnóstico clínico da CGB, pois várias doenças do trato genital de bovinos podem produzir sinais clínicos semelhantes (Lage & Leite, 2000) a confirmação laboratorial é imprescindível. O isolamento de *C. fetus* é considerado o *gold standard* para o diagnóstico de CGB, mas o baixo número de microrganismos por amostra, a sua fraca resistência e as inúmeras bactérias contaminantes podem prejudicar os resultados deste meio de diagnóstico. Por sua vez, a IFD é um método rápido e fácil de realizar, a presença de contaminantes não é um problema relevante, mas não permite a distinção entre as duas subespécies. Para além disso, as condições de colheita e tempo de transporte não precisam ser tão rígidas quanto às exigidas para o isolamento (Figueiredo *et al.*, 2002; Pellegrin, 2002). O resultado da IFD pode ser emitido pelo laboratório em apenas doze horas (Leite, 1977; Fernandes, 2009), enquanto o resultado do isolamento bacteriano apenas será proferido ao fim de pelo menos dez dias (Groff, 2010).

A técnica de IFD apresentada neste estudo não consegue discriminar entre Cff e Cfv, no entanto, a elevada sensibilidade e o baixo custo desta técnica, em comparação com o isolamento bacteriológico, pode ser muito útil em estudos epidemiológicos.

7. Conclusão

Os resultados deste estudo evidenciaram a presença da infecção por *C. fetus* em touros na região do Alentejo, sendo a prevalência estimada de CGB nesta região de 52,89% (43,9 a 61,7%, com um intervalo de confiança de 95%), sem contar com os animais suspeitos, visto que o diagnóstico destes não foi confirmado. Quanto à prevalência nas explorações testadas, esta foi bastante elevada, com um valor de 80,00%. Por sua vez, o isolamento bacteriológico foi difícil de executar e a sua correlação com o diagnóstico por IFD foi bastante baixa, sendo o valor de kappa de 0,128. No isolamento bacteriológico a presença de contaminantes foi um problema evidente, conduzindo possivelmente a alguns resultados falso-negativos.

Assim, recomenda-se a inclusão da pesquisa de CGB na rotina de diagnóstico laboratorial e na lista de prováveis doenças que causem baixos índices reprodutivos em explorações da região.

Os resultados apresentados expõem a necessidade do desenvolvimento de pesquisas nesta área para que sejam geradas informações atuais sobre as condições das explorações alentejanas frente à CGB e a sua possível influência na produtividade e rentabilidade da bovinicultura, para que possibilitem o desenvolvimento e a aplicação de medidas preventivas e de controlo da CGB.

O papel do Médico Veterinário nesta doença é fazer um correto diagnóstico, e adotar medidas de profilaxia e controlo sanitário, de modo a aumentar os lucros da exploração da pecuária.

Bibliografia

- 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. *Clinical Microbiology and Infection*, **13**: 993–1000.
- Akhtar, S., Riemann, H.P., Thurmond, M.C., & Franti, C.E. (1993). The association between antibody titres against *Campylobacter fetus* and milk production efficiency in dairy cattle. *Veterinary Research Communications*, **17**: 183–191.
- Alves, T.M. (2006). Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, pp 34.
- Alves, T.M. (2010). Participação dos receptores semelhantes ao Toll na indução de expressão de mRNA para CXCL8 (IL-8) na infecção in vitro de células epiteliais por *Campylobacter fetus* subs. *venerealis* e *Trichomonas foetus*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, pp 61.
- Alves, T.M., Stynen, A.P.R., Miranda, K.L., & Lage, A.P. (2011). Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **31**: 336–344.
- Andreotti, P.E., Ludwig, G.V., Peruski, A.H., Tuite, J.J., Morse, S.S., & Peruski, L.F. (2003). Immunoassay of infectious agents. *BioTechniques*, **35**: 850–861.
- Andrews, P.J., & Frank, F.W. (1974). Comparison of four diagnostic tests for detection of bovine genital vibriosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **165**: 695–697.
- Aoki, V., Sousa Jr, J.X., Fukumori, L.M., Périgo, A.M., Freitas, E.L., & Oliveira, Z.N. (2010). Direct and indirect immunofluorescence. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **85**: 490–500.
- Ball, L., Dargatz, D.A., Cheney, J.M., & Mortimer, R.G. (1987). Control of venereal disease in infected herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **3**: 561–574.
- Bawa, E.K., Adekeye, J.O., Oyedipe, E.O., & Omoh, J.U. (1991). Prevalence of bovine campylobacteriosis in indigenous cattle of three states in Nigeria. *Tropical Animal Health and Production*, **23**: 157–160.
- Bettero, L.B., Ton, N.C., Acapovi, G., & Beltrame, M.A.V. (2009). Pesquisa de *Campylobacter fetus* em prepúcio de touros, em uma propriedade rural do Espírito Santo, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, **1**: 486–490.

- Bhavsar, S.P., & Kapadnis, B.P. (2007). Virulence factors of *Campylobacter*. doi: 10.5580/62b
- Bielanski, A., Sampath, M., Gradil, C., Eaglesome, M.D., & Garcia, M. (1994). In vitro Fertilization of Bovine Ova in the Presence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Reproduction in Domestic Animals*, **29**: 488–493.
- Bier, P.J., Hall, C.E., Duncan, J.R., & Winter, A.J. (1977). Experimental infections with *Campylobacter fetus* in bulls of different ages. *Veterinary Microbiology*, **2**: 13–27.
- Blaser, M.J., Wang, E., Tummuru, M.K., Washburn, R., Fujimoto, S., & Labigne, A. (1994). High-frequency S-layer protein variation in *Campylobacter fetus* revealed by sapA mutagenesis. *Molecular Microbiology*, **14**: 453–462.
- BonDurant, R.H. (2005). Venereal Diseases of Cattle: Natural History, Diagnosis, and the Role of Vaccines in their Control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **21**: 383–408.
- Bouters, R., De Keyser, J., Vandeplassche, M., Van Aert, A., Brone, E., & Bonte, P. (1973). *Vibrio fetus* infection in bulls: curative and preventive vaccination. *British Veterinary Journal*, **129**: 52–57.
- Brooks, B., Robertson, R., Lutze-Wallace, C., & Pfahler, W. (2002). Monoclonal antibodies specific for *Campylobacter fetus* lipopolysaccharides. *Veterinary Microbiology*, **87**: 37–49.
- Brooks, B.W., Devenish, J., Lutze-Wallace, C.L., Milnes, D., Robertson, R.H., & Berlie-Surujballi, G. (2004). Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Veterinary Microbiology*, **103**: 77–84.
- Campero, C.M., Anderson, M.L., Walker, R.L., Blanchard, P.C., Barbano, L., Chiu, P., Martínez, A., Combessies, G., Bardon, J.C., & Cordeviola, J. (2005). Immunohistochemical Identification of *Campylobacter fetus* in Natural Cases of Bovine and Ovine Abortions. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **52**: 138–141.
- Campero, C.M., Moore, D.P., & Odeón, A.C. (2003). Aetiology of Bovine Abortion in Argentina. *Veterinary Research Communications*, **27**: 3359–3369.
- Campero, C.M., Morrell, E., Morsella, C., Paolicchi, F., Cano, D., & Lazaro, L. (2010). *Campylobacteriosis* en toros. *Revista Veterinaria*, **21**: 8–12,
- Catena, M., Teruel, M., Morán, P., Chiapparrone, M., Echevarría, H., Monteavaro, C., & Soto, P. (2008). Evaluación del desarrollo preimplantacional de embriones murinos in vitro en presencia de *Campylobacter fetus venerealis*. *Revista Veterinaria, Argentina*, **19**: 109–113.

- Cattaneo, M. (2004). *Campylobacter*: Identificación del antígeno de superficie K. Santa Elena Laboratorios. Acedido a 14 de Agosto de 2013, em http://www.santaelena.com.uy/uc_49_1.html
- Chaban, B., Chu, S., Hendrick, S., Waldner, C., & Hill, J.E. (2012). Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **76**: 166.
- Chang, W., & Ogg, J.E. (1971). Transduction and mutation to glycine tolerance in vibrio *fetus*. *American Journal of Veterinary Research*, **32**: 649–653.
- Claessens, S. F. A. (2010). Prevalence of *Tritrichomonosis* in bulls in a communal farming system in Mpumalanga Province, RSA: A pilot study. Tese de Douturamento, Universiteit Utrecht, Holanda, pp. 38.
- Clark, B.L. (1971). Review of bovine vibriosis. *Australian Veterinary Journal*, **47**: 103–107.
- Clark, B.L., Dufty, J.H., & Monsborough, M.J. (1968). Vaccination of Bulls Against Bovine Vibriosis. *Australian Veterinary Journal*, **44**: 530–530.
- Clark, B.L., Dufty, J.H., Monsborough, M.J., & Parsonson, I.M. (1977). A dual vaccine for the immunisation of cattle against vibriosis. *Australian Veterinary Journal*, **53**: 465–466.
- Cobo, E.R., Cipolla, A., Morsella, C., Cano, D., & Campero, C. (2003). Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **50**: 75–80.
- Cobo, E.R., Corbeil, L.B., & BonDurant, R.H. (2011). Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. *Journal of Reproductive Immunology*, **89**: 55–61.
- Cobo, E.R., Morsella, C., Cano, D., Cipolla, A., & Campero, C.M. (2004). Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. *Theriogenology*, **62**: 1367–1382.
- Corbeil, L.B. (1999). Immunization and diagnosis in bovine reproductive tract infections. In *Advances in Veterinary Medicine* ed. Schultz, R.D., Academic Press, EUA. ISBN: 978-0-12-039242-1, pp. 217–239.
- Corbeil, L.B., & BonDurant, R.H. (2001). Immunity to bovine reproductive infections. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **17**: 567–583.
- Corbeil, L.B., Campero, C.M., Rhyan, J.C., & BonDurant, R.H. (2003). Vaccines against sexually transmitted diseases. doi:10.1186/1477-7827-1-118

- Corbeil, L.B., Corbeil, R.R., & Winter, A.J. (1975). Bovine venereal vibriosis: activity of inflammatory cells in protective immunity. *American Journal of Veterinary Research*, **36**: 403–406.
- Corbeil, L.B., Schurig, G.D., Duncan, J.R., Corbeil, R.R., & Winter, A.J. (1974). Immunoglobulin classes and biological functions of *Campylobacter (Vibrio) fetus* antibodies in serum and cervicovaginal mucus. *Infection and Immunity*, **10**: 422–429.
- Corbeil, L.B., Schurig, G.G., Duncan, J.R., Wilkie, B.N., & Winter, A.J. (1981). Immunity in the female bovine reproductive tract based on the response to *Campylobacter fetus*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **137**: 729–743.
- De la Maza, L.M., Pezzlo, M.T., & Baron, E.J. (1999). Atlas de diagnóstico em microbiologia. Artmed, Porto Alegre, Brasil. ISBN: 9780815106210, pp. 216.
- Dekeyser, J. (1984). Bovine genital Campylobacteriosis. In: *Campylobacter Infection in Man and Animals* ed. Butzler, J.P., CRC Press, Boca, EUA, pp. 181–191.
- 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*. *Clinical and Vaccine Immunology*, **12**: 1261–1268.
- Drost, M., & Thomas, P.G.. (1996). Diseases of the reproductive system; female reproductive disorders. In: *Large Animal Internal Medicine* ed. Smith, B.P., Mosby Incorporated, Missouri, EUA. ISBN: 9780323009461, pp. 1519–1544.
- Duffy, J., & Vaughan, J. (1993). Bovine Venereal Campylobacteriosis. In: *Current Veterinary Therapy 3: Food Animal Practice* ed. Howard, J.L., W.B. Saunders Filadélfia, EUA. ISBN: 9780721636337.
- Duffy, J.H. (1967). Diagnosis of vibriosis in the bull. *Australian Veterinary Journal*, **43**: 433–437.
- Dunn, B.E., Blaser, M.J., & Snyder, E.L. (1987). Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter* outer membrane proteins. *Infection and Immunity*, **55**: 1564–1572.
- Eaglesome, M.D., & Garcia, M.M. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Bulletin*, **62**: 743-775.
- Eaglesome, M.D., & Garcia, M.M. (1997). Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Revue Scientifique et Technique*, **16**: 215–225.
- Edmonds, P., Patton, C.M., Barrett, T.J., Morris, G.K., Steigerwalt, A.G., & Brenner, D.J. (1985). Biochemical and genetic characteristics of atypical *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*

- strains isolated from humans in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, **21**: 936–940.
- Encyclopedia of Life. (2013). *Campylobacter fetus*. Encyclopedia of Life. Acedido a 14 de Agosto de 2013, em <http://eol.org/pages/6376224/overview>
- Fernandes, M.R. (2009). Campilobacteriose Genital Bovina. Instituto de Pós-graduação Qualittas.
- Figueiredo, J.F. (2001). Avaliação da imunofluorescência direta no diagnóstico da campilobacteriose genital bovina. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, pp. 27.
- Figueiredo, J.F., Pellegrin, A.O., Fóscolo, C.B., Machado, R.P., Miranda, K.L., & Lage, A.P. (2002). Evaluation of direct fluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital Campylobacteriosis. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, **44**: 118–123.
- Finlay, R.C., Ruckerbauer, G.M., & Stovell, P.L. (1985). *Campylobacter fetus* in artificial insemination unit and slaughterhouse bulls in Ontario. *Canadian journal of comparative medicine*, **49**: 231–232.
- Fivaz, B.H., Swanepoel, R., McKenzie, R.L., & Wilson, A. (1978). Passive transmission of *Campylobacter fetus* by immunised bulls. *Australian Veterinary Journal*, **54**: 531–533.
- Florent, A. (1959). Les deux vibrioses génitales: la vibriose due à *V. fetus venerialis*, et la vibriose d'origine intestinale due à *V. fetus intestinalis*. Institut National de recherches vétérinaires, Bélgica, pp. 60.
- Fóscolo, C.B., Pellegrin, A.O., Leite, R.C., Stynen, A.P.R., & Lage, A.P. (2005). Vaccination of bulls against Bovine Genital Campylobacteriosis: a therapeutic approach. *Animal Reproduction Science*, **2**: 122–127.
- Fraser, G.M., Bergeron, J.A., Mays, A., & Aiello (1996). Manual Merck de veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. Roca, ISBN: 9788572411851, pp. 2169.
- Fujita, M., Morooka, T., Fujimoto, S., Moriya, T., & Amako, K. (1995). Southern blotting analyses of strains of *Campylobacter fetus* using the conserved region of *sapA*. *Archives of Microbiology*, **164**: 444–447.
- Garcia, M.M., & Brooks, B.W. (1993). *Campylobacter*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Iowa State University Press, Ames, EUA, ISBN 0-8138-1343-3, pp. 262–272.
- 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. *venerialis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of *sapA* homologs. *Journal of Bacteriology*, **177**: 1976–1980.

- Garcia, M.M., Ruckerbauer, G.M., Eaglesome, M.D., & Boisclair, W.E. (1983). Detection of *Campylobacter fetus* in artificial insemination bulls with a transport enrichment medium. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **47**: 336.
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., & Staley, J.T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, EUA, ISBN 978-0-387-29298-4, pp. 1388.
- GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, National Center for Biotechnology Information
- George, H.A., Hoffman, P.S., Smibert, R.M., & Krieg, N.R. (1978). Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **8**: 36–41.
- Givens, M.D. (2006). A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*, **66**: 648–654.
- Gomes, M.J.P. (2012). Gênero *Campylobacter* spp., Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Goodger, W.J., & Skirrow, S.Z. (1986). Epidemiologic and economic analyses of an unusually long epizootic of trichomoniasis in a large California dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **189**: 772–776.
- Groff, A.C., Kirinus, J.K., Machado, G., Costa, M.M., Vargas, A.P., & Sá e Silva, M. (2010). Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **30**: 1031–1035.
- Groff, A.C.M. (2005). PCR para o diagnóstico da Campilobacteriose genital bovina. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, pp. 39.
- Guerrant, R.L., Lahita, R.G., Winn, W.C., Jr, & Roberts, R.B. (1978). Campylobacteriosis in man: pathogenic mechanisms and review of 91 bloodstream infections. *The American Journal of Medicine*, **65**: 584–592.
- Guerry, P. (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology*, **15**: 456–461.
- Hercheler, R.C. (1963). The diagnosis of *Vibrio fetus* in the bovine. Tese de Doutorado, University of Menesota, EUA.
- Hewson, P.I., Lander, K.P., & Gill, K.P. (1985). Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Campylobacter fetus* in bovine vaginal mucus. *Research in Veterinary Science*, **38**: 41–45.
- Hoffer, M.A. (1981). Bovine campylobacteriosis: a review. *The Canadian Veterinary Journal*, **22**: 327–330 .
- Hughes, D.E. (1953). A study of the diagnosis of bovine vibriosis with special reference to the detection of agglutinins in the vaginal secretions. *Cornell veterinarian*, **43**: 431–444.

- Hum, S. (2007). Vibriosis of cattle, NSW DPI, Prime fact 451.
- Hum, S., & McInnes, A. (1987). Bovine Campylobacteriosis: Bacteriology and Antibody Detection. *Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases*, **22**.
- Hum, S., Brunner, J., & Gardiner, B. (1993). Failure of therapeutic vaccination of a bull infected with *Campylobacter fetus*. *Australian Veterinary Journal*, *70*, 386–387.
- Hum, S., Hornitzky, M., & Berg, T. (2009). Bovine Genital Campylobacteriosis. Australia and New Zealand Standard Diagnosis Procedures.
- Hum, S., Quinn, C., & Kennedy, D. (1994). Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. *Australian Veterinary Journal*, *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. *Australian Veterinary Journal*, *75*: 827–831.
- Hum, S., Stephens, L.R., & Quinn, C. (1991). Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Australian Veterinary Journal*, *68*: 272–275.
- Iraola, G., Hernández, M., Calleros, L., Paolicchi, F., Silveyra, S., Velilla, A., Carretto, L., Rodríguez, E., & Pérez, R. (2012). Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *Journal of Veterinary Science*, *13*: 371.
- Irons, P.C., van Der Walt, M.L., & Bishop, G.C. (2004). Genital Campylobacteriosis in Cattle. *In: Infectious Diseases of Livestock* ed. Coetzer, J.A.W. & Tustin, R.C., Oxford University Press Southern Africa, África do Sul, ISBN 978-0195782028, pp. 1459–1468.
- Jepsen, A., & Vindekilde, T. (1951). The occurrence and significance of agglutinins in the genital organs of Brucella-infected cows. *American Journal of Veterinary Research*, *12*: 97–99.
- Jesus, V.L.T. de, Trés, J.E., Jacob, J.C.F., Latorre, L.B.L.M., & Santos Júnior, J. de C.B. (1999). Campilobacteriose genital bovina: ocorrência nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, *6*: 133–136.
- Jimenez, D.F., Perez, A.M., Carpenter, T.E., & Martinez, A. (2011). Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, *101*: 157–162.
- Johnson, W.M., & Lior, H. (1988). A new heatlabile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microbial Pathogenesis*, *4*: 115–126.
- Jones, R.L., Davis, M.A., & Vonbyern, H. (1985). Cultural procedures for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from preputial secretions and the occurrence of

- antibiotics resistance. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, **28**: 225–238.
- Junqueira, J.R., & Alfieri, A.A. (2006). Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina: Ciências Agrárias*, **27**: 289–298.
- Kalka-Moll, W.M., Van Bergen, M. a. P., Plum, G., Krönke, M., & Wagenaar, J.A. (2005). The need to differentiate *Campylobacter fetus* subspecies isolated from humans. *Clinical Microbiology and Infection*, **11**: 341–342.
- Kania, S.A., Reed, S.L., & Thomford, J.W. (2001). Degradation of bovine complement C3 by trichomonad extracellular proteinase. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **78**: 83–96.
- Kasari, T., & Gleason, D. (1996). Herd management practices that influence total beef calf production. Part I. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* **18**, 1358–1366.
- Kienesberger, S., Gorkiewicz, G., Wolinski, H., & Zechner, E.L. (2011). New molecular microbiology approaches in the study of *Campylobacter fetus*. *Microbial Biotechnology*, **4**: 8–19.
- Kiggins, E.M., & Plastringe, W.N. (1956). Effect of Gaseous Environment on Growth and Catalase Content of *Vibrio fetus* Cultures of Bovine Origin. *Journal of Bacteriology*, **72**: 397–400.
- King, E.O. (1957). Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *Journal of Infectious Diseases*, **101**: 119–128.
- Klastrup, N.O., & Halliwell, R.W. (1977). Infectious causes of infertility/abortion of cattle in Malawi. *Nordisk veterinaermedicin*, **29**: 325–330.
- Kwon, S.Y., Cho, D.H., Lee, S.Y., Lee, K., & Chong, Y. (1994). Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* isolated from blood and synovial fluid. *Yonsei Medical Journal*, **35**: 314–319.
- Laboratorio Azul. (2013). Raspadores plásticos descartables. Grupo Laboratorio azul. Acedido a 20 de Agosto de 2013, em <http://www.laboratorioazul.com.ar/Raspadores/Raspadores.aspx>
- Lage, A.P., & Leite, R.C. (2000). Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). *Revista Pecuária Corte*, **100**: 50–54.
- Lage, A.P., Pellegrin, A.O., Costa, G.M., Silva, N., Reinato, A.P., Gomes, L.I., Guimarães, P.H.S., & Leite, R.C. (1997). Campilobacteriose genital bovina: diagnostico na Escola de Veterinaria da UFMG de 1976 a 1996. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **21**: 164–166.

- Lander, K.P. (1990). The application of a transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. *British Veterinary Journal*, **146**: 334–340.
- Lander, K.P., & Gill, K.P. (1985). Campylobacters. In: *Isolation and Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance* ed. Collins, C.H. & Grange, J.M., Academic Press, Londres, Inglaterra, Orlando, EUA, ISBN 978-0121814601, pp. 123–142.
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, **33**: 159–174.
- Leal, D.R., Fernandes, G.O., Gouveia, F.F., Miranda, K.L., & Neves, J.P. (2012). Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal e em seu entorno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **36**: 256–259.
- Leite, R.C. (1977). Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, pp 48.
- Lima, T. (2010). ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). *Imunologia & Hematologia*. Acedido a 7 de Agosto de 2013, em <http://imunologiahematologia.wordpress.com/2010/01/26/elisa/>
- Madoroba, E., Gelaw, A., Hlokwé, T., & Mnisi, M. (2011). Prevalence of *Campylobacter foetus* and *Trichomonas foetus* among cattle from Southern Africa. *African Journal of Biotechnology*, **10**: 10311–10314.
- 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 practicable control measures. *Australian Veterinary Journal*, **65**: 153–156.
- McEwen, S.A., & Fedorka-Cray, P.J. (2002). Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clinical Infectious Diseases*, **34**: S93–S106.
- McFadden, A.M., Heuer, C., Jackson, R., West, D.M., & Parkinson, T.J. (2005). Investigation of bovine venereal campylobacteriosis in beef cow herds in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, **53**: 45–52.
- McFadyean, J., & Stockman, S. (1913). Report of the Departmental Committee appointed by the Great Britain Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. House of Commons Sessional Papers.
- McGoldrick, A., Chanter, J., Gale, S., Parr, J., Toszeghy, M., & Line, K. (2013). Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. *Journal of Microbiological Methods*, **94**: 199–204.

- McGowan, A.C., & Murray, R.D. (1999). Health Status of Bulls Used For Natural Breeding on Farms in South West Scotland. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **46**: 311–321.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 938–945.
- McPherson, M.J., & Møller, S.G. (2006) PCR, Taylor & Francis, Inglaterra, ISBN 9780203002674, pp. 305.
- Mellick, P.W., Winter, A.J., & Mcentee, K. (1965). Diagnosis of vibriosis in the bull by use of the fluorescent antibody technic. *Cornell veterinarian* **55**, 280–294.
- Miranda, K.L. (2005). Prevalência da infecção por *Campylobacter fetus* em bovinos de corte no Brasil - 2000. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, pp 36.
- Mishu, B., Patton, C.M., & Tauxe, R.V. (1992). Clinical and epidemiologic features of non-jejuni, non-coli *Campylobacter* species. In: *Campylobacter Jejuni: Current Status and Future Trends* ed. Nachamkin, I., Blaser, M.J. & Tompkins, L.S., American Society for Microbiology, Washington, EUA, ISBN 155581042X, pp. 31–41.
- Mohan, K., Pai, S., Rao, R., Sripathi, H., & Prabhu, S. (2008). Techniques of immunofluorescence and their significance. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, **74**: 415–419.
- Molina, L.L. (2012). Spatio-temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). Tese de Mestrado, Universidad de Córdoba, Argentina, pp 22.
- Monke, H.J., Love, B.C., Wittum, T.E., Monke, D.R., & Byrum, B.A. (2002). Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **14**: 35–39.
- Moolhuijzen, P.M., Lew-Tabor, A.E., Wlodek, B.M., Agüero, F.G., Comerci, D.J., Ugalde, R.A., Sanchez, D.O., Appels, R., & Bellgard, M. (2009). Genomic analysis of *Campylobacter fetus* subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets. *BMC Microbiology*, **9**: 86-96.
- Moynihan, I.W.M., & Stovell, P.L. (1955). Vibriosis in Cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **19**.
- 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. *Tropical Animal Health and Production*, **44**: 1487–1489.

- Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., & Silva, G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, **31**: 247–256.
- Newsam, I.D.B. (1960). Experimental *Vibrio fetus* infection in heifers. *Australian Veterinary Journal*, **43**: 426–432.
- Newsam, I.D.B., & Monsbourhg, M.J. (1967). Diagnosis of Bovine Vibriosis:: The Production and Use of Standard Suspensions of *Vibrio fetus* Agglutinating Antigen. *Australian Veterinary Journal*, **43**: 237–242.
- Ng, L.K., Sherburne, R., Taylor, D.E., & Stiles, M.E. (1985). Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, **164**: 338–343.
- Njiro, S.M., Kidanemariam, A.G., Tsotetsi, A.M., Katsande, T.C., Mnisi, M., Lubisi, B.A., Potts, A.D., Baloyi, F., Moyo, G., Mpofu, J., *et al.* (2011). A study of some infectious causes of reproductive disorders in cattle owned by resource-poor farmers in Gauteng Province, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, **82**: 213–218.
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, G.C.W., & Arthur, Dvs. (2001). Specific infectious diseases causing infertility in cattle. *In: Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, W.B. Saunders, ISBN 978-0-7020-2556-3, pp. 473–509.
- Norman, S.T., Parry, S., Ladds, P., & Brown, A. (2003). The Identification and Management of Reproductive Diseases of Bulls. *Journal Sain Veterinary*, **21**: 6-22.
- Nunes, P. L. A. (2005). Campilobacteriose Genital Bovina (Vibrose). Associação Brasileira de Limousin. Acedido a 7 de Agosto de 2013, em <http://www.limousin.com.br>.
- Odell, I.D., & Cook, D. (2013). Immunofluorescence Techniques. doi:10.1038/jid.2012.455
- OIE. (2012a). *Terrestrial code* (21^a ed., Vols. 1-2). Retirado de <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/>
- OIE. (2012b). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (7^a ed., Vols. 1-2). Retirado de <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/>
- OIE. (2013). Listed diseases, infections and infestations in force in 2013. *OIE-World Organisation for Animal Health*. Acedido a 13 de Agosto de 2013, em <http://www.oie.int/>
- OIE. (2013). Disease distribution maps - Bovine genital campylobacteriosis. *World Animal Health Information Database (WAHID) Interface*. Acedido a 15 de Agosto de 2013, em http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap
- Oliveira, T. M. S. (2010). PCR em tempo real: métodos e aplicações. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Portugal, pp. 111.

- On, S. I. w. (2001). Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology*, **90**: 1–15.
- On, S.L., & Harrington, C.S. (2001). Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. *Journal of Applied Microbiology*, **90**: 285–293.
- Oyarzabal, O.A., Wesley, I.V., Harmon, K.M., Schroeder-Tucker, L., Barbaree, J.M., Lauerman, L.H., Backert, S., & Conner, D.E. (1997). Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. *Veterinary Microbiology*, **58**: 61–71.
- Panaccio, M., Stephens, L., & Widders, P. (1993). Field evaluation of a PCR-based test for the diagnosis of Bovine Campylobacteriosis. *Dairy Research and Development Corporation*.
- 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. *Journal of the South African Veterinary Association*, **59**: 139–140.
- Pei, Z., & Blaser, M.J. (1990). Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Role of surface array proteins in virulence in a mouse model. *Journal of Clinical Investigation*, **85**: 1036–1043.
- Pellegrin, A.O. (2001). Campilobacteriose genital bovina na sub-região da Nhecolândia do Pantanal Sul-Mato-Grossense e proposição de novas técnicas de diagnóstico. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, pp.81.
- Pellegrin, A.O. (2002). A Campilobacteriose e Tricomonose são doenças reemergentes? Embrapa Pantanal, Brasil.
- Pellegrin, A.O., Figueiredo, J.F., Leite, R.C., & Lage, A.P. (2003a). Imunofluorescência Direta: Um Teste Sensível e Específico Para o Diagnóstico da Campilobacteriose Genital em Touros. Embrapa Pantanal, Brasil
- 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. *Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.*, **55**: 169–173.
- Pellegrin, A.O., Leite, R.C., Lage, A.P., & Ravaglia, E. (2003b). Coleta de Material Para Diagnóstico das Doenças Infeciosas Que Interferem Com a Reprodução de Bovinos. Embrapa Pantanal, Brasil.
- Penner, J.L. (1988). The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clinical Microbiology Reviews* **1**, 157–172.

- Peter, D.A. (1997). Bovine Venereal Diseases. In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, R.S. Yougquist, ed. (Filadélfia, EUA: W. B. Saunders), pp. 355–363.
- Philpott, M. (1968). Diagnosis of *Vibrio fetus* infection in the bull. I – A modification of Mellick's fluorescence antibody test. *Veterinary Record* **82**, 424–426.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Carter, M.E., & Donnelly, S. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Blackwell Science, Iowa, EUA, ISBN 9780632055258, pp. 536.
- Rae, D.O., & Crews, J.E. (2006). *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **22**: 595–611.
- Robinson, J.P., Sturgis, J., & Kumar, G.L. (2009). Immunofluorescence. In: *Immunohistochemical Staining Methods*, Dako, Califórnia, EUA, 61–65.
- Romero, J. (2008). Enfermedades Venereas de los Bovinos. Acedido a 12 de Dezembro de 2012, em <http://old.fcv.unlp.edu.ar/sitios-catedras/75/material/VENEREA2.pdf>
- Ruckerbauer, G.M., Malkin, K., Mitchell, D., & Boulanger, P. (1974). Vibriosis: Demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubulus* Organisms in Preputial Fluid by Immunofluorescence and Cultural Techniques. *Canadian journal of comparative medicine*, **38**: 321–327.
- Safford, J.W. (1969). Bovine vibriosis and regulatory veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **155**: 2178–2181.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487–491.
- Salama, S.M., Garcia, M.M., & Taylor, D.E. (1992). Differentiation of the subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**: 446–450.
- Samuelson, J., & Winter, A. (1966). Bovine vibriosis: the nature of the carrier state in the bull. *Journal of Infectious Diseases*, **116**: 581–592.
- Saunders. (2007). Immunofluorescence. *Medical Dictionary*. Acedido a 21 de Agosto de 2013, em <http://www.thefreedictionary.com>
- Schmidt, T. (2009). *Detection of Campylobacter fetus in bovine preputial scrapings using PCR and culture assays*. Tese de Mestrado, University of Pretoria, África do Sul, pp. 120.
- Schmidt, T., Venter, E.H., & Picard, J.A. (2010). Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. *Journal of the South African Veterinary Association*, **81**: 87–92.

- Schulze, F., Bagon, A., Muller, W., & Hotzel, H. (2006). Identification of *Campylobacter fetus* Subspecies by Phenotypic Differentiation and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 2019–2024.
- Schurig, G.G., Hall, C.E., Corbell, L.B., Duncan, J.R., & Winter, A.J. (1975). Bovine venereal vibriosis: cure of genital infection in females by systemic immunization. *Infection and Immunity*, **11**: 245–251.
- Sebald, M., & Véron, M. (1963). Base DNA Content and Classification of Vibrios. *Annales de l'Institut Pasteur*, **105**: 897–910.
- Shisong, C., Redwood, D.W., & Ellis, B. (1990). Control of *Campylobacter fetus* in artificially contaminated bovine semen by incubation with antibiotics before freezing. *British Veterinary Journal*, **146**: 68–74.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., & Sneath, P.H.S. (1980). Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **30**: 270–271.
- Skirrow, S., BonDurant, R., Farley, J., & Correa, J. (1985). Efficacy of ipronidazole against trichomoniasis in beef bulls. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **187**: 405–407.
- Smibert, R.M. (1974). Genus II. *Campylobacter* Sebald and Veron 1963. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* ed. Buchanan, R.E. & Gibbons, R., Williams & Wilkins Co., Baltimore, EUA, ISBN 978-0683011173, pp. 207–212.
- Smibert, R.M. (1978). The genus *Campylobacter*. *Annual Review of Microbiology*, **32**: 673–709.
- Smith, T., & Taylor, M.S. (1919). Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes of cattle. *The Journal of Experimental Medicine*, **30**: 299–311.
- Stoessel, F. (1982). Las Enfermedades venéreas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital, Acribia, Espanha, ISBN 978-84-200-0490-7, pp.164.
- Stynen, A.P.R., Lage, A.P., Moore, R.J., Rezende, A.M., de Resende, V.D. d. S., Ruy, P. d. C., Daher, N., Resende, D. d. M., de Almeida, S.S., Soares, S. d. C. (2011). Complete Genome Sequence of Type Strain *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354T. *Journal of Bacteriology*, **193**: 5871–5872.
- Stynen, A.P.R., Pellegrin, A.O., Fóscolo, C.B., Figueiredo, J.F., Canella Filho, C., Leite, R.C., & Lage, A.P. (2003). Bovine genital campylobacteriosis in dairy herds with reproductive problems of the microregion of Varginha, MG, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **55**: 766–769.
- Swai, E.S., Hulsebosch, J., & Van der Heijden, W. (2005). Prevalence of genital campylobacteriosis and trichomonosis in crossbred breeding bulls kept on zero-grazed

- smallholder dairy farms in the Tanga region of Tanzania. *Journal of the South African Veterinary Association*, **76**: 224–227.
- Tedesco, L.F., Errico, F., & Del Baglivi, L.P. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Australian Veterinary Journal*, **53**: 470–472.
- Thompson, A.S., & Blaser, M.J. (2000). Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. In: *Campylobacter* ed. Nachamkin, I. & Blaser, M.J., ASM Press, Washington, EUA, ISBN 9781555811655, pp. 321–347.
- Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., & Barlough, J.E. (1988). The genus *Campylobacter*. In: *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals: With Reference to Etiology, Epizootiology, Pathogenesis, Immunity, Diagnosis, and Antimicrobial Susceptibility* ed. Hagan, W.A. , Bruner, D.W. & Timoney, J.F., Cornell University Press, Ithaca, EUA, ISBN 0801418968, pp. 153–160.
- Travers, K., & Barza, M. (2002). Morbidity of Infections Caused by Antimicrobial-Resistant Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, **34**: 131–134.
- Tu, Z.-C., Gaudreau, C., & Blaser, M.J. (2005). Mechanisms underlying *Campylobacter fetus* pathogenesis in humans: surface-layer protein variation in relapsing infections. *Journal of Infectious Diseases*, **191**: 2082–2089.
- Van Bergen, M.A.P. (2005). Subspecies differentiation and typing of *Campylobacter fetus*. Tese de Doutorado, University of Utrecht, Holanda.
- Van Bergen, M.A.P., Dingle, K.E., Maiden, M.C.J., Newell, D.G., van der Graaf-Van Bloois, L., van Putten, J.P.M., & Wagenaar, J.A. (2005c). Clonal Nature of *Campylobacter fetus* as Defined by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 5888–5898.
- 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*. *Revue Scientifique et Technique*, **24**: 1017–1026.
- Van Bergen, M.A.P., Simons, G., Bloois, L.G., Putten, J.P.M.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. *Journal of Medical Microbiology*, **54**: 1217–1224.
- Vargas, A.C., Costa, M.M., Groff, A., Viana, L.R., Krewer, C.C., Spricigo, D.A., & Kirinus, J.K. (2005). Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* isolated from cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **25**: 1–3.

- Vasquez, L.A., Ball, L., Bennett, B.W., Rupp, G.P., Ellis, R., Olson, J.D., & Huffman, M.H. (1983). Bovine genital campylobacteriosis (vibriosis): vaccination of experimentally infected bulls. *American Journal of Veterinary Research*, **44**: 1553–1557.
- Véron, M., & Chatelain, R. (1973). Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **23**: 122–134.
- Wagenaar, J.A., & van Bergen, M.A.P. (2012). Bovine genital campylobacteriosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* ed. Office international des épizooties, ISBN 978-92-9044-718-4, 661-670.
- Wagenaar, J.A., van Bergen, M.A.P., Newell, D.G., Grogono-Thomas, R., & Duim, B. (2001). Comparative Study Using Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting, PCR Genotyping, and Phenotyping To Differentiate *Campylobacter fetus* Strains Isolated from Animals. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 2283–2286.
- Wagner, W.C., Dunn, H.O., & Vanvleck, L.D. (1965). Incidence of Vibriosis in an AI Stud. *Cornell veterinarian.*, **55**: 209–220.
- 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*. *Journal of Bacteriology*, **175**: 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*. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 4744–4747.
- Ware, D.A. (1980). Pathogenicity of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in causing infertility in cattle. *British Veterinary Journal*, **136**: 301–303.
- Wilkie, B.N., Duncan, J.R., & Winter, A.J. (1972). The origin, class and specificity of immunoglobulins in bovine cervico-vaginal mucus: variation with parenteral immunization and local infection with *Vibrio fetus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, **31**: 359–365.
- Willoughby, K., Nettleton, P. f., Quirie, M., Maley, M. a., Foster, G., Toszeghy, M., & Newell, D. (2005). A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* -species *venerealis*: use on UK isolates of *C.fetus* and other *Campylobacter* spp. *Journal of Applied Microbiology*, **99**: 758–766.

- Winter, A.J. (1982). Microbial immunity in the reproductive tract. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **181**: 1069–1073.
- Winter, A.J., Samuelson, J.D., & Elkana, M. (1967). A comparison of immunofluorescence and cultural techniques for demonstration of *Vibrio fetus*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **150**: 498–502.
- Yaeger, M.J., & Holler (2007). Bacterial Causes of Bovine Infertility and Abortion. *In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology* ed. Youngquist, R.S. & Threlfall, W.R. Saunders Elsevier, Missouri, EUA, ISBN 9780721693231, pp. 389–399.
- Yamazaki, W., Taguchi, M., & Misawa, N. (2010). Development of a loop-mediated isothermal amplification and PCR assays for rapid and simple detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00233.x.
- Zan Bar, T., Yehuda, R., Hacham, T., Krupnik, S., & Bartoov, B. (2008). Influence of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on ram sperm cell quality. *Journal of Medical Microbiology*, **57**: 1405–1410.

Anexo

Solução-mãe tampão fosfato (*phosphate buffer saline* – PBS) (10x)

Para a preparação da solução-mãe tampão fosfato, pesaram-se as quantidades referidas na Tabela I, para um volume total de 1 L.. Os reagentes pesados foram colocados num copo de precipitação, adicionaram-se 800 mL de água e agitou-se sobre um agitador magnético. Uma vez dissolvidos os reagentes, completaram-se os 1000 mL com água destilada e esterilizou-se a solução na autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Esta solução foi conservada a 4 °C.

Tabela I Reagentes para a solução-mãe de PBS (10x)

Reagente		Volume final = 1000 mL
Cloreto de sódio	NaCl	81,70 g
Fosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	26,50 g
	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	13,89 g
	Na ₂ HPO ₄	10,51 g
Fosfato monossódico	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	4,07 g
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3,60 g
	NaH ₂ PO ₄	3,12 g
Água destilada	H ₂ O	1000 ml

Solução PBS pH 7,2 (1x)

Para a preparação de PBS pH 7,2 (1x), mediram-se 900 mL de água destilada e esterilizada e adicionaram-se 100 mL de solução-mãe de PBS (10x). Após medido o pH, que foi de 7,2 ($\pm 0,1$), guardou-se a 4 °C e ao abrigo da luz, num frasco de cor âmbar.

Solução PBS fenolada (0,5%)

Para a elaboração da solução PBS fenolada, em primeiro lugar, preparou-se uma solução de fenol a 50%. Para a preparação desta solução, utilizando luvas, pesaram-se 5g de

fenol (C₆H₆O) em cristais e adicionou-se 10 mL de água destilada e esterilizada. Depois, mediram-se 890 mL de água destilada e esterilizada e adicionaram 100 mL de solução-mãe de PBS (10x), e 10 mL de solução de fenol a 50%. Após a medição do pH, que foi de 7,2 (±0,1), distribuiu-se a solução por tubos *falcon* esterilizados de 15 mL, ficando 8,5 mL por tubo.

Colheita de sangue

A preparação de alguns meios de cultura requer a adição de sangue desfibrinado. Por isso antes destes serem preparados, realizou-se uma colheita de sangue.

Para a colheita de sangue desfibrinado, é necessário adicionar 10% de anticoagulante ao sangue. Por isso, em primeiro lugar, colocou-se 25 mL de anticoagulante num frasco esterilizado de 250 mL.

Selecionou-se uma ovelha tendo em conta que deveria apresentar uma boa condição corporal e estar em bom estado de saúde. O animal foi então contido e na zona da jugular realizou-se a tricotomia e a assepsia com uma solução de iodopovidona e seguidamente com álcool 70°. Enquanto se fazia o garrote da zona, o cateter foi introduzido na jugular e o sangue foi recolhido para o frasco anteriormente preparado com anticoagulante. Há que ter em conta que as condições de assepsia são muito importantes para a correta recolha de sangue.

De modo a verificar se o sangue recolhido não se encontrava contaminado, este foi inoculado em agar sangue, e a placa foi incubada durante 24 horas a 37°C. O sangue estava apto a ser utilizado, caso não se observa-se o crescimento de nenhuma colónia na placa inoculada.

Meio de enriquecimento de transporte Weybridge

O meio escolhido para o transporte de *C. fetus* foi o meio de enriquecimento de transporte Weybridge. Na composição original deste meio era utilizado cicloheximida (Lander, 1990), contudo devido à sua potencial toxicidade, este agente antifúngico foi substituído por anfotericina B (Wagenaar & van Bergen, 2012).

Para a elaboração deste meio prepararam-se 500 mL de caldo Mueller-Hinton, juntando 15,5 g de base do caldo Mueller-Hinton (*Mueller-Hinton Broth* - CM0405 Oxoid®) a 500 mL de água destilada, ao qual se adicionou 2,5 g de carvão bacteriológico. Esta preparação foi depois esterilizada na autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Depois de arrefecido o meio, adicionou-se asepticamente 35 mL de sangue desfibrinado, uma ampola de suplemento de crescimento para *Campylobacter* (*Campylobacter Growth Supplement* - SR0232 Oxoid®), uma ampola de suplemento seletivo para *Campylobacter* de Skirrow (*Campylobacter Selective Supplement* - SR0069 Oxoid®), 25 mL de 5-fluorouracil (10 mg/mL) (343922,

Calbiochem®) (Hum & McInnes, 1987) e 5 mL de anfotericina B (200 µg/mL) (171375, Calbiochem®) (Anexo).

Assepticamente, o meio de transporte preparado foi distribuído em tubos esterilizados de 10 mL, ficando 8 mL por tubo. Aquando da distribuição, o meio foi regularmente agitado, de modo a permitir uma distribuição uniforme do carvão bacteriológico. Os tubos foram conservados a 4 °C até à sua utilização (Hum & McInnes, 1987).

Agar de Skirrow modificado

Em primeiro lugar preparou-se o agar sangue, juntando 40 g de base de agar sangue (*Blood agar base*: CM0271 – Oxoid®) a um litro de água, e deixou-se ferver para a sua completa dissolução. Depois de esterilizado na autoclave a 121 °C durante 15 minutos, deixou-se arrefecer até aos 55°C e adicionou-se 70 mL de sangue desfibrinado, uma ampola de suplemento seletivo para *Campylobacter* de Skirrow (*Campylobacter Selective Supplement* - SR0069 Oxoid®) (Hum & McInnes, 1987), e 5 mL de anfotericina B (400 µg/mL) (171375, Calbiochem®) (Anexo).

Com os devidos cuidados de assépsia, o meio foi distribuído em placas de Petri esterilizadas. Depois de solidificado o meio, as placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 horas, de modo a verificar se não teria ocorrido contaminação do meio. Depois da prova de esterilidade, as placas foram conservadas a 4 °C.

Agar sangue (AS)

Em primeiro lugar preparou-se o agar sangue, juntando 40 g de base de agar sangue (*Blood agar base*: CM0271 – Oxoid®) a um litro de água, e deixou-se ferver para a sua completa dissolução. Depois de esterilizado na autoclave a 121 °C durante 15 minutos, deixou-se arrefecer até aos 55 °C e adicionou-se 50 mL de sangue desfibrinado. Com os devidos cuidados de assépsia, o meio foi distribuído em placas de Petri esterilizadas. Depois de solidificado o meio, as placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 horas, de modo a verificar se não teria ocorrido contaminação do meio. Depois da prova de esterilidade, as placas foram conservadas a 4 °C.

Meio de 1% de glicina

O meio de 1% de glicina tem como base o agar Mueller-Hinton suplementado com 10% de sangue. Assim, em primeiro lugar, adicionou-se 19 g de agar Mueller-Hinton (*Mueller-Hinton*

Agar - CM0337 Oxoid®) e 5 g de glicina (*Glycine* – 3570 Calbiochem®) a 500 mL de água, deixou-se ferver para a sua completa dissolução. Depois de esterilizado na autoclave a 121 °C durante 15 minutos, deixou-se arrefecer até aos 55 °C e adicionou-se 100 mL de sangue desfibrinado.

Com os devidos cuidados assépticos, o meio foi distribuído em placas de Petri esterilizadas. Depois de solidificado o meio, as placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 horas, de modo a verificar se não teria ocorrido contaminação do meio. Depois da prova de esterilidade, as placas foram conservadas a 4 °C.

Meio de conservação FBP

Para conservar *Campylobacter fetus*, preparou-se o meio de conservação FBP. Em primeiro lugar dissolveram-se 25 g de caldo nutriente (*Nutrient Broth* – 70122 Sigma®) num litro de água destilada. A esta solução foi adicionado 1,2 g de agar, 1,0 g de extrato de levedura, uma ampola de suplemento seletivo para *Campylobacter* de Skirrow (*Campylobacter Selective Supplement* - SR0069 Oxoid®) e 150 mL de glicerol. O meio foi distribuído em microtubos de 1,5 mL, completando este volume. Os tubos foram esterilizados na autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Lander & Gill, 1985).

Até à sua utilização, os tubos foram conservados a 4 °C. Para a inoculação do meio, com uma zaragatoa estéril recolheu-se toda a cultura de uma placa de AS pura da estirpe a ser conservada e inoculou-se num microtubo, que foi depois congelado a -20 °C.

Depois de inoculado o meio de conservação FBP com *C. fetus*, as bactérias permanecem viáveis durante algumas semanas à temperatura ambiente e durante alguns meses a -20 °C.

Suplemento de crescimento para *Campylobacter*

Uma ampola de suplemento de crescimento para *Campylobacter* (2mL) (*Campylobacter Growth Supplement* - SR0232 Oxoid®) é constituída por:

- 0,125 g de piruvato de sódio,
- 0,125 g de metabissulfito de sódio e
- 0,125 g de sulfato ferroso (sal hidratado).

Adicionou-se o conteúdo de uma ampola a 500 ml de um meio nutriente estéril arrefecida até 50-55 ° C, com 5-7% de lise desfibrinado cavalo ou de sangue de carneiro.

Suplemento seletivo para *Campylobacter* de Skirrow

Uma ampola de suplemento seletivo para *Campylobacter* de Skirrow (*Campylobacter Selective Supplement* - SR0069 Oxoid®) é composta por:

- 5,0 mg de vancomicina,
- 2,5 mg de trimetoprim e
- 1.250 UI de polimixina B.

Reconstituiu-se a ampola de acordo com as instruções adicionar assepticamente o conteúdo a 500 ml de um meio nutriente arrefecida até aproximadamente 50 ° C, com 10% de sangue de cavalo desfibrinado ou ovelhas.

Preparação da solução de 5-Fluorouracil

Para preparar 25 mL de solução de 5-fluorouracil na concentração de 10 mg/mL, pesou-se 250 mg deste composto e adicionou-se 25 mL de água destilada esterilizada. Depois de solubilizado, a solução foi esterilizada por filtração (filtro de 0,2 µm).

Preparação da solução de anfotericina B

Para preparar 5 mL de solução de anfotericina B na concentração de 200 µg/mL, pesou-se 1 mg de anfotericina B e adicionou-se 5 mL de água destilada esterilizada. Depois de solubilizado, a solução foi esterilizada por filtração (filtro de 0,2 µm). De modo a preparar 5 mL de solução de anfotericina B na concentração de 400 µg/mL, pesou-se 2 mg de anfotericina B e adicionou-se 5 mL de água destilada esterilizada. Esta foi esterilizada por filtração (filtro de 0,2 µm).