

T636.089 69  
S 938d  
2000

Ana Paula Reinato Stynen

**Detecção de *Campylobacter fetus* em lavados prepuciais de touros pela PCR.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Andrey Pereira Lage.

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2000

S938d Stynen, Ana Paula Reinato, 1972-  
2000 Detecção de *Campylobacter fetus* em lavados prepuciais de  
touro pela PCR / Ana Paula Reinato Stynen. –Belo Horizonte:  
UFMG – Escola de Veterinária, 2000.  
36p.: il.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária  
1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Infecções por *Campylobacter* -  
Diagnóstico – Teses. I. Título.  
CDD – 636.089 693 6

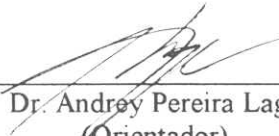
0236-15460


BIBLIOTECA UNIVERSITARIA


15/09/00

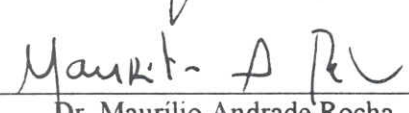
855600-08


Dissertação defendida e aprovada em 18 de fevereiro de 2000, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Andrey Pereira Lage  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rômulo Cerqueira Leite

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Edel Figueiredo Barbosa

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Maurílio Andrade Rocha

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

*Dedico este trabalho:  
Aos meus avós Getúlio e Nini.  
Aos meus pais por tudo que sou.  
À Wim por ser minha alma, meu amor, meu enigma.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por mais esta conquista.

Ao Prof Andrey Pereira Lage, orientador e amigo.

Ao Prof Rômulo Cerqueira Leite, pelo exemplo.

Aos Profs. Maurilio Andrade Rocha e Edel Figueiredo Barbosa pela valiosas sugestões e observações na elaboração deste trabalho.

Aos meus irmãos pelo exemplo de família.

Aos amigos Cid, José Renato, Joseli e Gláucia, pela amizade que não se explica.

À Aiesca, pela amizade, apoio, estímulo e exemplo.

Aos amigos Raul, Kika, Raquel, Carol pela convivência no Lab.

As minhas grandes amigas Anadélia e Pati, pela paciência, dedicação e amizade verdadeira acima de tudo.

Aos queridos amigos Ricardo e Tyna, pelo carinho e atenção.

Aos amigos que conquistei: Nádía, Juliana, Cristiano, Cleusa, Rizaldo, Alice, Érica, Luciana, Marcelão, Henrique, Lili, Marcos, Júnia, Jorge, Nelson, Luciana, Renata, Márcio.

Aos amigos professores que muito me ensinaram: Chico, Zélia e Alex.

Aos colegas do curso de mestrado pelo companheirismo e saudável convivência.

Ao Colegiado dos cursos de Pós Graduação da Escola de Veterinária, pela a tenção e colaboração.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelo apoio.

À FAPEMIG e FEP-MVZ pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio concedido durante o curso.

*"...Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante,  
do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo..."*

*Raul Seixas*

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Campilobacteriose Genital Bovina	15
2.2. Campilobacteriose Genital Bovina no Brasil	16
2.3. Diagnóstico da Campilo-bacteriose Genital Bovina	16
2.4. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Bactérias de referência	18
3.2. Amostras clínicas	19
3.3. Lavado prepucial	19
3.4. Extração de DNA das bactérias de referência	19
3.5. Extração de DNA do lavado prepucial	20
3.5.1. Inoculação artificial de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> em lavado prepucial	20
3.5.2. Extração de DNA pela técnica do tiocianato de guanidina	20
3.5.3. Extração de DNA pela lise alcalina	20
3.5.4. Extração de DNA pela resina Chelex 100	20
3.6. Extração de DNA a partir do material clínico	20
3.7. Iniciadores	21
3.8. Reações de amplificação (PCR)	22
3.9. Detecção do material amplificado	22
3.10. Avaliação do limite de detecção da PCR	22
3.11. Avaliação da especificidade da PCR e do produto amplificado	22
3.12. Controle de qualidade da PCR	22
3.13. Imunofluorescência Direta	22
3.14. Comparação entre as técnicas de PCR e a IFD	23
4. RESULTADOS	23
4.1. Otimização da PCR	23
4.2. Comparação entre as técnicas de extração de DNA da amostra de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> inoculada em lavado prepucial	23
4.3. Limite de detecção das bactérias de referência pela PCR.	25
4.4. Limite de detecção da PCR nos lavados prepuciais inoculados artificialmente	26
4.5. Especificidade da PCR	26
4.6. Detecção de <i>C. fetus</i> em lavado prepucial	29
4.7. Imunofluorescência direta	31
4.8. Comparação entre PCR e IFD para detecção de <i>C. fetus</i> em lavado prepucial	31
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

---

LISTA DE TABELAS

---

TABELA 1 - Bactérias de referência utilizadas como controle de qualidade nos diversos experimentos	19
TABELA 2 - Comparação entre PCR e IFD na detecção de <i>C. fetus</i> em lavado prepucial	31

---

LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA 1 – Seqüência do gene do dna ribossomal 23s de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	21
FIGURA 2 - Extração de dna pelo método do tiocianato de guanidina.	24
FIGURA 3- Extração de dna pelo método da lise alcalina.	24
FIGURA 4- Extração de dna pelo tratamento com a resina chelex 100	25
FIGURA 5 - Sensibilidade da pcr utilizando a amostra de referência de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354.	26
FIGURA 6 - Especificidade da PCR 1.	27
FIGURA 7 - Especificidade da PCR 2.	27
FIGURA 8- Especificidade da PCR 3.	28
FIGURA 9 - Produtos da PCR digeridos com a enzima <i>Ava II</i> .	29
FIGURA 10- Detecção de <i>C. fetus</i> em lavados prepuciais	30
FIGURA 11- Análise de restrição do produto amplificado	30

---



## RESUMO

Uma reação em cadeia da polimerase (PCR) baseada na sequência 23S do DNA ribossomal foi desenvolvida para detecção de *C. fetus* em lavados prepuciais de touros. Foram avaliados três métodos de extração de DNA nos lavados prepuciais: o método do tiocianato de guanidina, o da lise alcalina e do Chelex 100. Para determinar a especificidade do teste, amostras de referência de *Campylobacter* sp, *Helicobacter* sp e *Escherichia coli* foram submetidas a PCR. Lavados prepuciais de 47 touros de uma propriedade com diagnóstico de Campilobacteriose Genital Bovina foram testados pela PCR e imunofluorescência direta (IFD). Somente amostras de *C. fetus* subps. *venerealis* e *C. fetus*, subps. *fetus* foram amplificadas e o limite de detecção da PCR em lavado prepucial foi de  $3,8 \times 10^2$  CFU/ml de *C. fetus*. A especificidade do produto amplificado foi confirmada pela análise de restrição frente à enzima *Ava* II. Oito touros foram considerados infectados pelas duas técnicas, porém três animais só foram positivos à PCR e sete somente na IFD. A PCR padronizada mostrou-se eficiente na detecção de *C. fetus* em amostras de lavado prepucial, nas condições trabalhadas.

Palavras-chave: Campilobacteriose Genital Bovina, PCR, *Campylobacter fetus*, bovino, lavado prepucial, diagnóstico, gene 23S rDNA

## ABSTRACT

A PCR based on the 23S rDNA sequence was developed for the detection of *C. fetus* from preputial washings of bulls. Three extraction methods were evaluated for the extraction of DNA in preputial washings: the guanidinium thiocyanate, the alkaline lysis and the Chelex 100 methods. To determine the specificity of the test, *Campylobacter* sp, *Helicobacter* sp and *Escherichia coli* reference strains were submitted to PCR. Preputial washings of 47 bulls from one farm with a positive diagnosis of Bovine Genital Campilobacteriosis were tested by PCR and direct fluorescent antibody test (DFAT). Only *C. fetus* subps. *fetus* and *C. fetus* subps. *venerealis* were amplified by PCR and the detection limit was  $3,8 \times 10^2$  CFU/ml of *C. fetus*. The specificity of the amplified product was confirmed by restriction analysis with *Ava*II. Eight bulls were considered infected by the two techniques, but three animals were only positive by PCR and seven only by DFAT. The present PCR assay was suitable to detect *C. fetus* in preputial washing samples.

Keywords: Bovine genital Campylobacteriosis, PCR, *Campylobacter fetus*, cattle, preputial washing, diagnosis, 23S rDNA gene

## 1. INTRODUÇÃO

A Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) é uma enfermidade de transmissão venérea, causada pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* que provoca infertilidade temporária com repetições de cio e abortamentos, levando a grandes perdas econômicas devido aos problemas reprodutivos causados (Dekeyser, 1984).

Existem duas subespécies que podem causar problemas reprodutivos: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*.

A infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* provoca uma doença de caráter endêmico, onde vários animais de um mesmo rebanho são acometidos, apresentando repetição de cio e aumento do intervalo entre os partos. Este agente tem seu habitat natural no aparelho genital dos bovinos; no touro ele coloniza a mucosa prepucial e nas fêmeas a mucosa da vagina, cérvix, útero e ovidutos.

Por outro lado o *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, tem seu habitat no intestino e causa abortos esporádicos nos bovinos, aborto enzoótico em ovinos, e infecções intestinais no homem.

A infecção neste caso não se dá pelo coito, mas pela disseminação de *C. fetus fetus* a partir do intestino ou da vesícula biliar, provocando uma bacteremia com conseqüente infecção do útero gestante. Entretanto, a via de migração deste agente não está totalmente esclarecida.

Embora a epidemiologia da Campilobacteriose Genital Bovina de forma geral já seja bem conhecida, o papel desempenhado por cada subespécie nos distúrbios reprodutivos ainda não é bem conhecido, em parte pela dificuldade de recuperação e identificação destas bactérias nos casos de aborto e infertilidade.

Por suas características epidemiológicas, principalmente por ser de transmissão venérea, a Campilobacteriose Genital Bovina deve ser entendida como uma doença de rebanho. O touro é o animal ideal para se efetuar o diagnóstico da doença no rebanho devido ao seu papel disseminador do *C. fetus* subsp. *venerealis* no plantel. Então, a presença de um macho

infectado no rebanho leva a classificar aquele rebanho ou lote de animais que são cobertos por este touro como positivo para a Campilobacteriose Genital Bovina.

As perdas econômicas decorrentes da Campilobacteriose Genital Bovina são representadas por descarte e necessidade de reposição de animais inférteis, custo do sêmen, queda de produção de bezerros devido a reabsorção embrionária e abortamentos e, principalmente, à grande redução na produção de leite pelo aumento do intervalo entre partos (Goodger et al., 1986).

O diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina é difícil pois o *C. fetus* subsp. *venerealis* é uma bactéria microaerofílica, de difícil isolamento e que não resiste bem fora do hospedeiro (Lander, 1990).

Para que um programa de controle da Campilobacteriose Genital Bovina possa ser estabelecido em uma propriedade ou região é necessário que técnicas de diagnóstico confiáveis, rápidas, sensíveis e de fácil execução estejam disponíveis para a identificação dos animais e dos rebanhos infectados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA

A infecção pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* geralmente resulta em doença subclínica que, muitas vezes, passa despercebida na maioria das propriedades. Nos machos, a infecção limita-se à cavidade prepucial, mas não se observam alterações clínicas nos animais infectados. Nas fêmeas, a doença traduz-se por repetições de cio, resultantes da morte do embrião, por cervicites, endometrites e salpingites (Dekeyser, 1984). Abortos também podem ocorrer em torno do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> mês de gestação em menos de 10% das vacas infectadas (Garcia & Brooks, 1993).

Em condições naturais, a subespécie *C. fetus* subsp. *venerealis* é transmitida do macho à fêmea, e vice-versa, pelo coito ou uso de sêmen contaminado, sendo que a transmissão entre

machos pode ocorrer pelo seu comportamento homossexual quando agrupados ou através de fômites e camas contaminadas (Roberts, 1971, Dekeyser, 1984). A transmissão do agente de touros infectados para fêmeas alcança quase 100%, sendo o touro importante disseminador da enfermidade (Garcia & Brooks, 1993).

## 2.2. CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA NO BRASIL

A Campilobacteriose Genital Bovina é uma doença importante em países onde existem grandes rebanhos comerciais que ainda utilizam a monta natural no manejo reprodutivo, como a Austrália, a Argentina e o Brasil.

No Brasil, a Campilobacteriose Genital Bovina foi detectada pela primeira vez por D'Apice (1956), no Estado de São Paulo. Esta doença foi bem investigada até o início da década de 1980, com levantamentos epidemiológicos no Rio Grande do Sul (27%) (Mies Filho, 1960), em São Paulo, no Paraná, e em Minas Gerais (14%) (Castro et al., 1971), no Rio de Janeiro (13%) (Ramos & Guida, 1978) e no Mato Grosso do Sul (56%) (Pellegrin et al., 1994). Genovez e colaboradores (1989) examinando touros provenientes de rebanhos com problemas reprodutivos no Estado de São Paulo observaram, pelo isolamento do *Campylobacter fetus*, 24% de animais infectados.

Lage e colaboradores (1997) analisaram 942 materiais enviados para diagnóstico de Campilobacteriose Genital Bovina realizados na Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (EV/UFGM) no período de 1976 a 1996. Observou-se que 28% dos materiais foram positivos, sendo estes provenientes de 51% das 114 propriedades analisadas. O material mais frequentemente coletado foi o lavado prepucial e a técnica empregada nestes exames foi a imunofluorescência direta (IFD).

Estes dados mostram que a Campilobacteriose Genital Bovina está presente em nosso meio e que a frequência da doença em nossos rebanhos é certamente um dos fatores que influenciam as baixas taxas de desfrute e produtividade observadas, devido às frequentes repetições de cio e aumento do intervalo entre partos (Leite, 1977, Dekeyser, 1984, Pellegrin et al., 1998).

## 2.3. DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA

Os métodos de diagnóstico utilizados no controle da Campilobacteriose Genital Bovina têm sofrido uma lenta evolução. Apesar disso na maioria das vezes, nem mesmo estes métodos podem exprimir toda a sua sensibilidade devido ao desconhecimento por parte de muitos técnicos das formas de coleta e transporte de material (Pellegrin, 1999a).

O diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina é difícil devido ao *C. fetus* subsp. *venerealis* ser uma bactéria microaerofílica, de difícil isolamento e que não resiste bem fora do hospedeiro (Lander, 1990). Além disto, a detecção de anticorpos no soro dos animais não apresenta boa sensibilidade e especificidade (Hewson et al., 1985) devido a infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* se restringir ao trato genital dos animais. As técnicas rotineiramente utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* são, além do isolamento e identificação, a imunofluorescência direta (IFD) (Ruckerbauer et al., 1974) e a aglutinação em muco cervico-vaginal (Hughes, 1953).

A imunofluorescência direta apresenta grandes vantagens em relação ao isolamento, pois é efetuada em curto espaço de tempo, a presença de contaminantes não é um problema para a técnica e as condições de coleta e o tempo entre a coleta e o diagnóstico não precisam ser tão rígidos quanto em comparação com a cultura. Entretanto, a IFD não permite distinguir entre as duas subespécies de *C. fetus*, o *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis*. O diagnóstico através da IFD tem sido utilizado principalmente para detectar touros infectados pelo *C. fetus* (Philpott, 1968; Leite, 1977).

O teste de mucoaglutinação também possui vários inconvenientes como a demora no aparecimento de aglutininas no muco cervico-vaginal após infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* e a presença de resultados falso negativos durante o estro (Lawson & Mackinnon, 1952; Corbeil et al., 1974).

Em touros, tentativas de se detectarem anticorpos nos fluidos prepuciais têm geralmente falhado (Easterbrooks et al., 1955, Samuelson & Winter, 1967) ou têm revelado títulos baixos.

indistinguíveis daqueles presentes antes da infecção. Entretanto, estes resultados foram obtidos utilizando-se a técnica de aglutinação que não apresenta boa sensibilidade.

Nos últimos anos, Hewson e colaboradores (1985) e Hum e colaboradores (1991) desenvolveram ensaios imunoenzimáticos para detecção de imunoglobulinas da classe A (IgA) específicas contra *C. fetus* subsp. *venerealis* no muco cérvico-vaginal, verificando que tais ensaios eram bastante específicos e mais sensíveis que os testes de mucoaglutinação utilizados, sendo de grande valia no diagnóstico da infecção nos rebanhos. O teste de ELISA, que já foi padronizado na EV-UFMG (Pellegrin et al., 1999b), está em fase de teste, podendo vir a substituir o teste da mucoaglutinação como teste de rebanho, apresentando maior sensibilidade e especificidade.

#### 2.4. A REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A PCR é uma técnica baseada na repetição cíclica e automática de três etapas: desnaturação térmica da fita dupla de DNA; anelamento de iniciadores nas fitas desnaturadas e síntese da fita complementar na sequência molde de DNA. Este fenômeno ocorre através da extensão de cada iniciador anelado, pela ação de enzimas. Saiki e colaboradores, (1988) descreveram a utilização de uma DNA polimerase termoestável, o que ampliou muito a aplicação do teste. Todas as três reações ocorrem no mesmo tubo, com os mesmos reagentes, variando-se apenas as temperaturas. Devido à capacidade da PCR de produzir com grande precisão e em apenas 30 ciclos um milhão de cópias a partir de uma única molécula, favoreceu, nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas altamente sensíveis, específicas e rápidas para a detecção de agentes infecciosos em materiais biológicos (Hayden et al., 1991).

Os primeiros trabalhos sobre o uso da PCR no diagnóstico veterinário apareceram no final dos anos 80. A PCR é uma técnica recomendável, uma vez que métodos de diagnóstico tradicionais requerem longos e complexos procedimentos e a presença ou ausência da sequência de DNA específica em amostras clínicas pode ser determinada em menos de cinco horas. Outras vantagens da PCR, comparada a outros métodos

que utilizam DNA, são: a versatilidade, a sensibilidade e a especificidade. A PCR pode ser adaptada para a detecção de várias espécies de microrganismos (Hayden et al., 1991).

Wesley e colaboradores (1991) trabalharam com a sequência 16S do DNA ribossomal para a detecção de *C. fetus*, mas a diferenciação entre as espécies de *C. fetus* e *C. hyointestinalis* só foi possível após restrição enzimática e hibridação com sondas de DNA, pois as duas espécies apresentaram 99,7% de homologia na região amplificada da sequência trabalhada.

A partir de 1991, várias publicações vêm relatando a detecção de *C. fetus* utilizando iniciadores derivados da sequência 16S do DNA ribossomal (Wesley et al., 1991; Van Camp et al., 1993; Blom et al., 1995; Oyarzabal, et al., 1997).

Baseando-se na necessidade de um método mais sensível de detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* em sêmen Eaglesome e colaboradores (1995) desenvolveram um teste para o diagnóstico da infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* utilizando iniciadores derivados da sequência 16S de DNA ribossômico (rDNA) de *Campylobacter* sp. Esta metodologia mostrou-se bastante específica e sensível para a detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis*, mas apresenta o inconveniente da necessidade de se digerirem os produtos amplificados para posterior análise dos produtos digeridos e diagnóstico. Isto, além de aumentar o custo do teste, aumenta também a margem de erros.

Van Camp e colaboradores (1993) analisaram as sequências 16S e 23S do DNA ribossomal de *Campylobacter* sp utilizando iniciadores universais. Baseando-se na sequência 23S do DNA ribossomal foi realizada uma análise filogenética de 17 amostras de *Campylobacter* sp. Estes resultados foram comparados à árvore filogenética baseada na sequência 16S do DNA ribossomal. O alinhamento revelou que, apesar de parcial, a sequência 23S do DNA ribossomal contém maior número de regiões variáveis e, quando se investigam organismos filogeneticamente muito próximos, regiões variáveis oferecem mais informações. Para este propósito, a sequência 23S do DNA ribossomal deve ser considerada como uma opção eficiente.

Eyers e colaboradores (1993) utilizaram iniciadores derivados das regiões variáveis da sequência 23S de DNA ribossômico, para detecção de amostras termofílicas de *Campylobacter* sp. O ensaio demonstrou que um par de oligonucleotídeos selecionado foi capaz de detectar todas as espécies de *Campylobacter* sp, enquanto outros quatro pares permitiram diferenciar entre as espécies de *C.coli*, *C.jejuni* subsp. *Jejuni*, *C. lari*, *C. upsaliensis*.

Bastyns e colaboradores (1994) utilizaram a sequência 23S do DNA ribossomal para diferenciar várias espécies de *Campylobacter*, entre elas o *C. fetus* do *C. hyointestinalis*. As tentativas de desenhar iniciadores para a diferenciação entre o *C. fetus* subsp. *venerealis* e o *C. fetus* subsp. *fetus* não surtiram efeito. O alinhamento das frações 23S do DNA ribossomal revelou que somente em 7 posições de uma região de 1015 pares de bases (pb) existia uma diferença entre as duas espécies (Van Camp, et al., 1993), bem como na sequência 16S do DNA ribossomal a diferença entre as duas subespécies encontra-se somente em 14 posições em uma região de 1518 pb (Wesley et al., 1991)

Este trabalho teve por objetivos:

- a. Padronizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a sequência 23S do DNA ribossomal para detecção de *C. fetus* em lavado prepucial;

- a.1. Determinar o método mais eficiente de extração de DNA em amostras de lavado prepucial;
- a.2. Avaliar o limite de detecção da PCR utilizando a sequência 23SS do DNA ribossomal na detecção de *C. fetus* em lavado prepucial;
- a.3. Avaliar a especificidade da PCR utilizando a sequência 23S do DNA ribossomal na detecção de *C. fetus*;
- b. Comparar a PCR e a imunofluorescência direta (IFD) na detecção de *C. fetus* em amostras de lavado prepucial.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA

As bactérias de referência utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1.

**TABELA 1** - Bactérias de referência utilizadas como controle de qualidade nos diversos experimentos

Espécie	Amostra
<i>C. coli</i>	NCTC 11366 <sup>T</sup>
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	ATCC <sup>1</sup> 27374 <sup>T</sup>
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	NCTC <sup>2</sup> 10354 <sup>T</sup>
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	LCDC <sup>3</sup> 17398 (= LMG <sup>4</sup> 12686)
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	LCDC 6576 (= LMG 14432)
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	LMG 14432 <sup>T</sup>
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	LMG 8843 <sup>T</sup>
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	NCTC 11351 <sup>T</sup>
<i>C. lari</i>	NCTC 11352 <sup>T</sup>
<i>C. sputorum</i> biovar <i>paraureolyticus</i>	LCDC 6577(= LMG 11764)
<i>C. sputorum</i> biovar <i>paraureolyticus</i>	LCDC 6939(= LMG 11764)
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i> <sup>5</sup>	LMG 6447
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Helicobacter fenneliae</i>	LMG 13306
<i>Helicobacter mustelae</i>	LMG 8777
<i>Helicobacter pametensis</i>	LMG 12637
<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC 53726

T - amostra tipo (type strain)

1 - ATCC - American Type Culture Collection - Estados Unidos da América

2 - NCTC - National Culture Type Collection - Inglaterra

3 - LCDC - Laboratory Center for Disease Control - Canadá

4 - LMG - Laboratorium voor Microbiologie - Rijksuniversiteit Gent - Bélgica

5 - Antiga amostra do tipo de *C. sputorum* biovar *hubulu*

### 3.2. AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram coletadas amostras de lavado prepucial de 47 touros das raças Nelore e Tucura, de uma fazenda de gado de corte com criação extensiva, manejo reprodutivo de monta natural e estação de monta, localizada no município de Corumbá no Pantanal-MS. Esta fazenda já havia apresentado touros infectados pelo *C. fetus* em anos anteriores (Pellegrin et al., 1994). Todos os animais estavam em repouso sexual de pelo menos seis meses.

### 3.3. LAVADO PREPUCIAL

O lavado prepucial foi coletado em solução salina tamponada estéril pH 7,2 (PBS) introduzida por um equipo estéril e com massagem vigorosa do prepúcio (Leite et al., 1995). Após a coleta, o material foi transportado em gelo até o laboratório para ser utilizado na PCR e na IFD.

### 3.4. EXTRAÇÃO DE DNA DAS BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA

A extração e purificação de DNA genômico foi realizada de acordo com Pitcher e colaboradores (1989). Culturas das amostras de referência em ágar sangue, com 48 horas de incubação foram centrifugadas a 17000 X g por 15 min. Os sedimentos foram ressuspensos em 100 µl de tampão TE (10 mM Tris - HCl, 0,5 M ácido etilodiaminotetracético (EDTA), pH 8,0 e adicionado de RNase A (1,0 µg/µl). O DNA foi extraído pelo método do tiocianato de guanidina (tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 0,5 M, sarcosyl 10%). O DNA precipitado foi ressuspensado em 100 µl de água deionizada e estocado a 4°C. A concentração de DNA extraído foi determinada em gel de agarose a 1%, comparando a intensidade do DNA extraído com a intensidade de diluições do padrão de concentração conhecida (250ng/µl) de DNA do fago λ digerido com a enzima *Hind* III (Amersham Pharmacia Biotech - USA) (Sambrook et al., 1991).

### 3.5. EXTRAÇÃO DE DNA DO LAVADO PREPUICIAL

#### 3.5.1. Inoculação artificial de *C. fetus* subsp. *venerealis* em lavado prepucial

Afim de avaliar diferentes métodos de extração de DNA, amostras de lavado prepucial foram inoculadas com *C. fetus* subsp. *venerealis*. A amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 foi cultivada em ágar sangue (Brain Heart Infusion agar – Difco - USA, 10% de sangue de cavalo) por 48 horas e incubada a 37°C em microaerofilia. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 2 ml de solução salina tamponada estéril pH 7,2 (PBS) e a suspensão foi padronizada pela escala 2 de MacFarland. Desta suspensão foram retirados 200 µl e adicionados a um tubo contendo 1,8 ml de PBS (pH 7,2) denominado diluição 1. Após a homogeneização da solução, foram retirados 200 µl e adicionados a um outro tubo contendo 1,8 ml de PBS (pH 7,2) denominado diluição 2 e assim sucessivamente até a diluição 8. De cada diluição foram aplicados em duplicata 20 µl em placa de ágar sangue para contagem bacteriana (Quinn et al., 1994) e o restante foi estocado a -20°C. As placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C em microaerofilia, quando então se procedeu a contagem bacteriana.

Após a contagem bacteriana, 100 µl de cada diluição foram misturados a 900 µl de lavado prepucial, coletado segundo Leite e colaboradores (1995), de um touro livre da infecção por *C. fetus*, avaliado pela IFD.

Cada uma dos tubos contendo 1 ml das amostras do lavado prepucial inoculadas com as diluições foram posteriormente utilizadas para determinação da forma de extração de DNA mais adequada para as amostras clínicas e da sensibilidade da PCR em lavado prepucial.

Os tubos contendo lavado prepucial inoculado artificialmente foram centrifugados a 13000 x g por 30 min para obtenção de sedimento e estocados a -20 C.

#### 3.5.2. Extração de DNA pela técnica do tiocianato de guanidina

Os sedimentos obtidos pela centrifugação do lavado prepucial inoculado artificialmente, foram ressuspensos em 100 µl de tampão TE (10mM Tris-HCl, 0,5M EDTA, pH 8,0) e adicionado de RNase A (1,0 µg/ml) O DNA foi extraído pelo método de tratamento com o tiocianato de guanidina segundo Pitcher e colaboradores (1989), conforme descrito em 5.4, e ressuspensos em 50 µl de água deionizada.

#### 3.5.3. Extração de DNA pela lise alcalina

Os sedimentos obtidos pela centrifugação do lavado prepucial inoculado artificialmente foram ressuspensos em 50 µl de água deionizada. A esta suspensão foram adicionados 50 µl de NaOH 50mM e em seguida a mistura foi coberta com 100µl de óleo mineral. Os tubos foram, então, aquecidos a 100°C por 15 min. Após o resfriamento dos tubos, 8 µl de Tris-HCl 1M pH 7,5 foram adicionados à mistura abaixo do óleo mineral (Lage et al., 1995) e estocados a 4°C até sua utilização na reação de amplificação.

#### 3.5.4. Extração de DNA pela resina Chelex 100

Os sedimentos obtidos pela centrifugação do lavado prepucial inoculado artificialmente foram ressuspensos em 50 µl de água deionizada e adicionados de 200µl de Chelex 100 (Bio-Rad, USA) a 5%. 2 µl de proteinase K (10 mg/ml) (Merck, Germany) e 7 µl de ditiotreitol a 1M (BioRad, USA). A suspensão foi suavemente homogeneizada e incubada a 56°C por 45 min. Após centrifugação por 10 s a 13000 x g, os tubos foram colocados em água deionizada fervente por 8 min, subseqüentemente centrifugados por 3 min a 13000 x g e conservados a 4°C até o uso na PCR (Rocha, 1998).

### 3.6. EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DO MATERIAL CLÍNICO

Após determinar o método de extração de DNA mais adequado para as amostras clínicas, as alíquotas contendo 2 ml de lavado prepucial coletadas para PCR foram centrifugadas a 13000 X g por 30 min. O sobrenadante foi descartado e

o sedimento ressuspendido em 100 µl de tampão TE e adicionado de RNase A (1,0 µg/ml) o DNA foi extraído pelo método do tratamento com o tiocianato de guanidina, segundo Pitcher e colaboradores (1989).

### 3.7. INICIADORES

Foram utilizados os iniciadores FET1 (5'- CTC ATA ATT TAA TTG CAC TCA TA - 3') e 69ar

(5'- CTT AGG ACC GTA TAG TTA C - 3') (sintetizados pela Gibco-BRL, USA), segundo Bastyns e colaboradores (1994). Este par de iniciadores amplificam um fragmento de 835 pares de base (pb) da região hipervariável da seqüência 23S do DNA ribossomal de *C. fetus* subsp. *venerealis* (número de acesso no EMBL X67773), Figura 1.

```

1  GCGTAATAGC TCACTGGTCT AGTGATTCTG CGCGGAAAAT ATAACGGGGC
51  TAAAATGAGT ACCGAAGCTT TAGACTTGCA CTTAATTCTA ATTATAAATT
101 TGGCTAAGAG CTTTTAAGTT ATATTTCTCA TAATTTAATT GCACTCATAT
151 AAATTAATTA ATGAGAAAAT AGTTTAGCTA AAATAATTAG AAGTAATTAG
201 AATTAAGTGC AAGTGGTTGG AGAGCGTTCT ATTCAGCGTT GAAGGTATAC
251 CGGTAAGGAG TGCTGGAGCG GATAGAAGTG AGCATGCAGG CATGAGTAGC
301 GATAATTGAT GTGAGAATCA TCAACGCCGG AAACCCAAGG TTTCTTACGC
351 GATGCTCGTC ATCGTAGGGT TAGTCGGGTC CTAAGCAAAG TCCGAAAAGG
401 NATGCGATGG AAAATTGGTT AATATTCCAA TACCAATTAT TATGTGCGAT
451 GGAAGGACGC TTAAAGTTAG TGGAGCTAGC GGATGGAAGT GCTAGTCTAA
501 GGGTGTAGGT TGAGTTATAG GCAAATCCGT AACTCTTTAT CCGAGACCTA
551 AAAGGCTCAT GACGCTCTTC GGAGTAGATT GAGAATCCAT GATACTATCG
601 AGCCAAGAAA AGTTTCTAAG TTTAGTAATA ATTGCCCGTA CCGTAAACCG
651 ACACAGGTGG GTGGGATGAG TATTCTAAGG CGCGTGGAAG AACTCTCTTT
701 AAGGAACTCT GCAAAATAGC ACCGTATCTT TGGTATAAGG TGTGCCCTAAC
751 TTTGTATTAA GATTCACTCC CAAAGCAAAG AAGGTTACAA CAAAGAGTCC
801 CTCCCGACTG TTTACCATAA ACACAGCACT CTGCTAACAC GTAAGTGGAT
851 GTATAGGGTG TGACGCCTGC CCGGTGCTCG AAGGTTAATT GATGATGTTA
901 GCTATGCGAA GCATTTGATC GAAGCCNNN NNNNNNNNNN NNNGTAACTA
951 TACGGTCCTA AG

```

Figura 1 – Seqüência do gene do DNA ribossomal 23S de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* – Número de acesso no EMBL X67773. Os oligonucleotídeos Fet1 e 69ar estão representados em negrito. Os sítios de restrição da enzima *Ava*II estão sublinhados.



### 3.8. REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO (PCR)

As reações foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo 20 pmol de cada iniciador, 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 10mM Tris-HCl (pH8,3), 50mM de KCl, 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 UI de Taq DNA polimerase e 10µl do DNA extraído. Essa mistura foi então submetida a um ciclo de 3 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 58,5°C, 1 min a 72°C e 1 min a 94°C, e um ciclo final composto de 1 min a 58,5°C e 10 min a 72°C.

Anteriormente, foram realizadas variações na temperatura de anelamento, nas concentrações de MgCl<sub>2</sub> e de iniciadores, visando aumentar a sensibilidade e especificidade da PCR.

### 3.9. DETECÇÃO DO MATERIAL AMPLIFICADO

Após a amplificação, 10 µl de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% em tampão TBE (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8.2) e corados pela prata segundo Herring e colaboradores (1988). Para determinar o tamanho dos produtos de PCR incluiu-se em cada corrida o marcador de tamanho molecular de DNA do fago λ, digerido pela enzimas *Hind* III e *Eco*RI (Amersham Pharmacia Biotech - USA) contendo fragmentos variando de 125 a 2415 pares de base.

### 3.10. AVALIAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DA PCR

Para se determinar o limite de detecção da PCR foram realizados dois tipos de experimentos. No primeiro experimento, 10 µl das diluições seriadas em base 10, de 36 ng/µl a 36 at/µl, do DNA da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 foram submetidos à PCR.

No segundo experimento o sedimento de cada diluição da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 em lavado prepucial preparadas em 5.5.1 foram submetidas às técnicas de extrações de escritas em 5.5. Foram utilizados 10 µl da suspensão de DNA para a realização da PCR.

Os produtos amplificados foram detectados em gel de poliacrilamida a 6% conforme descrito em 5.9.

### 3.11. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA PCR E DO PRODUTO AMPLIFICADO

Para determinar a especificidade da PCR, amostras de referência de *Campylobacter* sp, *Helicobacter* sp e *Escherichia coli* (Tabela 1) foram submetidas a PCR conforme descrito 5.8.

Além disto, foi verificado o perfil de restrição enzimática dos produtos amplificados frente à enzima *Ava* II (Promega - USA). A enzima foi diluída no tampão, seguindo especificações do fabricante e foi adicionado 1UI de enzima a 5µl do produto de PCR, em um volume final de 10 µl de reação. As amostras foram incubadas a 37°C por uma hora. Os produtos de restrição (10 µl) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% em tampão TBE e corados pela prata segundo Herring e colaboradores (1988).

### 3.12. CONTROLE DE QUALIDADE DA PCR

Para evitar contaminações no laboratório devido à presença de fragmentos de DNA específicos amplificados, o preparo do material para amplificação e a análise dos produtos amplificados foram realizados em locais separados e com materiais específicos a cada etapa (Kwok & Higuchi, 1989).

### 3.13. IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

A imunofluorescência direta foi realizada de acordo com Mellick e colaboradores (1963) e Winter e colaboradores (1967). O material coletado foi submetido a duas centrifugações: a primeira a 600 x g, por 10 min., obtendo-se um sobrenadante que era então centrifugado a 10.000 x g por 30 min. Do sedimento obtido foi preparado o esfregaço e levado a estufa à temperatura de 37°C para secagem por 10 min. Após a fixação em acetona por 30 min, em temperatura entre 0°C e -10°C, os esfregaços foram cobertos com soro anti-*C. fetus* produzido em coelho (Walsh & White, 1968) e marcado pelo isotiocianato de fluoresceína (Ruckerbauer et al., 1974) e mantidos em ambiente de câmara úmida por 30min, a 37°C. As três lavagens do

esfregação corado foram efetuadas em PBS (pH 7,2), por 10 min. Para a montagem da lâmina foi utilizada glicerina tamponada (pH 9,2) e o esfregado coberto com laminula. Em cada lâmina havia um controle positivo constituído por um cultivo de *C. fetus* subsp. *venerealis* (NCTC 10354) e um controle negativo constituído por um cultivo de *C. sputorum* biovar *sputorum* (LMG 6447). Os esfregados foram examinados em microscópio de fluorescência episcópica (Olympus, CBA) com objetivas de 40x e 100x. Foram considerados positivos os lavados prepuciais que apresentarem bactérias fluorescentes com morfologia típica de *C. fetus*, bastonetes finos e em formato de "S".

#### 3.14. COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE PCR E A IFD

Para a análise de concordância entre os resultados obtidos nos testes de PCR e IFD foi utilizada a estatística kappa ( $\kappa$ ) (Smith, 1995).

### 4. RESULTADOS

#### 4.1. OTIMIZAÇÃO DA PCR

Os primeiros experimentos foram realizados utilizando a metodologia proposta por Bastyns e colaboradores (1994) com *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC10354 e *C. jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 10351. Nestes experimentos obteve-se banda de 835 pares de base e uma banda inespecífica de aproximadamente 1400 pares de base, demonstrada em agarose 1%.

Posteriormente foram realizadas alterações nas concentrações de  $MgCl_2$ , variando de 1,5 mM a 4,0 mM; na temperatura de anelamento, variando de 54°C a 59°C; na concentração de iniciadores, variando de 5 pmoles a 25 pmoles cada. Os melhores resultados foram obtidos com a concentração de 2mM de  $MgCl_2$ , a temperatura de anelamento de 58,5°C e 20 pmoles de cada primer. Após estas alterações, somente o produto esperado de 835 pares de base foi observado em gel de agarose 1%.

#### 4.2. COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA DA AMOSTRA DE *C. FETUS* SUBSP. *VENEREALIS* INOCULADA EM LAVADO PREPUCIAL

O lavado prepucial inoculado com diferentes diluições de *C. fetus* subsp. *venerealis* foram centrifugados e submetidos aos três métodos de extrações. Na extração pelo tiocianato de guanidina pode-se observar uma maior intensidade das bandas esperadas (Figura 2) em relação ao método que utilizou a lise alcalina (Figura 3). No tratamento com a resina Chelex 100, nenhuma banda esperada pode ser vista (Figura 4) no gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata.

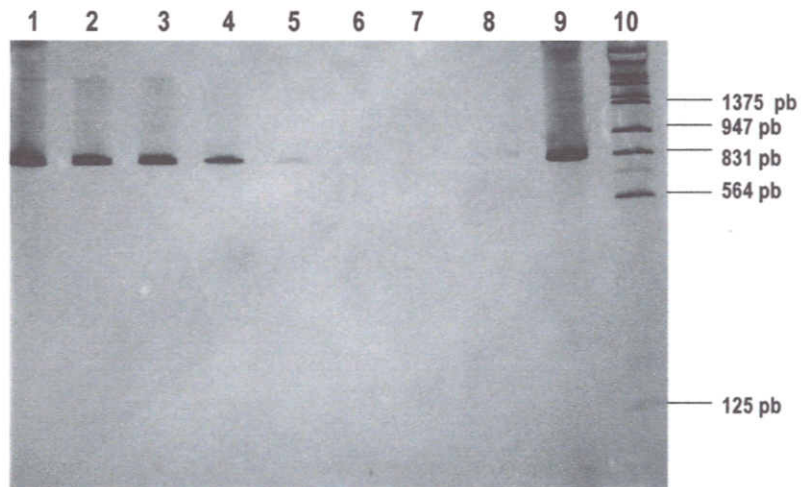


Figura 2 - Extração de DNA pelo método do tiocianato de guanidina. Canaletas 1 a 7: diluições seriadas em base 10 da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 de  $3,8 \times 10^7$  a  $3,8 \times 10^2$  CFU inoculada em lavado prepucial; canaleta 8: controle negativo; canaleta 9: DNA da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354; canaleta 10: marcador de tamanho molecular DNA do fago  $\lambda$  digerido pelas enzimas *Hind* III e *Eco*RI. Gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata.

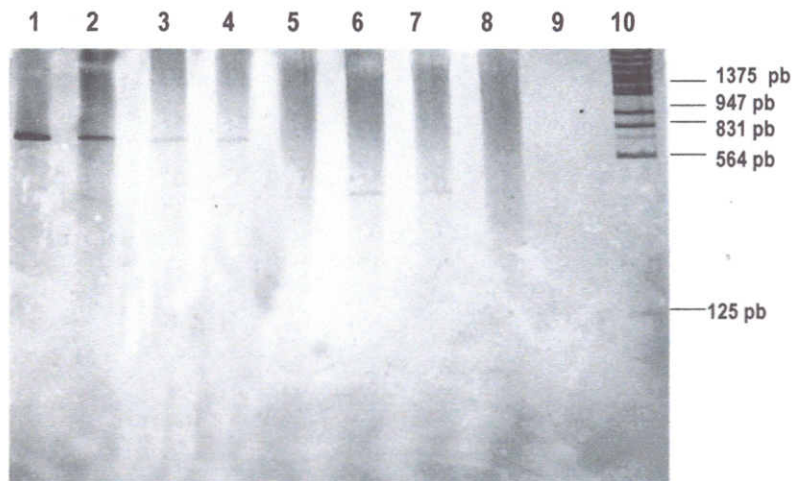


Figura 3- Extração de DNA pelo método da lise alcalina. Canaletas 1 a 8: diluições seriadas em base 10 da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 de  $3,8 \times 10^7$  a  $3,8 \times 10^2$  CFU inoculada em lavado prepucial; canaleta 9: controle negativo; canaleta 10: marcador de tamanho molecular DNA do fago  $\lambda$  digerido pelas enzimas *Hind* III e *Eco*RI. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata.

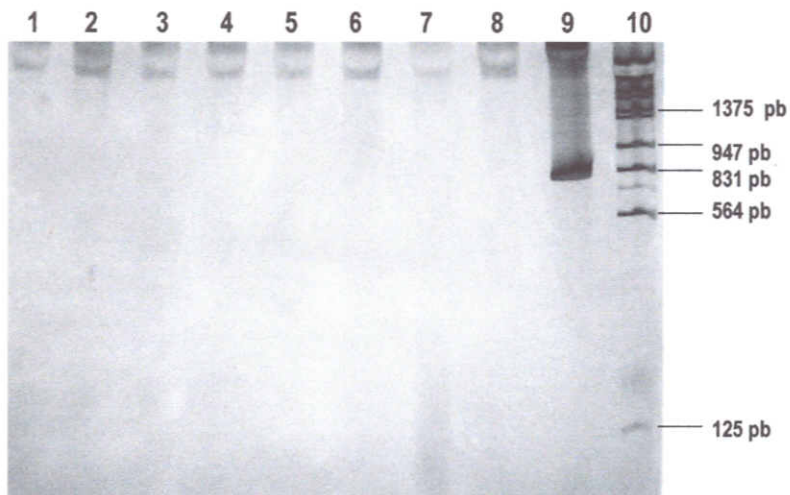


Figura 4- Extração de DNA pelo tratamento com a resina Chelex 100. Canaletas 1 a 8: diluições seriadas em base 10 da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 de  $3,8 \times 10^7$  a  $3,8 \times 10^2$  CFU inoculada em lavado prepucial; canaleta 9: DNA da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354; canaleta 10: marcador de tamanho molecular DNA do fago  $\lambda$  digerido pelas enzimas *Hind* III e *Eco*RI. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata

#### 4.3. LIMITE DE DETECÇÃO DAS BACTÉRIAS DE REFERÊNCIA PELA PCR.

Bandas foram identificadas quando se utilizou DNA nas concentrações de 360 ng a 3,6 pg de DNA da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC10354. Este resultado indica que o ensaio detectou um limite de 3,6 pg de DNA em gel de

poliacrilamida a 6% corado pela prata (Figura 5). Baseando no tamanho do genoma das espécies de *Campylobacter* sp, aproximadamente de 1700 kpb, e na presença de três cópias de 23S DNAr por cromossomo (Taylor et al., 1992), este limite de detecção corresponde a aproximadamente 675 bactérias.

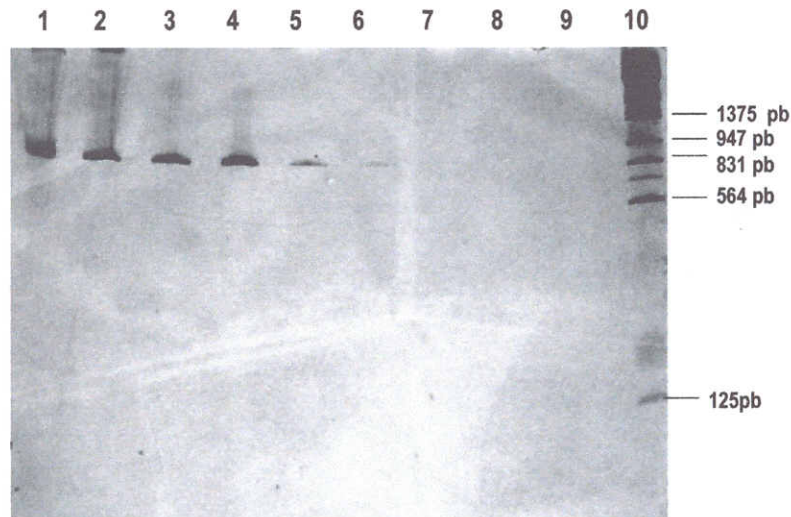


Figura 5 - Sensibilidade da PCR utilizando a amostra de referência de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354. Canaletas 1 a 8: diluições seriadas em base 10 do DNA da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 de 360 ng a 36 fg; canaleta 9: controle negativo; canaleta 10: marcador de tamanho molecular DNA do fago  $\lambda$  digerido pelas enzimas *Hind* III e *Eco*RI. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata.

#### 4.4. LIMITE DE DETEÇÃO DA PCR NOS LAVADOS PREPUCIAIS INOCULADOS ARTIFICIALMENTE

A extração de DNA pelo método da lise alcalina permitiu uma amplificação até a diluição 4 do lavado inoculado artificialmente com a amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* que corresponde a  $3,8 \times 10^3$  CFU/ml (Figura 3). Na extração pelo tiocianato de guanidina o resultado obtido foi melhor, chegando a uma detecção limite e  $3,8 \times 10^2$  CFU/ml (Figura 2), entretanto na extração

utilizando a resina Chelex 100 nenhuma banda foi observada (Figura 4).

#### 4.5. ESPECIFICIDADE DA PCR

Para determinar a especificidade do teste desenvolvido utilizaram-se as amostras bacterianas de referência listadas na Tabela 1. Material amplificado foi observado somente nas amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus venerealis* como mostrado nas figuras 6, 7 e 8.

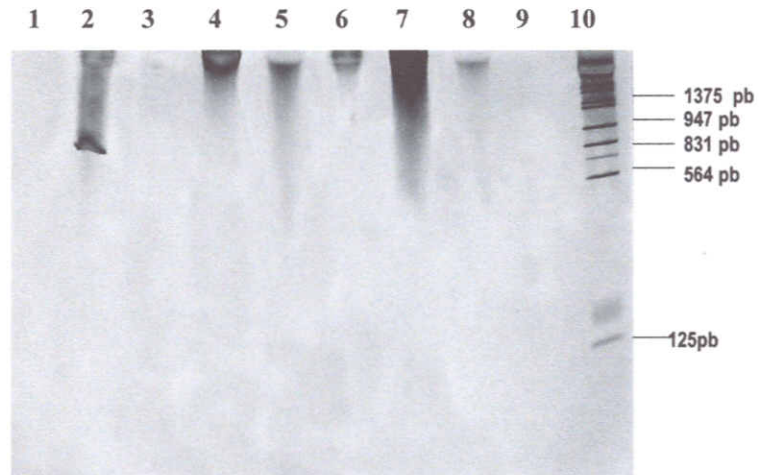


Figura 6 - Especificidade da PCR 1. Canaleta 2: *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC10354; canaleta 3: *E. coli* ATCC25922; canaleta 4: *C. jejuni* subsp *doylei* LMG8843; canaleta 5: *Helicobacter fenneliae* LMG1330; canaleta 6: *C. lari* NCTC11352; canaleta 7: *C. jejuni* subsp. *jejuni* NCTC11351; canaleta 8: *Helicobacter pametensis* LMG12637; 9: controle negativo; canaleta10: marcador de tamanho molecular DNA fago  $\lambda$  digerido pelas enzimas *Hind* III e *Eco*RI. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata.

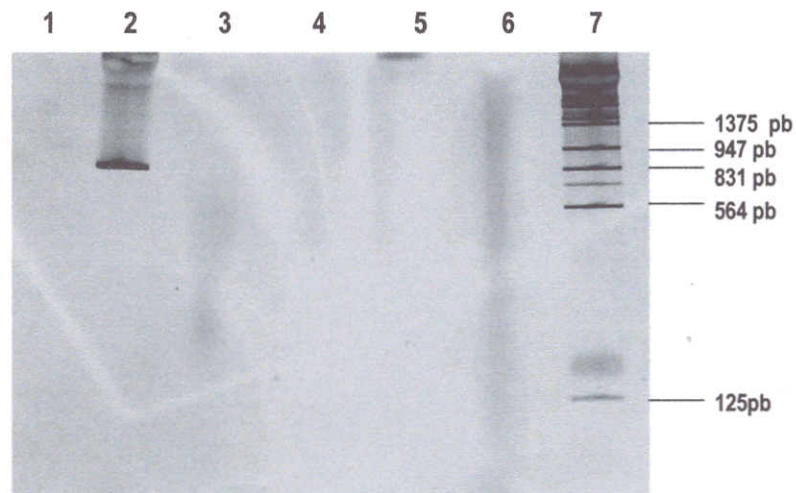
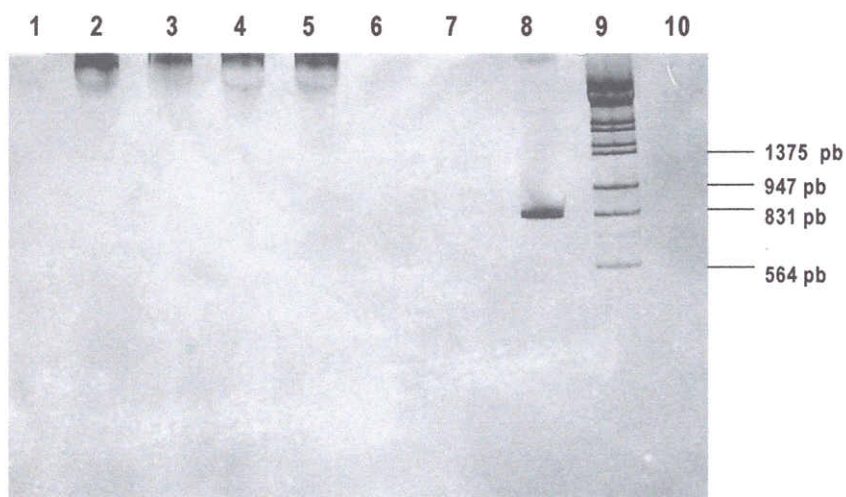


Figura 7 - Especificidade da PCR 2. Canaleta 1: controle negativo; canaleta 2: *C. fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374; canaleta 3: *Helicobacter mustelae* LMG8777; canaleta 4: *Helicobacter pylori* ATCC 53726; canaleta 5: *C. hyointestinalis* 1833; canaleta 6: *C. coli* NCTC 11366; canaleta 7: marcador de tamanho molecular DNA fago  $\lambda$  digerido pelas enzimas *Hind* III e *Eco*RI. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata.



**Figura 8** - Especificidade da PCR 3. Canaleta 1: *C. hyointestinalis* subsp *lawsonii* LMG 14432.; canaleta 2: *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* LMG11764; canaleta 3: *C. hyointestinalis* LMG 12686; canaleta 4: *C. hyointestinalis* subps *lawsonii* LMG14432; canaleta 5: *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* LMG 11764; canaleta 6: *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6447; canaleta 7: controle negativo; canaleta 8: *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354; canaleta 9: marcador de tamanho molecular DNA fago  $\lambda$  digerido pelas enzimas *Hind* III e *Eco*RI. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata.

A especificidade do produto amplificado foi analisada pela restrição enzimática. A figura 1 representa os sítios de restrição dos fragmentos amplificados pela PCR para a enzima *Ava* II realizada a partir da seqüência 23S do DNA ribossomal de *C. fetus* subsp. *venerealis* pelo programa Clone Manager (version 3.11, 1980. Scientific and Education Software - EUA)

A especificidade das ampliações obtidas foi confirmada pela obtenção de fragmentos esperados de 577 pares de base e 250 pares de base sendo o fragmento de 8 pares de base não visualizado no gel. Após restrição enzimática com a enzima *Ava* II, como observado na Figura 9.

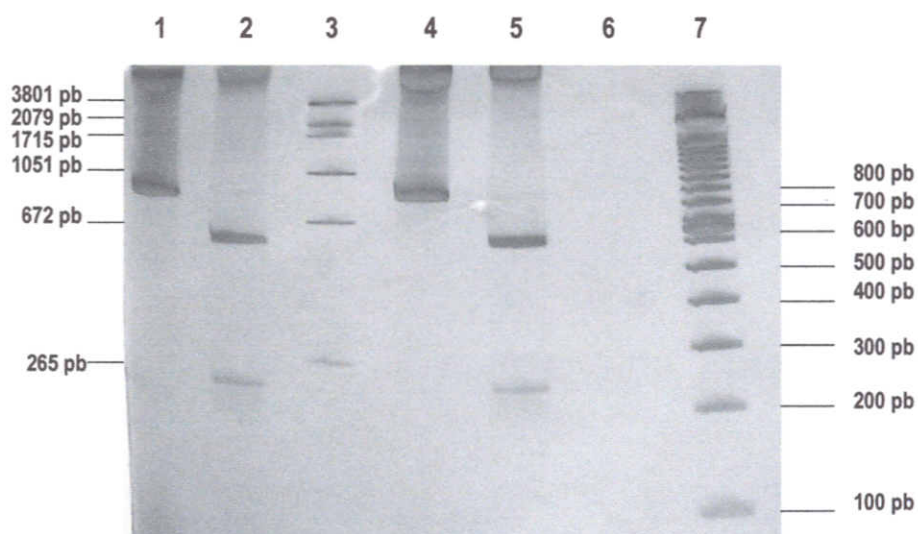


Figura 9 - Produtos da PCR digeridos com a enzima Ava II. Canaleta 1: *C. fetus* subps *venerealis*; canaleta 2 *C. fetus* subps *venerealis* digerido com a enzima Ava II., canaleta 3: marcador de tamanho molecular *pEI - HindIII*., canaleta 4: *C. fetus* subps *fetus*., canaleta 5: *C. fetus* subps *fetus* digerido com a enzima Ava II., canaleta 6: controle negativo., canaleta 7: marcador de tamanho molecular Dna ladder 100bp. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata.

#### 4.6. DETECÇÃO DE *C. FETUS* EM LAVADO PREPUCIAL

Baseado nos resultados mostrados em 6.2 e 6.4 a técnica de extração de DNA pelo tratamento pelo tiocianato de guanidina foi empregada em todas os lavados prepuciais coletados dos touros do

Pantanal – MS. Das 47 amostras de lavado prepucial analisadas 11 (23,4%) apresentaram bandas esperadas de 835 pares de base observados em gel de poliacrilamida 6% e coradas pela prata. A figuras10 mostra a análise de alguns lavados prepuciais pela PCR.



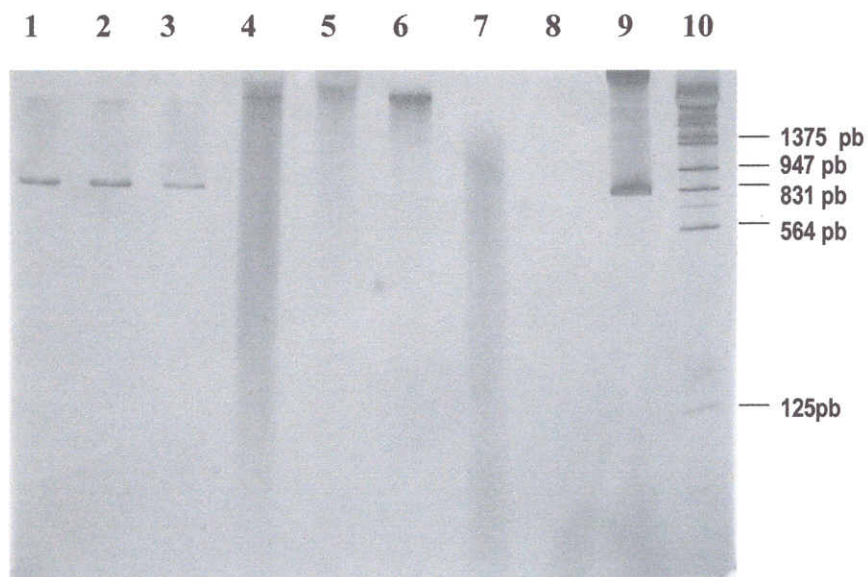


Figura 10 – Detecção de *C. fetus* em lavados prepuciais 1. Canaletas 1 a 8: amostras clínicas., canaleta 9: controle negativo., canaleta 10: marcador de tamanho molecular DNA fago  $\lambda$  digerido pelas enzimas *Hind* III e *Eco*RI. Gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata.

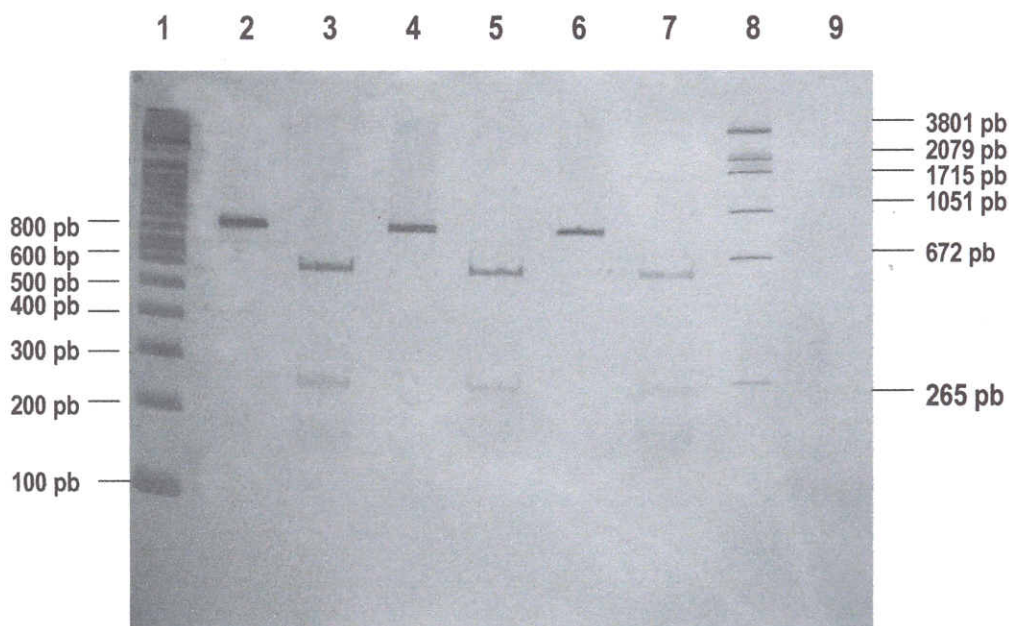


Figura 11 – Análise de restrição do produto amplificado. Canaleta 1: DNA ladder 100pb, canaleta 2: *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, canaleta 3: *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 digerido com *Ava* II; canaleta 4 e 6 : amostras clínicas; canaletas 5 e 7: amostras clínicas digeridas com *Ava* II; canaleta 8: pEI *Hind* II, canaleta 9: controle negativo.

#### 4.7. IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Analisando os lavados prepuciais dos 47 touros coletados no Pantanal – MS, foram encontradas 15 (31,9%) amostras que apresentaram bactérias fluorescentes, com morfologia típica do gênero *Campylobacter*.

#### 4.8. COMPARAÇÃO ENTRE PCR E IFD PARA DETECÇÃO DE *C. FETUS* EM LAVADO PREPUCIAL

Das 47 amostras de lavado prepucial analisadas 8 (17%) foram positivas para PCR e IFD, 3 amostras apresentaram resultado positivo para PCR e foram negativas na IFD e 7 foram IFD positivas e PCR negativas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Comparação entre PCR e IFD na detecção de *C. fetus* em lavado prepucial

	IFD positiva	IFD negativa	Total
PCR positiva	8	3	11
PCR negativa	7	29	36
Total	15	32	47

$kappa = 0,47$

Na análise dos resultados, os testes de PCR e IFD demonstraram 79% de concordância na detecção de *C. fetus* em lavado prepucial. O valor da estatística kappa ( $\kappa$ ) foi de 0,47 demonstrando alinhamento moderado entre os testes.

## 5. DISCUSSÃO

A seqüência 23S do DNA ribossomal de *C. fetus* subsp. *Venerealis*, que compreende três regiões variáveis, foi escolhida após alinhamento e comparação da seqüência 23S do DNA ribossomal completa (Van Camp et al., 1993).

A escolha desta região demonstrou ser eficiente para o desenvolvimento de uma PCR para detecção de *C. fetus*, pois os iniciadores selecionados derivados da seqüência 23S amplificaram somente a espécie *C. fetus* e

nenhuma outra amostra de *Campylobacter* sp. *Helicobacter* sp ou *E. coli* testadas.

É importante ressaltar que o *Campylobacter sputorum* biovar *sputorum* é comensal do trato genital de bovinos e apresenta morfologia indistinguível de *C. fetus* por microscopia de campo escuro. A PCR desenvolvida para detecção de *C. fetus* não amplificou o *C. sputorum* biovar *sputorum*. Outra espécie importante a ser relatada é o *C. hyointestinalis* que tem sido isolado de intestino de suínos, de bovinos e de outros mamíferos (Gebhart et al., 1985; Grau, 1988). Entretanto, não há descrição de seu isolamento do trato reprodutivo de bovinos. O alinhamento da seqüência de 23S do DNA ribossomal de *C. fetus* com o *C. hyointestinalis* apresenta homologia de 97% (Van Camp et al., 1993), sendo o *C. hyointestinalis* a espécie filogenética mais próxima do *C. fetus*. Apesar desta homologia nenhuma amostra das subespécies de *C. hyointestinalis* foi amplificada pela PCR padronizada.

Os resultados obtidos mostraram que o método de extração de DNA em lavado prepucial que apresentou maior eficiência foi a técnica que utiliza o tiocianato de guanidina. Esta técnica permite a obtenção de um DNA mais puro, pois nucleases endógenas são inativadas, restos celulares formados são retirados e nenhuma proteína é precipitada (Pitcher et al., 1989).

A lise alcalina é um método rápido para extração de DNA, com baixo risco de contaminação mas possui a desvantagem de não permitir a purificação do DNA extraído (Rofls et al., 1992). Isto pode explicar a baixa eficiência da técnica de extração pela lise alcalina nos lavados prepuciais, uma vez que esta técnica apenas expõe o DNA da célula sem nenhuma purificação deste DNA que pode conter proteínas ou outros produtos ligados ao DNA inibindo a ação da Taq DNA polimerase.

Chelex 100 é uma resina quelante que atua sequestrando metais pesados divalentes que podem danificar o DNA em processos de extração em altas temperaturas (Walsh et al., 1991). A resina não foi eficiente na extração de DNA das amostras de lavado prepucial. Fato semelhante foi observado por Morhan e colaboradores (1998) que utilizaram o método de

aquecimento para extração de DNA de *Campylobacter* sp onde algumas amostras utilizadas falharam na exposição do DNA, permitido somente a passagem de proteínas menores e RNA, sugerindo a existência de células com diferentes estruturas de superfície. A falha na extração de DNA pela resina Chelex 100 talvez possa ser explicada pela não exposição do DNA ou pela presença de inibidores da Taq-DNA polimerase, como a proteinase K que tem sua atividade inibitória inativada após incubação a 95°C por 10 min (Saiki, et al., 1988).

O limite de detecção da PCR utilizando os iniciadores Fet1 e 69ar, baseados na seqüência 23S do DNA ribossomal de *C. fetus* subsp. *venerealis* foi de 3,6 pg de DNA para a amostra de referência de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, correspondendo a aproximadamente 675 bactérias. E em lavado prepucial foram detectadas  $3,8 \times 10^2$  CFU/ml. A detecção limite dos dois procedimentos se encontram na mesma ordem de grandeza.

Um fator importante que contribuiu para alcançar esta sensibilidade foi o uso de géis de poliacrilamida corados pela prata, que permite uma melhor resolução dos produtos amplificados apresentando um limite de detecção de 3pg/mm<sup>2</sup>. (Sanguinetti et al., 1994; Caballero et al., 1997).

Não há na literatura trabalhos sobre a detecção de *C. fetus* em lavado prepucial pela PCR. Eyers e colaboradores (1993) trabalhando com a seqüência 23S para diferenciar amostras termofílicas de *Campylobacter* sp obtiveram uma sensibilidade de 0,062 pg de DNA que corresponde a aproximadamente 12 bactérias. Bastyns e colaboradores (1994), trabalhando com a mesma seqüência, testaram o limite de detecção da PCR para a amostra de *Campylobacter mucosalis* e obtiveram uma sensibilidade de 128 fg que corresponde a aproximadamente a 24 bactérias. Estes trabalhos porém não indicam a sensibilidade da PCR para a amostra de *C. fetus* e nem trabalharam com amostras clínicas.

A comparação dos resultados obtidos pela PCR e pela IFD foi realizada pela estatística kappa ( $\kappa$ ). Esta análise é utilizada quando se comparam

testes e não há um padrão ouro para comparação (Smith, 1995).

As três amostras de lavado prepucial positivas na PCR e negativas na IFD podem ser resultados falso positivos da PCR ou falso negativos da IFD. Esta última hipótese é a mais provável, pois as técnicas de PCR apresentam alta sensibilidade (Rolfs et al., 1992) e todas as medidas de controle foram tomadas para se evitar contaminação pelos produtos amplificados na PCR (citadas no item 5.12).

A eficiência destas medidas pode ser observada pela ausência de contaminação em todos os controles negativos utilizados na PCR, diminuindo assim a probabilidade destas três amostras serem resultados falso positivos da PCR.

Outro dado importante que torna a hipótese mais provável das três amostras positivas na PCR e negativas na IFD serem resultados falso negativos da IFD é que a IFD, embora seja uma técnica rápida, de fácil execução e relativa sensibilidade e especificidade, apresenta algumas limitações no que se refere a subjetividade de interpretação dos resultados (Callow et al., 1974).

As sete amostras de lavado prepucial IFD positivas e PCR negativas podem ser consideradas como resultados falso positivos da IFD devido à alta subjetividade apresentada por este teste (Callow et al., 1974). Entretanto, é mais provável que estes resultados se constituam em resultados falso negativos da PCR.

Lavados prepuciais de alguns animais podem conter urina ou outras substâncias que podem inibir a PCR. Estudos realizados com amostras de urina demonstraram a presença de inibidores da Taq DNA polimerase, que variam entre os indivíduos e chegam a variar de um dia para outro no mesmo indivíduo (Greenfield et al., 1993).

Existem poucas pesquisas sobre a estrutura bioquímica de substâncias em fluidos biológicos que podem inibir as enzimas utilizadas na PCR (Greenfield, et al., 1993), mas alguns reagentes

tradicionalmente utilizados na purificação de DNA como proteinase K, fenol, EDTA e detergentes são inibidores já conhecidos de enzimas de amplificação (Rolfs et al., 1992).

O uso destes componentes para solubilizar as células ou inativar nucleases requerem etapas adicionais para removê-los ou neutralizá-los, que devem ser realizadas para evitar resultados falso negativos obtidos na PCR.

Outro fator relevante é que para amostras que contêm pouco DNA, a purificação e precipitação deste DNA durante a extração pode significar em risco de grandes perdas (Rolfs et al., 1992). Os lavados prepuciais coletados foram submetidos à técnica de extração pelo tiocianato de guanidina que permite a obtenção de um DNA mais puro, conseqüentemente oferece maior risco de perda durante sua extração e purificação.

Outro ponto importante são os iniciadores, que foram baseados na seqüência 23S do DNA ribossomal, que contém quase a mesma informação filogenética da seqüência 16S do DNA ribossomal, entretanto a avaliação da seqüência 23S do DNA ribossomal ainda não é completa (Ludwig et al., 1999), provavelmente outras regiões contidas na seqüência 23S do DNA ribossomal ofereçam melhor sensibilidade do que a região escolhida para o desenho dos iniciadores.

## 6. CONCLUSÕES

A) A reação em cadeia da polimerase (PCR) baseada na seqüência 23S do DNA ribossomal pode ser utilizada na detecção de *C. fetus* em amostras de lavado prepucial;

B) O método utilizando tiocianato de guanidina mostrou-se adequado para a extração de DNA de amostras de lavado prepucial a serem utilizadas na PCR;

C) O limite de detecção da PCR baseada na seqüência 23S do DNA ribossomal foi de  $3.8 \times 10^2$  CFU/ml de *C. fetus* em amostras de lavado prepucial;

D) A PCR padronizada é específica na detecção de *C. fetus* em lavado prepucial;

E) A PCR e a IFD apresentaram 79% de concordância na detecção de *C. fetus* em lavado prepucial.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTYNS, K., CHAPELLE, S., VANDAMME, P., et al. Species-specific detection of *Campylobacter* important in veterinary medicine by PCR amplification of 23S rDNA areas. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.17, p.563-568, 1994.

BLOM, K., PATTON, C.M., NICHOLSON, A.M., SWAMINATHAN, B. Identification of *Campylobacter fetus* by PCR-DNA probe method. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.5, p.1360-1362, 1995.

CABALLERO, O.L., MENEZES, C.L.P., COSTA, M.C.S.L., et al. High sensitive single-step PCR protocol for diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* n.35, p.3192-3287, 1997.

CALLOW, L.H., MACGREGOR, W., PAKKER, R.J., ET AL. Immunity of cattle to *Babesia bigemina* following its elimination from the host with observations on antibodies levels detected by indirect fluorescent antibody test. *Austr. Vet. J.*, v.50, p.12-18, 1974.

CASTRO, A.F.P., ROSA, C.A.S., TROISE, C., et al. *Vibriose bovina* no Estado de São Paulo. Isolamento de *Vibrio* em um feto bovino e de um touro. *Arq. Inst. Biol.*, v.30:175-176, 1967.

CASTRO, AFP, GIORGI, W., AOKI, D., et al. Pesquisas de aglutininas anti-*Vibrio fetus* em mucos vaginais de rebanhos bovinos dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. *Biológico*, v.37, p.115-118, 1971.

CORBEIL, LB, DUNCAN, JR, SCHURING, GGD, et al. Bovine venereal vibriosis: variations in immunoglobulin class fo antibodies in genital secretions and serum. *Infect. Immun.*, v.10, p.1084-1090, 1974.

- COSTA, EA. Vibriose bovina no Estado da Bahia. I - Pesquisa de aglutininas anti-*Campylobacter fetus* no muco vaginal. **Bol. Inst. Biol. Bahia**, v.15, p.14-18, 1976.
- D'APICE, M. Ocorrência do aborto no Estado de São Paulo, devido ao *Vibrio fetus*. **Biológico**, v.22, p.15-18, 1956.
- DEKEYSER, J. *Bovine genital Campylobacteriosis*. In: BUTZLER, J.P. *Campylobacter infection in man and animal*. Boca Raton: CRC Press, 1984. 181-191 p.
- EASTERBROOKS, H.L.; PALSTRIDGE, W.N.; WILLIAMS, LF. *Vibriosis: diagnostic and therapeutic considerations*. **Vet. Med.**, v.50, p.51-56, 1955.
- EAGLESOME, MD, SAMPATH, MI, GARCIA, MM. A detection assay for *Campylobacter fetus* in bovine semen by restriction analysis of PCR amplified DNA. **Vet. Res. Comm.**, v.19, p.253-263, 1995.
- EYERS, M., CHAPELLE, S., VAN CAMP, G., GOOSSENS, H., DEWATCHER, R. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polimerase chain reaction amplification of 23s rDNA gene fragments. **J Clin. Microbiol.** v.31, p.3340-3343, 1993.
- FERNANDES, J. C. T. MOOGEN, V., PALÁCIO, P. T. Isolamento do *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis* sorotipo A de touros no Rio Grande do Sul. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.3, p.7-12, 1975.
- GARCIA, M.M. & BROOKS, B.W. *Campylobacter*. In: Prescott, J.F., Zuermer, R.L. Gyles, C.L. (ed), Thoen, C.D. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Ed.2, Iowa States University Press, p.262-272, 1993.
- GENOVEZ, M.E., SCARCELLI, E., ROJAS, S. *Campylobacteriose Genital Bovina: proposta de um diagnóstico mais sensível em touros*. **Arq. Inst. Biol.**, v.56, p.5-7, 1989.
- GEBHART, C.J., EDMONDS, P., WARD, G.E., KURTZ, J., BRENNER, D.J. A *Campylobacter hyointestinalis* sp. nov: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and others animals. **J. Clin. Microbiol.**, v.21, p.715-7820, 1985.
- GOODGER, W.J., SKIROW, S.Z. Epidemiology and economic analyses of a usually long epizootic of trichomoniasis in large California Dairy herd. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.189, p.772-776, 1968.
- GRAU, F.H. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis* in the intestinal tract and on the carcasses of calves and cattle. **J. Food. Prot.** v.51, p.3804-3808, 1998.
- GREENFIELD, L., WHITE, J.T. Sample preparation. IN: Persing, H. et al., **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. AMS, 1993. 122-133p.
- HAYDEN, J.D., HO, S.A., HAWKEY, D.M. et al. The promises and pitfalls of PCR. **Rev. Med. Microbiol.**, v.2, p.129-137, 1991.
- HERRING, A.J., INGLIS, N.F., OJEH, C.K., et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrilamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, n.16, p.473-477, 1988.
- HEWSON, PI, LANDER, KP, GILL, KPW. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Campylobacter fetus* in bovine vaginal mucus. **Res. Vet. Sci.**, v.38, p.41-45, 1985.
- HUGHES, DE. A study of the diagnosis of bovine vibriosis with special reference to the detection of agglutinins in the vaginal secretions. **Cornell Vet.**, v.43, p.431-444, 1953.
- HUM, S, STEPHENS, LR, QUINN, C. Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. **Aust. Vet. J.**, v.68, p.272-275, 1991.

- KWOK, S. HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v.339, p.237-238, 1989
- LAGE, AP, GODFROID, E, FAUCONNIER et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection for *cagA* gene in gastric biopsy specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 33, 2752-2756, 1995.
- LAGE, A.P., PELLEGRIN, A.O., COSTA, G.M., SILVA, N., REINATO, A.P.R., GOMES, L.I. Campilobacteriose Genital Bovina: diagnóstico na Escola de Veterinária da UFMG de 1976 a 1996. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.2, n.2, p.164-166, 1997.
- LANDER, KP. The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. **Br. Vet. J.**, v.146, p.327-333, 1990.
- LAWSON, JR & MacKINNON, DJ. *Vibrio fetus* infection in cattle. **Vet. Record**, 64:763-773, 1952.
- LEITE, RC. Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG, 1977. 38p Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- LEITE, R.C. HADAD, J.P.A., COSTA, G.M et al. Técnica modificada para coleta de lavado prepucial de touros, para exame de tricomonose e ou Campilobacteriose. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 19, p.434, 1995.
- LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. Pphlogeny of bactria beyond the 16s rDNA standard. **ASMnews**, v.65, n.11, p.752-757, 1999.
- MEDEIROS, PM & FIGUEIREDO, JB. Vibriose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v. 23, p.137-147, 1971.
- MELICK, P.W., WINTER, A.J., McENTEE, K. Diagnosis of vibriosis in the bull by the use of the fluorescent antibody technic. **Corn Vet.**, v.55, n.2, p.280-294, 1963.
- MIES FILHO, A. Vibriose Bovina. Evolução de um foco no Rio Grande do Sul. **Rev. Fac. Agr. Vet. UFRGS**, v.6, p.73-83, 1963.
- MOHRAN, Z.S., et al. Differentiation of *Campylobacter* isolates on the basis of sensitivy to boiling in water as measured by PCR- detectable DNA. **Appl. Envirom. Microbiol.**, v.64, n.1, p.363-365, 1998.
- OYARZABAL, O.A., WESLEY, I.V., HARMON, K.M. et al. Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. **Vet. Microbiol.**, v.58., p.61-71., 1997.
- PELLEGRIN, A.O., COSTA, G.M., SERENO, J.R.B., LEITE, R.C., SILVA, R.A. Campilobacteriose Genital Bovina em rebanhos de corte do estado do Mato Grosso do Sul: resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11. Belo Horizonte, 1994. Resumos. Belo Horizonte, p.442.
- PELLEGRIN, A.O., SERENO, J.R.B., LEITE, R.C. Campilobacteriose Genital Bovina em touros do Mato Grosso do Sul. **Rev. Bras. Reprod Anim.** v.22, p.43-47, 1998
- PELLEGRIN, A.O. A Campilobacteriose e tricomonose são doenças reemergentes? **Rev. Bras. Repr. Anim.**, v.23, n.4., p.523-531, 1999a.
- PELLEGRIN, A.O. LAGE, A.P., BARBOSA, E.F. B. et al. Ensaio imunoenzimático para detecção de imunoglobukinas A em muco-cérvico vaginal de fêmeas bovinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. Anais..., Salvador: CBM, 1999b. p.166.
- PHILPOTT, M. Diagnosis of *Vibrio fetus* infection in the bull. **Vet. Rec.**, v.82, p. 458-463, 1968.
- PITCHER, D.G., SAUNDERS, N.A., OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Lett. App. Microbiol.**, v.8, p.151-156, 1989.

- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARREY, B. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Ed. 1994, 648p.
- RAMOS, A.A., GUIDA, H.G. Aglutininas anti-*Campylobacter fetus* em mucos vaginais de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.2, p.715, 1978.
- ROCHA M.A. **Desenvolvimento e um sistema PCR nested para detecção do Herpesvírus Bovino -1 em sêmen e feto abortado**. Belo Horizonte, MG. 94p. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal - Curso de Pós graduação) em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia. UFMG. 1998.
- ROLFS, A., SCHULLER, I., FINCKH, U. et al. 1992. **PCR: Clin Diag Res**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p.35.
- ROBERTS, J.S. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 2<sup>nd</sup>ed. Ithaca, New York, 1971.
- RUCKERBAUER, G.M., MALKIN, K., MITCHELL, D. et al. Vibriosis: demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubalus* organisms in preputial fluid by immunofluorescence and culture techniques. **Can. J. Comp. Med.**, v.38, p.321-327, 1974.
- SAIKI, R.K., SOFFELS, S., SCHAT, S.J., et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, n.239, v.4839, p.487-491, 1988.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molec. Clon. Lab. Man**. New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.
- SAMUELSON, J.A., WINTER, A.J. Bovine vibriosis: the nature of the carrier state in bull. **J. Infect. Dis.**, 116:581-592, 1967.
- SANGUINETTI, C.J., DISNETO, E., SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. **Biotechniques**, n.17, p.915-918, 1994.
- SMITH, R.D. **Veterinary Clinical Epidemiology: A problem-oriented approach**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press, 1995.
- TAYLOR, D.F., EATON, M., YAN, W., CHANG, N. Genome maps of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **J. Bacteriol.**, V.174, p.2332-2337, 1992.
- VAN CAMP, G., VAN DER PIER, Y., NICOLAI, S. et al. Structure of 16S and 23S ribosomal RNA genes in *Campylobacter* species: phylogenetic analyses of the genus *Campylobacter* presence of internal transcribed spacers. **Syst. Appl. Microbiol.** 16, 361-368, 1993.
- WALSH, P.S., METZGER, D.A., HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction DNA for PCR - based typing from forensic material. **Biotechniques**, n. 1, p. 506 - 513, 1991.
- WALSH, A.F. & WHITE, F. Biochemical and serological characteristics of *Vibrio* isolated from cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.29, p.1377-1383, 1968.
- WESLEY, I.V., WESLEY, R.D., CARDELLA, M. et al. Oligodeoxynucleotide probes for *Campylobacter fetus* and *Campylobacter hyointestinalis* based on 16S rRNA sequences. **J. Clin. Microbiol.** V. 29, p.1812-1817, 1991.
- WINTER, A.J., SAMUELSON, J.D., ELKANA, M. A comparison of immunofluorescence and cultural techniques for demonstration of *Vibrio fetus*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.150, n.8, p.498-502, 1967.