

T636.089 63

F475a

2001

JOSELY FERREIRA FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA NO DIAGNÓSTICO
DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA**

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: Prof. Andrey Pereira Lage

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2001

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

06.11.01

1521101-11

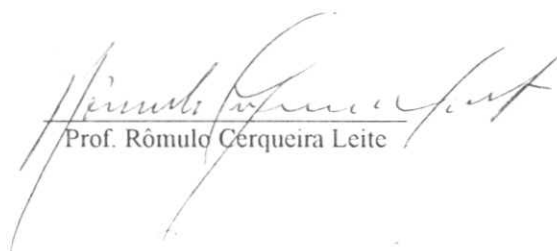
0320-6360

F475A Figueiredo, Josely Ferreira, 1974-
2001 Avaliação da imunofluorescência direta no diagnóstico da campilobacteriose genital bovina / Josely Ferreira Figueiredo. – Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2001.
34p.: il.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Infecções por *Campylobacter* – Teses. 3. Imunofluorescência – Teses. I. Título.
CDD – 636.089 693 6

Dissertação defendida e aprovada em 22 de março de 2001 pela comissão examinadora constituída por:




Prof. Andrey Pereira Lage
Orientador


Prof. Rômulo Cerqueira Leite


Prof. Zélia Inês Portela Lobato


Prof. Isabella Bias Fortes Ferraz

Aos meus queridos Pais

Joaquim e Elisa

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Andrey Pereira Lage pela amizade e incansável orientação ao longo do curso:

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite pela confiança em meu trabalho e contribuição na minha carreira profissional:

À Prof^a. Zélia Inês Portela Lobato e Dr^a Isabella Bias Fortes pelas valiosas sugestões nesse trabalho:

À amizade e companheirismo de Aiesca Oliveira Pellegrin durante todo o curso:

À Raquel, Cid, Karina, Carolina e João Paulo pela inestimável contribuição na realização desse trabalho:

Aos amigos Ana Paula Stynen, Paulo Emílio, Ana Helena, Kika, Paula, Amélia, Luciana, Beth, Simone, Giovana, Ricardo Aurélio, Geder, Cristiano, Ana Paula Belchior, José Renato, Gláucia, Nádia, Eliane, Ricardo e Neide:

Aos meus cunhados, Eustáquio e Ricardo pela amizade, exemplo e pelos bons momentos:

Ao meu querido Jairo que sempre me ajudou a persistir nos nossos objetivos:

À minha família, minhas irmãs Joely e Jonisy e meus pais Joaquim e Elisa, por serem minha vida, minha alegria e meus exemplos. A vocês agradeço por tudo que sou:

Ao Dr. Brian Brooks, Animal Diseases Research Institute, Nepean, Canadá, por nos enviar as amostras de *C. fetus* sorotipadas e ao Dr Lawrence Price, Laboratory Center for Disease Control, Winnipeg, Laboratory, Ottawa, Canadá, por nos fornecer algumas amostras de referência:

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de estudo:

À Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária – FEP-MVZ Coordenação Preventiva pelo apoio financeiro.

A todos meus sinceros agradecimentos!

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”

Guimarães Rosa

SUMÁRIOS		Pág.
RESUMO.....		13
ABSTRACT.....		13
1. INTRODUÇÃO		15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....		15
2.1. Campilobacteriose Genital Bovina.....		15
2.1.1. Diagnóstico em touros		17
2.1.1.1. Imunofluorescência direta.....		17
2.1.1.2. Outras técnicas de diagnóstico		18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....		19
3.1. Imunofluorescência direta.....		19
3.1.1. Produção de soro hiperimune.....		19
3.1.2. Precipitação de imunoglobulinas.....		19
3.1.3. Produção do conjugado.....		19
3.1.4. Reação de imunofluorescência direta		19
3.2. Preparo das suspensões bacterianas.....		20
3.3. Coleta de lavado prepucial.....		20
3.4. Inoculação do lavado prepucial		20
3.5. Processamento do lavado prepucial.....		21
3.6. Delineamento experimental.....		21
3.6.1. Leitura da reação de imunofluorescência direta.....		22
3.6.2. Avaliação do limite de detecção da imunofluorescência direta e dos efeitos inter e intra-observadores.....		22
3.6.3. Avaliação da especificidade e sensibilidade da imunofluorescência direta para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina		22
3.6.4. Avaliação da especificidade do conjugado utilizado na reação de imunofluorescência direta		22
4. RESULTADOS.....		23
4.1. Concentração bacteriana.....		23
4.2. Limite de detecção da imunofluorescência direta para <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e efeitos inter e intra-observadores		27
4.2.1. Solução salina tamponada (PBS)		27
4.2.2. Lavado prepucial não centrifugado		27
4.2.3. Lavado prepucial centrifugado.....		27
4.3. Especificidade e sensibilidade da imunofluorescência direta para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina.....		28
4.4. Especificidade do conjugado utilizado na reação de imunofluorescência direta		28
5. DISCUSSÃO.....		28
6. CONCLUSÕES		31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Amostras de referência utilizadas na avaliação da especificidade do conjugado na reação de imunofluorescência direta para diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina	23
Tabela 2 -	Concentrações das suspensões bacterianas de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354 utilizadas nos diversos experimentos	23
Tabela 3 -	Concentrações da amostra de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354 nas misturas de lavados prepuciais inoculadas	23
Tabela 4 -	Percentagem de acerto das leituras de imunofluorescência direta para <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> nas diferentes classes de concentração bacteriana	25
Tabela 5 -	Limite de detecção da imunofluorescência direta para <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> nos diferentes ensaios	27
Tabela 6 -	Percentagem de acerto dos observadores nas leituras de imunofluorescência direta para <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	27

LISTA DE FIGURAS

Figuras 1 -	Esquema de utilização das suspensões bacterianas e das misturas de lavado prepucial na avaliação da imunofluorescência direta para <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	21
Figura 2 -	Reação de imunofluorescência direta em PBS para <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> em diferentes concentrações bacterianas (1200 X).....	25

RESUMO

O teste de imunofluorescência direta para diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina foi avaliado quanto ao limite de detecção, efeito dos observadores e sensibilidade e especificidade. Além disso, a especificidade do conjugado fluorescente foi testada contra *Campylobacter* sp, *Arcobacter* sp, *Helicobacter* sp, *E. coli* e bactérias da flora normal do prepúcio. Foram usadas dez diluições na base 10 de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 em PBS ou em lavado prepucial centrifugado e não centrifugado. Todo experimento foi feito às cegas, em duplicata, com controles positivos e negativos e com três observadores. Os limites de detecção da imunofluorescência direta foram 10^4 , 10^3 e 10^2 UFC/ml, respectivamente, em PBS, lavado prepucial não centrifugado e centrifugado. Não houve diferenças significativas entre as leituras dos observadores. A técnica apresentou especificidade de 88,89% e sensibilidade de 92,59%. O conjugado fluorescente reconheceu somente *C. fetus*. A imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis* mostrou-se específica, sensível e não foi influenciada pelos observadores.

Palavras-chave: Campilobacteriose Genital Bovina, imunofluorescência direta, *Campylobacter fetus*, bovino, lavado prepucial, diagnóstico.

ABSTRACT

The direct fluorescent antibody test (DFAT) for the diagnosis of Bovine Genital Campylobacteriosis was reassessed for its detection limit, observer effect and sensitivity and specificity. Also, the specificity of the fluorescent conjugate was tested against *Campylobacter* sp, *Arcobacter* sp, *Helicobacter* sp, *E. coli* and bacteria from the preputial flora. Ten-fold dilutions of *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 in PBS or in centrifuged and non-centrifuged preputial washings were used. All experiment was done blind in duplicate with three observers. Positive and negative controls were included in each assay. The detection limits of DFAT were 10^4 , 10^3 and 10^2 CFU/ml, respectively, for PBS, non-centrifuged and centrifuged preputial washings. There was no significant observer effect intra or inter-assays. The sensitivity and specificity of DFAT were 93.59% and 88.89%, respectively. The fluorescent conjugate recognized only *C. fetus*. The DFAT was observed to be sensitive, specific and the effect of experienced observers is minimal on the performance of the test.

Key words: Bovine Genital Campylobacteriosis, direct fluorescent antibody test, *Campylobacter fetus*, bovine, preputial washing, diagnoses.

1. INTRODUÇÃO

A Campilobacteriose Genital Bovina ou infertilidade enzoótica é uma enfermidade infecciosa, sexualmente transmitida, causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. A doença causa falhas na concepção se caracterizando por quadros de repetição de cio e intervalos entre partos prolongados.

Essa doença é considerada de importância nas centrais de coleta de sêmen, pelo risco de transmissão do *C. fetus* pelo sêmen bovino e é de grande impacto econômico para a bovinocultura, devido à diminuição da eficiência reprodutiva do animal e do rebanho. A eficiência reprodutiva é afetada principalmente pelo aumento do intervalo entre partos que promove menor taxa de parição no rebanho, menor número de bezerras, diminuição do número de vacas em lactação e aumento do número de vacas secas, resultando em diminuição da produção leiteira e perdas econômicas para a pecuária nacional.

As infecções por *C. fetus* em bovinos têm diminuído em regiões onde a inseminação artificial e efetivos programas de vacinação e terapias antibióticas são praticados, porém o agente continua sendo um importante patógeno causador de problemas reprodutivos em muitos países que possuem grandes rebanhos em monta natural.

O diagnóstico e controle da Campilobacteriose Genital Bovina são realizados principalmente em touros, por serem portadores assintomáticos do agente e os grandes responsáveis pela difusão da doença nos rebanhos. A detecção de touros portadores de *C. fetus* pode estabelecer a causa dos distúrbios reprodutivos no rebanho, o qual deverá ser submetido às medidas de controle apropriadas à doença. O diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina em touros pode ser realizado por isolamento e identificação do *C. fetus* subsp. *venerealis*, reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunofluorescência direta, cada uma dessas técnicas apresenta limitações e vantagens.

A imunofluorescência direta tem sido caracterizada como um método rápido e de baixo custo para detectar touros portadores de *C. fetus*. A técnica, porém, ainda não foi avaliada quanto a

sua capacidade em diagnosticar a Campilobacteriose Genital Bovina considerando as reações inespecíficas, a interferência dos observadores e o limite de detecção. Não existem trabalhos na literatura que demonstrem as limitações e a acurácia da técnica, restringindo a confiabilidade dos técnicos em utilizá-la para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina.

O diagnóstico seguro da Campilobacteriose Genital Bovina em touros é indispensável para o controle da doença, o que aumenta a demanda do setor agropecuário por métodos eficientes de diagnóstico. A submissão do teste de imunofluorescência direta a avaliações para averiguar sua subjetividade, especificidade e limite de detecção, poderá validar a aplicação dessa técnica no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina.

Os objetivos desse trabalho são avaliar o limite de detecção, o efeito do observador, a especificidade e a sensibilidade da imunofluorescência direta para detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* em lavado prepucial de touros e a especificidade do conjugado utilizado na imunofluorescência direta, frente a amostras de *Campylobacter* sp, *Helicobacter* sp, *Arcobacter* sp e *Escherichia coli* e bactérias da flora normal do prepúcio de touros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Campilobacteriose Genital Bovina

A espécie *C. fetus*, causadora da Campilobacteriose Genital Bovina, é constituída por bactérias finas, curtas, em forma de "S", vírgula ou asa de gaivota. É melhor examinada em microscópio de contraste de fase, onde se pode ver sua morfologia e também seu rápido e característico movimento. O *C. fetus* é microaerofílico, apresentando melhor crescimento a 37°C em atmosfera com 10% de CO₂, 85% de N₂ e 5% de O₂ (Dekeyser, 1985).

O *C. fetus* tem sido separado em dois sorogrupos, designados A e B, baseado nos antígenos termoestáveis. Amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* pertencem ao sorogrupo A enquanto amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* pertencem aos sorogrupos A ou B (Berg et al., 1971). Apesar das semelhanças

de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis*, essas subespécies causam infecções e manifestações clínicas diferentes (Garcia & Brooks, 1993).

O *C. fetus* subsp. *fetus* habita o trato gastrointestinal do homem e de animais e causa ocasionalmente aborto em bovinos, aborto enzoótico em ovinos e infecções sistêmicas e entéricas no homem. O *C. fetus* subsp. *fetus* pode ser eliminado pelas fezes de animais infectados, pelos fetos abortados, ou descargas vaginais (Penner, 1988). A infecção pelo *C. fetus* subsp. *fetus* se dá pela ingestão de alimentos ou água contaminados com a bactéria.

O aborto causado por *C. fetus* subsp. *fetus*, que é esporádico em bovinos, deve-se à disseminação da bactéria presente no intestino ou vesícula biliar somada à alta afinidade da bactéria por tecidos placentários. O agente invade o útero e multiplica-se no feto imaturo imunologicamente e no placentomo, induzindo inflamação e necrose dos cotilédones e, conseqüente, aborto (Penner, 1988).

O *C. fetus* subsp. *venerealis* tem como habitat natural o trato reprodutivo dos bovinos. O agente coloniza a mucosa do prepúcio, da vagina, da cérvix, do útero e dos ovidutos dos bovinos (Dekeyser, 1985).

O *C. fetus* subsp. *venerealis* é o responsável por infertilidade em bovinos, principalmente em novilhas. A infertilidade é usualmente indicada por repetição de cio, devido ao processo inflamatório que o *C. fetus* subsp. *venerealis* ocasiona no útero, não permitindo que o óvulo fecundado se implante, ocorrendo a morte do embrião (Dekeyser, 1985).

O aborto devido ao *C. fetus* subsp. *venerealis* ocorre em menos que 10% das vacas infectadas, geralmente em primíparas ou vacas primoinfectadas e durante o quinto mês de gestação (Garcia & Brooks, 1993). As causas do aborto são o ambiente inóspito criado no útero pela bactéria (Dekeyser, 1985), a reação de hipersensibilidade à endotoxina nos tecidos placentários (Osborne & Smibert, 1964) e a restrição do suprimento de oxigênio ao embrião (Ware, 1980).

A transmissão do *C. fetus* para o touro ocorre normalmente pela monta com fêmeas infectadas, porém pode ocorrer pelo contato direto com outros touros infectados, devido ao comportamento homossexual (Garcia & Brooks, 1993) e pelo contato com cama infectada (Schutte, 1969), sendo essa última a razão pela qual 50% ou mais dos touros em centrais de coleta de sêmen podem ser afetados pelo *C. fetus* (Dekeyser, 1985).

O touro comporta-se como portador assintomático, albergando o microrganismo na cavidade prepucial, por um tempo relativamente longo, podendo permanecer infectado por toda a vida (Clark, 1971). Os touros albergam o agente na mucosa do prepúcio e porção distal da uretra (Soto & Dick, 1983). A quantidade de microrganismo presente na cavidade prepucial pode variar consideravelmente, durante a atividade sexual do animal (Newsan, 1960).

A infecção por *C. fetus* no prepúcio permanece localizada e não produz sintomas gerais nem locais. Os machos infectados não mostram alteração na capacidade reprodutiva, mantendo normais a produção e viabilidade dos espermatozoides, assim como a libido (Dekeyser, 1985).

Pelo fato do *C. fetus* poder ser transmitido via sêmen congelado na inseminação artificial, centrais de coleta e distribuição de sêmen em muitos países exigem que os touros tenham atestado veterinário garantindo serem livres de Campilobacteriose Genital Bovina, antes e após ingressarem nessas centrais, com confirmação semestral do diagnóstico. Requerem também que todos os lotes de sêmen bovino sejam testados e certificados livres de *C. fetus* (Eaglesome et al., 1995, Normas..., 1996; Eaglesome & Garcia, 1997).

A condição de portador depende da idade do animal, por atuar como um importante fator na susceptibilidade ao *C. fetus* (Soto & Dick, 1983). A maior incidência de touros portadores ocorre em animais com mais de cinco anos de idade, devido ao aumento do tamanho e número das criptas do pênis e do prepúcio (Samuelson & Winter, 1966; Soto & Dick, 1983). A baixa tensão de oxigênio e nutrientes fornecidos pelas glândulas secretoras no fundo das criptas possibilitam a aderência e multiplicação do *C.*

fetus no prepúcio dos animais mais velhos (Dekeyser, 1985).

A permanência de *C. fetus* em touros jovens (até quatro anos de idade) é curta, podendo variar de 67 dias (Soto & Dick, 1983) a três meses (Dekeyser, 1985). A recuperação espontânea desses animais está relacionada à presença de poucas criptas rasas na mucosa prepucial, criando um ambiente inadequado para a sobrevivência do agente (Samuelson & Winter, 1966). Além disso, a contaminação fecal do prepúcio e pênis é muito freqüente em touros jovens, o que induz uma mudança na flora bacteriana, competindo com a multiplicação do *C. fetus* (Briano et al., 1973).

Embora touros jovens alojem o *C. fetus* no prepúcio por aproximadamente três meses, esses animais podem servir como vetores da Campilobacteriose Genital Bovina às fêmeas sadias. Em um rebanho susceptível, basta um touro portador de poucos microorganismos, durante poucos dias, para que ocorra a transmissão da enfermidade a uma vaca susceptível (Soto & Dick, 1983).

A recuperação espontânea da infecção natural em touros mais velhos raramente ocorre, caracterizando-os como portadores do *C. fetus* (Soto & Dick, 1983; Dekeyser, 1985). Esses animais infectados mostram resultados positivos em repetidos testes de imunofluorescência direta e cultura (Philpott, 1968b).

A persistência da infecção nos touros mais velhos pode estar associada às sucessivas mudanças nos antígenos de superfície de *C. fetus*, devido aos rearranjos gênicos, durante a infecção (Eaglesome & Garcia, 1997). Essas mudanças antigênicas somadas à localização superficial do agente no prepúcio (Winter 1982), resultam em um estímulo mínimo da resposta imunológica local (IgA) (Garcia et al., 1995), que é indistinguível da resposta presente antes da infecção (Eaglesome & Garcia, 1997).

2.1.1 Diagnóstico em touros

O diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina tem sido realizado principalmente em touros, por serem responsáveis pela difusão da doença no rebanho e por se apresentarem como

portadores assintomático de *C. fetus* subsp. *venerealis* (Garcia et al., 1983).

O diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina em touros pode ser realizado com fluido prepucial ou sêmen utilizando técnicas diretas como isolamento e identificação do *C. fetus*, PCR e imunofluorescência direta (Mellick et al., 1965; Dufty & McEntee, 1969; Eaglesome et al., 1995). As técnicas indiretas para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina em touros não são eficientes devido aos baixos títulos de anticorpos anti-*C. fetus* nas secreções prepuciais de touros infectados (Winter, 1982). As técnicas sorológicas também não têm apresentado resultados satisfatórios pela ausência de uma resposta imune e por reações cruzadas com outras espécies de *Campylobacter* presentes no trato gastro-intestinal (Hewson et al., 1985).

A amostragem prepucial é mais adequada que o sêmen para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina devido à maior concentração de microorganismos, ao baixo custo e à facilidade de obtenção (Winter et al., 1967).

Para a coleta de amostra de material prepucial em touros, tem sido utilizada a pipeta de inseminação artificial (Dufty 1967, Leite, 1977), a lavagem prepucial (Dufty & McEntee, 1969; Leite et al., 1995) e a raspagem prepucial (Gibson et al., 1970). O lavado prepucial é considerado por muitos um método mais prático e mais eficiente, por permitir a obtenção de um número maior de microorganismos (Philpott, 1968b).

2.1.1.1 Imunofluorescência direta

A imunofluorescência direta foi desenvolvida e utilizada para detecção de touros infectados, como método complementar à cultura (Mellick et al., 1965; Ruckerbauer et al., 1974). É uma técnica de diagnóstico prática, confiável, rápida, precisa, simples e de baixo custo para detectar touros portadores de *C. fetus* (Philpott, 1968b; Safford, 1969).

Algumas desvantagens da imunofluorescência direta implicam em não detectar *C. fetus* em amostras com baixo número de organismos presentes (menos de 50) e em amostras congeladas devido ao rompimento da parede

celular da bactéria pelo congelamento e descongelamento (Ruckerbauer et al., 1974).

A técnica pode apresentar-se subjetiva e sujeita às dificuldades de interpretação dos achados, porém esses problemas podem ser inteiramente resolvidos pelo uso de um técnico bem treinado e experiente (Winter et al., 1967).

Para diagnóstico de Campilobacteriose Genital Bovina em touros em centrais de coleta de sêmen, a imunofluorescência direta foi utilizada por Philpott (1969a) na Inglaterra e Winter et al. (1967) nos Estados Unidos. Philpott (1968b) sugere inclusive que a imunofluorescência direta possa ser adotada nas centrais de coleta de sêmen como um teste de rotina para touros recém-adquiridos ou já residentes.

Em levantamentos epidemiológicos da Campilobacteriose Genital Bovina em touros, a imunofluorescência direta foi utilizada por diversos autores na Argentina (Villar & Spina, 1982; Soto & Di Rocco, 1984) e no Brasil (Leite, 1977; Lage et al., 1997; Pellegrin et al., 1998).

A imunofluorescência direta tem algumas vantagens sobre a cultura. É considerada uma técnica mais rápida, sendo possível diagnosticar a presença do agente em poucas horas, no mesmo dia da coleta da amostra (Dufty, 1967; Winter et al., 1967; Philpott, 1968b); possibilita identificar e diferenciar *C. fetus* de outros *Campylobacter* sp sem o uso de testes bioquímicos (Winter et al., 1967; Ruckerbauer et al., 1974); é efetiva em materiais altamente contaminados e em amostras contendo *C. fetus* não viáveis (Winter et al., 1967; Philpott, 1968b; Ruckerbauer et al., 1974); as amostras utilizadas na imunofluorescência direta podem ser transportadas ou estocadas a 4°C, por vários dias sem influência da confiabilidade do teste (Dufty, 1967; Philpott, 1968b), enquanto na cultura direta a amostra deve ser processada até seis horas de coleta (Lander, 1990).

A especificidade do conjugado produzido com anticorpos anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* utilizado na imunofluorescência direta, foi testada por Mellick et al. (1965), Dufty (1967), Philpott (1968a), Philpott (1968b), Ruckerbauer et al. (1974) e Leite (1977). Esses autores não evidenciaram reação cruzada do conjugado com *C. sputorum* biovar *sputorum*, porém as

subespécies de *C. fetus* não puderam ser diferenciadas por imunofluorescência direta.

A técnica de imunofluorescência direta, usando conjugado produzido com anticorpos anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* apresentou reação cruzada com cocos e com bastonetes provenientes de cultura de lavado prepucial negativo (Philpott, 1968b), porém esse resultado não foi evidenciado por Dufty (1967) e por Philpott (1968a) realizando trabalhos semelhantes.

2.1.1.2. Outras técnicas de diagnóstico

A técnica de isolamento e identificação do *C. fetus* subsp. *venerealis* é reconhecida como prova padrão no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina (Shepler et al., 1963; Hum et al., 1991).

Em touros, o isolamento e identificação de *C. fetus* subsp. *venerealis* indica que o animal está infectado e, portanto, práticas reprodutivas adequadas devem ser empregadas e mantidas no rebanho (Finlay et al., 1985). Entretanto, um simples exame negativo em cultura de sêmen ou esmegma não garante que o touro não seja portador do agente (Ruckerbauer et al., 1974).

A técnica de isolamento e identificação de *C. fetus* é pouco prática, quando usada como teste de rotina no diagnóstico em machos, bem como para diagnósticos epidemiológicos da doença (Shepler et al., 1963; Garcia et al., 1984). Isto deve-se à presença, no prepúcio, de organismos contaminantes de rápido crescimento (Shepler et al., 1963; Dufty & McEntee, 1969; Lander, 1990), perda da viabilidade de *C. fetus* após 24 horas a 9°C (Ruckerbauer et al., 1974), reduzido número de *C. fetus* existentes nas amostras (Shepler et al., 1963; Dufty, 1967; Winter et al., 1967) e necessidade de testes bioquímicos para identificação das subespécies após o isolamento (Bryner, 1974).

Quando a contaminação está ausente ou mínima (menos que um terço da placa) a eficiência do isolamento no diagnóstico é elevada, permitindo que 90% dos touros portadores sejam identificações e quando a contaminação está presente ocupando mais de 2/3 da placa, o isolamento do *C. fetus* é sensivelmente prejudicado, sendo necessários realizar testes em conjunto ou alternativos (Dufty, 1967).

Na tentativa de contornar o problema da contaminação, ágar seletivo para o isolamento de *C. fetus* subsp. *venerealis* e filtração foram desenvolvidos (Dufty 1967; Lander 1990). Algumas amostras de material de prepúcio e de sêmen porém, podem apresentar contaminação no isolamento de *C. fetus* que não são resolvidos nem com o uso de antibiótico nem com a filtração (Finlay et al., 1985).

A PCR foi desenvolvida pela necessidade de um método mais sensível de detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* (Eaglesome et al., 1995). A técnica tem as vantagens de ser rápida, versátil, sensível e específica (Hayden et al., 1991) e as desvantagens de ter alto custo e poder ser inibida por urina ou outras substâncias presentes em alguns lavados prepuciais (Greenfield & White, 1993).

Para diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina em sêmen de touros, Eaglesome et al. (1995) desenvolveram a PCR utilizando iniciadores derivados da sequência 16S de DNA ribossômico de *Campylobacter* sp. A PCR detectou as subespécies de *C. fetus* e cinco outras espécies de *Campylobacter* e apresentou-se sensível, com um limite de detecção de 3 UFC/ml.

Com o objetivo de detectar *C. fetus* em lavado prepucial, Stynen (2000) utilizou a PCR baseada na sequência 23S do DNA ribossômico. A técnica foi capaz de detectar $3,8 \times 10^2$ UFC/ml e de amplificar somente a espécie *C. fetus* entre outras amostra de *Campylobacter* sp., *Helicobacter* sp ou *E. coli* testadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Imunofluorescência direta

3.1.1 Produção de soro hiperimune

O soro anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* foi produzido em três coelhos de aproximadamente 2,5 Kg, segundo a metodologia de Edwards & Ewing (1972), com modificações.

Os coelhos foram submetidos a uma primeira inoculação intramuscular constituída de 0,5ml de adjuvante completo de Freund acrescido de 0,5 ml de suspensão bacteriana. Essa suspensão foi produzida com amostra de *C. fetus* subsp.

venerealis NCTC 10354 ressuspendida em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4 e padronizada pelo tubo 10 da escala de MacFarland.

Após seis dias da primeira inoculação os animais receberam quatro inoculações semanais de 0,5 ml; 1,0 ml; 2,0 ml e 4,0 ml, respectivamente, aplicadas via endovenosa. Essas inoculações foram de suspensões bacterianas sem adjuvante padronizadas pelo tubo 10 da escala de MacFarland.

Foram feitas sangrias parciais nos animais para análise da soroconversão pelo teste de aglutinação. Essas sangrias foram realizadas com intervalos de quinze dias, tendo início no dia da primeira inoculação. A sangria total foi realizada quinze dias após a última inoculação.

3.1.2 Precipitação de imunoglobulinas

A precipitação de imunoglobulinas do soro dos coelhos foi realizada pelo método de sulfato de amônio saturado e ácido caprílico (McKinney & Parkinson, 1987). Posteriormente foi feita dosagem protéica segundo a metodologia descrita por Lowry et al. (1951).

3.1.3. Produção do conjugado

O conjugado foi preparado pela ligação da IgG de coelho anti-*C. fetus* subsp. *venerealis*, previamente purificada, com isotiocianato de fluoresceína, segundo a técnica descrita por (Ruckerbauer et al., 1974).

O conjugado foi titulado em diluições seriadas a partir de 1:25 até 1:150 frente à suspensão bacteriana da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 na concentração de 10^7 UFC/ml. A diluição ótima do conjugado foi estabelecida em 1:50. O conjugado foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.1.4 Reação de imunofluorescência direta

A reação de imunofluorescência direta foi realizada segundo Mellick et al. (1965) e Winter et al. (1967).

O material a ser analisado foi aplicado em duplicata, no volume de 20 µl, em lâminas de imunofluorescência devidamente identificadas.

Como controles negativo e positivo da reação foram utilizados, respectivamente PBS pH 7.2 e suspensão da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354.

As lâminas foram colocadas a 37°C para a secagem do material e posteriormente foram colocadas em acetona a -20°C por 30 min para fixação do mesmo. Em seguida o material foi incubado com 20 µl de conjugado na diluição de 1:50, em PBS pH 7.2, em câmara úmida a 37°C por 30 min. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7.2 por 10 min e uma vez com água destilada por 10 min e montadas com glicerina tamponada (pH 9.2) e laminula. As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência episcópica (CBA, Olympus, Japão) com objetivas de 40 x e 100 x.

As amostras que apresentaram pelo menos uma bactéria fluorescente com morfologia típica de *C. fetus* foram consideradas positivas.

3.2. Preparo das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas foram produzidas a partir da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 cultivada em ágar BHI acrescido de 10% de sangue equino por 48 horas à 37°C em microaerofilia.

Após o crescimento, as colônias de *C. fetus* subsp. *venerealis* foram retiradas com "swab" e ressuspensas em aproximadamente 2 ml de PBS pH 7.2 estéril. Posteriormente, realizou-se um esfregaço corado pelo método de Gram para se avaliar a pureza da suspensão.

Seis suspensões que se apresentaram puras à coloração pelo método de Gram, codificadas A, B, C, D, E e F, foram utilizadas nos diversos experimentos. Essas suspensões foram ajustadas, com PBS pH 7.2 estéril, a uma turbidez aproximada ao tubo 3 da escala de MacFarland. Posteriormente, a concentração final das suspensões foi ajustada para absorvância 1,0 a 595 nm.

As suspensões A a F deram origem a nove diluições consecutivas na base 10. Todas as diluições foram submetidas à contagem bacteriana.

A contagem bacteriana foi realizada com 20 µl de cada uma das diluições das suspensões bacterianas, que foram aplicadas em duplicata em ágar BHI acrescido de 10% de sangue equino (Miles & Misra, 1938). As placas foram incubadas por 48 horas à 37°C em microaerofilia. Após a incubação, foram realizadas a contagem de colônias e a quantificação das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml).

3.3. Coleta de lavado prepucial

Foram coletados 18 lavados prepuciais de touros virgens entre 6 e 9 meses de idade, procedentes de propriedades sem histórico de Campilobacteriose Genital Bovina, da região de Pedro Leopoldo - MG. Esses lavados foram coletados em aproximadamente 50 ml de PBS estéril introduzidos na cavidade prepucial com auxílio de uma sonda (Leite et al., 1995).

Após massagem vigorosa do prepúcio, o lavado prepucial foi recolhido no frasco estéril e em seguida transportado em gelo ao laboratório. Uma amostra de 1 ml de cada lavado foi centrifugada a 600 x g por 10 min e o sobrenadante foi submetido a outra centrifugação de 13000 x g por 30 min. O sedimento originado da segunda centrifugação foi testado pela imunofluorescência direta (Mellick et al., 1965; Winter et al., 1967). Todos os lavados prepuciais foram negativos nesse teste.

3.4. Inoculação do lavado prepucial

Os lavados prepuciais deram origem a três misturas de lavado prepucial de 300 ml cada, denominadas de M1, M2 e M3, para isso, cada seis lavados prepuciais foram homogeneizados e originaram uma mistura. Cada mistura de lavado prepucial foi dividida em 10 alíquotas de 27 ml.

Cada alíquota de lavado prepucial recebeu 3 ml de uma das diluições das suspensões bacterianas D, E e F. Apenas uma alíquota de cada mistura não recebeu suspensão bacteriana e foi reservada para avaliação da especificidade da imunofluorescência direta (item 3.6.3).

As alíquotas de lavado prepucial inoculadas foram utilizadas diretamente sem centrifugação e também processadas (item 3.5), segundo Mellick et al. (1965) e Winter et al. (1967).

3.5. Processamento do lavado prepucial

As aliquotas provenientes das misturas M1, M2 e M3 de lavado prepucial foram centrifugadas a 600 x g por 10 min. O sobrenadante originado dessa primeira centrifugação foi submetido à segunda centrifugação de 13000 x g por 30 min. O sedimento da segunda centrifugação foi ressuspenso em 500 µl de PBS estéril pH 7,2. O material foi homogeneizado e 20 µl foram

aplicados em lâmina e processados para imunofluorescência direta.

3.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi realizado conforme o esquema mostrado na Figura 1.

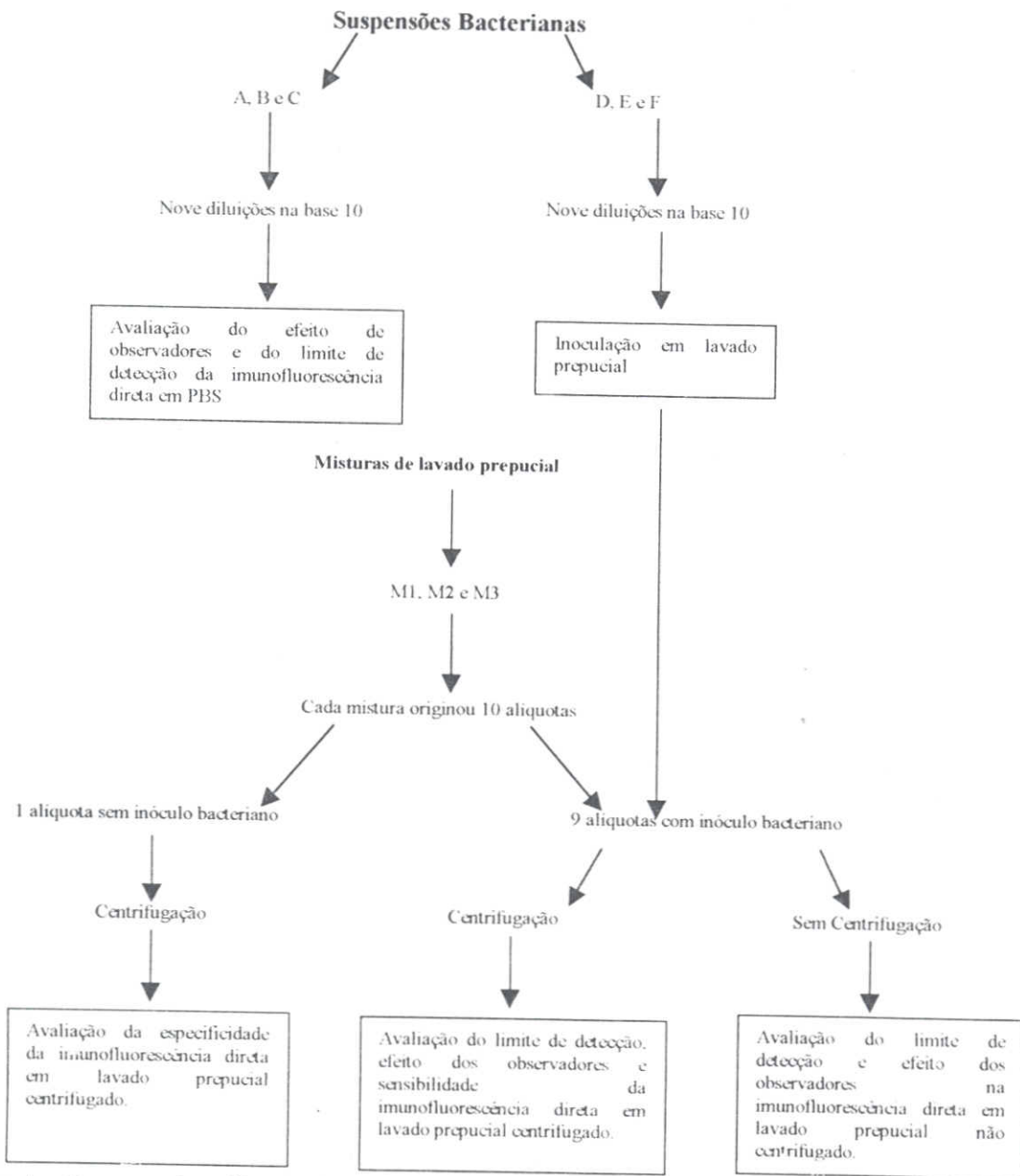


Figura 1 - Esquema de utilização das suspensões bacterianas e das misturas de lavado prepucial na avaliação da imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis*

3.6.1. Leitura da reação de imunofluorescência direta

As leituras de todos os experimentos foram realizadas por três veterinários, codificados por 1, 2 e 3, responsáveis pelo diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina na Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária – FEP-MVZ Coordenação Preventiva - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os experimentos foram realizados às cegas, pois nenhum dos responsáveis pela leitura conhecia o conteúdo das lâminas.

3.6.2. Avaliação do limite de detecção da imunofluorescência direta e dos efeitos inter e intra-observadores

A avaliação do limite de detecção da imunofluorescência direta e dos efeitos inter e intra-observadores foi realizada em três ensaios: um utilizando PBS (suspensões A, B e C) e os outros dois utilizando lavado prepucial (misturas M1, M2 e M3) diretamente, sem centrifugação, e processado como descrito no item 3.5. Cada ensaio baseou-se em um esquema fatorial: 3 suspensões ou misturas x 10 alíquotas (nove diluições da suspensão bacteriana e uma alíquota negativa) x 3 observadores x 2 repetições.

Todas as dez diluições de cada suspensão ou mistura foram homogeneizadas e 20 µl de cada uma foram colocados em duplicata em lâminas para imunofluorescência e processadas como descrito no item 3.1.4.

As leituras discordantes encontradas nas duplicatas (uma positiva e outra negativa) foram consideradas positivas.

A avaliação do limite de detecção da imunofluorescência direta foi feita para cada ensaio, considerando as leituras de todos os observadores. Para encontrar o limite de detecção de cada ensaio, observou-se, dentro de cada suspensão o limite de detecção parcial, ou seja, qual a última concentração em que todos os observadores consideraram positiva. Como foram realizadas três suspensões para cada ensaio, foram obtidos três limites de detecção parciais. Desses três limites de detecção parciais, o maior deles foi considerado como limite de detecção final.

A influência da concentração bacteriana nas leituras, para cada ensaio, foi avaliada pelo teste do qui-quadrado (Sampaio, 1998). A análise foi feita agrupando as concentrações bacterianas em três classes, sendo, classe 1: concentração 10^8 a 10^6 UFC/ml classe 2: 10^5 a 10^3 UFC/ml e classe 3: 10^2 a 1 UFC/ml.

Os efeitos inter e intra-observadores em cada ensaio foram avaliados utilizando o teste Q de Cochran (Siegel, 1975).

3.6.3. Avaliação da especificidade e sensibilidade da imunofluorescência direta para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina

Para avaliação da especificidade e sensibilidade da imunofluorescência direta para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina foram utilizados os lavados prepuciais centrifugados. Foram analisadas 81 leituras de lavado prepucial inoculado (3 misturas x 9 diluições x 3 observadores) e nove leituras de lavado prepucial não inoculado (3 alíquotas x 3 observadores). As análises foram realizadas segundo Henken et al. (1997), considerando a inoculação das amostras como prova padrão.

3.6.4. Avaliação da especificidade do conjugado utilizado na reação de imunofluorescência direta

A avaliação da especificidade do conjugado utilizado na reação de imunofluorescência direta foi realizada com as amostras de referência listadas na Tabela 1 e com bactérias isoladas da flora normal do prepúcio.

Para avaliação do conjugado frente às amostras de referência, as mesmas foram cultivadas em ágar BHI (Brain Heart infusion agar - Difco – USA) acrescido de 10% de sangue equino, por 48 horas a 37°C em microaerofilia (85% de N₂, 10% de CO₂ e 5% de O₂) e em aerobiose.

Para avaliação do conjugado frente às bactérias isoladas da flora normal do prepúcio, as três alíquotas de lavado prepucial que não receberam *C. fetus* subsp. *venerealis* foram misturadas e 20µl foram inoculados em duas placas de ágar BHI acrescido de 10% de sangue equino. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C.

sendo uma em microaerofilia e outra em aerobiose.

Após o crescimento, as colônias das amostras de referência e de bactérias da flora normal do prepúcio foram, separadamente, ressuspensas em PBS pH 7,2 estéril. De cada amostra de referência e de cada placa do lavado prepucial foi realizada uma suspensão bacteriana de concentração semelhante ao tubo 3 da escala de MacFarland.

Da suspensão bacteriana foram feitas três diluições consecutivas na base 10. A imunofluorescência direta foi realizada com 20 µl de cada diluição, conforme descrito no item 3.1.4.

Tabela 1 - Amostras de referência utilizadas na avaliação da especificidade do conjugado na reação de imunofluorescência direta para diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina.

Espécie	Amostra
<i>Arcobacter skirrowii</i>	LMG ¹ 6621
<i>A. butzleri</i>	LMG 15919
<i>Campylobacter coli</i>	NCTC ² 11366 ^T
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> sorotipo A	ADRI ³ 1811
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> sorotipo A	ADRI 1812
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> sorotipo B	ADRI 553
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> sorotipo B	ADRI 1810
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> sorotipo B	ATCC ⁴ 27374 ^T
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	NCTC 10354
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ADRI 510
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ADRI 528
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ADRI 534
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ADRI 1832
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	LCDC ⁵ 17398
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsoni</i>	(= LMG 12686)
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsoni</i>	LMG 14432 ^T
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	LMG 8843 ^T
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	NCTC 11351 ^T
<i>C. lari</i>	NCTC 11352 ^T
<i>C. sputorum</i> biovar <i>fecalis</i>	NCTC 11415
<i>C. sputorum</i> biovar <i>paraureolyticus</i>	LCDC 6577
<i>C. sputorum</i> biovar <i>paraureolyticus</i>	LCDC 6939
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i> ⁶	LMG 6447
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Helicobacter fennelliae</i>	LMG 13306

1 - Amostra tipo (type strain)

1 - LMG - Laboratorium voor Microbiologie - Rijksuniversiteit Gent - Belgica

2 - NCTC - National Culture Type Collection - Inglaterra

3 - ADRI - Animal Diseases Research Institute - Canada

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

5 - LCDC - Laboratory Center for Disease Control - Canada

6 - Antiga amostra tipo de "*C. sputorum* biovar *bubulus*" (antiga "*C. bubulus*")

4. RESULTADOS

4.1. Concentração bacteriana

Os resultados das contagens bacterianas das suspensões A a F são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações das suspensões bacterianas de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 utilizadas nos diversos experimentos.

Diluições	Concentração das suspensões (UFC/ml)					
	A	B	C	D	E	F
1	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
2	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
3	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
4	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
5	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
6	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
7	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³
8	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ²
9	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰	10 ¹	10 ¹	10 ¹

A concentração da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* nas misturas inoculadas de lavados prepuciais M1, M2 e M3 é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 nas misturas de lavados prepuciais inoculadas.

Diluições	Concentração das misturas (UFC/ml)		
	M1	M2	M3
1	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
2	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
3	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
4	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
5	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
6	10 ³	10 ³	10 ³
7	10 ²	10 ²	10 ²
8	10 ¹	10 ¹	10 ¹
9	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰

A percentagem de acerto das leituras de imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis* nos três ensaios, nas diferentes classes de concentração bacteriana é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Percentagem de acerto das leituras de imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis* nas diferentes classes de concentração bacteriana.

Ensaio	Classes de Concentração (UFC/ml)		
	10 ⁸ a 10 ⁶	10 ⁵ a 10 ³	10 ² a 1
PBS	100%	92,59%	77,77%
LPNC ^a	100%	85,18%	29,62%
LPC ^b	100%	100%	77,77%

a- Lavado prepucial não centrifugado
b- Lavado prepucial centrifugado

As reações de imunofluorescência direta em PBS para *C. fetus* subsp. *venerealis* em diferentes concentrações bacterianas são apresentadas na Figura 2.

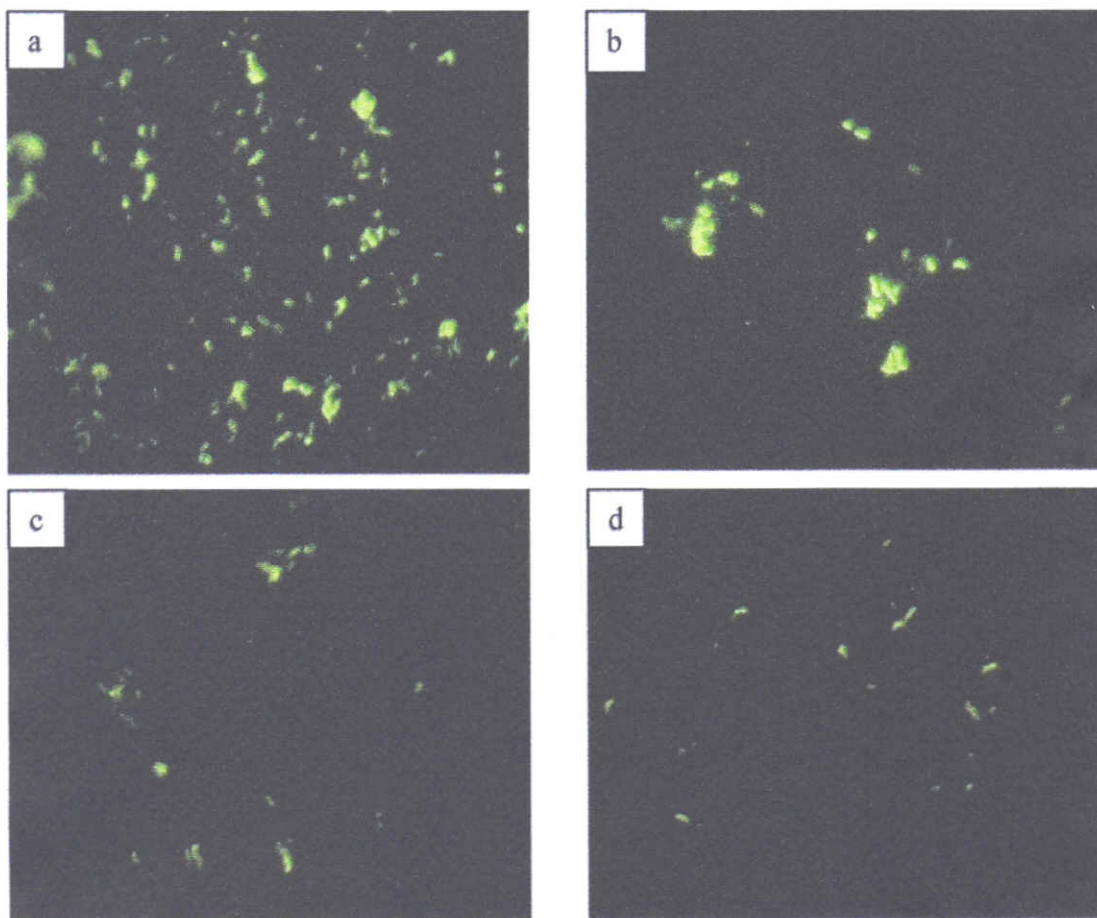


Figura 2 – Reação de imunofluorescência direta em PBS para *C. fetus* subsp. *venerealis* em diferentes concentrações bacterianas (1200 X). a. 10⁷ UFC/ml; b. 10⁶ UFC/ml; c. 10⁵ UFC/ml; d. 10⁴ UFC/ml.

4.2. Limite de detecção da imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis* e efeitos inter e intra-observadores

Os limites de detecção parciais e finais da imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis* nos diferentes ensaios são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Limite de detecção da imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis* nos diferentes ensaios.

Ensaio	Limites de detecção parciais (UFC/ml)						LDF ^c (UFC/ml)
	Suspensões			Misturas			
	A	B	C	M1	M2	M3	
PBS	10 ⁴	10 ³	10 ⁰	-	-	-	10 ⁴
LPNC ^a	-	-	-	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁴
LPC ^b	-	-	-	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ²

a- Lavado prepucial não centrifugado

b- Lavado prepucial centrifugado

c- Limites de detecção finais

A percentagem de acerto dos observadores nas leituras de imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis*, nos diferentes ensaios é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Percentagem de acerto dos observadores nas leituras de imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Ensaio	Observadores		
	1	2	3
PBS	96,29%	88,88%	85,18%
LPNC ^a	77,77%	70,37%	66,66%
LPC ^b	96,29%	92,59%	88,88%

a- Lavado prepucial não centrifugado

b- Lavado prepucial centrifugado

4.2.1. Solução salina tamponada (PBS)

O limite de detecção da imunofluorescência direta em PBS foi de 10⁴ UFC/ml (Tabela 5).

A concentração influenciou nos resultados das leituras ($\chi^2 = 7,78$, gl = 2, P<0,05). Na concentração mais alta (10⁸ a 10⁶ UFC/ml) houve 100% de acerto, na concentração intermediária (10⁵ a 10³ UFC/ml) houve 92,59% de acerto e na concentração mais baixa (10² a 1 UFC/ml) houve 77,77% de acerto (Tabela 4).

Não houve diferença significativa nos resultados das leituras dos observadores (Q = 2,80, gl = 2, P = 0,24). Pode-se observar, porém, que o observador 1 obteve melhor desempenho nas leituras (96,29%), seguido do observador 2 (88,88%) e do 3 (85,18%) (Tabela 6).

Não houve diferença estatística nas leituras de cada observador (análise intra-observador) (observador 1: Q = 1,0, gl = 2, P = 0,60; observador 2: Q = 0,54, gl = 2, P = 0,76; observador 3: Q = 0,61, gl = 2, P = 0,73).

4.2.2. Lavado prepucial não centrifugado

O limite de detecção da imunofluorescência direta em lavado prepucial não centrifugado foi de 10⁴ UFC/ml (Tabela 5).

A concentração influenciou nos resultados das leituras ($\chi^2 = 36,57$, gl = 2, P<0,001). Na concentração mais alta (10⁸ a 10⁶ UFC/ml) houve 100% de acerto, na concentração intermediária (10⁵ a 10³ UFC/ml) 85,18% e na concentração mais baixa (10² a 1 UFC/ml) 29,62% de acerto (Tabela 4).

Não houve diferença significativa nos resultados das leituras dos observadores (Q = 2,88, gl = 2, P = 0,23). No entanto, o observador 1 obteve melhor desempenho nas leituras, com 77,77% de acerto, seguido do observador 2 (70,37%) e do observador 3 (66,66%) (Tabela 6).

Não houve diferença estatística nas leituras de cada observador (análise intra-observador) (observador 1: Q = 0,61, gl = 2, P = 0,73; observador 2: Q = 0,53, gl = 2, P = 0,76; observador 3: Q = 0,77, gl = 2, P = 0,67).

4.2.3. Lavado prepucial centrifugado

O limite de detecção da imunofluorescência direta em lavado prepucial centrifugado foi de 10² UFC/ml (Tabela 5).

A concentração influenciou nos resultados das leituras ($\chi^2 = 12,96$, gl = 2, P<0,01). Na concentração mais alta (10⁸ a 10⁶ UFC/ml) houve 100% de acerto, na concentração intermediária (10⁵ a 10³ UFC/ml) 100% e na concentração mais baixa (10² a 1 UFC/ml) 77,77% de acerto (Tabela 4).

Não houve diferença significativa nos resultados das leituras dos observadores ($Q = 4,66$, $gl = 2$, $P = 0,09$). Entretanto, o observador 1 obteve melhor desempenho nas leituras com 96,29% de acerto, seguido do observador 2 (92,59%) e do 3 (88,88%) (Tabela 6).

Não houve diferença estatística nas leituras de cada observador (análise intra-observador) (observador 1: $Q = 1,2$, $gl = 2$, $P = 0,54$; observador 2: $Q = 0,33$, $gl = 2$, $P = 0,84$; observador 3: $Q = 0,75$, $gl = 2$, $P = 0,68$).

4.3. Especificidade e sensibilidade da imunofluorescência direta para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina

Das 81 leituras de lavado prepucial inoculado, 75 foram positivas pelo teste de imunofluorescência direta e das 9 leituras de lavado prepucial não inoculado, 8 foram negativas ao teste de imunofluorescência direta. A especificidade encontrada foi de 88,88% e a sensibilidade de 92,59%.

4.4 Especificidade do conjugado utilizado na reação de imunofluorescência direta

Os resultados da especificidade do conjugado frente às amostras de referência e às bactérias da flora normal do prepúcio foram concordantes para todos os observadores.

O conjugado utilizado na reação de imunofluorescência direta reagiu apenas com as amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* (ADRI 510, ADRI 528, ADRI 534, ADRI 1832 e NCTC 10354) e com as amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo A (ADRI 1811 e ADRI 1812).

Na avaliação da imunofluorescência para *C. fetus* subsp. *venerealis* frente às bactérias da flora normal do prepúcio não foram visualizadas bactérias fluorescentes por nenhum dos observadores.

5. DISCUSSÃO

O impacto econômico e os efeitos difundidos da infertilidade provocados pela Campilobacteriose Genital Bovina na exploração pecuária não deixam dúvidas da necessidade de esclarecimentos da situação epidemiológica da doença e conseqüente busca de métodos de

controle e eventual erradicação. Os avanços nos estudos epidemiológicos e no manejo sanitário dessa doença seriam notáveis se o diagnóstico fosse realizado de forma mais extensa. Isso seria possível se o método de coleta da amostra para diagnóstico da doença fosse prático e não exigisse muito equipamento e ao mesmo tempo, o diagnóstico fosse rápido e confiável.

O limite de detecção da imunofluorescência direta em PBS mostra a eficiência da técnica de imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis* sem interferência de qualquer contaminante ou resíduo, como urina, presente no lavado prepucial. Essa avaliação em PBS por não ter sido centrifugada não teve perda de bactéria, portanto forneceu dados precisos quanto à concentração bacteriana das diluições consideradas positivas.

A imunofluorescência direta em lavado prepucial não centrifugado obteve limite de detecção semelhante ao do PBS, porém as leituras nas três classes de concentrações e as leituras de cada observador apresentaram menor índice de acerto. Os piores resultados observados nesse ensaio se devem provavelmente ao não processamento do lavado prepucial, o que permite a presença de alguns componentes, como restos celulares, que podem interferir na reação e na leitura dos observadores.

As leituras do teste de imunofluorescência direta para os lavados centrifugados foram as que apresentaram melhores resultados, com maiores taxas de acerto nas diferentes classes de concentrações e inter observadores e limite de detecção mais baixo.

A reação da imunofluorescência direta em lavado centrifugado obteve melhor resultado por ter sido submetido a duas centrifugações, o que retira os componentes do lavado prepucial que podem interferir na reação, e, principalmente, concentra as bactérias em pequeno volume, facilitando o diagnóstico.

O limite de detecção da imunofluorescência direta em lavado prepucial centrifugado obtido no atual experimento foi semelhante ao limite de detecção da reação de imunofluorescência direta realizada por Philpott (1968a) em lavado prepucial, a qual detectou 50 a 100 UFC/ml e ao limite de detecção da PCR utilizada por Stynen

(2000) em lavado prepucial (10^2 UFC/ml). Foi inferior, porém, ao limite de detecção da PCR utilizada por Eaglesome et al. (1995), que foi capaz de detectar 3 UFC/ml de *C. fetus* subsp. *venerealis* em sêmen bovino.

A semelhança do limite de detecção da imunofluorescência direta ao da PCR em lavado prepucial revela a precisão da técnica em estudo. Embora a imunofluorescência direta para Campilobacteriose Genital Bovina seja uma técnica desenvolvida na década de 60, seus resultados são comparáveis aos da PCR, uma técnica mais recente e considerada por muitos autores como muito sensível e específica (Hayden et al., 1991; Eaglesome et al., 1995).

Esses dados comprovam que o lavado prepucial é uma amostra adequada para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina pela imunofluorescência direta, como sugerido por Winter et al. (1967). Esse fato facilita o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina por ser o lavado prepucial considerado um método prático, capaz de obter mais microrganismos, de fácil obtenção e de baixo custo (Winter et al., 1967; Philpott, 1968b).

Os limites de detecção da imunofluorescência direta em PBS e em lavado prepucial não centrifugado foram mais altos que o limite de detecção em lavado prepucial centrifugado, revelando que, em futuros experimentos de avaliação da técnica de imunofluorescência direta, não se deve substituir o lavado prepucial centrifugado por PBS ou mesmo deixar de centrifugar o lavado prepucial, pois as observações com estes métodos não refletem os valores reais da técnica de imunofluorescência direta.

Por ser capaz de detectar poucas bactérias em lavado prepucial centrifugado, a imunofluorescência direta apresenta vantagem em relação à técnica de isolamento e identificação. Embora esta última seja considerada padrão para diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina (Shepler et al., 1963; Hum et al., 1991), o baixo número de bactérias presente pode dificultar o diagnóstico realizado por esse método (Hoerlein et al., 1964; Winter et al., 1967; Philpott, 1968b), devido à presença de contaminantes de rápido crescimento na flora prepucial e ao curto tempo de

sobrevivência do *C. fetus* na amostra prepucial, principalmente quando o tempo entre a coleta e o processamento da amostra no laboratório é prolongado (Lander, 1990).

Os resultados das leituras da imunofluorescência direta em PBS e nos lavados prepuciais centrifugados e não centrifugados mostraram eficiência na leitura dos três observadores (altas taxas de acerto) e ausência de subjetividade da técnica. Isso pode ser explicado pelo treinamento dos observadores, pois tratam-se de técnicos que conhecem bem a morfologia da bactéria e são acostumados a realizar o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina pela técnica de imunofluorescência direta.

A exatidão das leituras dos observadores confirma a proposta de Winter et al. (1967) de que as dificuldades de interpretação dos achados da imunofluorescência direta podem ser diminuídas se os técnicos forem bem treinados e experientes.

O conhecimento do limite de detecção da imunofluorescência direta, encontrado nesse estudo, possibilita que os técnicos de laboratórios sejam treinados para dar o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina mesmo em amostras com baixa concentração de bactéria.

As concentrações bacterianas influenciaram nas leituras de todos os ensaios, mostrando que nas concentrações mais baixas, começam a aparecer as divergências inter observadores e a diminuir a porcentagem de acerto. Essas pequenas divergências inter observadores, embora não sejam significativas, foram as responsáveis pelo limite de detecção encontrado nesse estudo, ou seja, sem as divergências, principalmente na classe de concentração intermediária, o limite de detecção da técnica teria sido menor.

A ausência de experimentos anteriores que mostrem valores de especificidade e sensibilidade da imunofluorescência direta no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina limita o questionamento e a avaliação dos valores encontrados no atual estudo. Pode-se porém considerar que a imunofluorescência direta apresentou-se sensível e específica. A presença de resultados falso-negativos (perda da sensibilidade) provavelmente ocorreu devido à baixa concentração bacteriana das amostras, pois

todas as leituras dos falsos negativos foram dadas para as amostras com concentração bacteriana igual ou inferior a 10^3 UFC/ml.

Apenas uma leitura falso-positiva (perda da especificidade) ocorreu e ainda em uma das duplicatas. Apesar de ter sido utilizada pequena amostragem para avaliação da especificidade da imunofluorescência direta, o valor encontrado de 88,88% pode servir como estimativa da especificidade da técnica para ser discutida em futuros experimentos, pois estes dados de especificidade da imunofluorescência direta para detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* são inexistentes na literatura.

O conjugado utilizado na reação de imunofluorescência direta não apresentou reação cruzada com as bactérias do gênero *Helicobacter* sp e *Arcobacter* sp embora sejam filogeneticamente próximas ao gênero *Campylobacter* (Vandamme, 2000), bem como com as bactérias do gênero *Campylobacter* que não o *C. fetus*.

A especificidade do conjugado utilizado na imunofluorescência direta frente a essas amostras de referência contribui para a eficiência da técnica pois, são bactérias muito semelhantes ao *C. fetus* subsp. *venerealis* e podem ser encontradas na cavidade prepucial de touros saudáveis (Samuelson & Winter, 1966; Plastringe et al., 1961; Winter et al., 1965; Gill, 1988), em fetos abortados (Fernandez et al., 1995) e no trato intestinal de bovinos (Wesley et al., 2000; Vandamme, 2000).

O conjugado utilizado na realização desse trabalho não apresentou reação cruzada com *E. coli* nem com bactérias provenientes da flora normal do prepúcio, assemelhando com os trabalhos realizados por Mellick et al. (1965), Dufty (1967) e Philpott (1968a) e discordando do trabalho de Philpott (1968b), onde foi possível visualizar cocos e bastonetes corados.

O reconhecimento apenas de *C. fetus* pelo conjugado utilizado neste experimento assemelha-se ao encontrado por Stynen (2000) na técnica da PCR para detectar *C. fetus* em lavado prepucial e com trabalhos de imunofluorescência direta realizados por Mellick et al. (1965), Dufty (1967) e Ruckerbauer et al. (1974). A imunofluorescência direta avaliada

nesse estudo apresentou-se porém mais específica que a técnica de PCR realizada por Eaglesome et al. (1995), na qual o par de iniciadores detectou cinco outras espécies de *Campylobacter*.

Reação cruzada entre *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* é esperada devido às suas similaridades antigênicas (Winter & Dunne, 1962). Entretanto, como o conjugado desse estudo foi produzido com amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis*, que é do sorotipo A, o mesmo não reagiu com amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo B por possuírem diferenças antigênicas.

Segundo Dekeyser (1985) a imunofluorescência direta utilizando conjugado anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* apresenta resultados negativos frente às amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo B e similarmente dará resultado positivo frente às amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo A, o que foi observado no presente estudo.

A ausência de reação frente a algumas amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* assemelha-se com os resultados encontrados por Taul & Kleckner (1968) e por Belden & Robertstad (1965) que avaliaram a técnica de imunofluorescência direta, apesar destes autores não conhecerem os sorotipos das amostras testadas.

A ausência de reação na imunofluorescência direta ao *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo B não interfere no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina e nos estudos epidemiológicos da infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*, que dentro da espécie *C. fetus*, caracteriza-se como agente mais importante relacionado com os problemas reprodutivos nos rebanhos, devido ao tropismo pelo trato genital (Hum & McInnes, 1993). Além disso, a ausência de reação com *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo B na imunofluorescência direta não dificultaria a resolução dos problemas de rebanho provocados pelas subespécies de *C. fetus*, pois a infecção pelo *C. fetus* subsp. *fetus* não é enzoótica (Penner, 1988).

Os dados relativos à especificidade da técnica de imunofluorescência direta frente às amostras de referência e demais bactérias presentes na flora normal do prepúcio ressaltam duas vantagens da técnica em estudo em relação ao isolamento e identificação do agente: primeira, a

imunofluorescência é eficaz mesmo na presença de contaminantes (Shepler et al., 1963; Winter et al., 1967; Philpott, 1968b; Dufty & McEntee, 1969; Ruckerbauer et al., 1974) e segunda, não há necessidades de testes bioquímicos para diferenciar *C. fetus* das demais espécies de *Campylobacter* (Winter et al., 1967; Bryner, 1974; Ruckerbauer et al., 1974).

A técnica de imunofluorescência direta apresentou resultados satisfatórios nesse estudo, que somados à praticidade de coleta de amostra utilizada contribuirão para maior confiabilidade dos técnicos em empregá-la no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina. A imunofluorescência direta por ser rápida, prática, sensível e específica possibilita a realização de maior número de diagnósticos da Campilobacteriose Genital Bovina e, conseqüentemente, a detecção de animais portadores, possibilitando o estabelecimento de medidas de controle e prevenção da doença.

6. CONCLUSÕES

- A imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis* utilizando lavado prepucial centrifugado apresentou limite de detecção de 10^2 UFC/ml;
- A imunofluorescência direta para *C. fetus* subsp. *venerealis* é uma técnica pouco subjetiva, quando realizada por técnicos treinados;
- O conjugado utilizado na reação de imunofluorescência direta foi específico na detecção de *C. fetus* e não apresentou reação cruzada frente a outras espécies do gênero *Campylobacter* sp, *Helicobacter* sp, *Arcobacter* sp, *E. coli* e bactérias presentes na flora normal do prepúcio;
- A imunofluorescência direta apresentou-se sensível e específica para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELDEN, EL; ROBERTSTAD, GW. Application of fluorescent antibody technique for serotyping *Vibrio fetus*. *Am. J. Vet. Res.* v.26, p.1437-1441, 1965.
- BERG, RL; JUTILA, JW; FIREHAMMER, BD. A revised classification of *Vibrio fetus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.32, p.11-22, 1971.
- BRIANO, R; CORDERO, A; MERLINI, J. Trichomoniasis y Vibriosis bovina. *Aportado de Practive*, Bs. As. 1973.
- BRYNER, JH. Laboratory diagnosis of bovine abortion. *Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab.*, v. 17, p.369-378, 1974.
- CLARK, BL. A review of vibriosis bovina. *Aust. Vet. J.*, v.47, p.103-107, 1971.
- DEKEYSER, J. Bovine genital Campilobacteriosis. In: BUTZLER, JP. *Campylobacter infection in man and animal*. Boca Raton: CRC Press, 1985, 181-191p.
- DUFTY, JH. Diagnosis of vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, v.43, p.433-437, 1967.
- DUFTY, JH; McENTEE, K. Evaluation of some culture media and sampling techniques for the diagnosis of vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.* v. 45, p. 140-144, 1969.
- EAGLESOME, MD; GARCIA, MM. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v.16, n.1, p.215-225, 1997.
- 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.
- EDWARDS, PR.; EWING, WH. *Identification of enterobacteriaceae*. 3 ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972, 67-108p. Cap.5.
- FERNANDEZ, H; ROJAS, X; GAJARDO, T. Primer aislamiento de *Arcobacter cryaerophilus* a partir de un aborto bovino en Chile. *Arch. Med. Vet.*, v.27, p.111-114, 1995.
- FINLAY, RC; RUCKERBAUER, GM; STOVELL, PL. *Campylobacter fetus* in artificial insemination unit and slaughterhouse bulls in Ontario. *Can. J. Comp. Med.*, v.49, p.231-232, 1985.

- GARCIA, MM; BROOKS, BW. *Campylobacter*. In: PRESCOTT, JF; ZUERMER, RL; GYLES, CL (ed); THOEN, CD *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, Ed. 2. Iowa State University Press, p.262-272, 1993.
- GARCIA, MM; RUCKERBAUER, GM; EAGLESOME, MD; BOISCLAIR, WA. Detection of *Campylobacter fetus* in artificial insemination bulls with a transport enrichment medium. *Can. J. Comp. Med.*, v.47, p.336-340, 1983.
- GARCIA, MM; STEWART, RB; RUCKERBAUER, GM. Quantitative evaluation of a transport-enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Vet. Rec.*, v.27, p.434-436, 1984.
- GARCIA, MM; LUTZE-WALLACE, CL; DENES, AS; EAGLESOME, MD; HOLST, E; BLASER, MJ. Protein shift and antigenic variation in the S-layer of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of *sapA* homologs. *J. Bacteriol.*, v.177, n.8, p.1976-1980, 1995.
- GIBSON, CD; DREHER, WH; ZEMJANIS, R. Simplified technique for collection of preputial samples from bulls for isolation of *Vibrio fetus*. *J.A.V.M.A.*, v.157, n.6, p.834-836, 1970.
- GILL, KPW. Aerotolerant *Campylobacter* strain isolated from a bovine preputia sheath washing. *Vet. Rec.*, v.112, p.459, 1988.
- GREENFIELD, L; WHITE, JT. Sample preparation methods. In: PERSING, DH; SMITH, TF; TENOVER, FC; WHITE, TJ. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993. Cap. 6, p.122-133.
- HAYDEN, JD; HO, AS; HAWKEY, DM. The promises and pitfalls of PCR. *Rev. Med. Microbiol.*, v. 2, p.129-137, 1991.
- HEWSON, PI; LANDER, KP; GILL, KP. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Campylobacter fetus* in bovine vaginal mucus. *Rev. Vet. Sci.* v.38, p.41-45, 1985.
- HENKEN, AM; GRAAT, EAM; CASAL, J. Measurement of disease frequency. In: NOORDHUIZEN, JPTM; FRANKENA, K; HOOFD, CM; GRAAT, EAM. *Application of quantitative methods in Veterinary Epidemiology*. The Netherlands: Wageningen Pers, 1997. Cap. IV, p.63-98.
- HOERLEIN, AB; KRAMER, T; CARROL, EJ. Vibriosis in range cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.144, p.146-151, 1964.
- 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.
- HUM, S; McINNES, A. Bovine campylobacteriosis: Bacteriology and antibody detection. In: CORNER, LA; BAGUST, TJ (ed). *Australian standard diagnostic techniques for animal diseases*. Australian: CSIRO, 1993. p.1-8.
- LAGE, AP; PELLEGRIN, AO; COSTA, GM; SILVA, N; REINATO, APR; GOMES, LI. Campilobacteriose Genital Bovina: diagnóstico na Escola de Veterinária da UFMG de 1976 a 1996. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.2, n 2, p164-166, 1997.
- LANDER, KP. The application of a transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. *Br. Vet. J.*, 146, 334-340, 1990.
- 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).
- LEITE, RC; HADAD, JPA; COSTA, GM; PELLEGRINI, AO; RIBEIRO, ACCL. Técnica modificada para coleta de lavado prepuccial de touros, para exame de Tricomomose e ou Campilobacteriose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: [s.n.], 1995. p.434.
- LOWRY, HL; ROSEBROUGH, NJ; FARR, AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.2665-275, 1951.

- McKINNEY, MM; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascitic fluid. *J. Immunol. Methods*, v.96, p.271-278, 1987.
- MELLIICK, PW; WINTER, AJ; McENTEE, K. Diagnosis of vibriosis in the bull by the use of the fluorescent antibody technique. *Corn. Vet.*, v.55, n.2, p.280-294, 1965.
- MILES, AA; MISRA, SS. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.*, v.38, p.732-742, 1938.
- NEWSAN, IB. Experimental *Vibrio fetus* infection in heifers. Part.I *Aust. Vet. J.*, v.36, p.426-431, 1960.
- NORMAS sanitárias para a habilitação e funcionamento de estabelecimentos de produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino dos estados-membros do Mercosul. *Rev. Bras. Reprod. Anm.*, v.20, p.42-45, 1996. (Proposta de modificação da resolução n.68/94 do MAA).
- OSBORNE, JC; SMIBERT, RM. *Vibrio fetus* endotoxin. I. Hypersensitivity and abortifacient action. *Cornell Vet.*, v.54, p.561-572, 1964.
- PELLEGRIN, AO; SERENO, JRB; LEITE, RC; COSTA, GM; COSTA E SILVA, E. Campilobacteriose genital bovina em touros do mato grosso do sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, n.1, p.43-46, 1998.
- PENNER, JL. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.1, n.2, p.157-172, 1988.
- PHILPOTT, M. Diagnosis of *Vibrio fetus* Infection in the bull. I - A modification of Mellick's fluorescence antibody test. *Vet. Rec.*, v.82, p.424-426, 1968a.
- PHILPOTT, M. Diagnosis of *Vibrio fetus* infection in the bull. II An epidemiological survey using a fluorescent antibody test and comparing this with a cultural method. *Vet. Rec.*, v.82, p.458-463, 1968b.
- PHILPOTT, M. Studies on vibriosis in an A.I stud. *Vet. Rec.*, v.85, p.404-407, 1969.
- PLASTRIDGE, WN; KOTHS, ME; WILLIAMS, LF. Antibiotic mediums for the isolation of vibrios from bull semen. *Am. J. Vet. Res.*, v. 22, p. 867-870, 1961.
- RUCKERBAUER, GM; MALKIN, K; MITCHELL, D; BAULANGER, P. Vibriosis: demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubulus* organisms in preputial fluid by immunofluorescence and culture techniques. *Can. J. Comp. Med.*, v.38, p.321-327, 1974.
- SAFFORD, JW. Bovine vibriosis and regulatory veterinary medicine. *J.A.V.M.A.*, v.155, n.15, p.2178-2181, 1969.
- SAMPAIO, IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 1998. 221p.
- SAMUELSON, JD; WINTER, JA. Bovine vibriosis the nature of the carrier state. In: *The Bull. Jour. Infec. Dis.*, v.116, p.881-892, 1966.
- SCHUTTE, AP. Some aspects of *Vibrio fetus* infection in bulls. *Med. Veeartsenijschool Rijksuniversiteit Gent*, v.13, n.88, 1969.
- SHEPLER, CM; PLUMER, GJ; FABER, JE. Isolation of *Vibrio fetus* from bovine preputial fluid, using millipore filters and an antibiotic medium. *Am. J. Vet. Res.* 24, n.101, 1963.
- SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica*. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. Cap. 7, p.181-188.
- SOTO, P; DICK, A. Campylobacteriosis: infección experimental de toros jóvenes. *Rev. Med. Vet.* V.64, n.3, p.166-169, 1983.
- SOTO, P; DI ROCCO, MJ. Campylobacteriosis bovina: Prevalencia en diversas zonas de la República Argentina. *Revista de Investigaciones Agrop.* v.19, n.2, p.273-279, 1984.
- STYNEN, APR. *Detecção de Campylobacter fetus em lavados prepuciais de touros pela PCR*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG, 2000. 36p Dissertação (Mestrado).

TAUL, LK; KLECKNER, AL. Fluorescent antibody studies of *Vibrio fetus*: staining characteristics in semen, preputial exudate, and pure culture. *Am. J. Vet. Res.*, v.29, p. 711-715, 1968.

VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteriaceae. In: NACHAMKIN, I. BLASER, M.J. *Campylobacter*. 2ed. Washington DC:ASM Press, 2000. Cap.1, p.3-27.

VILLAR, JÁ; SPINA, EM Campilobacteriosis (vibriosis) bovina. Una recopilación de datos sobre su incidencia en el periodo 1966-1981. *Gac. Vet.* V.44, p.647-658, 1982.

WARE, DA. Pathogenicity of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in causing infertility in cattle. *Br. Vet. J.*, v.136, p.301, 1980.

WESLEY, VI; WELLS, SJ; HARMON, KM; GREEN, A; SCHROEDER-TUCKER, L; GLOVER, M; SIDDIQUE, I. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, n.5, p.1994-2000, 2000.

WINTER, AJ. Microbial immunity in the reproductive tract. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.181, n.10, p.1969-1073, 1982.

WINTER, AJ; DUNNE, HW. An antigenic analysis of *Vibrio fetus*. I. Properties of soluble extracts of the organisms. *Amer. Jour. Vet. Res.*, v.23, p.150-158, 1962.

WINTER, AJ; BURDA, K; DUNN, HO. An evaluation of cultural techniques for the detection of *Vibrio fetus* in bovine semen. *Cornell Vet.* v. 55, n. 3, p. 431- 4, 44, 1965.

WINTER, AJ; SAMUELSON, JD; 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.

UFMG - ESCOLA DE VETERINÁRIA - BIBLIOTECA

Doação de:

Ed. Cursos Pós-Graduados

Preço

R\$ 5,00

Data:

05.11.01