

Jordana Almeida Santana

**Infecção experimental intravaginal de camundongos BALB/c com
Campylobacter fetus subsp. *venerealis***

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Andrey Pereira Lage

Coorientadores: Dr^a Telma Maria Alves
Prof. Vasco Azevedo

**Belo Horizonte
UFMG - EV
2012**

S232i Santana, Jordana Almeida, 1987-
Infecção experimental intravaginal de camundongos BALB/c com *Campylobacter fetus*
subsp. *veneralis* / Jordana Almeida Santana. – 2012.
42 p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage

Coorientadores: Telma Maria Alves, Vasco Azevedo

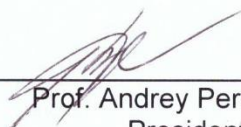
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. *Campylobacter fetus* – Teses. 3. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 4. Infecções por *Campylobacter* – Teses. 5. Infecção experimental – Teses. I. Lage, Andrey Pereira. II. Alves, Telma Maria. III. Azevedo, Vasco. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.089 693 6

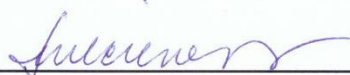
Dissertação defendida e aprovada em 10 de fevereiro de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Andrey Pereira Lage
Presidente



Prof^a. Ana Paula Reinato Stynen



Prof^a. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

Dedico este trabalho à mamãe por nossa vitória
e às amigas do LBA por nossa conquista.

“A satisfação está no esforço e não apenas na realização final.”
Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus. Sem Ele seria impossível acreditar nos meus sonhos e seguir em frente.

Agradeço à mamãe, meu exemplo, por acreditar em mim mais que eu mesma, e me mostrar desde criança que a conquista é fruto de muito esforço e perseverança.

Agradeço ao papai pelo carinho, companheirismo e saudade com a qual ele sempre me recebe nas minhas poucas idas a Sacramento.

Agradeço aos meus avós, que embora morem longe, estão comigo sempre! Eu morro, morro, morro de saudade!

Agradeço ao Tio Ruy, à Tia Nise, à Tia Rally, ao Tio Zé, à Mara, à Adriana, à Alessandra e ao Ryan por todo o amor e carinho com que me receberam em BH.

Agradeço à UFMG e todo o pessoal que trabalha aqui por serem tão acolhedores e dispostos a ajudar.

Agradeço ao Prof. Andrey por participar do meu crescimento profissional e pessoal ao me dar a oportunidade de fazer parte do seu grupo. Obrigada pela confiança, amizade e orientação.

Agradeço ao Prof. Marcos, que para mim é um anjo, por todo amparo, paciência, compreensão, amizade, direcionamento e confiança.

Agradeço à prof. Tatiane pela paciência e grande contribuição com a parte histopatológica deste trabalho.

Agradeço à minha co-orientadora Telma, mais conhecida como a minha segunda mãe, por estar ao meu lado sempre, por me fazer acreditar em mim mesma, por vibrar comigo a cada etapa cumprida do meu experimento, por confiar em mim e por ser tão especial.

Agradeço à Ana Paula por ter alegrado meus dias tristes, por ter me ajudado tanto no experimento, ter me ensinado coisas para a profissão e para a vida e, principalmente, por querer meu bem.

Agradeço à Ju, que eu tenho certeza que é um anjo, por sempre estar perto quando estou muito encrocada, por me acalmar em todos os aspectos, por fazer eu ver o lado bom das coisas e por me ensinar que nada acontece por acaso.

Agradeço à Giovanna (Ladris) por ser uma das amigas mais engraçadas que eu tenho, por me fazer rir o tempo todo, por se preocupar comigo, por confiar em mim e estar sempre disposta a me ajudar.

Agradeço à Elaine por sempre me apoiar, me escutar na hora do desespero, se dispor a me ajudar em todos os momentos e tentar me ensinar a usar mais a razão, ao invés da emoção.

Agradeço ao Danilo pelo companheirismo, pela paciência com tantas mulheres juntas e pelo pão de queijo ótimo que ele faz.

Agradeço à minha família de BH, meus amigos que estarão sempre no meu coração: Bruno, Aninha, Eriquita, Fernandinha, Gabriel, Val e Ártus. Sem o apoio, a compreensão e a amizade de vocês, eu não teria conseguido.

A todos que participaram dos momentos inesquecíveis que passei nestes dois anos.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	12
2.1 CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA	12
2.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA CGB.....	13
2.3 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	15
3. HIPÓTESE	17
4. OBJETIVO	17
5. MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1 AMOSTRA DE <i>C. fetus</i> SUBSP. <i>venerealis</i> P3	17
5.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO DA AMOSTRA DE <i>C. fetus</i> SUBSP. <i>venerealis</i> P3	17
5.3 DESENHO EXPERIMENTAL	17
5.4 ANIMAIS	18
5.5 PESQUISA PARA <i>C. fetus</i> SUBSP. <i>venerealis</i> EM CAMUNDONGOS BALB/C	18
5.6 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL.....	19
5.7 LAVADOS VAGINAIS	19
5.8 EUTANÁSIA E COLETA DO TRATO GENITAL	19
5.9 ISOLAMENTO.....	19
5.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA	20
5.11 IMUNOISTOQUÍMICA.....	20
5.12 HISTOPATOLOGIA	21
5.12.1 Determinação da fase de ciclo estral.....	21
5.12.2 Avaliação histopatológica	21
5.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	21
5.14 ANIMAIS POSITIVOS PARA A INFECÇÃO POR <i>C. fetus</i> SUBSP. <i>venerealis</i>	22
6. RESULTADOS	22
6.1 ANIMAIS POSITIVOS PARA INFECÇÃO POR <i>C. fetus</i> SUBSP. <i>venerealis</i>	22
6.2 ANIMAIS POSITIVOS PARA A INFECÇÃO POR <i>C. fetus</i> SUBSP. <i>venerealis</i> NO ISOLAMENTO.....	23
6.3 ANIMAIS POSITIVOS PARA A INFECÇÃO POR <i>C. fetus</i> SUBSP. <i>venerealis</i> NA IFD23	
6.3.1 IFD das amostras isoladas de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	23
6.3.2 IFD das amostras do meio TEM	23
6.3.3 IFD do esfregaço do tecido vaginal em lâmina.....	23
6.4 ANIMAIS POSITIVOS PARA A INFECÇÃO POR <i>C. fetus</i> SUBSP. <i>venerealis</i> NA IHQ	24
6.5 HISTOPATOLOGIA	25
6.5.1 Influência das fases do ciclo estral durante a inoculação no estabelecimento da infecção e na recuperação de isolados de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	25
6.5.2 Influência das fases do ciclo estral durante a eutanásia na observação de alterações histopatológicas e na recuperação de isolados de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	27
6.5.3 Alterações histopatológicas e recuperação de amostras isoladas de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> em um período de 7 dias de infecção.....	29
6.6 VISUALIZAÇÃO DO <i>C. fetus</i> SUBSP. <i>venerealis</i> POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	29

7. DISCUSSÃO.....	30
8. CONCLUSÃO.....	36
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escore de vaginite para avaliação histopatológica.....	21
Tabela 2 - Animais infectados por <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> durante a avaliação experimental	22
Tabela 3 - Animais detectados como positivos no isolamento de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> por dia analisado.....	23
Tabela 4 - Porcentagem de animais infectados por <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> diagnosticados como positivos em cada método de diagnóstico utilizado no estudo.....	25
Tabela 5 – Estimativa das fases do ciclo estral em que os animais positivos para a infecção por <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> foram inoculados.....	26
Tabela 6 - Prováveis fases do ciclo estral em que os animais positivos no isolamento de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> foram inoculados	27
Tabela 7 - Escore de vaginite e porcentagem de isolamento de acordo com a fase do ciclo estral estimada durante a eutanásia	27
Tabela 8 - Escore de vaginite e porcentagem de isolamento de acordo com dia pós- infecção..	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental indicando todas as etapas realizadas durante os 7 dias avaliados para a infecção por <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> P3.	18
Figura 2 - Amostras de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> detectadas em uma fêmea de camundongo BALB/c experimentalmente infectada, com 2 dias pós-inoculação, pela técnica de IFD.....	24
Figura 3 - Histologia vaginal de camundongos BALB/c fêmeas em diferentes fases do ciclo estral	26
Figura 4 - Histologia vaginal de camundongos BALB/c fêmeas infectadas por <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> em diferentes fases do ciclo estral	28
Figura 5 - Eletromicrografia de varredura de corno uterino de camundongo BALB/c após 9 dias de infecção por <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	30

RESUMO

A campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma doença venérea de grande importância para a pecuária mundial. Apesar de relevante, poucas são as informações a respeito de sua patogenia e resposta imunológica do animal, o que poderia ser demonstrado através de um modelo de infecção experimental em um animal de laboratório. O objetivo deste estudo foi infectar camundongos BALB/c com *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* por via intravaginal e estabelecer um modelo animal para permitir estudos deste microrganismo. Camundongos BALB/c foram inoculados, via intravaginal, com *C. fetus* subsp. *venerealis*, e a infecção foi avaliada por 7 dias. Durante este período, diariamente, foram coletados lavados vaginais para a realização das técnicas de isolamento e Imunofluorescência direta (IFD) com o intuito de se identificar a bactéria. Após a eutanásia dos animais, o trato genital foi coletado para a realização das técnicas de Imunoistoquímica (IHQ), Hematoxilina e Eosina (HE) e IFD do esfregaço do tecido vaginal em lâmina. Foi observado que camundongos BALB/c são infectados por *C. fetus* subsp. *venerealis*, por via intravaginal, em qualquer estágio do ciclo estral sem a necessidade de imunossupressão ou modificação do ciclo, permanecendo na vagina destes animais por até 7 dias após a inoculação experimental, o que permite concluir que o camundongo BALB/c pode ser usado como modelo de infecção experimental para estudos sobre o *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Palavras-chave: campilobacteriose genital bovina; infecção experimental; *C. fetus* subsp. *venerealis*; camundongos BALB/c.

ABSTRACT

The bovine genital campylobacteriosis (BGC) is a venereal disease of great importance to the world's livestock. Despite its relevance, there is little information about its pathogenesis and animal immune response, which could be demonstrated by a model of experimental infection in a laboratory animal. The objective of this study was to infect BALB/c mice with *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, intravaginally, and establish an animal model in which this microorganism can be studied. BALB/c mice were inoculated intravaginally with *C. fetus* subsp. *venerealis* and infection was assessed by 7 days. During this period, they were collected vaginal washes for carrying out culture and Direct Immunofluorescence (DIF) techniques to identify the bacteria. Every day, after euthanasia, the genital tracts were removed and subjected to Immunohistochemistry (IHC), Hematoxylin and Eosin (HE) and DIF of the vaginal tissue imprint in slide. It was observed that BALB/c mice are infected by *C. fetus* subsp. *venerealis*, intravaginally, at any stage of estrous cycle without the need of immunosuppression or estrous cycle modification, remaining in the vagina of these animals for up to 7 days after experimental inoculation, which allows conclude that the BALB/c mouse can be established as experimental infection model for studies about *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Keywords: bovine genital campylobacteriosis, experimental infection, *C. fetus* subsp. *venerealis*, BALB/c mice.

1. INTRODUÇÃO

A campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma doença sexualmente transmissível, causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, que contribui com baixos índices reprodutivos em propriedades de bovinos de corte e leite.

Apesar dos estudos realizados em torno desta enfermidade, muito pouco se sabe a respeito de sua patogênese e dos mecanismos envolvidos na interação entre a bactéria e o hospedeiro. A complexidade de manejo, aliada à dificuldade de obtenção e o alto custo de sistemas experimentais envolvendo bovinos retardam o progresso no campo de conhecimento da CGB e destaca a necessidade de novas alternativas que busquem esclarecer os mistérios desta moléstia.

O desenvolvimento de modelos alternativos de laboratório tem por finalidade aumentar o acesso, diminuir os custos e ampliar os estudos de diversas doenças que afetam animais considerados complicados de se estudar. A elaboração de um modelo experimental representativo da CGB aumentaria as chances de prevenção, tratamento e cura desta doença, pois possibilitaria o entendimento dos vários mecanismos de patogenicidade do *C. fetus* subsp. *venerealis* e da resposta imunológica que o mesmo pode incitar no hospedeiro.

Deste modo, a realização deste trabalho seria um passo em direção à elaboração de um modelo de infecção experimental para se estudar os mecanismos que medeiam a colonização do trato genital pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* e os recursos de proteção que o hospedeiro utiliza contra a infecção, desvendando, assim, os diversos mistérios ainda obscuros e sem respostas desta enfermidade que acomete o mundo todo.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1 CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA

A CGB é uma doença de caráter venéreo que está constantemente associada a falhas reprodutivas nos rebanhos bovinos e, conseqüentemente, relacionada a perdas econômicas significativas para produtores de gado de leite e corte (Alves *et al.*, 2011).

Esta enfermidade é causada pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*, um bastonete Gram negativo, espiralado, em forma de vírgula, “S” ou asa de gaivota, que necessita de atmosfera rica em CO₂ (10%) e reduzida concentração de O₂ (5%) para seu crescimento. Possui um ou dois flagelos polares, sendo sua motilidade melhor observada em microscopia de contraste de fase ou de campo escuro (Vandamme *et al.*, 1991a).

Este agente etiológico é responsável por repetições de cio com intervalos aumentados e irregulares, intervalos prolongados entre partos, morte e absorção embrionária, abortos esporádicos, queda na produção de leite, além de reações inflamatórias do trato genital que podem levar os animais à infertilidade temporária ou permanente (Alves *et al.*, 2011).

A transmissão ocorre durante a cópula ou inseminação artificial. O agente pode passar de um touro infectado ou sêmen contaminado para uma fêmea susceptível, ou de uma fêmea infectada para um macho susceptível (Roberts, 1971). Fômites, cama contaminada e comportamento homossexual entre animais jovens também podem tornar-se vias de infecção (Lage e Leite, 2000).

A patogenia da doença ocorre com a colonização do trato genital da fêmea de forma ascendente, multiplicando-se na vagina, cérvix, útero e ovidutos, sendo normalmente eliminada após o descanso

sexual (Alves *et al.*, 2011). Nos machos, o agente ocupa a cavidade prepucial, infectando as criptas prepuciais e multiplicando-se nas glândulas penianas e na uretra distal, porém, não provoca quaisquer lesões ou reações inflamatórias, o que os tornam assintomáticos, embora abriguem o microrganismo durante toda a vida (Eaglesome e Garcia, 1992).

A manutenção e a disseminação da CGB no rebanho são totalmente dependentes do manejo reprodutivo da fazenda. Propriedades que utilizam monta natural, touros mais velhos ou touros de repasse associados à inseminação artificial são mais susceptíveis e apresentam alta prevalência para a doença (Pellegrin, 1999) que, quando detectada, já trouxe grandes prejuízos ao produtor, uma vez que os sinais clínicos são pouco evidentes e geralmente percebidos tardiamente (Lage, 2001).

Países cujo sistema de manejo dominante é a monta natural possuem alta prevalência da doença em seus rebanhos. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a CGB está amplamente distribuída pelo mundo, sendo considerado um problema na África do Sul, Argentina Austrália, Canadá, Estados Unidos da América, França, Inglaterra, Nova Zelândia, dentre outros (OIE, 2005).

No Brasil, um estudo realizado por Pellegrin (1999) relatou índices de 12,5% a 27% de infecção. Outro trabalho da mesma autora demonstrou que, no Pantanal Mato-Grossense, houve prevalência de 52,3% de infecção em touros e 89,5% de animais infectados nas propriedades (Pellegrin *et al.*, 2002). Esses resultados concordam com Miranda (2005), que apresentou prevalência de 50,8% de touros infectados provenientes de rebanhos com mais de 500 animais nos Estados de Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo e Tocantins, regiões que

concentram as maiores populações de bovinos de corte do país e que demonstram, claramente, a distribuição da CGB no território nacional.

Estratégias para reduzir esta ampla prevalência de animais infectados têm sido elaboradas e estudadas ao longo dos anos. A vacinação pode ser útil no combate à doença, entretanto, não deve ser adotada como única medida profilática (Fóscolo *et al.*, 2005). A implementação de programas de inseminação artificial com segregação de animais jovens e criteriosa avaliação dos touros de repasse também são medidas que reduzem a disseminação e facilitam o controle da CGB (Lage e Leite, 2000). No entanto, são métodos de difícil execução em grandes rebanhos que mantêm sistema de criação extensivo, devido às dificuldades tecnológicas e, conseqüentemente, ao alto custo de implantação e manutenção. Além disso, a segregação de animais jovens para formação de rebanho livre da doença é impraticável, pois é necessário que haja segregação total de animais sadios de infectados, não sendo possível ou sendo economicamente inviável (Lage, 2001).

2.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA CGB

O diagnóstico da CGB inicia-se com a avaliação do histórico da propriedade. A partir de sinais clínicos como repetições de cio frequentes, abortos esporádicos, vacas vazias no final da estação de monta e outros problemas que caracterizam um baixo desempenho reprodutivo das fêmeas, cria-se a suspeita da enfermidade no local. Embora os sintomas sejam observados nas vacas, o teste diagnóstico é, preferencialmente, realizado nos touros, pois além de menor quantidade, são eles os responsáveis pela transmissão no rebanho (Stoessel, 1982).

O material coletado para a realização dos testes diagnósticos nos touros é o esmegma, que pode ser obtido por raspador ou pipeta de

inseminação artificial e lavado prepucial (Genovez *et al.*, 1986; Alves *et al.*, 2011). Nas vacas, pode ser coletado muco cérvico-vaginal com pipeta de inseminação artificial ou tampão absorvente (Hum e McInnes, 1993; Stynen *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2011). O diagnóstico também pode ser realizado de fetos abortados e membranas fetais (Stoessel, 1982; Alves *et al.*, 2011).

A coleta requer um manuseio cuidadoso, pois a bactéria tem viabilidade limitada quando se encontra fora do hospedeiro. A alta tensão de oxigênio em condições atmosféricas normais e a grande quantidade de microrganismos contaminantes podem se tornar obstáculos na detecção de animais infectados durante o transporte das amostras até o laboratório, pois a bactéria pode se tornar inviável ou ser suprimida por outros microrganismos como *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. (Dufty, 1967; Dufty e McEntee, 1969; Clark *et al.*, 1972; Lander, 1990a).

Para minimizar estes problemas e assegurar a viabilidade do *C. fetus* subsp. *venerealis*, o material coletado é inoculado imediatamente em um meio de transporte e enriquecimento (TEM) que proporciona uma atmosfera microaerofílica, além de inibir o crescimento de contaminantes que prejudicam o diagnóstico laboratorial final (Lander, 1990a; Alves *et al.*, 2011). Esta seletividade é resultado da presença de antimicrobianos e reagentes que criam uma atmosfera pobre em oxigênio, impedindo o crescimento de outros microrganismos e favorecendo o crescimento de *C. fetus* subsp. *venerealis* (Monke *et al.*, 2002).

De Lisle *et al.* (1982) relataram que *C. fetus* subsp. *venerealis* sobrevive em meio TEM por um tempo de 24 horas a 72 horas, à temperatura ambiente, se o inóculo for de 10^3 e 10^5 bactérias, respectivamente, mas o crescimento é progressivo até 48 horas, abrandando-se após este período de incubação (Garcia *et al.*, 1984). O meio de enriquecimento e transporte promove maior

recuperação de *C. fetus* subsp. *venerealis*, além de possibilitar um maior tempo para o transporte das amostras entre fazendas e laboratórios, aumentando a sensibilidade dos métodos diagnósticos usados para detectar animais infectados (Lander, 1990b; Monke *et al.*, 2002).

A técnica de isolamento, cultura e identificação do *C. fetus* subsp. *venerealis* é reconhecida como prova padrão no diagnóstico da CGB, pois a recuperação da bactéria indica que o animal está infectado (Shepler *et al.*, 1963; Hum *et al.*, 1991). Entretanto, este método é menos sensível quando a bactéria está inviável ou suprimida por contaminantes do meio (Shepler *et al.*, 1963; Dufty e McEntee, 1969).

Com o intuito de solucionar o problema de contaminação, o isolamento de *C. fetus* subsp. *venerealis* pode ser realizado em meio seletivo, constituído de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com 10% de sangue desfibrinado equino, acrescido de suplemento seletivo de Skirrow (SKM) para *Campylobacter* spp. (Oxoid, Inglaterra). A utilização de uma membrana de celulose ($0,45 \mu\text{m}$ - $0,60 \mu\text{m}$) por cima do ágar com o intuito de filtrar o meio TEM antes de ser estriado nas placas também pode reduzir a contaminação (Dufty 1967; Lander, 1990a), porém, algumas amostras podem conter um grande número de contaminantes, que não é reduzido com os antibióticos adicionados ao ágar seletivo, mesmo com a filtração em membrana de celulose (Finlay *et al.*, 1985). Em ocasiões onde há baixíssima quantidade de bactérias, o método de filtração pode prejudicar ao invés de favorecer a recuperação, pois, embora promova a redução dos contaminantes, pode reduzir também o número de *C. fetus* subsp. *venerealis* presente nas amostras coletadas (Dufty, 1967; Hum *et al.*, 1994).

A Imunofluorescência Direta (IFD) foi desenvolvida para complementar a técnica para detecção do *C. fetus* subsp. *venerealis*

em animais infectados (Mellick *et al.*, 1965; Ruckerbauer *et al.*, 1974). É um método bastante utilizado em levantamentos epidemiológicos (Leite, 1977; Lage *et al.*, 1997; Pellegrin, 1999), sendo efetivo em materiais altamente contaminados e, também, em amostras não viáveis, as quais podem ser estocadas a 4°C por vários dias, sem influência na confiabilidade do teste (Dufty, 1967). Estas vantagens levam a IFD a ser considerada por alguns autores como a técnica mais sensível empregada no diagnóstico da CGB, pois não sofre influência de contaminantes, nem é inibida por resíduos presentes no material coletado, como acontece com outros métodos utilizados para detectar esta enfermidade (Winter *et al.*, 1997; Philpott, 1968b; Ruckbauer *et al.*, 1974; Figueiredo *et al.*, 2002).

Outras técnicas também podem ser usadas para o diagnóstico da CGB. A imunistoquímica (IHQ) é uma delas, e resume-se à identificação de antígenos em cortes de tecido por meio de anticorpos específicos. Uma vez que ocorre a ligação antígeno-anticorpo, é possível visualizar uma reação por microscopia de luz, sendo um método conceitualmente simples, mas que pode tornar-se complexo quando exige maior sensibilidade e especificidade (Ramos-Vara, 2005). Na CGB, esta técnica é pouco utilizada e, geralmente, é aplicada a fetos abortados, pois é necessário que o animal esteja morto para que a mesma seja executada (Campero *et al.*, 2005).

Em meio a tantos métodos disponíveis, Lander (1990b) e Schulze *et al.*, (2006) destacaram a importância de se utilizar mais de uma técnica de diagnóstico na detecção da CGB, pois o *C. fetus* subsp. *venerealis* é uma bactéria fastidiosa e exigente, de difícil diagnóstico, o que pode encobrir e subestimar a verdadeira quantidade de animais infectados. A associação de métodos de diagnóstico, como cultura e imunofluorescência direta, por exemplo,

pode aumentar a sensibilidade das provas, elevando a confiabilidade do diagnóstico final da doença (Schulze *et al.* 2006).

2.3 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A complexidade de manipulação aliada à dificuldade de obtenção e o alto custo de sistemas experimentais envolvendo bovinos têm levado vários pesquisadores a desenvolver modelos alternativos de laboratório para estudar diversas doenças que afetam estes animais (Humphrey *et al.*, 1985; St. Claire *et al.*, 1994; Hook Jr. *et al.*, 1997).

Estudos “*in vivo*” utilizando pequenos animais são importantes, principalmente, pelo fato de os mesmos serem prolíferos, com ciclo estral e período de gestação curtos, além de serem facilmente manejados, o que influi fortemente no planejamento e custo/benefício de uma pesquisa e representa melhor a patogenia de uma doença, assim como os mecanismos de defesa nela envolvidos (Santos, 2002b; Chorilli *et al.*, 2007).

Doenças reprodutivas semelhantes à CGB, como a Tricomonose Genital Bovina (TGB), já têm modelos alternativos de laboratório em camundongos, os quais tornam mais acessíveis os estudos e trabalhos em torno destas enfermidades (St. Claire *et al.*, 1994; Hook Jr. *et al.*, 1997).

Os modelos murídeos são os mais utilizados, pois, como já citado anteriormente, possuem ciclo estral de curta duração (Spornitz *et al.*, 1999; Marcondes *et al.*, 2001) e há algumas semelhanças na estrutura histológica do endométrio de murídeos e bovinos. Apesar de as placentas serem diferentes (epitéliocorial nas vacas e hemocorial nos murídeos), as duas espécies compartilham características evolutivas, como a presença de trofoblasto invasivo (Leiser e Kaufmann, 1994; Entrican, 2002), o que se torna um fator positivo na utilização do camundongo como modelo alternativo para estudos de doenças da reprodução que acometem bovinos.

Entre as linhagens de camundongos, os BALB/c são os mais susceptíveis à infecção experimental pelo protozoário *Tritrichomonas foetus* (Van Andel *et al.*, 1996; Hook Jr. *et al.*, 1997). Embora sejam doenças diferentes, a CGB e a TGB, causadas pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* e o *T. foetus*, respectivamente, apresentam muitas similaridades clínico-epidemiológicas altíssimas, com sinais clínicos idênticos tanto em fêmeas, quanto em machos (Ball *et al.*, 1987), o que permite extrapolar a condição de que os estudos já realizados com um destes microrganismos, podem servir como orientação para o estudo do outro.

A administração prévia de estrógeno favorece a infecção intravaginal por tricomoníades em camundongos (McGrory *et al.*, 1994). Entretanto, este hormônio pode limitar o uso do modelo laboratorial em estudos imunológicos, pois o estrógeno influencia a resposta imunológica no trato reprodutivo de fêmeas (St. Claire *et al.*, 1994). Pode haver aumento dos níveis de anticorpos no útero e diminuição na vagina (Wira e Sandoe, 1987), além de efeitos colaterais como descargas vaginais purulentas que podem inibir a colonização do trato genital devido à grande quantidade de muco, e abscessos perivulvares que podem ser confundidos com lesões causadas pelo microrganismo (Rutkowski e Harmsen, 2007), o que sugere que animais não submetidos a tratamento com estrógeno são mais adequados como modelos de doenças reprodutivas (St. Claire *et al.*, 1994; Mutwiri e Corbeil, 1998; Soto *et al.*, 2005).

Mutwiri e Corbeil (1998) relataram que, em animais sem tratamento prévio com estrógeno, a infecção por *T. foetus* também pode ser estabelecida e mantida. Os autores também alegam que esses modelos reproduzem melhor as infecções do trato reprodutivo feminino.

Na maioria dos estudos que envolvem modelos experimentais de TGB, a infecção

dos animais é realizada durante o estro (St. Claire *et al.*, 1994; Hook *et al.*, 1995; Van Andel *et al.*, 1996; Hook Jr. *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 2005), pois é a fase em que ocorre a transmissão do agente do macho para a fêmea ou vice-versa (Alves *et al.*, 2011). Mutwiri e Corbeil (1998) demonstraram que não há relação entre o estabelecimento e a manutenção da infecção por *T. foetus* e a fase do ciclo estral em que o animal se encontra, podendo este, ser infectado em qualquer estágio do ciclo.

Há estudos que relatam que na fase progesterônica do ciclo estral, que abrange metaestro e diestro, os animais podem ser mais susceptíveis à infecção que na fase estrogênica, composta por proestro e estro (Singh *et al.*, 1999). Isto porque, durante a fase progesterônica não há intensa produção de muco, nem extensa cornificação das células epiteliais da vagina como observado na fase estrogênica (Burgess e McDonald, 1992), justificando, talvez, o motivo do estabelecimento da infecção em camundongos que não estão no estro (Burgess e McDonald, 1992; Singh *et al.*, 1999).

Alguns relatos sobre modelos experimentais de TGB em camundongos BALB/c fêmeas alegam que a infecção é estabelecida, mas a resposta inflamatória e as alterações histopatológicas no trato genital geralmente são ausentes (Van Andel *et al.*, 1996; Rutkowski e Harmsen, 2007). Alguns autores sugerem que esta ausência de lesões e alterações inflamatórias podem ser devido a diferenças no trato reprodutivo de camundongos e bovinos, como microbiota, pH e condições ambientais, que afetam a habilidade do *T. foetus* em induzir alterações histopatológicas em murídeos (Van Andel *et al.*, 1996).

O estudo da interação bactéria-hospedeiro é de fundamental importância para o conhecimento da patogenia da doença, pois propicia informações para o possível

desenvolvimento de futuros quimioterápicos, vacinas e testes diagnósticos. Deste modo, estabelecer um modelo animal de pequeno porte para se estudar os mecanismos de colonização do *C. fetus* subsp. *venerealis* “*in vivo*” seria um grande passo no campo do conhecimento da CGB.

3. HIPÓTESE

C. fetus subsp. *venerealis* infecta, experimentalmente, camundongos BALB/c por via intravaginal.

4. OBJETIVO

Avaliar a infecção por via intravaginal de *C. fetus* subsp. *venerealis* em camundongos BALB/c.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA DE *C. fetus* SUBSP. *venerealis* P3

A amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 foi usada na infecção dos camundongos BALB/c. A amostra de referência *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T foi inoculada em novilha virgem e, após sete dias de infecção, foi isolada do muco cérvico-vaginal deste animal a amostra denominada P1. Subsequentemente, a amostra P1 foi inoculada na vagina de outra novilha virgem

e, após nove dias de infecção, foi isolada do útero deste animal a amostra denominada P2. Da inoculação da amostra P2 em outra novilha virgem, foi possível o isolamento, a partir do muco cérvico-vaginal, 14 dias pós-infecção, da amostra P3, que foi utilizada neste experimento (Cottorello, 2006; Stynen, 2009).

5.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO DA AMOSTRA DE *C. fetus* SUBSP. *venerealis* P3

A amostra P3 foi cultivada em ágar BHI (Difco, EUA) suplementado com 10% de sangue desfibrinado equino e mantida a 37°C sob microaerofilia (5% O₂, 5% H₂, 10% CO₂, e 80% N₂) por 48 horas. A pureza da amostra foi avaliada pelo método de coloração com Fucsina.

Confirmada a pureza, as bactérias foram suspensas em tampão *Phosphate-buffered saline* (PBS) pH 7,2, estéril, e a concentração bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro (OD_{600nm}) para uma concentração aproximada de 1 x 10⁶ bactérias em 10 µL de suspensão.

5.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A Figura 1 sumariza a sequência de procedimentos adotados durante todo o período do experimento.

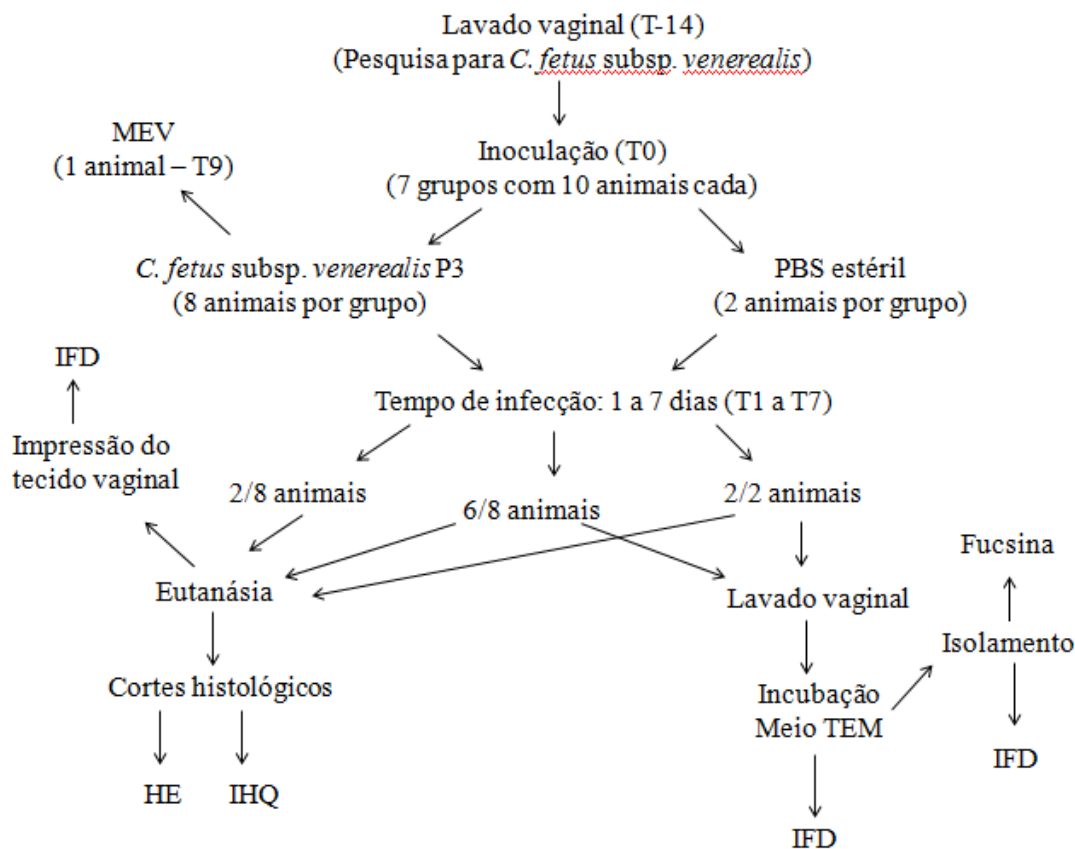


Figura 1 - Desenho experimental indicando todas as etapas realizadas durante os 7 dias avaliados para a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* P3. TEM: Meio de enriquecimento e transporte para *Campylobacter*; IFD: Imunofluorescência direta; IHQ: Imunoistoquímica; MEV: Microscopia eletrônica de varredura; HE: Hematoxilina e Eosina.

5.4 ANIMAIS

Setenta fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c, com idade de 4 semanas e peso aproximado de 30 gramas, foram adquiridas no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram alojados em gaiolas no biotério de experimentação animal da Escola de Veterinária da UFMG, separados em 7 grupos distintos com 10 animais cada, com alimentação e água à vontade.

Toda a experimentação animal foi realizada seguindo as boas práticas de manipulação de animais (ScVC, 1997; AVMA, 2007) e foi aprovada pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA–UFMG) sob protocolo nº 180/11 (Anexo 1).

5.5 PESQUISA PARA *C. fetus* SUBSP. *venerealis* EM CAMUNDONGOS BALB/C

Antes da inoculação, foi realizada a pesquisa de *C. fetus* subsp. *venerealis* para verificar se os animais estavam livres da infecção pela bactéria, pois, embora camundongos não sejam infectados naturalmente por *C. fetus* subsp. *venerealis*, esta é uma informação importante para manter a confiabilidade do experimento.

Deste modo, foi feita antissepsia da área genital dos camundongos com álcool 70%

iodado, álcool 70% e água destilada. Cinquenta microlitros de PBS estéril acrescidos de 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, EUA) foram introduzidos na vagina dos animais e, logo após, aspirados com auxílio de uma ponteira estéril. O lavado vaginal de todos os animais foi inoculado em meio de enriquecimento e transporte para *Campylobacter* (TEM) e incubado a 37°C por 48 horas. Após este período, foi repicado em ágar BHI (Difco, EUA) suplementado com 10% de sangue desfibrinado equino e mantido a 37°C, sob microaerofilia (5% O₂, 5% H₂, 10% CO₂, e 80% N₂), por 48 horas. A pesquisa de *C. fetus* subsp. *venerealis* foi feita por IFD para a confirmação da ausência da infecção nos camundongos estudados.

5.6 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL

A inoculação experimental foi realizada quando os animais atingiram 6 semanas de idade, pela introdução de uma ponteira estéril contendo o inóculo na vagina dos camundongos. Cinquenta e seis animais, distribuídos igualmente em 7 grupos, foram inoculados com 10 µL de PBS contendo 1x10⁶ bactérias (P3) e 14 animais, também distribuídos em 7 grupos, foram inoculados com 10 µL de PBS estéril (grupo controle).

5.7 LAVADOS VAGINAIS

Foram obtidos lavados vaginais, como na primeira etapa do experimento, de 6 animais inoculados com *C. fetus* subsp. *venerealis* e 2 inoculados com PBS estéril de cada grupo. Não foi feito lavado vaginal nos outros 2 camundongos inoculados com a bactéria. Esses animais foram “reservados” para o estudo do efeito do procedimento na resposta inflamatória.

5.8 EUTANÁSIA E COLETA DO TRATO GENITAL

A eutanásia foi realizada pelo método de deslocamento cervical, seguindo as boas práticas de manipulação de animais (ScVC,

1997; AVMA, 2007), em um grupo por dia, durante os 7 dias avaliados.

O trato genital de todos os animais foi retirado assepticamente. Fragmentos foram coletados para a obtenção de cortes histológicos para as técnicas de histopatologia e imunoistoquímica e para a realização de esfregaços do tecido vaginal para a IFD.

Os esfregaços foram feitos pressionando o tecido da vagina em uma lâmina de vidro de microscopia, seguida de secagem à temperatura ambiente e fixação em acetona a -20°C.

5.9 ISOLAMENTO

Após a realização dos lavados, os mesmos foram imediatamente transferidos para o meio TEM (Lander, 1990a) e submetidos à incubação nos tempos de 24 h e 48 h, a 37°C. Após cada um dos dois tempos de incubação avaliados, aproximadamente 30 µL da parte superior do meio TEM inoculado com o lavado foi estriado, com o auxílio de um alça descartável estéril, em placas de ágar BHI (Difco, EUA) com 10% de sangue desfibrinado equino, em placas de ágar BHI (Difco, EUA) com 10% de sangue desfibrinado equino na presença de uma membrana filtrante de celulose (0,45-0,60µm), que logo após a filtragem, este foi retirado e o filtrado foi estriado e, em placas de ágar BHI (Difco, EUA) com 10% de sangue equino e suplemento de Skirrow (Oxoid, Inglaterra) (Skirrow, 1977). As placas foram incubadas, inicialmente, por 48 horas, a 37°C, sob microaerofilia, entretanto, algumas permaneceram incubadas por mais tempo devido ao crescimento fastidioso do *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Após a incubação, as amostras cultivadas foram submetidas à coloração com Fucsina. Aquelas com morfologia semelhante ao *C. fetus* subsp. *venerealis* foram armazenadas a -20°C para a realização da IFD, com o intuito

de confirmar o isolamento. As amostras identificadas como *C. fetus* subsp. *venerealis* foram estocadas a -80°C em caldo *Brucella* (Difco, EUA) acrescido de 20% de glicerol (Merck, Alemanha).

Pequena quantidade da parte superior do meio TEM, aproximadamente 100 µL, foi coletada tanto com 24h, quanto com 48h, centrifugada e submetida à técnica de IFD, com o intuito de aumentar a probabilidade de detecção de fêmeas infectadas não diagnosticadas no isolamento.

5.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

As amostras obtidas do isolamento direto da placa de BHI e do meio TEM e os esfregaços do tecido vaginal em lâmina foram submetidos à técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) (Figueiredo *et al.*, 2002).

As amostras foram submetidas a duas centrifugações, sendo a primeira a 600 x g por 10 minutos, obtendo-se um sobrenadante que foi, então, centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 500 µL de PBS estéril e dos mesmos foram retiradas alíquotas de 20 µL para preparo dos esfregaços em lâminas próprias para IFD. As lâminas foram mantidas à 37°C por 10 minutos para secagem e, logo após, foram imersas em acetona a -20°C para fixação, por 30 minutos. Após a fixação, as lâminas foram incubadas com o conjugado (IgG de coelho anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* conjugado à fluoresceína usado na diluição de 1:2 - Ruckerbauer *et al.*, 1974) e mantidas em câmara úmida por 30 minutos, a 37°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS por 5 minutos cada, e então, montadas com a lamínula em glicerina tamponada (pH 9,5).

Foram utilizados controles positivos, cultivo de *C. fetus* subsp. *venerealis* P3, e controles negativos, PBS, em todas as lâminas.

Os esfregaços foram examinados em microscópio de fluorescência episcópica (Olympus, CBA) com objetiva de 100X. Foram consideradas positivas, as amostras que apresentaram bactérias fluorescentes com morfologia típica de *C. fetus* subsp. *venerealis*, ou seja, bastonetes finos em formato de “S”, vírgula ou asa de gaivota.

5.11 IMUNOISTOQUÍMICA

Após a retirada do trato genital, os fragmentos de tecidos foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% por 24 h, desidratados em álcool em concentração crescente de 70% a 100%, diafinizados em xilol e embebidos em parafina.

Cortes de 5 µm foram desparafinizados, hidratados e incubados com proteinase K (50 mg/mL - Sigma, EUA) por 10 minutos a 37°C para a recuperação antigênica. Após lavagem em PBS, foram novamente incubados com 3% de peróxido de hidrogênio, por 20 minutos, para o bloqueio de peroxidase endógena. Depois de outra lavagem em PBS, foram bloqueados para a ligação inespecífica do anticorpo com 0,5% de leite em pó desnatado dissolvido em água destilada, e incubados a 4°C, durante a noite. No outro dia, foi realizada a incubação com o anticorpo primário policlonal anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* (1:2500), por 1 hora, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados três vezes em PBS e incubados com o anticorpo secundário biotilado (LSAB+ Kit, DAKO Corporation, EUA) por 20 minutos. Logo após, foram lavados novamente e incubados com o complexo estreptoavidina-peroxidase (LSAB+ Kit, DAKO Corporation, CA, EUA) por 20 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. A reação foi revelada usando o corante 3-amino-9-etilcarbazol (AEC - DAKO Corporation, EUA) e os cortes foram contracolorados com hematoxilina. A localização das bactérias imunomarcadas foi determinada nos tecidos avaliados.

5.12 HISTOPATOLOGIA

Após a retirada do trato genital, os fragmentos de tecidos foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% por 24 horas, desidratados em álcool em concentração crescente de 70% a 100%, diafinizados em xilol e embebidos em parafina. Os cortes de 5 µm de espessura foram corados pela técnica rotineira de hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histológica. Somente vagina e útero foram analisados em todos os animais avaliados.

5.12.1 Determinação da fase de ciclo estral

Inicialmente, foi determinada a fase do ciclo estral na qual os animais estavam quando foram sacrificados e, a partir daí, foi estimada a fase em que os mesmos foram inoculados. O período total do ciclo estral de camundongos compreende 4 dias, sendo uma fase por dia (proestro, estro, metaestro e diestro). Assim, para determinar a provável fase de inoculação de cada animal, foi utilizada a seguinte fórmula:

FI = FE – dias pós-inoculação (fases)

em que FI representa a fase do ciclo estral em que os animais estavam no momento da inoculação e FE representa a fase em que os animais estavam no momento da eutanásia (FE).

As quatro fases foram determinadas através de características como a espessura e o número de camadas do epitélio, além da presença e quantidade de células mucosas, queratina ou células inflamatórias no epitélio ou no lúmen vaginal (Snell, 1941). São elas: proestro, caracterizado por muitas camadas de células epiteliais e mucosas, sem a presença de leucócitos; estro, caracterizado por muitas camadas de células, além da grossa camada cornificada superficial, sem a presença de leucócitos; metaestro, caracterizado pela descamação da camada cornificada e aparecimento de leucócitos no epitélio e lúmen vaginal; diestro, caracterizado por finas camadas de células epiteliais, sem cornificação, com leucócitos

intraepiteliais e no lúmen da vagina (Snell, 1941).

5.12.2 Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica foi baseada no escore de vaginite, ou seja, nas alterações inflamatórias predominantes observadas na mucosa vaginal caracterizadas por microabscessos multifocais intraepiteliais ou superficiais e leucócitos no lúmen vaginal (Tabela 1).

Tabela 1 – Escore de vaginite para avaliação histopatológica

Score	Alteração inflamatória
0	Sem alterações inflamatórias
1	Discreta
2	Moderada
3	Intensa

A presença destas alterações durante as fases de metaestro e diestro foi considerada normal conforme descrito para histologia vaginal de camundongos, pois são estágios em que células inflamatórias relacionadas à fisiologia do animal são encontradas (Snell, 1941).

5.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após 7 dias de experimento, um animal inoculado com *C. fetus* subsp. *venerealis* foi mantido por até 9 dias após a inoculação. Após ser sacrificado, seu trato genital foi removido e submetido à técnica de microscopia eletrônica de varredura, com o intuito de identificar a presença de bactérias com morfologia semelhante à do *C. fetus* subsp. *venerealis* no interior do trato genital da fêmea de camundongo BALB/c. Para isto, o trato genital foi coletado e lavado 10 vezes em PBS por 2 minutos, para a retirada de muco presente nas estruturas. Após a lavagem, o mesmo foi fixado em glutaraldeído (Merck, Alemanha) 4%, diluído em PBS, por 15 horas, à temperatura

ambiente. Após este período, as amostras foram fixadas, também, em tetróxido de ósmio (Merck, Alemanha) 1%, diluído em água, por 2 horas, à temperatura ambiente. Logo após, o trato genital foi submetido à desidratação em álcool com as seguintes concentrações: 50%, 70%, 80%, 90%, 100% e 100%, sendo 30 minutos o tempo de cada etapa. Depois, o corte foi processado no Centro de Microscopia Eletrônica do ICB – UFMG (CEMEL), onde foi realizada a secagem ao ponto crítico com CO₂, utilizando o aparelho de secagem ao ponto crítico Balzers Union – CPD 020. Após a secagem, a amostra foi fixada em um suporte de alumínio (stub) envolvido com uma camada de cola de prata e deixada em dessecador até o dia em que foi realizada a etapa de metalização. A mesma foi procedida no Departamento de Física – ICEX da UFMG, onde o trato genital foi recoberto com ouro, em acessório para metalização (DSV-203) do equipamento BAF-300 da Balzers, por 30 segundos. Após todos estes procedimentos, as imagens foram capturadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura Zeiss – DSM 950 no CEMEL.

5.14 ANIMAIS POSITIVOS PARA A INFECÇÃO POR *C. fetus* SUBSP. *venerealis*

Foram considerados positivos para a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*, os animais nos quais a bactéria foi detectada nas técnicas de isolamento e/ou IFD, que foram os métodos que apresentaram maior sensibilidade de diagnóstico da bactéria neste estudo.

6. RESULTADOS

6.1 ANIMAIS POSITIVOS PARA INFECÇÃO POR *C. fetus* SUBSP. *venerealis*

Considerando todas as técnicas empregadas neste experimento, dos 56 animais inoculados experimentalmente com *C. fetus* subsp. *venerealis* amostra P3, 46 foram positivos (82,0%), enquanto 10 foram considerados negativos (18,0%), pois não foram detectados em nenhum método testado.

A avaliação de animais positivos para a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* por dia analisado está representada na Tabela 2.

Tabela 2 - Animais infectados por *C. fetus* subsp. *venerealis* durante a avaliação experimental

Dia	Total de animais	Positivos	Negativos	Porcentagem de Positivos
1	8	8	0	100,0%
2	8	5	3	62,5%
3	8	5	3	62,5%
4	8	7	1	87,5%
5	8	7	1	87,5%
6	8	7	1	87,5%
7	8	7	1	87,5%
Total	56	46	10	82,0%

6.2 ANIMAIS POSITIVOS PARA A INFECÇÃO POR *C. fetus* SUBSP. *venerealis* NO ISOLAMENTO

Ao isolamento, foram detectados 20 animais positivos após 48 horas de incubação em meio TEM e 48 horas de incubação em ágar sangue e ágar sangue com SKM, à 37°C, sob microaerofilia. Apenas 1 animal, pertencente ao 2º dia pós-infecção, foi considerado positivo no isolamento após 24 horas de incubação em meio TEM, embora o mesmo também tenha sido recuperado às 48 horas.

Na Tabela 3, é possível observar o número de amostras recuperadas no isolamento por dia analisado, sendo que a maior recuperação ocorreu a partir do 4º dia e, o 5º dia foi aquele com maior número de amostras isoladas, lembrando que somente 6 animais de cada grupo foram submetidos ao lavado vaginal, portanto, somente 6 animais foram submetidos ao isolamento.

Tabela 3 - Animais detectados como positivos no isolamento de *C. fetus* subsp. *venerealis* por dia analisado

Dia	Total de animais	Isolados	Porcentagem
1	6	2	33,33%
2	6	1	16,66%
3	6	2	33,33%
4	6	4	66,66%
5	6	5	83,33%
6	6	3	50,00%
7	6	3	50,00%
Total	42	20	47,61%

6.3 ANIMAIS POSITIVOS PARA A INFECÇÃO POR *C. fetus* SUBSP. *venerealis* NA IFD

6.3.1 IFD das amostras isoladas de *C. fetus* subsp. *venerealis*

Todas as amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* isoladas de camundongos BALB/c

fêmeas foram identificadas e confirmadas pela técnica de IFD.

Como se tratam de colônias isoladas e ampla quantidade de bactérias, foi possível observar maior fluorescência que nos testes feitos com o meio TEM ou com a impressão do tecido vaginal (Figura 3).

6.3.2 IFD das amostras do meio TEM

A IFD mostrou-se eficaz em identificar o *C. fetus* subsp. *venerealis* no meio de enriquecimento e transporte (Figura 3). Após 24 horas de incubação no meio TEM, este método diagnosticou 52,38% de animais positivos para a infecção e, às 48 horas, foram detectados 66,66%, o que já era esperado devido ao maior tempo para multiplicação e identificação da bactéria.

6.3.3 IFD do esfregaço do tecido vaginal em lâmina

A IFD do esfregaço do tecido vaginal detectou 73,21% de animais infectados, sendo a técnica mais sensível observada neste estudo. Assim como a IFD realizada das colônias isoladas de *C. fetus* subsp. *venerealis*, a IFD do esfregaço do tecido vaginal também confirmou a infecção em todos os animais que foram positivos no isolamento, só que ao invés do lavado, a bactéria foi identificada no perímetro do tecido vaginal (Figura 2).

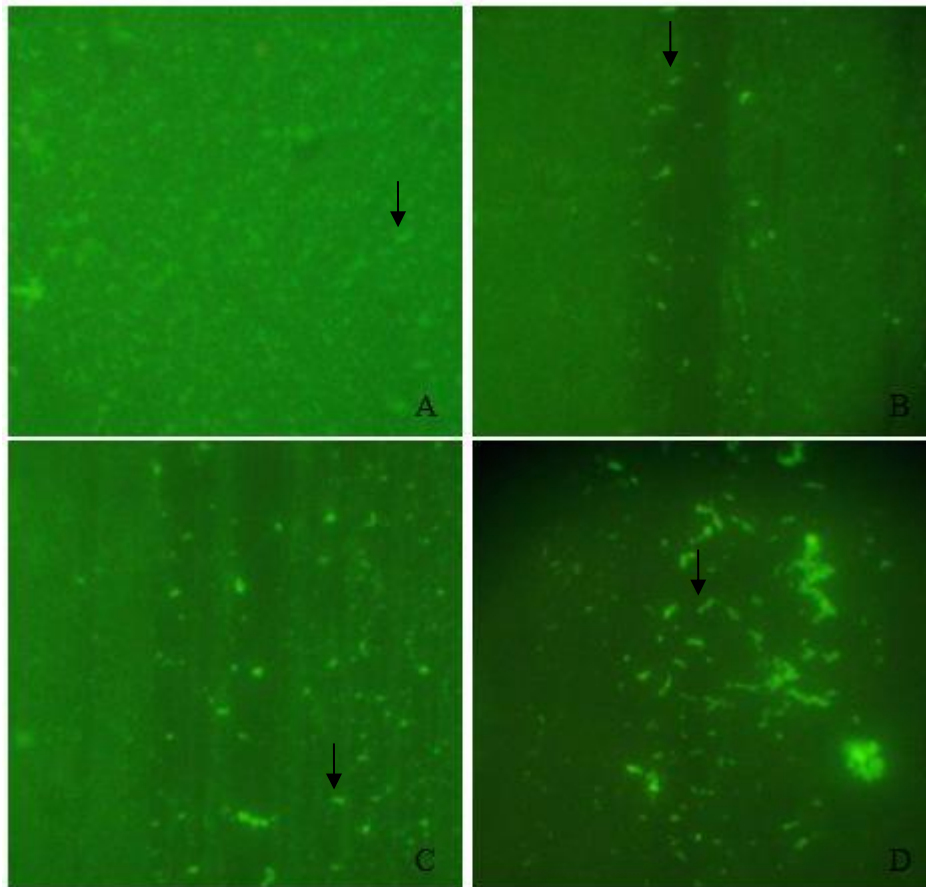


Figura 2 - Amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* detectadas em uma fêmea de camundongo BALB/c experimentalmente infectada, com 2 dias pós-inoculação, pela técnica de IFD (A-D, Aumento: 100x). As setas apontam *C. fetus* subsp. *venerealis*. Amostra isolada (A); Amostra detectada em meio TEM com 24 horas de incubação (B); Amostra detectada em meio TEM com 48 horas de incubação (C); Amostra detectada na impressão do tecido vaginal (D).

6.4 ANIMAIS POSITIVOS PARA A INFECÇÃO POR *C. fetus* SUBSP. *venerealis* NA IHQ

A IHQ detectou 39,28% dos animais como positivos para a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*. Não foi possível associar a localização do agente com as alterações histopatológicas descritas, nem com o isolamento, pois diagnosticou como negativo

a maior parte dos animais que tiveram amostras isoladas.

Para finalizar, a Tabela 4 tem por objetivo sumarizar a quantidade e a porcentagem de animais considerados positivos para a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em cada técnica empregada que foi descrita neste estudo.

Tabela 4 - Porcentagem de animais infectados por *C. fetus* subsp. *venerealis* diagnosticados como positivos em cada método de diagnóstico utilizado no estudo

Teste empregado	Positivos	Negativos	Total de animais	Porcentagem de Positivos
Isolamento 24h	1	41	42	2,30%
Isolamento 48h	20	22	42	47,61%
IFD TEM 24h	22	20	42	52,38%
IFD TEM 48h	28	14	42	66,66%
IFD impressão	41	15	56	73,21%
IHQ	22	34	56	39,28%

Foi observado que, das 46 fêmeas detectadas como positivas para a infecção, 37 foram diagnosticadas por mais de um método (80,5%). Nove animais foram detectados como positivos por apenas uma técnica de diagnóstico, sendo que destes 9, seis pertencem aos animais que não receberam lavado vaginal e foram submetidos apenas às técnicas de IFD do esfregaço do tecido vaginal e IHQ. Estes 6 animais foram positivos somente na IFD do esfregaço do tecido vaginal.

Três animais foram detectados somente na IFD das amostras do meio TEM após 48 horas de incubação.

6.5 HISTOPATOLOGIA

Durante o período do experimento, nenhum animal apresentou qualquer lesão

macroscópica ou reação adversa, assim como na necropsia. A vagina e o útero foram os órgãos de eleição para observação de mudanças histológicas, embora não tenha sido observada nenhuma alteração significativa nos fragmentos de útero avaliados.

6.5.1 Influência das fases do ciclo estral durante a inoculação no estabelecimento da infecção e na recuperação de isolados de *C. fetus* subsp. *venerealis*

Variações morfológicas no epitélio da vagina foram observadas entre animais de mesmo grupo e de grupos distintos (Figura 3), indicando que os mesmos se encontravam em diferentes estágios do ciclo estral após a eutanásia. A Tabela 5 detalha as prováveis fases em que os animais considerados positivos e negativos foram inoculados.

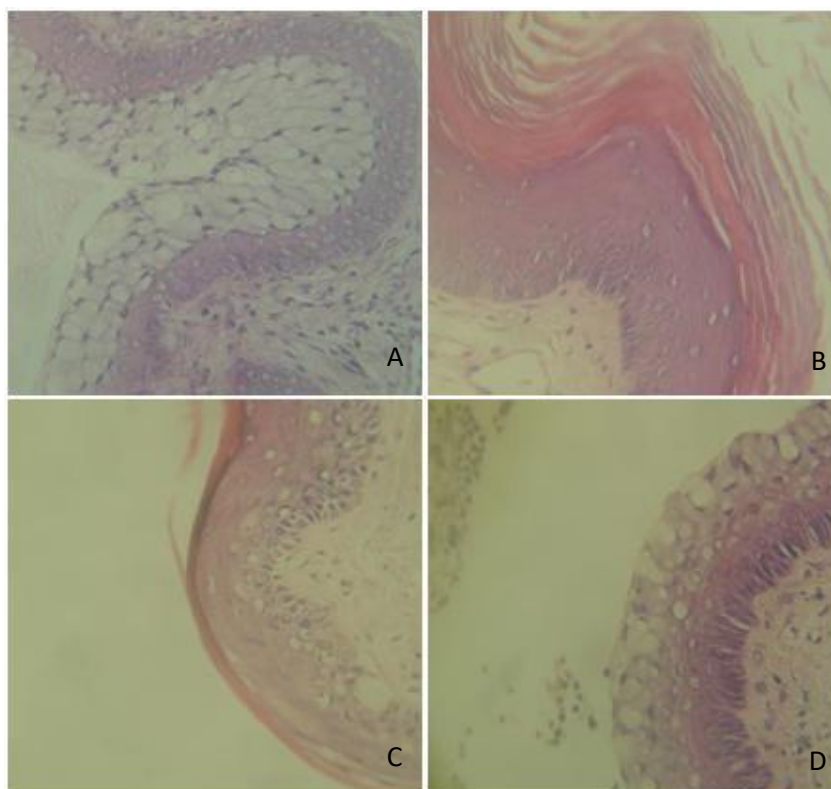


Figura 3 - Histologia vaginal de camundongos BALB/c fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (A-D, Aumento de 40x). Animal em proestro, após 2 dias pós-inoculação, apresentando muitas camadas de células epiteliais e mucosas, sem a presença de leucócitos (A); animal em estro, com 4 dias pós-inoculação, caracterizado por muitas camadas de células, além da grossa camada cornificada superficial, sem a presença de leucócitos (B); animal em mestaestro, com 3 dias pós-inoculação, apresentando descamação da camada cornificada (C) e animal em diestro, com 3 dias pós-inoculação, caracterizado por finas camadas de células epiteliais, sem cornificação, com leucócitos intraepiteliais e no lúmen da vagina (D). Todos os animais citados na figura pertenciam a grupos controle inoculados com PBS estéril. HE.

Tabela 5 – Estimativa das fases do ciclo estral em que os animais positivos para a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* foram inoculados

Fase do ciclo estral	Positivos	Negativos
Proestro	10/46 (21%)	4/10 (40%)
Estro	9/46 (20%)	1/10 (10%)
Metaestro	14/46 (30%)	2/10 (20%)
Diestro	13/46 (29%)	3/10 (30%)
Estrogênica (Proestro+estro)	19/46 (41%)	5/10 (50%)
Progesterônica (Metaestro+diestro)	27/46 (59%)	5/10 (50%)

A maioria dos animais positivos foi inoculada durante a fase progesterônica (metaestro/diestro). Os animais negativos foram inoculados nas fases progesterônica ou estrogênica, embora a inoculação no proestro tenha sido a mais frequente.

A Tabela 6 apresenta aqueles animais que, além de positivos, foram detectados na prova padrão de diagnóstico da CGB, o isolamento, e relaciona o mesmo com as prováveis fases de inoculação das fêmeas.

Tabela 6 - Prováveis fases do ciclo estral em que os animais positivos no isolamento de *C. fetus* subsp. *venerealis* foram inoculados

Fase do ciclo estral	Isolados	Porcentagem
Proestro	3/20	15%
Estro	5/20	25%
Metaestro	5/20	25%
Diestro	7/20	35%
Estrogênica (Proestro+estro)	8/20	40%
Progesterônica (Metaestro+diestro)	12/20	60%

Assim como na primeira tabela, o isolamento também obteve melhor desempenho quando os animais foram inoculados na fase progesterônica, com maior eficácia durante o diestro.

função das fases do ciclo estral e dos dias pós-infecção. A Tabela 7 sumariza a reação inflamatória dos animais de acordo com a fase do ciclo estral em que se encontravam durante a eutanásia e, mais uma vez, relaciona o isolamento aos dados histopatológicos.

6.5.2 Influência das fases do ciclo estral durante a eutanásia na observação de alterações histopatológicas e na recuperação de isolados de *C. fetus* subsp. *venerealis*

A avaliação histopatológica foi baseada no escore de vaginite que foi avaliado em

Tabela 7 - Escore de vaginite e porcentagem de isolamento de acordo com a fase do ciclo estral estimada durante a eutanásia

Grupo	n	Escore vaginite*	Isolamento**
Controle negativo	14	0,29 (0,43)	NSA
Proestro	19	1,13	40% (6/15)
Estro	14	0,36	45% (5/11)
Metaestro	10	0 (1)	62,5% (5/8)
Diestro	13	0,19 (0,73)	30% (3/10)
Estrogênica (Proestro+estro)	33	0,82	42% (11/26)
Progesterônica (Metaestro+diestro)	23	0,11 (0,85)	44% (8/18)

* Escore de vaginite entre parênteses inclui células inflamatórias consideradas fisiológicas de acordo com fase do ciclo estral. **Isolamento realizado em 6 animais de cada grupo (dias), os outros animais não receberam lavados vaginais, mas foram inoculados com a bactéria (2 animais por grupo). NSA= não se aplica

O maior número de amostras isoladas também ocorreu durante a fase progesterônica, mas desta vez não se trata da fase de inoculação e, sim, da fase em que os animais estavam quando foi realizado o lavado vaginal, logo após a eutanásia. No metaestro, obteve-se melhor isolamento, embora seu escore de vaginite tenha sido o menor de todos os outros grupos,

desprezando as células inflamatórias consideradas fisiológicas. Outro resultado importante foi o alto escore de vaginite na fase de proestro, pois trata-se de uma fase com poucas células inflamatórias fisiológicas, podendo denotar lesões que podem ser do *C. fetus* subsp. *venerealis* (Figura 4).

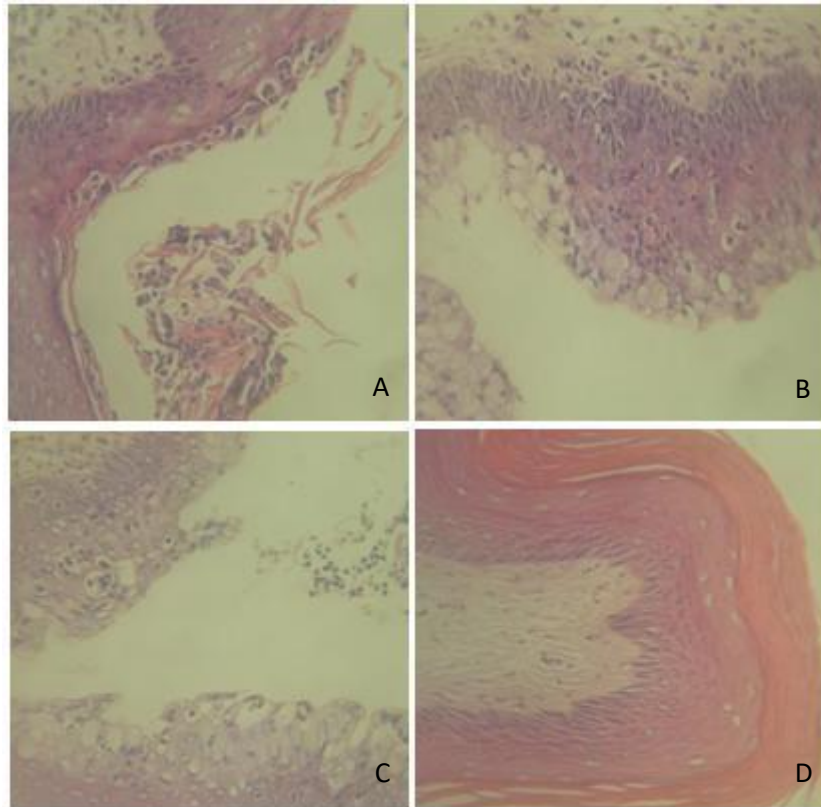


Figura 4 - Histologia vaginal de camundongos BALB/c fêmeas infectadas por *C. fetus* subsp. *venerealis* em diferentes fases do ciclo estral (A-D, Aumento de 40x). Animal em metaestro 7 dias pós-infecção, com presença de microabscessos intraepiteliais e leucócitos no lúmen vaginal (A). Animal em diestro 5 dias pós-infecção, com presença de microabscessos intraepiteliais na vagina (B). Animal em proestro 5 dias pós-infecção, com presença de microabscessos intraepiteliais e leucócitos no lúmen vaginal (C). Animal em estro 4 dias pós-infecção, sem presença de qualquer reação inflamatória (D). As reações em A e B são consideradas normais das fases progesterônicas do ciclo estral. HE.

6.5.3 Alterações histopatológicas e recuperação de amostras isoladas de *C. fetus* subsp. *venerealis* em um período de 7 dias de infecção

Em relação à análise do escore de vaginite ao longo dos 7 dias pós-infecção, observou-se o

maior valor no 5º dia pós-infecção, dia este que também apresentou o maior número de amostras isoladas de *C. fetus* subsp. *venerealis* dos camundongos. Entretanto, o segundo maior escore de vaginite observado foi no 2º dia que relata a menor taxa de isolados recuperados (Tabela 8).

Tabela 8 - Escore de vaginite e porcentagem de isolamento de acordo com dia pós-infecção

Grupo	N	Escore vaginite*	Isolamento **
Controle negativo	14	0,29 (0,43)	NSA
Dia 1	8	0,63	33% (2/6)
Dia 2	8	0,88	17% (1/6)
Dia 3	8	0,19 (0,81)	33% (2/6)
Dia 4	8	0,13 (0,5)	67% (4/6)
Dia 5	8	1,19 (1,44)	83% (5/6)
Dia 6	8	0,5 (0,75)	50% (3/6)
Dia 7	8	0,13 (0,75)	50% (3/6)

* Escore de vaginite entre parênteses inclui células inflamatórias consideradas fisiológicas de acordo com fase do ciclo estral. **Isolamento realizado em 6 animais de cada grupo (dias), os outros animais não receberam lavados vaginais, mas foram inoculados com a bactéria (2 animais por grupo). NSA= não se aplica.

Os animais controle negativo também apresentaram suave presença de vaginite, com presença de poucas células inflamatórias, embora as mesmas correspondam a fisiologia do ciclo estral destes animais.

6.6 VISUALIZAÇÃO DO *C. fetus* SUBSP. *venerealis* POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Pela microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar que o *C. fetus* subsp. *venerealis* está presente no corno uterino de camundogos BALB/c aos 9 dias pós-infecção (Figura 5).

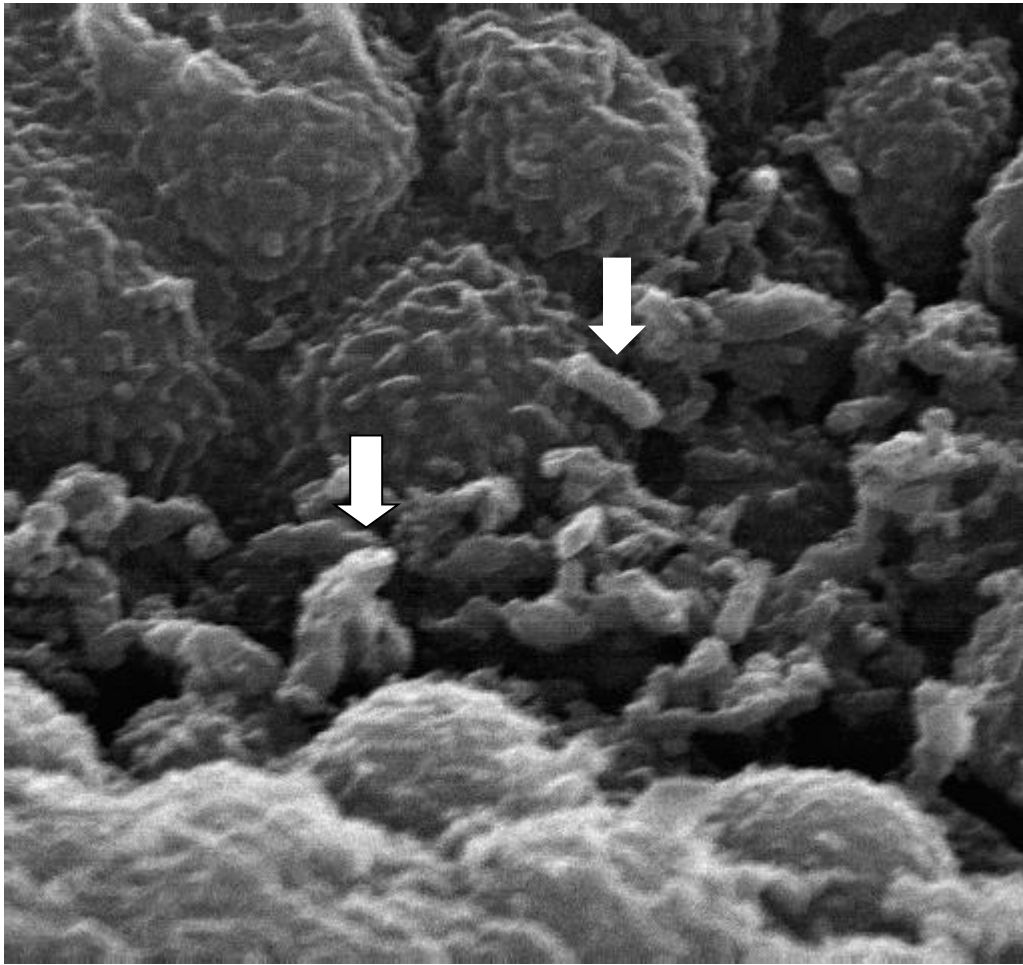


Figura 5 - Eletromicrografia de varredura de corno uterino de camundongo BALB/c após 9 dias de infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*. As setas indicam a bactéria (1,12/0,35 μ m). Aumento: 10.000x. Bar = 0,82 μ m

7. DISCUSSÃO

A CGB é uma doença que não dispõe de um modelo animal de laboratório como alternativa para pesquisas sobre patogenicidade e resposta imunológica, o que tem atrasado cada vez mais a obtenção de respostas sobre os mecanismos envolvidos na patogenia da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*. O presente estudo demonstrou a infecção de camundongos BALB/c por *C. fetus* subsp. *venerealis* por via intravaginal, a via natural da infecção em bovinos. O estabelecimento de um modelo animal de infecção mimetizando a via natural em que a mesma ocorre ajudará na

compreensão dos mecanismos de infecção e manutenção da bactéria no trato genital.

Inicialmente, foi observado que 82,0% das fêmeas foram consideradas positivas para a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*. Como não há estudos anteriores que descrevam a infecção experimental por *C. fetus* subsp. *venerealis*, via intravaginal, em animais de laboratório, foi obtida uma quantidade considerável de animais infectados.

O primeiro dia após a inoculação foi aquele com maior quantidade de animais infectados. Provavelmente, isto ocorreu pelo

fato de o *C. fetus* subsp. *venerealis* estar iniciando a colonização do trato genital e o hospedeiro ainda não ter produzido uma resposta suficiente para que houvesse uma diminuição do número desta bactéria. Se somente o primeiro dia pós-inoculação tivesse sido observado, poderia se pensar que houve infecção, mas não colonização, ou seja, o *C. fetus* subsp. *venerealis* não teria habilidade para permanecer no trato genital. Entretanto, não foi o que aconteceu, pois houve camundongos infectados durante os 7 dias avaliados, só que em menor quantidade. Esta diminuição, que aconteceu no segundo e terceiro dia pós-inoculação, pode ter ocorrido devido a alguma resposta do hospedeiro que resultou na redução do número de microrganismos, com consequente redução da eficiência de detecção pelos métodos disponíveis.

Trabalhos com outros microrganismos, como *T. foetus*, não relataram a cinética em períodos curtos, e sim, por várias semanas (Hook Jr. *et al.*, 1995; Van Andel *et al.*, 1996; Mutwiri, Corbeil, 1998; Soto *et al.*, 2005), o que não permitiu comparações com os resultados aqui apresentados. Entretanto, é importante ressaltar que a avaliação do modelo nos primeiros dias pode ser importante para se estudarem mecanismos de imunidade inata, assim como o processo de colonização do trato genital.

O aumento de animais considerados positivos deu-se a partir do dia 4 e assim permaneceu até o último dia de experimento, o que indica que o *C. fetus* subsp. *venerealis* colonizou o trato genital do camundongo e que a infecção não foi transitória, pois permaneceu por até 7 dias.

A técnica de isolamento e identificação de *C. fetus* subsp. *venerealis* é considerada prova padrão no diagnóstico da CGB, pois o reconhecimento do agente etiológico não deixa dúvidas de que o animal está infectado (Shepler, Plumer, Faber, 1963; Hum *et al.*, 1991). Várias pesquisas em torno da CGB

revelam dificuldade no isolamento do *C. fetus* subsp. *venerealis* principalmente de material clínico, como lavados prepuciais e muco cérvico-vaginal, devido à alta concentração de O₂ em condições atmosféricas normais e ao crescimento progressivo de microrganismos contaminantes que reduzem a viabilidade da bactéria (Dufty, 1967; Dufty, McEntee, 1969; Garcia *et al.*, 1984; Lander, 1990a).

Neste estudo houve recuperação de 47,61% de isolados de *C. fetus* subsp. *venerealis* (Tabela 2). Apesar da ocorrência de isolamento inédito de camundongos BALB/c fêmeas experimentalmente infectados, muitos animais positivos para a infecção não tiveram recuperação da bactéria por alguns fatores como condições atmosféricas normais e presença de contaminantes, entre outros, como baixa quantidade de bactérias recuperadas no lavado (Dufty, 1967) e influência do estágio do ciclo estral. Todos os isolados foram obtidos após 48 horas de cultivo em meio TEM. Apenas um isolado foi recuperado em 24 horas, provavelmente por este animal possuir maior carga de bactérias no lavado vaginal que os outros (Winter e Caveney, 1978). Pode ser que apenas 24 horas de incubação não foram suficientes para que houvesse multiplicação de bactérias no lavado vaginal das outras fêmeas, cujo isolamento de *C. fetus* subsp. *venerealis* foi observado somente após 48 horas. Winter e Caveney (1978), que testaram quantidade de inóculo e tempo de incubação do TEM, relataram que 48 horas é um tempo aceitável para um número mínimo de *C. fetus* subsp. *venerealis* serem cultivados e, então, recuperados no isolamento.

O método de filtração em membrana de celulose (0,45 µm - 60µm) também foi testado durante a etapa de isolamento com o intuito de diminuir a contaminação por outros microrganismos, mas não obteve sucesso, pois não houve crescimento de *C. fetus* subsp. *venerealis* ou de contaminantes.

Dufty (1967) também utilizou este método e concordou com os resultados aqui descritos, alegando que a filtração promove alta redução de contaminantes, mas também diminui muito a carga de *Campylobacter*, podendo prejudicar o isolamento.

A obtenção dos isolados revelou que o *C. fetus* subsp. *venerealis* infecta o trato genital de camundongos BALB/c fêmeas por até 7 dias. Entretanto, outras técnicas de diagnóstico como IFD e IHQ foram utilizadas para verificar a quantidade total de animais que realmente foram infectados pela bactéria, já que o isolamento foi limitado e pode ter sido prejudicado por todos os fatores já antes citados.

A IFD superou as outras técnicas de diagnóstico empregadas neste estudo. Este método possibilitou a observação de *C. fetus* subsp. *venerealis* no meio TEM nos dois tempos de incubação (52,38% em 24 horas e 66,66% em 48 horas) e nos esfregaços do tecido vaginal (73,21%), além de, também, ter confirmado a positividade de todas as amostras recuperadas no isolamento (100%).

Esta técnica foi desenvolvida e utilizada para a detecção da CGB como método complementar à cultura (Mellick, Winter e McEntee, 1965; Ruckerbauer *et al.*, 1974), pois é efetiva em materiais altamente contaminados e em amostras que contêm reduzida quantidade de *C. fetus* subsp. *venerealis*, além de possibilitar a identificação do agente quando este já não se encontra mais viável (Winter *et al.*, 1967; Philpott, 1968b; Ruckbauer *et al.*, 1974). Isto explica a maior sensibilidade da IFD em detectar *C. fetus* subsp. *venerealis* neste estudo, pois esta técnica não sofre interferência de qualquer contaminante ou resíduo como o isolamento, sendo capaz de identificar uma quantidade maior de animais positivos (Figueiredo *et al.*, 2002).

A IFD, geralmente, é realizada em lavados prepuciais e em muco cérvico-vaginal

(Philpott, 1968b). Neste estudo, foi implantado, também, o esfregaço do tecido vaginal, não observado em outras pesquisas de CGB em bovinos porque necessita que o animal esteja morto para sua realização. A idéia de se pressionar o tecido do trato genital contra a lâmina de vidro visava conseguir observar todo o perímetro da vagina e, assim, aumentar a probabilidade de encontrar a bactéria e confirmar a infecção. A técnica foi a grande surpresa deste trabalho, pois demonstrou eficiência e clareza nos resultados (Figura 2), ao contrário da IHQ, que também foi um método utilizado para observação da bactéria diretamente no tecido, mas que não obteve sucesso como ferramenta de diagnóstico da CGB no trato genital de camundongos.

A técnica de IFD, além de ser efetiva na detecção do agente nos hospedeiros definitivos da doença, também foi capaz de identificá-lo em camundongos BALB/c fêmeas experimentalmente infectadas, o que a mantém como ferramenta importantíssima nos próximos passos da elaboração de um modelo experimental de infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*.

A técnica de IHQ também foi empregada na pesquisa de *C. fetus* subsp. *venerealis* no tecido do trato genital, com o intuito de associar a localização do agente com o isolamento obtido e as lesões histopatológicas observadas. Entretanto, além de pouco sensível, não demonstrou qualquer relação de diagnóstico com o isolamento ou as alterações inflamatórias encontradas nos animais. Estes resultados contrariam Campero *et al.* (2005) que conseguiram isolar *C. fetus* subsp. *venerealis* de todos os fetos bovinos testados e considerados positivos na IHQ. Entretanto, o cultivo da bactéria, neste caso, foi realizado diretamente do tecido e do conteúdo estomacal dos fetos, enquanto que, no estudo atual, o *C. fetus* subsp. *venerealis* foi cultivado do lavado vaginal das fêmeas.

A realização do lavado vaginal pode ter prejudicado o desempenho da IHQ, pois talvez tenha retirado as bactérias que estavam aderidas às células epiteliais da vagina. Entretanto, a maior parte dos animais em que não foi realizado o lavado vaginal, foi considerada negativa para a infecção na IHQ, o que leva a crer que esta técnica não é uma ferramenta eficaz na detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* em fêmeas de camundongos experimentalmente infectadas, podendo ser excluída dos próximos experimentos ou, pelo menos, realizada em conjunto com outros métodos diagnósticos.

Neste estudo, 37 das 46 fêmeas (80,5%) foram diagnosticadas positivas para a infecção por mais de uma técnica empregada, seja através dos métodos de avaliação do lavado vaginal ou do tecido do trato genital. Esta condição foi recomendada por Lander (1990b) e Dufty (1967) ao citarem que ao menos duas técnicas deveriam ser utilizadas na detecção do *C. fetus* subsp. *venerealis*, já que se trata de uma enfermidade com tantas dificuldades de diagnóstico. Hum *et al.* (1997) também declararam que a realização de mais de um teste para detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* é uma tática mais adequada para a conclusão de um diagnóstico final mais acurado e confiável.

É perfeitamente compreensível o fato de terem sido obtidas 9 fêmeas positivas em apenas uma técnica, já que 6 delas pertenciam aos animais em que não foi realizado o lavado vaginal e foram submetidos apenas ao esfregaço do tecido vaginal e à IHQ. Estas 6 fêmeas foram positivas somente no esfregaço do tecido vaginal que, como já discutido anteriormente, demonstrou maior eficácia que a técnica de IHQ também empregada. Não foi encontrada explicação para as 3 amostras restantes que foram identificadas somente na IFD após 48 horas de incubação. Talvez este período de incubação não tenha

sido suficiente para que as bactérias destes animais se multiplicassem o bastante para serem isoladas ou, pelo menos, detectadas nos outros métodos utilizados.

A maior parte dos trabalhos sobre modelos experimentais com infecção induzida no trato genital destaca o estágio de ciclo estral como fator relevante para estabelecimento e manutenção da infecção em questão (Van Andel *et al.*, 1996; Hook Jr. *et al.*, 1997; Rutkowski, Harmsen, 2007; Agnew *et al.*, 2008).

Vacas são infectadas naturalmente durante o estro, pois é a fase em que ocorre a cópula e, conseqüentemente, a transmissão do *C. fetus* subsp. *venerealis* e outros microrganismos de transmissão venérea (Garcia, Eaglesome e Rigby, 1983; Alves *et al.*, 2011). Assim, os estudos que visam o estabelecimento de modelos animais de infecções venéreas geralmente estabelecem a sincronização do estágio do ciclo estral para a fase de estro na inoculação do agente, para que haja maior mimetização da doença observada em bovinos (Hook *et al.*, 1995; Van Andel *et al.*, 1996; Hook Jr. *et al.*, 1997; Mutwiri e Corbeil, 1998; Soto *et al.*, 2005; Rutkowski e Harmsen, 2007; Agnew *et al.*, 2008). No presente estudo não foi feita a sincronização (Figura 6), o que culminou na grande diversidade de fases estrais entre animais de mesmo grupo e grupos distintos (Chorilli, Michelin e Salgado, 2007), mas possibilitou a descoberta da infecção de camundongos BALB/c fêmeas por *C. fetus* subsp. *venerealis* em todas as fases do ciclo estral, assim como o isolamento, sem a necessidade de aplicações de estrógeno para que a infecção se estabelecesse, o que tornou o modelo mais natural.

A maioria dos animais diagnosticados como positivos para a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* foi inoculada durante as fases progesterônicas do ciclo estral, que incluem o metaestro e o diestro, enquanto a maioria dos animais negativos foram inoculados na

fase de proestro (40%). Singh *et al.* (1999) pesquisaram o efeito da progesterona na adesão de *T. foetus* a células epiteliais vaginais bovinas e concluíram que o hormônio não prejudica o estabelecimento da infecção, porque, ao contrário do estrógeno, não inibe a infecção devido à alta produção de muco e extensa cornificação das células epiteliais observadas durante as fases estrogênicas. Esse fato pode justificar os resultados do presente trabalho, uma vez que a maioria dos animais positivos para a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* foi inoculada durante as fases progesterônicas do ciclo estral e, a maior parte dos negativos foi inoculada em uma fase estrogênica.

As fases estrogênicas podem ter dificultado a recuperação de isolados de *C. fetus* subsp. *venerealis* dos camundongos, entretanto, em trabalhos com *T. foetus*, o protozoário geralmente é isolado de todos os animais em todas as fases (Hook *et al.*, 1995; Van Anandel *et al.*, 1996; Hook Jr. *et al.*, 1997; Mutwiri e Corbeil, 1998; Soto *et al.*, 2005; Rutkowski e Harmsen, 2007; Agnew *et al.*, 2008). Mutwiri e Corbeil (1998) conseguiram isolar *T. foetus* de todas as fêmeas BALB/c, que foram tratadas ou não com estrógeno, inoculadas durante os estágios de metaestro e diestro. Estes autores almejavam descobrir se o tratamento prévio com estrógeno era realmente necessário para o estabelecimento da tricomonose genital bovina em camundongos, como descrito em outros trabalhos (St. Claire *et al.*, 1994; Van Anandel *et al.*, 1996) e, se o estágio do ciclo estral influenciava no estabelecimento da infecção. Assim, chegaram à conclusão de que o estrógeno não é essencial para promover e manter a infecção e, que o estágio do ciclo estral no ato da inoculação dos animais não precisa, necessariamente, ser na fase de estro para que a infecção aconteça (Mutwiri e Corbeil, 1998), o que corrobora com os resultados aqui apresentados.

A sincronização do estágio de ciclo estral, na maioria das vezes, é realizada por injeções

ou implantes de estrógeno no animal a ser infectado. Diversos autores mantêm a constante aplicação do hormônio para que os animais permaneçam na fase de estro durante todo o procedimento experimental, alegando que essa prática é essencial para a manutenção da infecção intravaginal e a observação de lesões histopatológicas, já que é o período em que há ausência de leucócitos no trato genital (Hook *et al.*, 1995; Hook Jr. *et al.*, 1997; Van Anandel *et al.*, 1996).

Altas e repetidas doses de estrógeno podem causar efeitos adversos como a inibição do processo de colonização devido ao aumento da produção de muco (Rutkowski e Harmsen, 2007), descargas vaginais e abscessos perivulvares. o que mascara a resposta imunológica no trato reprodutivo de fêmeas (Wira e Sandoe, 1987; St. Claire *et al.*, 1994). Entretanto, é importante salientar que a sincronização da fase de ciclo de todos os animais, seja por aplicação única de estrógeno (Soto *et al.*, 2005) ou pela presença do macho (Chorilli, Michelin e Salgado, 2007), é adequada, pois facilita o manejo dos animais, o controle das condições ambientais e a observação e organização dos resultados.

Em relação às alterações histopatológicas, o escore de vaginite, que representa o grau de reação inflamatória observada, de animais sacrificados durante o proestro e estro foi mais alto que nos outros estágios estrais. A observação dessas alterações histopatológicas em animais infectados pode indicar a infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*, já que as fases proestro e estro apresentam poucos ou nenhum leucócito em animais não infectados (Snell, 1941). Entretanto, é difícil afirmar que estas reações são atribuídas ao *C. fetus* subsp. *venerealis*, pois as fases com o maior valor de escore de vaginite foram totalmente contrárias a maior recuperação de isolados, que aconteceu no metaestro (62,5%). A fase progesterônica, que pode ter proporcionado maior

estabelecimento da infecção, pode, também, ter tido alguma relação com o maior isolamento, devido aos mesmos fatores já discutidos anteriormente, como ausência de muco e células cornificadas no epitélio (Singh *et al.*, 1999).

Embora tenham sido observadas alterações inflamatórias no epitélio vaginal, as mesmas foram muito discretas. Alguns estudos demonstram que podem existir diferenças no padrão de lesões observadas nos modelos experimentais quando comparadas com a infecção natural. O trabalho de Van Andel *et al.* (1996) demonstrou a ausência de lesões na vagina e cérvix dos camundongos experimentalmente infectados por *T. foetus*. Estes autores sugerem que o *T. foetus* pode diminuir sua capacidade de induzir vaginite no camundongo devido às diferenças de pH vaginal e microbiota do trato genital de camundongos e bovinos, assim como as diferenças de condições ambientais, o que também podem ter ocorrido com o *C. fetus* subsp. *venerealis*, levando em conta o baixo escore de vaginite apresentado na maioria dos camundongos.

Quanto ao escore de vaginite e os dias de infecção avaliados, houve uma concordância entre maior reação inflamatória e maior isolamento, que ocorreu no dia 5. Isto contraria a única tentativa de criação de um modelo experimental para infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* realizado por Walsh, White e Warnick (1974). Eles não obtiveram sucesso na implantação de um modelo em fêmeas de cobaio, atribuindo a falha à transitoriedade da infecção e, também, à ausência de quaisquer alterações microscópicas no trato reprodutivo, incluindo vagina, cérvix e útero, durante os cinco dias em que realizaram o experimento. Rutkowski e Harmsen (2007) também não encontraram qualquer inflamação ou dano tecidual na vagina de camundongos estrogenizados e não-estrogenizados infectados experimentalmente com *T. foetus* num período de quatro dias, o que pode

significar pouco tempo para observação de lesões histopatológicas no trato genital destes pequenos animais de laboratório.

Nenhuma lesão ou alteração inflamatória significativa foi observada no útero. Pode ser que 7 dias seja um período curto para que a bactéria se aloje ou mesmo cause qualquer alteração na vagina e no útero dos camundongos, embora Dozsa *et al.* (1960) e Corbeil *et al.* (1975) tenham verificado mudanças histológicas na mucosa uterina de vacas após o 5º dia de infecção com *C. fetus* subsp. *venerealis*. Por outro lado, no estudo com cobaias, durante 5 dias pós-infecção não foi encontrada qualquer alteração no local (Walsh, White e Warnick, 1974), assim como em outros trabalhos usando camundongos como modelo experimental de tricomonose genital bovina. Apesar de diagnosticarem a infecção, não houve alterações histopatológicas no útero até duas semanas pós-inoculação (Van Andel *et al.*, 1996), o que pode explicar a ausência de reações e lesões nos fragmentos de útero de todos os animais testados durante os 7 dias de experimento.

A tentativa de se identificar o *C. fetus* subsp. *venerealis* por microscopia eletrônica de varredura no trato genital das fêmeas de camundongo BALB/c foi bem-sucedida e possibilitou a observação do agente no útero aos 9 dias pós-infecção, entretanto nenhuma bactéria foi encontrada na vagina. Esta situação reforça a idéia de que o modelo de infecção experimental por via intravaginal em camundongo tem potencial para estudos de colonização em infecções crônicas e agudas, devendo este, ser avaliado por tempo superior a 9 dias pós-inoculação. Durante os 7 dias avaliados, nenhuma bactéria foi encontrada no útero pelas técnicas aqui empregadas, o que pode significar que ela só estará no útero após 7 dias de infecção ou que as técnicas de diagnóstico não foram sensíveis o bastante para detectar a bactéria neste local, levando

em conta a ausência de lesões até mesmo nas infecções naturais.

A ausência de experimentos anteriores sobre modelos de infecção experimental com *C. fetus* subsp. *venerealis* por via intravaginal limita o questionamento e a avaliação dos resultados descritos neste trabalho. Entretanto, é importante salientar que esta foi a primeira descrição de um modelo animal de laboratório infectado por via intravaginal que pode ser inoculado em qualquer fase do ciclo estral, sem a necessidade de administração de hormônios ou imunossupressão, o que demonstra que a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em camundongos por via intravaginal é possível.

8. CONCLUSÃO

Camundongos BALB/c foram infectados por *C. fetus* subsp. *venerealis*, por via intravaginal, em qualquer estágio do ciclo estral sem a necessidade de imunossupressão ou modificação do ciclo, permanecendo na vagina dos animais por até 7 dias após a inoculação experimental.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNEW, D. W.; CORBEIL, L. B.; MUNSON, L.; BYRNE, B. A.; BONDURANT, R. H. A pregnant mouse model for bovine *Tritrichomonas foetus* infection. *Vet. Pathol.*, v. 45, p. 849-864, 2008.
- ALVES, T. M.; STYNEN, A. P. R.; MIRANDA, K. L.; LAGE, A. P. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n. 4, p. 336-344, 2011.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. *AVMA Guidelines on Euthanasia: Formely report of the AVMA panel on Euthanasia*. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2007. 36p.
- BALL, L.; DARGATZ, D. A.; CHENEY, J. M.; MORTIMER, R. G. Control of venereal disease in infected herds. *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.*, v. 3, n. 3, p. 561-574, 1987.
- BURGESS, D. E.; McDONALD, C. M. Analysis of adhesion and cytotoxicity of *Tritrichomonas foetus* to mammalian cells by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 4253-4259, 1992.
- CAMPERO, C. M.; ANDERSON, M. L.; WALKER, R. L.; BLANCHARD, P. C.; BARBANO, L.; CHIU, P.; MARTINEZ, A.; COMBESSIES, G.; BARDON, J. C.; CORDEVIOLA, J. Immunohistochemical Identification of *Campylobacter fetus* in Natural Cases of Bovine and Ovine Abortions. *J. Vet. Med.*, v. 52, p. 138-141, 2005.
- CLARK, B. L.; DUFTY, J. H.; MONSBOURGH, M. J. A method for maintaining the viability of *Vibrio fetus* var. *venerealis* in samples of preputial secretion collected from carrier bulls. *Aust. Vet. J.*, v. 48, p. 462-464, 1972.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev. Ciênc. Farm. Bas. Aplic.*, v. 28, p. 11-23, 2007.
- CORBEIL, L. B.; SCHURIG, G. G. D.; BIER, P. J.; WINTER, A. J. Bovine venereal vibriosis: antigenic variation of the bacterium during infection. *Infect. Immun.*, v. 11, p. 240-244, 1975.
- COTTORELLO, A. C. P. *Relação parasita - hospedeiro na infecção de células epiteliais in vitro por Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. 2006. 76p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) -

Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DEKEYSER, J. Bovine Genital Campylobacteriosis. In: BUTZLER, J.P. (Ed). *Campylobacter infection in man and animals*. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 181-191.

DE LISLE, G. W. STEPHENS, D. J.; BIRD, M. M. E. Transport media for *Campylobacter fetus venerealis*. *N. Z. Vet. J.*, v. 31, p. 31-32, 1982.

DOZSA, L.; OLSON, N. O.; CAMPBELL, A. The uterine biopsy technique for following the histologic changes caused by *Vibrio fetus* in the uterine mucosa. *Am. J. Vet. Res.*, p. 878-883, 1960.

DUFTY, J. H. Diagnosis of Vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, v. 43, p. 433-437, 1967.

DUFTY, J. H; 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, M. D.; GARCIA, M. M. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen. Part I, *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Bull.*, v. 62, p. 743-775, 1992.

EAGLESOME, M. D.; SAMPATH, M. I.; GARCIA, M. M. A detection assay for *Campylobacter fetus* in bovine semen by restriction analysis of PCR amplified DNA. *Vet. Res. Com.*, v. 19, n. 4, p. 253-263, 1995.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Complem. Path.*, v. 126, n. 2, p. 79-94, 2002.

FIGUEIREDO, J. F.; PELLEGRIN, A. O.; FÓSCOLO, C. B.; MACHADO, R. P.; MIRANDA, K. J.; LAGE, A. P. Evaluation

of direct immunofluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v. 28, p. 118-123, 2002.

FINLAY, R. C.; RUCKERBAUER, G. M.; STOVELL, P. L. *Campylobacter fetus* in artificial insemination unit and slaughterhouse bulls in Ontario. *Can. J. Comp. Med.*, v. 49, n. 2, p. 231-232, 1985.

FÓSCOLO, C. B.; PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R. C.; STYNEN, A. P. R.; LAGE, A. P. Vaccination of bulls against bovine genital campylobacteriosis: a therapeutic approach. *Anim. Reprod.*, v. 2, n. 2, p. 122-127, 2005.

GARCIA, M. M.; EAGLESOME, M. D.; RIGBY, C. *Campylobacters* important in veterinary medicine. *Vet. Bull.*, v. 53, p. 793-811, 1983.

GARCIA, M. M.; STEWART, R. B.; RUCKERBAUER, G. M. Quantitative evaluation of a transport-enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Vet. Rec.*, p. 434-436, 1984.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; PICONE, A. B. B. Avaliação de dois métodos de coleta de muco prepucial no diagnóstico da campilobacteriose genital em touros. *Biol.*, v. 52, p. 7-11, 1986.

GREENFIELD, L.; WHITE, T. J. Sample preparation methods. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. (Ed). *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1993. p. 122-137.

GROFF, A. C. M.; KIRINUS, J. K.; SÁ E SILVA, M.; MACHADO, G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. P. C. Polimerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, n. 12, p. 1031-1035, 2010.

- HERNANDEZ, J.; ALONSO, J. L.; FAYOS, A.; AMOROS, I.; OWEN, R. J. Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *C. jejuni* in estuarine surface waters. *FEMS. Microbiol. Lett.*, v. 127, p. 201-206, 1995.
- HONORÉ-BOUAKLINE, S.; VINCENSINI, J. P.; GIACUZZO, V.; LAGRANGE, P. H.; HERRMANN, J. L. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 2323-2329, 2003.
- HOOK, R. R.; St. CLAIRE, M.; RILEY, R.; FRANKLIN, C.; BESSCH-WILLIFORD, C. L. *Tritrichomonas foetus*: comparison of isolate virulence in an estrogenized mouse model. *Exp. Parasitol.*, v. 81, p. 202-207, 1995.
- HOOK Jr., R. R.; St. CLAIRE, M. C.; RILEY, C.; FRANKLIN, C.; BESCH-WILLIFORD, C. L. Mouse strain and age affect susceptibility to experimentally induced genital trichomoniasis. *Lab. Anim. Sci.*, v. 47, p. 324-326, 1997.
- HUM, S.; BRUNNER, J.; McINNES, A.; MENDOZA, G.; STEPHENS, J. Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from cattle. *Aust. Vet. J.*, v. 71, n. 6, p. 184-186, 1994.
- HUM, S.; QUINN, K.; BRUNNER, J.; ON, S. L. W. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.*, v. 75, n. 11, p. 827 - 831, 1997.
- HUM, S.; McINNES, A. Bovine campylobacteriosis, bacteriology and antibody detection. In: CORNER, A. A.; BAGUST, T. J. (Ed). *Australian standard diagnostic techniques for animal disease*. Victoria: CSIRO Information Service, 1993. p. 3-8.
- HUM, S.; STEPHENS, L. R.; QUINN, C. Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Aust. Vet. J.*, v. 8, p. 272-275, 1991.
- HUMPHREY, C. D.; MONTAG, D. M.; PITTMAN, F. E. Experimental infection of hamsters with *Campylobacter jejuni*. *J Infect Dis*, v. 3, p. 485-493, 1985.
- LAGE, A. P. Epidemiologia e controle da campilobacteriose genital bovina. In: V SIMPOSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 2001, Brasil. *Anais...* Brasil, 2001. p.17.
- LAGE, A. P.; LEITE, R. C. Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). *Pec. Corte*, n. 10, p. 50-54, 2000.
- LAGE, A. P.; PELLEGRIN, A. O.; COSTA, G. M. *et al.* Campilobacteriose genital bovina: 21 anos de diagnóstico na Escola de Veterinária da UFMG. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, p. 164-166, 1997.
- LANDER, K. P. The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Br. Vet. J.*, v. 46, p. 327- 333, 1990a.
- LANDER, K. P. The application of transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. *Br. Vet. J.*, v. 146, p. 334-340, 1990b.
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp. Clin. Endocrinol.*, v. 102, p. 122-134, 1994.
- LEITE, R. C. *Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina*. 1977. 38p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- MARCONDES, F. K.; MIGUEL, K.; MELO, L. L.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.*, v. 74, n. 4, p. 435-440, 2001.
- McGRORY, T.; MEYSICK, K.; LEMCHUK-FAVEL, L. T.; GARBER, G. E. The interaction of *Lactobacillus acidophilus* and *Trichomonas vaginalis* in vitro. *J. Parasitol.*, v. 80, p. 50-54, 1994.
- McMILLEN, L.; FORDYCE, G.; DOOGAN, V. J.; LEW, A. E. Comparison of culture and a Novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 3, p. 938-945, 2006.
- McPHERSON, M. J.; MOLLER, S. G. *PCR*. New York: Springer/Bios, 2000. 276p.
- MELLIICK, P. W.; WINTER, A. J.; McENTEE, K. Diagnosis of vibriosis in the bull by the use of the fluorescent antibody technique. *Cornell Vet.*, v. 55, p. 280-294, 1965.
- MIRANDA, K. L. *Prevalência da infecção por Campylobacter fetus em bovinos de corte no Brasil - 2000*. 2005. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MONKE, H. J., LOVE, B. C.; WITTUM, T. E.; MONKE, D. R.; BYRUM, B. A. Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 14, p. 35-39, 2002.
- MUTWIRI, G. K.; CORBEIL, L. B. Genital and systemic immune responses in a murine model of *Trichomonas foetus* infection. *J. Parasitol.*, v. 84, p. 321-327, 1998.
- OIE, 2005. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Iowa: Office International Organization of Epizooties.
- PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; LEITE, R. C.; COSTA, G. M.; 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.
- PELLEGRIN, A. O. A campilobacteriose e tricomoniose são doenças reemergentes? *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 23, n. 4, p. 479-566, 1999.
- PELLEGRIN, A. O.; LAGE, A. P.; SERENO, J. B.; RAVAGLIA, E.; COSTA, M.; LEITE, R. C. Bovine Genital Campilobacteriosis in Pantanal, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, v. 55, n. 3, 2002.
- PHILPOTT, M. Diagnosis of *Vibrio fetus* infection in the bull. *Vet. Rec.*, v. 82, p. 458-463, 1968b.
- PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidine thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.8, p.151-156, 1989.
- RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, v. 42, p. 405-426, 2005.
- ROBERTS, J. S. (Ed). *Veterinary obstetrics and genital disease*. Michigan: Ann Arbor Edward Brothers, 1971. 776p.
- RUCKERBAUER, G. M; MALKIN, K; MITCHELL, D.; BOULANGER, 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.

- RUTKOWSKI, M. R.; HARMSSEN, A. G. *Trichomonas foetus*: pathogenesis of acute. *Exp. Parasitol.*, v. 115, p. 143-159, 2007.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2100p.
- SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Ed.) *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002b. p.115-118.
- SCHULZE, F.; BAGON, A.; MÜLLER, W.; HOTZEL, H. Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 6, p. 2019-2024, 2006.
- SCIENTIFIC VETERINARY COMMITTEE, ANIMAL WELFARE SECTION, 1997. The welfare of intensively kept pigs. For the European Commission; Report nr Doc XXIV/B3/ScVC/0005/1997. 91p.
- SHEPLER, V. M.; PLUMER, G. J.; FABER, J. E. Isolation of *Vibrio fetus* from bovine preputial fluid using Millipore filters and an antibiotic medium. *Am. J. Vet. Res.*, v. 24, p. 749-755, 1963.
- SINGH, B. N.; LUCAS, J. J.; BEACH, D. H.; SHIN, S. T.; GILBERT, R. O. Adhesion of *Trichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 3847-3854, 1999.
- SKIRROW, M. B. *Campylobacter* enteritis: a 'new' disease. *Br. Med. J.*, v. 2, p. 9-11, 1977.
- SNELL, G. D. (Ed). *Biology of the Laboratory Mouse*. Oxford, England: Blakiston, 1941. 190-192p.
- SOTO, P.; ECHEVARRÍA, H. M.; MONTEAVARO, C. E.; CATENA, M. C. Experimentally induced intravaginal *Trichomonas foetus* infection in a mouse model. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 25, n. 4, 2005.
- SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DAVID A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anat. Rec.*, v. 254, p. 116-126, 1999.
- St. CLAIRE, M. C.; RILEY, L. K.; FRANKLIN, C. L. BESCH-WILLIFORD, C. L.; HOOK Jr., R. R. Experimentally induced intravaginal *Trichomonas foetus* infection in the estrogenized mouse. *Lab. Anim. Sci.*, v. 44, p. 430-434, 1994.
- STOESSEL, F. (Ed). *Las enfermedades venereas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital*. Zaragoza: Acribia, 1982. 163p.
- STYNEN, A. P. R. *Detecção de Campylobacter fetus em lavados prepuciais de touros pela PCR*. 2000. 36f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- STYNEN, A. P. R. *Expressão diferencial de proteínas de amostras de Campylobacter fetus venerealis após passagens sucessivas em novilhas*. 2009. 52p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- STYNEN, A. P. R.; PELLEGRIN, A. O.; FÓSCOLO, C. B.; FIGUEIREDO, J. F.; CANELLA FILHO, C.; LEITE, R. C.; LAGE A. P. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha – Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, p. 766-769, 2003.

VAN ANDEL, R. A.; FRANKLIN, C. L.; St. CLAIRE, M. C.; RILEY, L. K.; BESCH-WILLIFORD, C. L.; HOOK Jr., R. R. Lesions of experimental genital *Tritrichomonas foetus* infections in oestrogenized BALB/c mice. *Vet. Pathol.*, v. 33, p. 407-411, 1996.

VANDAMME, P.; FALSEN, E.; ROSSAU, R.; HOSTE, B.; SEGERS, P.; TYTGAT, R.; DE LEY, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 41, p. 88-103, 1991a.

WALSH, A. F.; WHITE, F. H.; WARNICK, A. C. Intravaginal inoculation of the guinea-pig with *Vibrio fetus* var. *venerealis* during natural and induced reproductive cycle phases. *J. Reprod. Fert.*, v. 38, p. 125-130, 1974.

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

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.

WIRA, C. R.; SANDOE, C. P. Specific IgA antibodies in the secretions of the female reproductive tract: effects of immunization and estradiol on expression of this response in vivo. *J. Immunol.*, v. 138, p. 4159-4164, 1987.