

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA: INTERAÇÕES MICROBIANAS E  
POSSÍVEIS EFEITOS NA FERTILIDADE BOVINA**

**SILVIA DE CARLI**

**PORTO ALEGRE**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA: INTERAÇÕES MICROBIANAS E  
POSSÍVEIS EFEITOS NA FERTILIDADE BOVINA**

**Autora: Silvia De Carli**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito final para a obtenção do título de doutor em Ciências Veterinárias na área de Microbiologia Veterinária – Bacteriologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Franciele Maboni Siqueira

**PORTO ALEGRE**

**2022**

**O Presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

CIP - Catalogação na Publicação

De Carli, Silvia  
CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA: INTERAÇÕES  
MICROBIANAS E POSSÍVEIS EFEITOS NA FERTILIDADE BOVINA  
/ Silvia De Carli. -- 2022.  
70 f.  
Orientador: Franciele Maboni Siqueira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Campilobacteriose Genital Bovina. 2. Comunidade fúngica. 3. Comunidade bacteriana. 4. Doenças reprodutivas bovinas. 5. Muco cervicovaginal. I. Maboni Siqueira, Franciele, orient. II. Título.

**Silvia De Carli**

**CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA: INTERAÇÕES MICROBIANAS E  
POSSÍVEIS EFEITOS NA FERTILIDADE BOVINA**

Aprovado em: 28/03/2022

APROVADO POR:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Franciele Maboni Siqueira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi  
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Fabrício Almeida Araújo  
Universidade Federal do Pará - UFPA  
Membro da Comissão

---

Dr<sup>ª</sup>. Fabiana Quoos Mayer  
Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - IPVDF  
Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço do fundo do meu coração aos meus pais, que nunca mediram esforços para me ajudar e incentivaram os meus estudos.

Agradeço ao meu marido Lucas pela paciência e amor durante esse período de doutorado. Você foi fundamental nessa trajetória. Obrigada por nunca soltar a minha mão.

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, incentivando-me e distraíndo-me das turbulências emocionais da pós-graduação.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Franciele por todos os ensinamentos, orientação e constante incentivo.

Agradeço a todas as colegas do LaBacVet pela cumplicidade, risadas e choros. Vocês tornaram esse processo muito mais leve.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade e referência, bem como ao apoio financeiro do CNPq.

## RESUMO

A Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) é uma doença venérea, que causa prejuízos econômicos para o setor pecuário, cujo agente etiológico é o *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (Cfv). Essa bactéria é fastidiosa e microaerófila, o que dificulta o transporte de amostras biológicas, o cultivo microbiológico e a identificação bacteriana. Além disso, existe uma lacuna no entendimento da interação microbiana das comunidades bacteriana e fúngica cervicovaginal, em casos de colonização por Cfv e outros agentes infecciosos carregados por touros, que causam problemas reprodutivos nas fêmeas bovinas. Portanto, esta tese objetivou: i) avaliar a viabilidade do congelamento de muco prepucial de touros para identificação de Cfv por ensaio de PCR; ii) screening molecular dos principais agentes infecciosos (Cfv, *M. bovis*, *M. bovigentialium*, *U. diversum* e *T. foetus*) carregados por touros e vinculados à infertilidade; iii) determinar a diversidade da comunidade fúngica residente na cérvix de vacas, conforme a ordem de paridade (múltiparas e nulíparas), e iv) determinar a diversidade bacteriana residente na cérvix de vacas com CGB. Identificamos que os mucos prepuciais de touros podem permanecer congelados a - 20 °C por 10 dias previamente ao diagnóstico molecular de Cfv, sem prejuízo na sensibilidade do método. O rastreamento molecular dos agentes infecciosos reprodutivos carregados por touros de rebanhos com baixas taxas reprodutivas evidenciou que 159/210 touros foram positivos para a presença de pelo menos um dos agentes investigados, sendo Cfv, *M. bovis*, *U. diversum* e *M. bovigentialium* os mais comumente observados. Os resultados dos sequenciamentos da região ITS sugerem que a comunidade fúngica presente na cérvix sofre significativas mudanças nas vacas com infertilidade, bem como nas vacas múltiparas. Ademais, o gênero *Candida* parece estar relacionado aos casos de infertilidade em fêmeas bovinas. O estudo da comunidade bacteriana cervicovaginal bovina evidenciou que a microbiota desse sítio não sofre alterações pela presença de Cfv. O perfil da microbiota bacteriana está intimamente relacionado ao fato do retorno ao cio na última estação, no qual a Cfv pode interagir e se beneficiar da microbiota presente, mas sem causar alterações diretas nela. Em resumo, esta tese caracteriza a microbiota cervicovaginal de vacas com CGB, permitindo o conhecimento sobre o perfil da interação microbiana no trato reprodutivo de fêmeas bovinas. Os resultados permitirão o aprimoramento do desenvolvimento tecnológico de medidas de controle e redução de perdas reprodutivas na bovinocultura.

**Palavras-chave:** Campilobacteriose Genital Bovina. Comunidade fúngica. Comunidade bacteriana. Muco cervicovaginal. Muco prepucial. Doenças reprodutivas bovinas.

## ABSTRACT

Bovine Genital Campylobacteriosis (BGC) is a venereal disease that causes economic losses to livestock, whose etiological agent is *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (Cfv). This bacterium is demanding and microaerophilic, making it difficult to transport biological samples, microbiological culture, and bacterial identification. There is a gap in understanding the microbial interaction of bacterial and fungal cervicovaginal communities in cases of colonization by Cfv and other infectious agents carried by bulls, which cause reproductive problems in female cattle. Therefore, this thesis aimed to i) evaluate the viability of freezing the preputial mucus of bulls for identification of Cfv by PCR assay; ii) molecular screening of the main infectious agents (Cfv, *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *U. diversum*, and *T. foetus*) required by bulls and linked to infertility; iii) determine the diversity of the fungal community residing in cows' cervix, according to the order of parity (multiparous and nulliparous), and iv) determine the bacterial diversity residing in cows' cervix with BGC. We identified that the preputial mucus of bulls can remain frozen at -20 °C for 10 days before the molecular diagnosis of Cfv without impairing the sensitivity of the method. Molecular screening of reproductive infectious agents carried by bulls of herds with low reproductive rates showed that 159 out of 210 bulls were positive for the presence of at least one of the investigated agents. Cfv, *M. bovis*, *U. diversum*, and *M. bovis genitalium* were the most common detected agents. The results of sequencing of the ITS region suggest that the fungal community present in the cervix undergoes significant changes in cows with infertility, as well as in multiparous cows. In addition, the genus *Candida* seems to be related to cases of infertility in female cattle. The study of the bovine cervicovaginal bacterial community showed that the microbiota of this site did not change due to the presence of Cfv. The profile of the bacterial microbiota is closely related to the return to estrus in the last season, in which the Cfv can interact and benefit from the microbiota present without causing direct changes in it. This thesis characterizes the cervicovaginal microbiota of cows with BGC, allowing knowledge about the profile of microbial interaction in the reproductive tract of female cattle. The results will allow the improvement of technological development in control measures and reduction of reproductive losses in cattle.

**Keywords:** Bovine Genital Campylobacteriosis. Fungal community. Bacterial community. Cervicovaginal mucus. Preputial mucus. Bovine reproductive diseases.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGB: Campilobacteriose Genital Bovina

TGB: Tricomonose Genital Bovina

DFAT: Imunofluorescência direta

DNA: Ácido desoxirribonucleico

MLST: *Multilocus sequence typing*

PBS: Tampão salina fosfato

PCoA: Análise da Coordenada Principal

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFGE: *Pulsed field gel electrophoresis*

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

OIE: Organização Mundial da Saúde Animal

WGS: *Whole genome sequencing*

ITS: *Internal transcribed spacer*

ASV: *Amplicon sequence variant*

pb: pares de base



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Países com pelo menos uma notificação de circulação da Campilobacteriose Genital Bovina para a OIE .....	16
Figura 2 - Microbiotas que influenciam na composição de micro-organismos do trato reprodutivo bovino .....	26
Figura 3 - Compilado da revisão sistemática com 46 estudos metagenômicos do trato reprodutivo de machos e fêmeas bovinos .....	27
Figura 4 - Fluxograma da coleta de amostras e elaboração dos grupos para o estudo da microbiota cervicovaginal bacteriana .....	35
Figura 5 - Fluxograma da coleta de amostras e elaboração dos grupos para o estudo da microbiota cervicovaginal fúngica .....	36
Figura 6 - Fluxograma de trabalho a partir de dados de sequências de brutas ( <i>reads</i> ) até as análises comparativas dos grupos estudados .....	37

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Resumo de pesquisas relatando a prevalência de CGB no Brasil entre os anos de 1995 e 2020 .....	15
Tabela 2 - Métodos de diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina e sua finalidade.....	20
Tabela 3 - Principais causas infecciosas de infertilidade e aborto em bovinos.....	23
Tabela 4 - Táxons da microbiota central do trato reprodutivo bovino identificados previamente por estudos de metagenômica.....	29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Epidemiologia da Campilobacteriose Genital Bovina.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Características do agente etiológico causador da Campilobacteriose Genital Bovina .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Diagnóstico diferencial de Campilobacteriose Genital Bovina .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Avanços na caracterização de populações microbianas .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6 Microbiota central do trato reprodutivo de bovinos .....</b>	<b>25</b>
<b>2.7 Microambiente do trato reprodutivo de fêmeas bovinas e influências na microbiota</b>	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Metodologia de seleção dos animais, amostragem e processamento das amostras ....</b>	<b>33</b>
4.1.1 Seleção e visita às propriedades para coleta de muco cervicovaginal de vacas .....	33
4.1.2 Coleta das amostras de muco cervicovaginal .....	33
4.1.3 Identificação molecular de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> nas amostras de muco cervicovaginal .....	33
4.1.4 Amplificação do alvo V4 do gene 16S rDNA nas amostras de muco cervicovaginal das vacas e sequenciamento dos amplicons .....	34
4.1.5 Amplificação da região intergênica ITS1 nas amostras de muco cervicovaginal das vacas e sequenciamento dos amplicons.....	35
4.1.6 Análises in silico da diversidade de bactérias e micro-organismos eucarióticos obtidos da cérvix das vacas analisadas.....	36
<b>5 CAPÍTULO 1: Muco prepucial bovino congelado como amostra adequada para o diagnóstico molecular direto de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>6 CAPÍTULO 2: Vigilância de touros de corte no Brasil para avaliar o seu papel como fonte de agentes infecciosos relacionados à infertilidade das vacas.....</b>	<b>43</b>

<b>7</b>	<b>CAPÍTULO 3: Desempenhos reprodutivos das vacas e a ordem de paridade influenciam a comunidade fúngica cervicovaginal .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>CAPÍTULO 4: Rumo à caracterização da microbiota cervicovaginal de vacas que carregam <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>53</b>
<b>10</b>	<b>CONTRIBUIÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DOS RESULTADOS ALCANÇADOS NESTA TESE .....</b>	<b>58</b>
<b>11</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>12</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira ocupa uma posição de destaque no cenário mundial, com uma produção de carne de, aproximadamente, 10 milhões de toneladas anuais. Desse montante, cerca de dois milhões de toneladas de carne em peso de carcaça bovina é exportado a cada ano, o que rende uma receita de, aproximadamente, US \$ 5,4 bilhões por ano (ERASMUS *et al.*, 2020). Além disso, o rebanho brasileiro é o maior do mundo e possui cerca de 218,2 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2020). A exportação de carnes é um dos principais setores do agronegócio nacional. No entanto, nos últimos anos, a bovinocultura gaúcha e nacional vem apresentando produtividade modesta, necessitando aprimorar os seus índices produtivos para aumentar o retorno financeiro dos produtores e possibilitar uma maior competitividade no mercado internacional (SILVA *et al.*, 2014). Dentre os importantes fatores associados à rentabilidade da pecuária bovina, destaca-se a reprodução, que afeta diretamente a produtividade dos rebanhos, sendo as doenças venéreas as principais responsáveis por esses problemas (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006). As infecções venéreas de bovinos apresentam distribuição mundial, com maior incidência em regiões e propriedades em que a monta natural se caracteriza como o principal método de concepção (SAHIN *et al.*, 2017).

Dentre os micro-organismos já conhecidos como potencialmente infecciosos no trato reprodutivo de bovinos, destacam-se: *Campylobacter fetus*, *Haemophilus somnus*, *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma* spp., *Leptospira* spp., *Brucella abortus*, *Tritrichomonas foetus*, agentes virais e outros parasitários (BONDURANT, 2005). Na bovinocultura, um estro perdido acarreta no atraso de aproximadamente 21 dias no ciclo produtivo. Consequentemente, há prejuízos com redução na produção de bezerros, e produção de leite, resultando na diminuição de renda. Nesse contexto, a Campilobacteriose Genital Bovina (CGB), a qual resulta na não implantação do embrião, e consequentemente retorno ao cio das fêmeas, causada pela bactéria *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, é considerada uma importante causa de problemas reprodutivos em bovinos, sendo considerada limitante para a melhoria da produtividade animal em países endêmicos (SILVEIRA *et al.*, 2018).

Os métodos de diagnóstico *Campylobacter* spp. disponíveis incluem cultivo bacteriológico, ensaio de imunofluorescência direta, identificação por MALDI-TOF-MS e por reação de PCR (SAHIN *et al.*, 2017). O método padrão é o cultivo microbiológico, seguido da identificação fenotípica ou genotípica. No entanto, o cultivo comumente é dificultado pela característica fastidiosa da bactéria e, por isso, a detecção direta em espécimes por PCR tem sido empregada com sucesso, ganhando destaque no diagnóstico preciso de *C. fetus* subsp.

*venerealis* (CARLI *et al.*, 2020; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS *et al.*, 2013). Porém, mesmo para detecção molecular, os longos períodos de transporte das amostras clínicas do campo até laboratórios, tornam-se um desafio no diagnóstico satisfatório de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Atualmente, a CGB é uma doença pouco estudada mundialmente, mesmo com o importante impacto negativo nas taxas reprodutivas e na produtividade. Em decorrência do reduzido número de estudos, ressalta-se a importância em investigar os casos de infertilidade bovina, principalmente a interação entre os micro-organismos presentes na cérvix de vacas infectadas com *C. fetus* subsp. *venerealis*, visando contribuir com a compreensão dos mecanismos de patogenicidade da doença. Diante do exposto, este trabalho objetivou padronizar os métodos de coleta e armazenamento de amostras prepuciais para o diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*, verificar a diversidade da microbiota cervicovaginal de vacas com CGB e, posteriormente, inferir as interações entre micro-organismos e a relação com o desfecho clínico da infertilidade nas vacas. Entender a composição e associação de micro-organismos cervicovaginais em vacas que carregam *C. fetus* subsp. *venerealis* ajudará a elucidar a patogenicidade desta bactéria, bem como determinar as associações que favorecem os quadros de infertilidade. Os dados gerados no presente estudo serão de extrema valia para o completo entendimento da patofisiologia dos casos de infertilidade em vacas, melhoramento da reprodução bovina com práticas de manejo adequadas e correto controle e prevenção da CGB.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Epidemiologia da Campilobacteriose Genital Bovina

A Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) é uma enfermidade infectocontagiosa, de transmissão venérea, causada por *C. fetus* subsp. *venerealis*, caracterizada por morte embrionária, retorno ao cio e infertilidade temporária em fêmeas bovinas (SMITH; TAYLOR, 1919). A doença impacta economicamente a pecuária de corte ao interferir no intervalo entre partos, índice reprodutivo de um rebanho que se reflete diretamente na viabilidade de produção (HOQUE *et al.*, 2021). A CGB predomina em países tradicionalmente produtores de carne bovina, onde acarreta baixas taxas de concepção, aumento da reposição de reprodutores, reduzindo, conseqüentemente, a produtividade de fazendas. No Brasil, a doença é endêmica em vários estados, e a ocorrência relatada da bactéria *C. fetus* subsp. *venerealis* em rebanhos bovinos varia de 1,8% a 51,7% (Tabela 1). A variabilidade observada nas frequências de identificação pode estar relacionada à dificuldade de detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis*, por métodos de cultivo convencional e fluorescência (SCHMIDT; VENTER; PICARD, 2012), que no passado eram as abordagens mais comuns. Atualmente, os ensaios moleculares são os métodos mais úteis para o diagnóstico de *C. fetus* subsp. *venerealis*, porque são independentes da viabilidade bacteriana (CARLI *et al.*, 2020).

Tabela 1 – Resumo de pesquisas relatando a ocorrência de CGB no Brasil entre os anos de 1995 e 2020

Referência	Ano (s) analisado (s)	Estados	Técnica de identificação	Origem da amostra	Tipo de produção	% animais positivos (N)
Pellegrin <i>et al.</i> (2002)	1995-1996	MS	DFAT	Touros	Corte	51,7 % (171/327)
Stynen <i>et al.</i> (2003)	1998	MG	DFAT	Vacas	Leite	25,5 % (40/157)
Miranda <i>et al.</i> (2005)	2000	BA, MA, GO, MT, MS, MG, PA, PR, RS, RO, SP e TO	DFAT	Touros	Corte	19,7% (224/1191)
Rocha <i>et al.</i> (2009)	2009	RJ	DFAT/I	Touros	Corte e Leite	IFD 35,9 % (14/39) I 10,3 % (4/39)
Leal (2012)	2009	DF	DFAT	Touros e Vacas	NI	11,1 % (44/398)
Ziech <i>et al.</i> (2004)	1999-2010	RS	PCR	Touros, Vacas e Fetos	Corte e Leite	10,9 % (89/816)
Oliveira <i>et al.</i> (2015)	2013	PE	PCR	Vacas	Leite	1,8 % (7/383)
Botelho <i>et al.</i> (2018)	2013	MG	PCR	Touros	Corte	17,5 % (35/200)
Nascimento <i>et al.</i> (2018)	2016	AL	PCR	Touros	Corte	4,9 % (8/162)
Filho <i>et al.</i> (2018)	2016	PB	PCR	Vacas	Leite	7,7 % (21/273)
Balzan <i>et al.</i> (2020)	2011-2018	RS	PCR/I	Touros, Vacas e Fetos	Corte e Leite	8 % (21/261)
De Carli <i>et al.</i> (2022)	2019-2020	RS, MT e MS	PCR	Touros	Corte	41% (87/210)

\* Dados coletados em 26/02/2022.

MS: Mato Grosso do Sul; MG: Minas Gerais; BA: Bahia; DF: Distrito Federal; GO: Goiás; MA: Maranhão; MT: Mato Grosso; MS: Mato Grosso do Sul; PA: Pará; PR: Paraná; RS: Rio Grande do Sul; RO: Rondônia; SP: São Paulo; TO: Tocantins; RJ: Rio de Janeiro; PE: Pernambuco; AL: Alagoas e PB: Paraíba.

DFAT: Imunofluorescência direta; I: Isolamento bacteriano; PCR: Reação em cadeia da Polimerase. NI: Não informado.

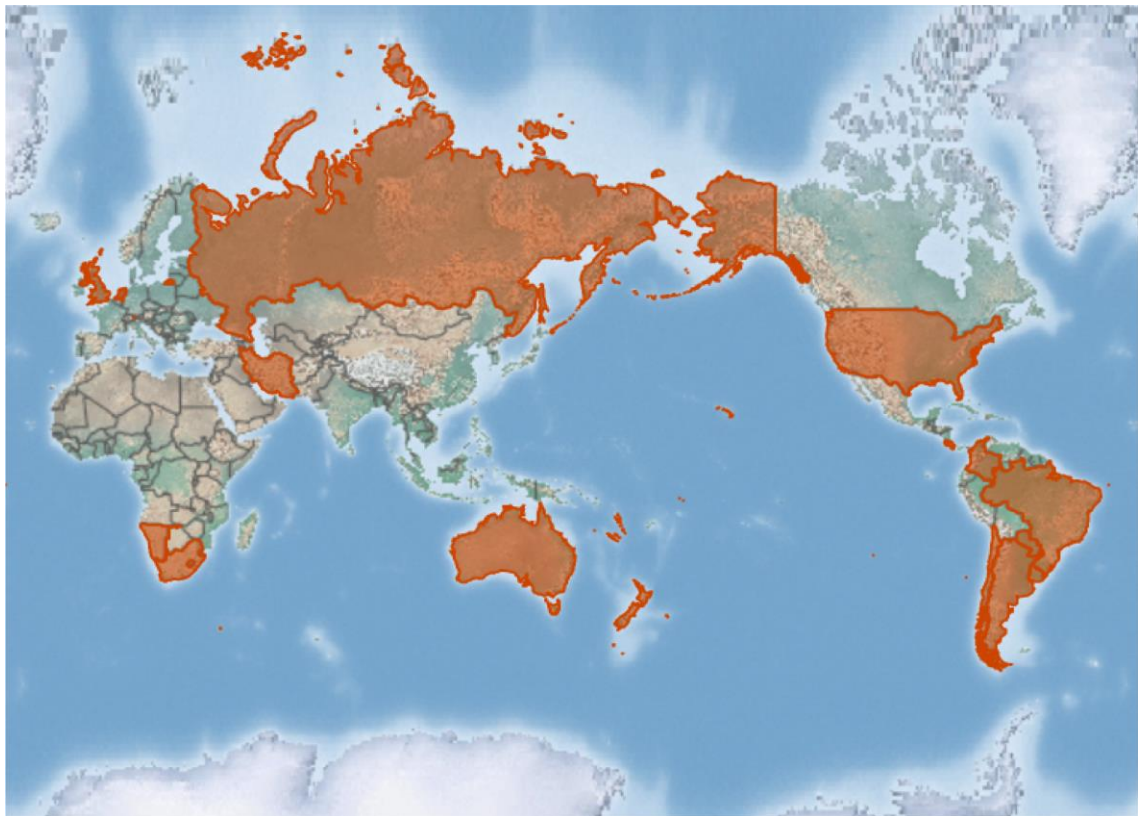
Fonte: Adaptado de Balzan *et al.* (2020)

A frequência de *C. fetus* subsp. *venerealis*, observada em outros países da América do Sul, como Uruguai e Argentina, é inferior a relatada no Brasil (DELPIAZZO *et al.*, 2021; MOLINA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2018). Nos países da América do Norte e da Ásia, *C. fetus* subsp. *venerealis* é rara entre touros reprodutores, com uma frequência de 1,1% a 8,8%



(HOSSEINZADEH; KAFI; POUR-TEIMOURI, 2013; WALDNER *et al.*, 201), enquanto na Oceania, o nível de touros infectados era de 28,8% (SANHUEZA *et al.*, 2014). Apesar da ausência de dados confiáveis de muitos países, a doença está distribuída em todo o mundo (MSHELIA *et al.*, 2010). Conforme podemos constatar no mapa de registros de presença ou ausência da notificação de CGB, na Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), grande parte dos países já notificaram, pelo menos uma vez, a ocorrência da doença (Figura 1). No entanto, alguns países, incluindo o Brasil, não notificam compulsoriamente os casos de CGB; portanto, os dados contidos no sistema da OIE podem não refletir a realidade, e datam até o ano de 2019.

Figura 1 - Países com pelo menos uma notificação de circulação da Campilobacteriose Genital Bovina para a OIE



A cor vermelha no mapa indica a presença da doença no país.

Fonte: OIE (2019)

Além da ausência de dados oficiais de CGB, a discrepância na prevalência da bactéria em diferentes regiões geográficas pode ser ocasionada por fatores epidemiológicos relacionados ao local de criação dos animais e manejo dos rebanhos. Entre os fatores de manejo, destaca-se a introdução de vacas e novilhas de rebanhos endemicamente infectados, a

importação de touros para fins de cruzamentos sem exames de doenças reprodutivas e a falta de controle na circulação de bovinos pelas fronteiras nacionais (MSHELIA *et al.*, 2010; PENA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Outros fatores associados à campilobacteriose incluem o uso de touros comunitários, ou a presença de mais de um touro em um mesmo rebanho (STYNEN *et al.*, 2003), pastoreio comunitário (PENA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021), ausência de vacinação profilática (JIMENEZ, 2018), contaminação mecânica ou durante a inseminação artificial por sêmen contaminado (CHIAPPARRONE; SOTO; CATENA, 2016), contato com cama contaminada ou fômites (MC ENTEE; HUGHES; GILMAN, 1954), e contato entre touros infectados e não infectados (BONDURANT, 2005). Esses fatores, somados à ausência de dados oficiais da circulação de *C. fetus* subsp. *venerealis*, tornam a CGB uma doença com distribuição mundial com dados de prevalência discrepantes entre as regiões geográficas.

## 2.2 Características do agente etiológico causador da Campilobacteriose Genital Bovina

O agente da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB), *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, foi descrito pela primeira vez por McFadyean & Stockman, em 1913. Inicialmente, o agente foi identificado como um micro-organismo com forma vibrioide, que possivelmente causava aborto em ovelhas e vacas (MCFADYEAN; STOCKMAN, 1913). Mais tarde, em 1919, Smith e Taylor isolaram um micro-organismo similar dos fluidos fetais abortados de vacas, que foi chamado *Vibrio fetus* (SMITH; TAYLOR, 1919). Apenas três décadas depois, essa espécie foi relacionada a baixas taxas reprodutivas em bovinos (LOVELL, 1963). A espécie *V. fetus* foi então dividida em duas subespécies, *V. fetus intestinalis* e *V. fetus venerealis* (LOVELL 1963), que, após reclassificação, são atualmente conhecidas como *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* respectivamente. No Brasil, a primeira descrição de isolamento do vibrio foi feita por D'Ápice em 1956, a partir do conteúdo abomasal de um feto abortado (D'ÁPICE, 1956 *apud* (STYNEN *et al.*, 2003). Desde então, diversos estudos foram conduzidos para demonstrar a circulação de *C. fetus* subsp. *venerealis* em rebanhos brasileiros (Tabela 1). A distribuição desta doença venérea é ampla, possivelmente pelo amplo emprego da monta natural como manejo reprodutivo, a qual proporciona o contato direto entre o macho e a fêmea e consequente propagação da bactéria entre os animais (BONDURANT, 2005).

O gênero *Campylobacter* é composto por bactérias Gram-negativas da classe Epsilonproteobacteria, família *Campylobacteriaceae*, muito adaptadas às superfícies mucosas. A maioria das espécies são patógenos de humanos e/ou animais. As análises de genômica comparativa em *Campylobacter* spp. revelaram que a evolução desse gênero bacteriano se deu

por redução genômica, resultando em um pequeno genoma cromossômico (aproximadamente 1,5 Mb), com baixo conteúdo G+C (aproximadamente 30%) e a perda de muitas vias metabólicas (KIENESBERGER *et al.*, 2014). Os genomas de *Campylobacter* spp. são caracteristicamente densos e em torno de 95% das sequências gênicas são codificantes.

A espécie *Campylobacter fetus* é representada, por três subespécies: *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *testudinum* (FITZGERALD *et al.*, 2014). As subespécies *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* são primariamente associadas aos mamíferos, enquanto *C. fetus* subsp. *testudinum* é associada, principalmente, aos répteis (FITZGERALD *et al.*, 2014). As duas subespécies de *C. fetus* que infectam mamíferos são geneticamente muito semelhantes, embora tenham distintos hospedeiros e sítios de ação.

O trato gastrintestinal é um habitat da bactéria *C. fetus* subsp. *fetus*, podendo, em humanos, causar infecções intestinais e sistêmicas, especialmente em imunossuprimidos (THOMPSON; BLASER, 2000), sendo considerado um patógeno emergente (ESCHER *et al.*, 2016). Já nos animais, essa subespécie pode colonizar o trato reprodutivo, induzindo abortos em ovinos e, esporadicamente, em bovinos, porém, sem transmissão venérea (BONDURANT, 2005). Por outro lado, *C. fetus* subsp. *venerealis* é adaptada aos bovinos, causando a CGB, que é uma doença venérea caracterizada pela morte embrionária precoce e infertilidade temporária em vacas, além de causar aborto esporádico (MICHI *et al.*, 2016). Esse micro-organismo tem grande importância na sanidade reprodutiva de bovinos, existindo regulamentos que previnem a transmissão por trânsito internacional de animais e sêmen (OIE, 2018).

Os machos são portadores assintomáticos permanentes de *C. fetus* subsp. *venerealis* e os principais responsáveis pela disseminação da bactéria nos rebanhos. Como a infecção é limitada à mucosa da glândula peniana, ao prepúcio e à porção distal da uretra, não há um caráter invasivo e, portanto, não há intensa indução de produção de anticorpos (MICHI *et al.*, 2016). Os touros comumente se infectam ao se acasalarem com as fêmeas infectadas, podendo ocorrer contágio por cama contaminada e iatrogênica, por materiais de coleta de sêmen contaminados (HOFFER, 1981; PELLEGRIN *et al.*, 2002). Os animais mais velhos (> 5 anos) têm mais chances de se tornarem portadores das bactérias, possivelmente decorrente do aumento do número e profundidade de criptas epiteliais do pênis e prepúcio e também pelo maior número de reproduções e possível exposição ao agente etiológico. Essa alteração anatômica torna o ambiente prepucial mais favorável para a colonização de *C. fetus* subsp. *venerealis* (SAMUELSON *et al.*, 1966; HOFFER, 1981).

As fêmeas se tornam infectadas após uma monta natural com um macho infectado ou pelo sêmen contaminado, sendo e os sítios de instalação da bactéria na fêmea o lúmen vaginal,

cérvix, útero e oviduto. Os quadros clínicos são de endometrite, morte embrionária com reabsorção e infertilidade, com observação de repetição de cio em intervalos aumentados e irregulares (BONDURANTE, 2005; GIUFFRIDA, 2016; SAHIN *et al.*, 2017). A maioria das fêmeas são capazes de reverter provisoriamente a infecção após três a seis ciclos reprodutivos, recuperando, temporariamente, a fertilidade (BONDURANT 2005).

### 2.3 Diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina

Conforme as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), o método padrão ouro para o diagnóstico de CGB é o isolamento bacteriano de *C. fetus* e posterior diferenciação entre as subespécies *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*, pela caracterização fenotípica pelo teste de tolerância à glicina a 1% (VERON; CHATELAIN, 1973). Enquanto *C. fetus* subsp. *fetus* é capaz de crescer na presença de glicina 1%, *C. fetus* subsp. *venerealis* não. No entanto, esse teste é pouco reproduzível (VAN BERGEN *et al.*, 2005) e apresenta falsos resultados, uma vez que as cepas de *C. fetus* subsp. *venerealis* adquiriram a característica de tolerância à glicina (CHANG; OGG, 1971); essa nova variante se tornou um biovar nomeado de *C. fetus* subsp. *venerealis* bv. *intermedius* (VERON; CHATELAIN, 1973). Além disso, a característica de crescimento fastidioso torna o cultivo microbiológico um desafio na identificação de *Campylobacter* spp., e portanto, o diagnóstico microbiológico é cada vez menos empregado.

Sendo assim, vários métodos moleculares para a identificação de subespécies de *C. fetus* foram descritos nos últimos anos, incluindo o ensaio de PCR (HUM *et al.*, 1997), o sequenciamento do gene 16S rDNA bacteriano (ON; HARRINGTON, 2001), o *Multilocus sequence typing* (MLST) (VAN BERGEN *et al.*, 2005) e o *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) (ON; HARRINGTON, 2001). Recentemente, o sequenciamento de genoma completo (WGS) foi descrito como uma ferramenta para uma caracterização muito confiável de cepas de *C. fetus* (VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS *et al.*, 2014). No entanto, o custo elevado para a aplicação da metodologia na rotina laboratorial a torna inviável para o diagnóstico diferencial das subespécies de *C. fetus*. As técnicas descritas para o diagnóstico de Campilobacteriose Genital Bovina estão ilustradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Métodos de diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina e sua finalidade

Método	Propósito						Vantagens	Desvantagens
	População livre de infecção	Livre de infecção individual/ animal antes da estação de monta	Contribuir para as políticas de erradicação	Confirmação de casos clínicos	Prevalência e vigilância de infecções	Estado imunológico em animais ou populações pós-vacinação	Vantagens para o emprego das técnicas	Desvantagens para o emprego das técnicas
Cultura (incluindo identificação de subespécies)	+++	+++	+++	+++	+++	-	Isolamento da bactéria; caracterização genômica	Depende da viabilidade bacteriana
Imunofluorescência indireta (IFI)	++	++	++	++	++	-	Alta especificidade; reprodutível	Subjetividade na leitura; ausência de automação
ELISA (mAb)	++	++	++	++	++	-	Deteção de anticorpos específicos	Subjetividade na leitura; ausência de automação
PCR	+++	+++	+++	+++	+++	-	Independente da viabilidade bacteriana; Especificidade; Sensibilidade	Depende de alvos / primers específicos
Anticorpos - ELISA	-	-	-	-	-	+	Determinação do status imunológico do rebanho	

Fonte: Adaptado OIE (2019) Chave: +++ = recomendado para esse propósito; ++ recomendado, mas com limitações; + = adequado em circunstâncias muito limitadas; - = não apropriado para este fim

O método mais empregado na rotina laboratorial para diagnóstico de CGB concerne aos ensaios de PCR (POLO *et al.*, 2021), o qual, como pode ser observado na Tabela 2, é altamente recomendado pela OIE. Hum *et al.* (1997) descreveram dois genes de *C. fetus* como potenciais alvos para a diferenciação das subespécies *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis*. O gene *cstA* para a detecção de *C. fetus* subsp. *fetus* possui 100% de sensibilidade e especificidade, *parA* para *C. fetus* subsp. *venerealis* tem 58% e 83% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. A ausência de uma região 100% sensível e específica fez com que vários autores investigassem novos alvos para a diferenciação entre as subespécies, sendo estes alvos, os genes: *nahE* e *sapB2* para *C. fetus* subsp. *fetus* (ABRIL *et al.*, 2007; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2002) e *ISCfe1* para *C. fetus* subsp. *venerealis* (ABRIL *et al.*, 2007).

Com o surgimento de alvos promissores para ensaios de PCR específicos e sensíveis, os testes moleculares com espécimes clínicas também avançaram. Recentemente, Silva *et al.* (2020a) analisaram a eficácia da utilização de PCR com os genes *parA* e *ISCfe1* para a diferenciação de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* nas amostras de campo. Ambos os alvos apresentaram potencial na diferenciação entre as subespécies. No entanto, os autores constataram que alguns dos animais testados apresentavam resultado positivo para os alvos específicos da subespécie *C. fetus* subsp. *venerealis* (*parA* e *ISCfe1*), mas resultados negativos para o alvo que determina a espécie *C. fetus* (*nahE*). Posteriormente, a fim de investigar esses resultados discrepantes apresentados na reação de PCR para os alvos mencionados acima, Silva *et al.* (2020b) utilizaram os mesmos DNAs com resultados de PCR discordantes para sequenciamento do alvo 16S rDNA, e constataram, assim, a existência de sequências heterólogas à *C. fetus*, para as quais os autores propuseram a existência de uma nova espécie, a qual denominaram *Campylobacter portucalensis* (SILVA *et al.*, 2020b). A presença do alvo *ISCfe1* nesta possível nova espécie de *Campylobacter* pode ser um entrave na confirmação do diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Conforme mencionado anteriormente, o diagnóstico de CGB apresenta diferenças de sensibilidade entre as técnicas disponíveis atualmente (MEDEROS *et al.*, 2022). Além disso, o resultado do teste pode sofrer influência pela intermitência da bactéria, ou seja, em touros, a bactéria reside no prepúcio e, por fatores como exposição do pênis, monta natural e contaminação com sujidades, a carga bacteriana pode ser baixa no momento da coleta, resultando em falso negativo. Outros fatores que devem ser considerados é a presença de sangue e urina no momento da coleta. Ambos os materiais podem inibir as reações de PCR e resultar

em falsos negativos. Portanto, o ideal é manter os animais em repouso sexual por 7 a 15 dias antes da colheita do material, para aumentar a sensibilidade do diagnóstico (OIE, 2019).

#### 2.4 Diagnóstico diferencial de Campilobacteriose Genital Bovina

Os sinais clínicos associados à CGB, como retorno ao cio e infertilidade temporária, embora indicativos, não são específicos; portanto, o diagnóstico diferencial de outros agentes sexualmente transmissíveis carregados pelos touros deve ser empregado na rotina clínica. Além do agente etiológico *C. fetus* subsp. *venerealis*, podemos destacar outros agentes infecciosos responsáveis por falhas reprodutivas em bovinos: *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovis* (AZEVEDO *et al.*, 2017; MICHI *et al.*, 2016; PARKER *et al.*, 2018), além do protozoário *Trichomonas foetus* (BOTELHO *et al.*, 2018).

Os touros podem ser portadores crônicos subclínicos dos agentes bacterianos e protozoários (*C. fetus* subsp. *venerealis*, *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis* e *Trichomonas foetus*), abrigando os patógenos em suas criptas prepúciais, o que possibilita a transmissão de agentes às vacas por reprodução natural ou via sêmen armazenado (CHIAPPARRONE; SOTO; CATENA, 2016; GIVENS; MARLEY, 2008; MICHI *et al.*, 2016). Portanto, a vigilância epidemiológica e o controle da doença baseiam-se, principalmente, na identificação de touros portadores dos agentes infecciosos. Em vacas, os agentes comumente colonizam a mucosa genital, principalmente na vagina e no útero, iniciando reações inflamatórias que resultam em retorno mais precoce ao estro, infertilidade e aborto esporádico (BONDURANT, 2005).

*M. bovis*, *M. bovis* e *U. diversum* são membros da mesma família *Mycoplasmataceae* (TULLY *et al.*, 1993) e podem estar relacionados com doenças reprodutivas em bovinos. As consequências reprodutivas de *Mycoplasma* spp. são pouco estudadas. No entanto, sabe-se que *M. bovis* e *M. bovis* colonizam o trato reprodutivo das vacas e causam quadros de endometrite e infertilidade, enquanto os touros são os carreadores crônicos assintomáticos desses agentes (HAZELTON *et al.*, 2020; SAED; SAED; AL-AUBAIDI, 1983). O mesmo acontece com o gênero *Ureaplasma*, que habita o trato reprodutivo de touros saudáveis e causa doenças reprodutivas nas vacas (WICKWARE *et al.*, 2019). Além disso, a Tricomonose Genital Bovina (TGB), causada pelo protozoário *T. foetus*, destaca-se no diagnóstico diferencial da CGB, pois ambas compartilham as mesmas rotas de infecção e semelhanças na patogenia da doença. Os touros são portadores crônicos do protozoário causador da TGB e, ao infectarem as fêmeas, promovem baixas taxas de fertilidade no rebanho (PARSONSON *et al.*, 1994; RHYAN *et al.*, 1999).

Faz-se necessário ressaltar, ainda, que *C. fetus* subsp. *venerealis* possui um conteúdo genético altamente similar a subespécie *C. fetus* subsp. *fetus*, dificultando a seleção de marcadores precisos na diferenciação dessas subespécies por métodos moleculares (VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS *et al.*, 2013). Embora ocorra essa alta semelhança genética, essas subespécies causam quadros clínicos distintos. *C. fetus* subsp. *venerealis* está intimamente relacionada ao retorno ao cio, infertilidade temporária e abortos esporádicos em fêmeas bovinas (SILVEIRA *et al.*, 2018). Por outro lado, *C. fetus* subsp. *fetus* habita o trato intestinal especialmente de ovinos, e mais raramente dos bovinos, mas pode migrar para o trato genital e causar abortos epizooticos esporádicos (VAN BERGEN *et al.*, 2006). Apesar das diferenças clínicas, o diagnóstico diferencial entre *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* deve ser empregado na rotina clínica de casos de aborto bovino.

Visto que *C. fetus* subsp. *venerealis* causa abortos esporádicos em bovinos (MACÍAS-RIOSECO *et al.*, 2020), faz-se necessário o rastreio e exclusão de outros possíveis agentes etiológicos envolvidos nesses casos (conforme se pode verificar na Tabela 3). Entre os agentes infecciosos causadores de abortos e infertilidade temporária em bovinos, destacam-se bactérias, vírus, fungos e protozoários. Desse modo, casos de aborto bovino são complexos e multifatoriais, e o diagnóstico diferencial deve ser empregado para a determinação do agente etiológico primário.

Tabela 3. Principais causas infecciosas de infertilidade e aborto em bovinos

Bactérias	Fungos	Protozoários	Vírus
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Neospora caninum</i>	Herpesvírus bovino tipo 1 - Bovine Herpesvirus type-1 (BoHV-1)
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>Mucor</i> spp.	<i>Tritrichomonas foetus</i>	Vírus da diarreia viral bovina - Bovine viral diarrhea virus (BVDV)
<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>Mortierella wolfii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	Vírus da língua azul - Bluetongue vírus (BTV)
<i>Leptospira</i> spp.		<i>Anaplasma marginale</i>	Vírus akabane
<i>Ureaplasma</i> spp.			
<i>Histophilus somni</i>			
<i>Arconobacterium pyogenes</i>			
<i>Chlamydophila</i> spp.			
<i>Salmonella</i> spp.			
<i>Coxiella burnetti</i>			
<i>Brucella</i> spp.			

Fonte: Adaptado de Givens e Marley (2008)



## 2.5 Avanços na caracterização de populações microbianas

No ano de 2001, Joshua Lederberg introduziu o termo “microbiota” para definir a “comunidade ecológica de micro-organismos comensal, simbiótica e patogênica, que compartilham o mesmo nicho ecológico e determina a saúde ou doença do hospedeiro” (LEDERBERG, J.; MCCRAY, 2001). No entanto, uma definição clara ou consensual de “microbiota” entre pesquisadores de diversas áreas permanece discutível. Recentemente, Berg *et al.* (2020) determinaram que o microbiota não se refere apenas aos micro-organismos envolvidos em um mesmo nicho, mas também abrange a sua atividade metabólica, o que resulta na formação de nichos ecológicos específicos.

Hoje, pela metagenômica, somos capazes de identificar bactérias, arqueias, vírus, fungos, algas e protistas nos seus habitats naturais. O sequenciamento de fragmentos dos genes 16S rDNA e 18S rDNA ou o espaçador interno transcrito (ITS) entre os genes 18S rDNA e 28S rDNA tem sido responsável pelo incremento no número de estudos de comunidades microbianas, tanto em humanos quanto em animais, durante determinados processos infecciosos, permitindo a determinação das bactérias e eucariotos presentes, sem a necessidade e o viés do cultivo microbiano (DELONG; PACE, 2001; HUGENHOLTZ, 2002). Atualmente, esse é o método mais empregado para explorar e determinar a composição de comunidades microbianas em quaisquer espécimes amostrais (BERG *et al.*, 2020).

A subunidade 16S rDNA é um componente da subunidade menor dos ribossomos procarióticos e, por apresentarem regiões gênicas conservadas intercalada por regiões hipervariáveis, a amplificação e o sequenciamento desse fragmento é uma poderosa ferramenta na captura de dados das comunidades bacterianas. O gene 16S rDNA pode ser dividido em nove regiões hipervariáveis (V1-V9), com taxas evolutivas distintas. Entre essas regiões, a V4 é considerada uma das mais poderosa na captura de dados da comunidade bacteriana (ZHANG *et al.*, 2018). Para a caracterização das comunidades eucarióticas, são utilizados os espaçadores internos transcritos (ITS) entre os genes 18S rDNA e 28S rDNA. O cistron de rDNA eucariótico consiste nos genes rDNA 18S, 5.8S e 28S transcritos como uma única unidade transcricional. Os processos pós-transcricionais dividem o cistron, removendo dois espaçadores transcritos internos. Esses dois espaçadores, incluindo o gene 5.8S, são geralmente chamados de região ITS. Tal região combina o maior poder de resolução para discriminar espécies intimamente relacionadas em uma ampla gama de fungos (SCHOCH *et al.*, 2012).

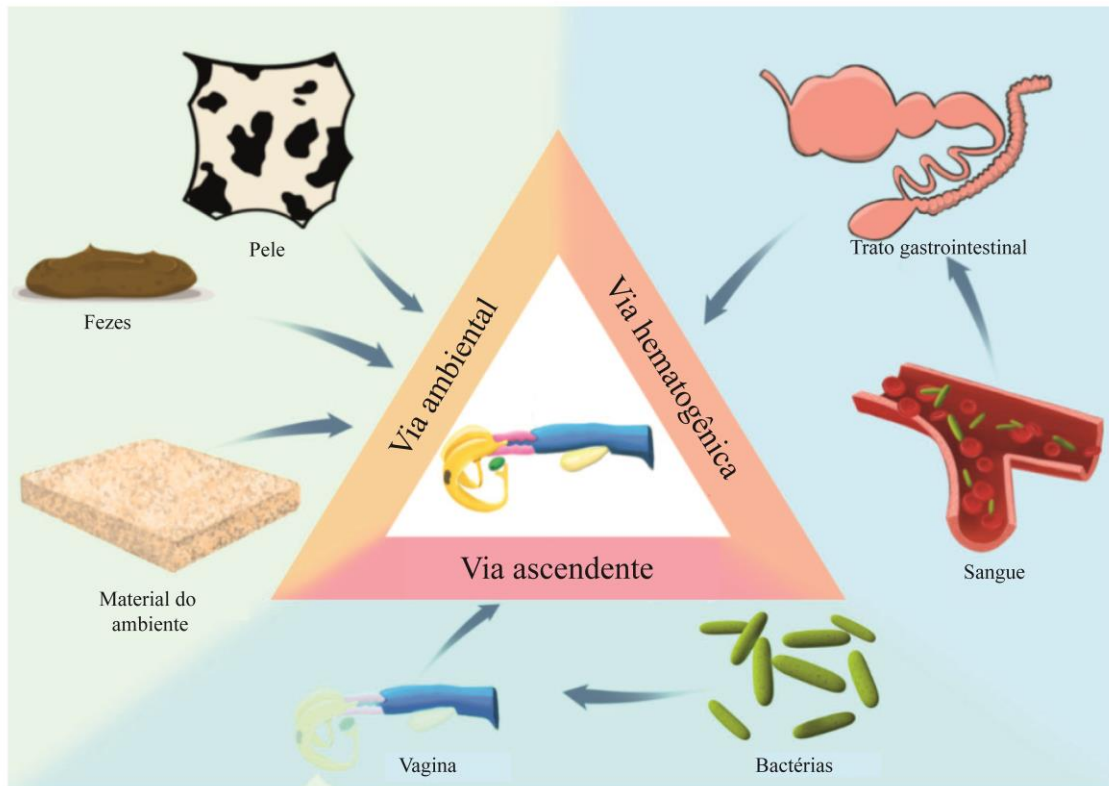
Essas análises possibilitam um melhor entendimento da diversidade taxonômica, da estrutura das populações e das funções ecológicas dos micro-organismos em um dado ambiente

(KONOPKA *et al.*, 2009). Atualmente, as aplicações das pesquisas de metagenômica podem ocorrer desde estudos básicos, em diversidade e ecologia microbiana, até a obtenção de produtos de interesse biotecnológico, como novas enzimas de interesse industrial, antibióticos, entre outras (BERG *et al.*, 2020).

## **2.6 Microbiota central do trato reprodutivo de bovinos**

O trato reprodutivo bovino engloba tanto os órgãos reprodutivos masculinos, quanto os femininos. A composição dos micro-organismos que colonizam a microbiota do trato reprodutivo bovino é complexa e passa por modificações constantemente. Até o momento, sabe-se que a microbiota cervicovaginal bovina é composta por interações com outras microbiotas como a do trato gastrointestinal, pele, ambiente e hematogênica (Figura 2). Jeon *et al.* (2017) evidenciaram a existência de gêneros centrais na microbiota de vacas, como *Bacteroides*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*, compartilhados por amostras de sangue, fezes, vaginais e uterinas de um mesmo animal. Já a composição da microbiota prepucial de touros parece estar relacionada à comunidade de micro-organismos do solo, fezes e fontes vaginais (WICKWARE *et al.*, 2020). Além disso, a microbiota vaginal da vaca é transferida para microbiota fecal e respiratória do bezerro durante a passagem do feto pelo canal do parto no nascimento (KLEIN-JÖBSTL *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019). São essas interações, no momento do parto, que começam a estabelecer a microbiota do trato reprodutivo dos bovinos e que podem influenciar tanto negativamente quanto positivamente no desempenho reprodutivo dos animais, na vida adulta (KHALIL *et al.*, 2022).

Figura 2 - Microbiotas que influenciam na composição de micro-organismos do trato reprodutivo bovino

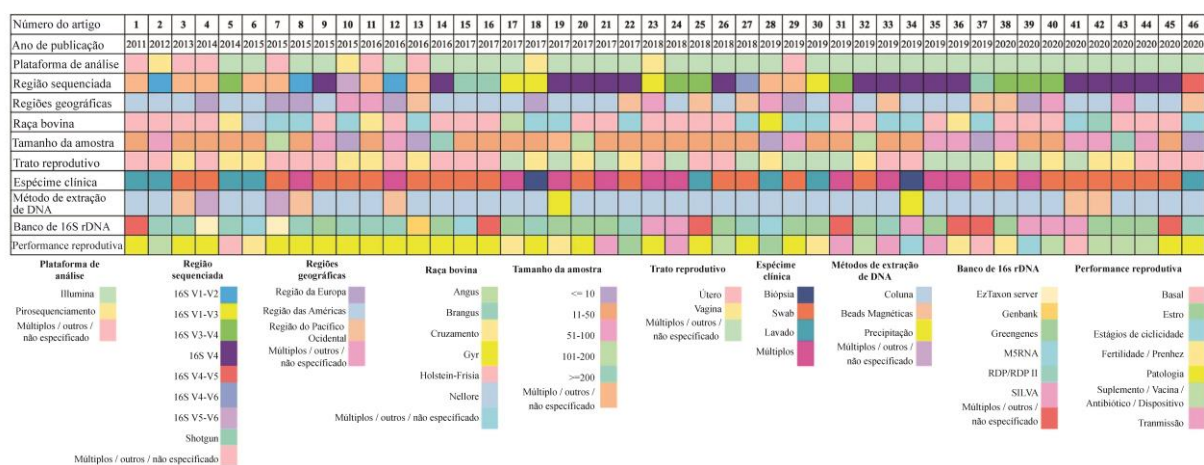


Fonte:

Adaptado de Appiah *et al.* (2020)

A microbiota do trato reprodutivo bovino já foi abordada e caracterizada em diversos estudos. Recentemente, uma revisão sistemática de ONG *et al.* (2021) levantaram dados metagenômicos do trato reprodutivo bovino utilizando abordagens independentes da cultura entre os anos de 2011 e 2020 (como se pode observar pela Figura 3) e evidenciaram a existência de uma microbiota central presente no trato reprodutivo. Os filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Bacteroidota*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* compuseram a grande parte da microbiota cervicovaginal das vacas, variando em abundância relativa conforme a condição clínica dos animais (JEON *et al.*, 2018; QUEREDA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2018). O filo *Proteobacteria* foi relacionado à condição saudável das vacas, enquanto o filo *Bacteroidota* apresentou uma tendência de aumentar a sua proporção em condições clínicas de doenças ou no período pós-parto (BICALHO, *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018).

Figura 3 - Compilado da revisão sistemática com 46 estudos metagenômicos do trato reprodutivo de machos e fêmeas bovinos



Cada um dos estudos científicos compilados na Figura está representado por números sequenciais, na primeira linha da Figura.

Fonte: Adaptado de Ong *et al.* (2021)

A microbiota central cervicovaginal das vacas, evidenciada na revisão sistemática de Ong *et al.* (2021), é compartilhada na microbiota prepucial em touros saudáveis, que é composta, em grande parte, pelos filos *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (WICKWARE *et al.*, 2020). Até o presente momento, apenas um estudo foi conduzido para elucidar a composição e diversidade da microbiota prepucial em touros saudáveis (WICKWARE *et al.*, 2020). Wickware *et al.* (2020) evidenciaram um padrão de agrupamento entre as microbiotas prepuciais dos touros. Parte da população microbiana prepucial investigada apresentou uma baixa diversidade bacteriana. Para amostras de baixa diversidade, *Bradyrhizobium* se destacou, enquanto as amostras de alta diversidade exibiam múltiplos gêneros bacterianos. Os colonizadores dominantes no prepúcio dos touros foram *Bacteroides*, *Ruminococcaceae* não classificados, *Histophilus* e *Streptobacillus* (WICKWARE *et al.*, 2020).

Apesar dos artigos científicos reportados na revisão sistemática apresentarem uma microbiota central no trato reprodutivo bovino, fica evidente, que, principalmente, quanto ao gênero, que a microbiota sofre modificações significativa entre os estudos. Com base nos artigos abordados na revisão sistemática, uma tabela com a microbiota central do trato reprodutivo dos bovinos foi elaborada (Tabela 4). De maneira geral, os gêneros *Escherichia coli*, *Histophilus* e *Fusobacterium* parecem estar ligados ao desenvolvimento de metrite pós-parto em vacas (WANG *et al.*, 2018; DENG *et al.*, 2019), enquanto os gêneros *Porphyromonas* e *Ureaplasma* foram, frequentemente, relacionados à microbiota de animais sem alterações

reprodutivas (JEON *et al.*, 2016; QUEREDA *et al.*, 2020). Os demais gêneros apresentados na Tabela 4 foram encontrados tanto em animais saudáveis quanto doentes e não possuem uma relação direta com a manifestação da condição clínica, ou seja, devem ser componentes da microbiota cervicovaginal normal.

Apesar dos filos e gêneros apresentados na Tabela 4 terem variado tanto em relação à presença e ausência quanto à abundância de *reads* nos trabalhos revisados, os táxons apresentados correspondem aos relatados frequentemente na literatura consultada. Com base na revisão sistemática, constatou-se que alguns estudos já descreveram a presença de *Campylobacter* em vacas que apresentavam quadros de metrite (JEON *et al.*, 2015; MORENO *et al.*, 2016), desordens reprodutivas (MIRANDA-CASOLUENGO *et al.*, 2019), em animais saudáveis (MACHADO *et al.*, 2012; SWARTZ *et al.*, 2014) e até mesmo sem exposição sexual prévia (QUEREDA *et al.*, 2020). Destaca-se que a presença de *Campylobacter* na microbiota do trato reprodutivo bovino ainda precisa ser elucidada para uma melhor compreensão do seu papel na performance reprodutiva bovina.

Tabela 4 - Táxons da microbiota central do trato reprodutivo bovino identificados previamente por estudos de metagenômica

<b>Táxons</b>	<b>Referências</b>
<i>f_Firmicutes</i>	1; 2; 5; 6; 7; 8; 9; 11; 12; 15; 16; 17; 19; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 31; 32; 33; 35; 36; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 45; 46
<i>f_Proteobacteria</i>	1; 2; 5; 6; 8; 9; 11; 12; 15; 16; 17; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 31; 32; 33; 35; 36; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46
<i>f_Tenericutes</i>	1; 2; 5; 8; 9; 12; 17; 21; 25; 26; 27; 28; 29; 32; 33; 35; 36; 38; 39; 40; 42; 43; 44; 46
<i>f_Bacteroidota</i>	1; 2; 5; 6; 8; 9; 11; 12; 14; 15; 16; 17; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 31; 32; 33; 35; 36; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46
<i>f_Fusobacteria</i>	1; 2; 5; 8; 9; 12; 14; 15; 16; 20; 21; 22; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 32; 33; 35; 38; 39; 41; 43; 44; 46
<i>f_Actinobacteria</i>	1; 2; 5; 11; 15; 16; 17; 24; 25; 27; 28; 29; 31; 32; 33; 35; 38; 39; 40; 41; 43; 46
<i>g_Bacteroides</i>	1; 2; 6; 9; 10; 13; 14; 15; 16; 21; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 32; 34; 35; 39; 40; 43; 46
<i>g_Ureaplasma</i>	1; 2; 5; 9; 14; 16; 17; 20; 27; 29; 32; 35; 36; 38; 39; 41; 42; 43
<i>g_Prevotella</i>	1; 2; 5; 6; 7; 9; 10; 12; 13; 14; 15; 17; 19; 21; 24; 25; 26; 28; 29; 35; 38; 39; 41; 45; 46
<i>g_E.coli/Shigella</i>	3; 4; 5; 6; 7; 9; 11; 13; 14; 15; 16; 19; 25; 28; 34; 36; 41; 45; 46
<i>g_Lactobacillus</i>	2; 3; 5; 10; 11; 13; 24; 25; 36; 39; 45
<i>g_Bacillus</i>	4; 6; 7; 11; 15; 18; 25; 28; 45
<i>g_Ruminococcus</i>	6; 9; 11; 12; 22; 24; 27; 28; 34; 35; 38; 39
<i>g_Clostridium</i>	2; 6; 9; 10; 11; 13; 17; 18; 22; 28; 29; 32; 34; 35; 36; 38; 39; 41; 46
<i>g_Trueperella</i>	2; 4; 7; 9; 16; 19; 24; 23; 25; 29; 45
<i>g_Alistipes</i>	2; 6; 10; 24; 27; 28; 34; 38; 39
<i>g_Corynebacterium</i>	4; 7; 10; 17; 21; 24; 32; 35; 41; 45
<i>g_Histophilus</i>	1; 10; 11; 22; 36; 38; 39; 41; 42
<i>g_Streptococcus</i>	2; 4; 5; 7; 10; 11; 25; 32; 34; 35; 38; 39; 41; 43; 45; 46
<i>g_Fusobacterium</i>	2; 8; 9; 10; 13; 15; 16; 19; 21; 25; 26; 27; 28; 29; 32; 34; 35; 41; 42; 43; 44; 45; 46
<i>g_Porphyrromonas</i>	1; 2; 5; 8; 9; 11; 14; 16; 18; 21; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 32; 34; 35; 39; 41; 43; 45; 46
<i>g_Helcococcus</i>	2; 9; 11; 17; 21; 25; 29; 32; 34; 39; 42; 43; 45; 46

f = filo; g = gênero. Os números correspondem ao identificador de cada estudo científico (numeração dada na Figura 3) na revisão sistemática de ONG *et al.* (2021)

## 2.7 Microambiente do trato reprodutivo de fêmeas bovinas e influências na microbiota

Conforme mencionado anteriormente, a microbiota cervicovaginal bovina apresenta uma estrutura central de micro-organismos, que podem variar de acordo com diversos fatores. Estudos de mapeamento da diversidade microbiana total no trato reprodutivo de vacas

demonstraram que a microbiota é alterada conforme a presença de infecções (GIANNATTASIO-FERRAZ *et al.*, 2019; LAGUARDIA-NASCIMENTO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018). A esse respeito, vacas saudáveis apresentam uma microbiota vaginal e uterina mais rica e diversa em comparação a animais que desenvolveram endometrite pós-parto (MIRANDA-CASOLUENGO *et al.*, 2019).

Nesse contexto, o principal evento capaz de modificar a composição da microbiota cervical é o pós-parto, especialmente em casos de desenvolvimento de metrite e endometrite (JEON *et al.*, 2016; BICALHO *et al.*, 2017; CLEMMONS *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Além disso, a intensidade da resposta imune perante a infecção uterina pós-parto influencia diretamente no dano tecidual local e, conseqüentemente, no prolongamento da disbiose e retorno da fertilidade (JEON *et al.*, 2016). Por exemplo, animais que apresentam febre como resposta à infecção uterina tendem a ter um dano tecidual mais intenso e, conseqüentemente, um maior atraso no retorno do ciclo estral (JEON *et al.*, 2016). Falhas ou atrasos na recuperação das infecções uterinas podem levar a problemas reprodutivos e até mesmo à infertilidade (MIRANDA-CASOLUENGO *et al.*, 2019).

Vacas que apresentam metrite pós-parto tendem a ter uma maior abundância de *Bacteroidota* e *Fusobacteria* na sua cérvix, enquanto as vacas saudáveis tendem a ter uma maior abundância de *Proteobacteria* (BICALHO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Além disso, a influência hormonal exercida pelo ciclo estral das vacas impacta diretamente na flutuação da abundância dos micro-organismos que compõem a microbiota cervicovaginal (QUEREDA *et al.*, 2020). Durante o estro, existe uma alta concentração de estrógeno circulante, enquanto no diestro o hormônio predominante é a progesterona. Quereda *et al.* (2020) demonstraram a flutuação entre os gêneros bacterianos identificados no trato vaginal ao longo do ciclo estral, principalmente para os táxons menos abundantes, acompanhado de uma alta dispersão das comunidades microbianas entre os indivíduos. Também já foi evidenciada uma flutuação da microbiota uterina nas diferentes fases fisiológicas da vaca, ou seja, a composição das comunidades bacterianas sofre alteração de abundância quando comparado o período de formação fetal, gestação e pós-parto (WANG *et al.*, 2018). Curiosamente, o gênero *Lactobacillus*, conhecido por promover uma eubiose na microbiota vaginal de humanos (CHEE *et al.*, 2020), parece não apresentar papel fundamental na microbiota bovina e é pouco abundante nesse nicho. No entanto, esse gênero parece alterar-se durante o ciclo estral, estando mais abundante na fase folicular (estro) do que na fase lútea (diestro) (QUEREDA *et al.*, 2020).

Outro fator responsável por interferir na composição da microbiota cervicovaginal é o ambiente onde o animal é mantido. A cama e o meio ambiente contribuem ativamente para a

mudança da microbiota cervicovaginal. Esses fatores podem ser alterados ao longo do ano, como ressaltam Nguyen *et al.* (2019), os quais demonstraram uma alteração na composição das comunidades bacterianas uterinas entre o inverno e verão, ou seja, eles evidenciaram que a microbiota uterina pode variar quando o ambiente que o animal é mantido sofre alterações. As famílias bacterianas *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Staphylococcaceae* e *Lactobacillaceae* foram mais abundantes na microbiota uterina durante o verão, e *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae* e *Clostridiaceae* foram mais abundantes durante o inverno (NGUYEN *et al.*, 2019). Essas alterações da composição das comunidades bacterianas uterinas das vacas podem impactar diretamente na performance reprodutiva dos animais.

Análises empregando cultivo microbiológico e sorologias sugerem a ocorrência de coinfeções na microbiota do trato reprodutivo bovino, como, por exemplo, entre *C. fetus* e *T. foetus* (BONDURANT, 2005). Sendo assim, a busca por associações entre a microbiota de determinado nicho ou hospedeiro e as suas possíveis correlações com enfermidades causadas por agentes patogênicos passou a ser pesquisada. Ao identificar os estados simbióticos e disbióticos da microbiota, as interações do complexo hospedeiro-parasita-bactéria-vírus nas superfícies mucosas ou epiteliais podem ser descritas, permitindo que novas pesquisas sejam conduzidas (WICKWARE *et al.*, 2019).

Até o momento dessa Tese, nenhum estudo abordou se a presença de *C. fetus* subsp. *venerealis* na cérvix de vacas com infertilidade pode interferir na microbiota daquele nicho. Portanto, a identificação da microbiota da cérvix de fêmeas bovinas representa o primeiro passo para o entendimento das interações que ocorrem nesse ambiente e que podem impactar na ocorrência de CGB. Além disso, a diferenciação das microbiotas de animais saudáveis e infectados, bem como a análise *in silico* da interação metabólica entre as bactérias e os fungos presentes nessa situação clínica, permitirá a realização de ensaios mais detalhados e precisos de efetividade de tratamentos e profilaxia contra os micro-organismos envolvidos.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é identificar os micro-organismos potencialmente relacionados ao desenvolvimento e manutenção da Campilobacteriose Genital Bovina, bem como o efeito da interação entre os agentes microbianos no trato reprodutivo de bovinos acometidos pela doença.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Padronizar os métodos de coleta, transporte e armazenamento de muco prepucial para diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*;
- b) Analisar em mucos prepuciais de touros de fazendas com histórico de infertilidade, além presença de *C. fetus* subsp. *venerealis*, a coexistência de outros agentes infecciosos considerados no diagnóstico diferencial da Campilobacteriose Genital Bovina;
- c) Coletar amostras de muco cervical de fêmeas bovinas com histórico de retorno ao cio e novilhas sem contato sexual prévio e, posteriormente, realizar o diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis* nas amostras coletadas;
- d) Identificar e comparar a diversidade de micro-organismos por sequenciamento *metabarcoding* com os alvos 16s rDNA e ITS e analisar as comunidades bacterianas e fúngicas presentes na cérvix das vacas com histórico de retorno ao cio portadoras ou não de *C. fetus* subsp. *venerealis*;
- e) Interrelacionar a presença de *C. fetus* subsp. *venerealis*, outras bactérias e outros micro-organismos com a ocorrência de retorno ao cio em vacas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Metodologia de seleção dos animais, amostragem e processamento das amostras

#### 4.1.1 Seleção e visita às propriedades para coleta de muco cervicovaginal de vacas

Os critérios para a seleção das propriedades participantes foram:

- a) propriedades criadoras de bovinos de corte, localizadas no estado do Rio Grande do Sul;
- b) fazendas que fazem uso de monta natural, mesmo que apenas em repasse com touros;
- c) histórico de retorno ao cio (infertilidade) na última estação reprodutiva.

#### 4.1.2 Coleta das amostras de muco cervicovaginal

De cada animal, uma escova cervical estéril (em tampão salina-fosfato - PBS) foi coletada. Para a coleta de muco cervicovaginal, a vulva de cada animal foi lavada com água destilada e um espécúlo foi introduzido na cavidade vaginal do animal para evitar a contaminação pelo fluido vaginal. A escova cervical foi acoplada em um coletor de suabe cervicovaginal de equinos, posteriormente introduzida na vagina pelo espécúlo e a amostra de secreção cervicovaginal foi coletada. Antes de armazenar adequadamente as escovas, as amostras foram espalhadas sobre uma lâmina de vidro e encaminhadas para análise citológica. Posteriormente, as escovas foram colocadas em um tubo estéril com 1 ml de solução PBS a 1%, transportadas para o Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBacVet) da FAVET/UFRGS e analisadas dentro de 12 horas após a coleta.

#### 4.1.3 Identificação molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis* nas amostras de muco cervicovaginal

O DNA metagenômico foi extraído com o emprego do Kit comercial de extração de *MagMAX Nucleic Acid Isolation Kit* (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). Os DNAs extraídos foram submetidos a uma PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA), com os *primers*, sonda e reação descritos por Van Der Graaf-Van Bloois *et al.* (2013) para quantificação absoluta de *C. fetus* subsp. *venerealis* nas amostras investigadas.

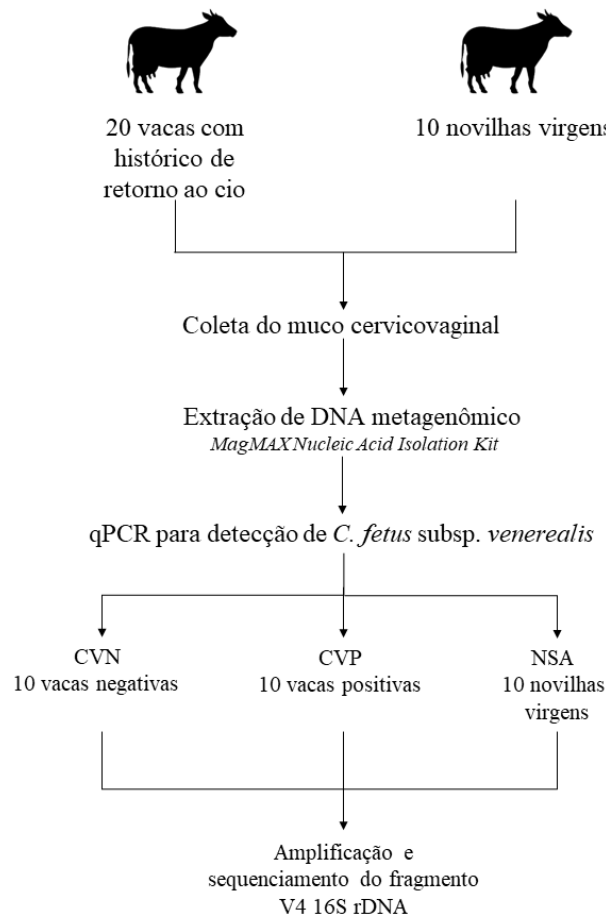
#### 4.1.4 Amplificação do alvo V4 do gene 16S rDNA nas amostras de muco cervicovaginal das vacas e sequenciamento dos *amplicons*

Levando em conta os resultados de identificação molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis* pela qPCR, nas amostras de muco cervicovaginal das vacas, três grupos amostrais foram formados. Cada grupo foi composto por 10 fêmeas:

- a) vacas que apresentaram retorno ao cio na última estação e com confirmação molecular de infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*;
- b) vacas que apresentaram retorno ao cio na última estação e com confirmação molecular de ausência de infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*;
- c) novilhas sem contato sexual (fêmeas virgens).

A amplificação dos *amplicons* procarióticos (dos três grupos: a, b e c) foi baseada na região V4 do gene 16S rDNA bacteriano (KOZICH *et al.*, 2013). Além disso, um controle negativo (*blank control*), caracterizado por DNA advindo de extração a partir de uma escova cervical sem amostra cervicovaginal, também foi submetido à amplificação do gene 16S rDNA. As bibliotecas de 16S rDNA foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) na empresa *Beijing Genomics Institute* (BGI). O fluxograma de trabalho até a obtenção dos grupos amostrais está ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma da coleta de amostras e elaboração dos grupos para o estudo da microbiota cervicovaginal bacteriana



Foram coletados muco cervicais de vacas com histórico de retorno ao cio e novilhas virgens para o diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*, e posterior sequenciamento da região V4 16S rDNA

Fonte: Próprio autor (2022)

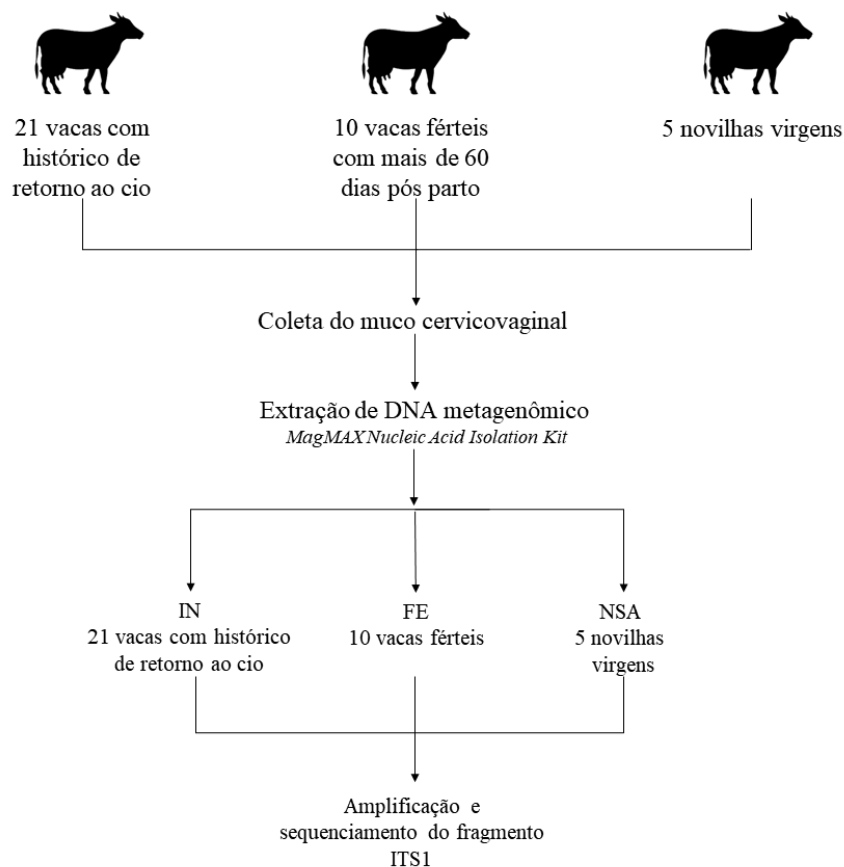
#### 4.1.5 Amplificação da região intergênica ITS1 nas amostras de muco cervicovaginal das vacas e sequenciamento dos *amplicons*

Para elucidação da microbiota fúngica cervicovaginal três grupos amostrais foram criados:

- a) 21 vacas com histórico de retorno ao cio na última estação de monta;
- b) 10 vacas férteis com mais de 60 dias de pós-parto;
- c) Cinco novilhas sem contato sexual (fêmeas virgens).

A amplificação dos *amplicons* eucarióticos foi pautada no espaçador gênico ITS1 (STOECK *et al.*, 2010). As bibliotecas de ITS foram purificadas, indexadas com indexes Nextera XT® e sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA), com o kit MiSeq v2 reagent kit 500 cycles usando *paired-end reads*. O fluxograma metodológico está apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da coleta de amostras e elaboração dos grupos para o estudo da microbiota cervicovaginal fúngica



Foram coletados muco cervicais de vacas com histórico de retorno ao cio, vacas férteis no período pós-parto e novilhas virgens para o sequenciamento da região ITS1

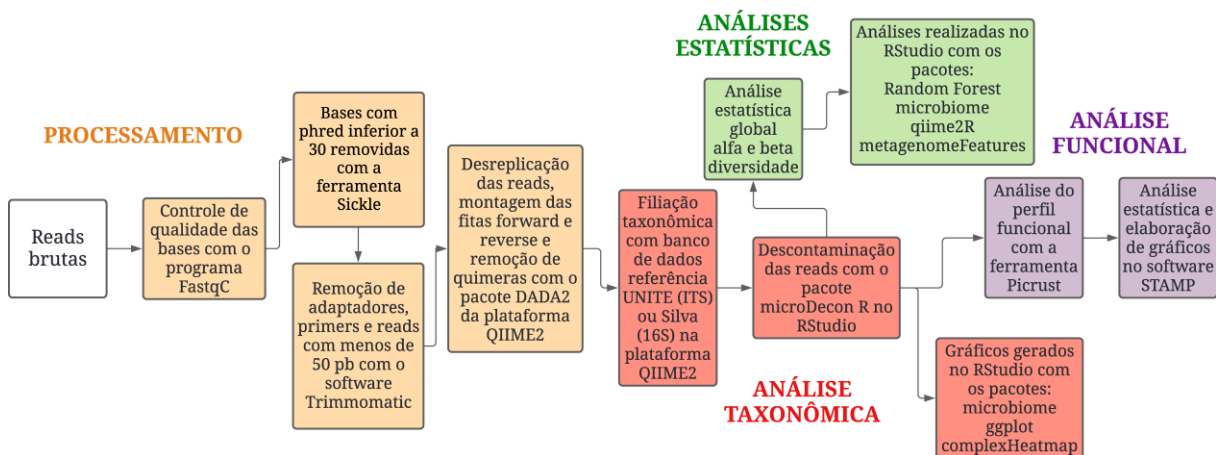
Fonte: Próprio autor (2022)

#### 4.1.6 Análises *in silico* da diversidade de bactérias e micro-organismos eucarióticos obtidos da cérvix das vacas analisadas

Ao todo foram obtidos resultados de sequenciamento para uma biblioteca de *blank control*, 30 bibliotecas de 16S rDNA e 36 bibliotecas de ITS. As *reads* de cada biblioteca foram

filtradas por qualidade de base, usando o software FastQC (versão 0.11.4) e as posições de sequência com um índice de qualidade inferior a phred 30 foram removidas, utilizando o Sickle (versão 1.33; GitHub). Depois disso, as sequências de adaptadores, *primers* e *reads* com menos de 50 pb foram removidas pelo software trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). A profundidade de sequenciamento foi avaliada usando curvas de rarefação e, além disso, a atribuição de taxonomia foi filiada com as ASVs, usando o software QIIME 2 (BOLYEN *et al.*, 2019). Resumidamente, o pacote DADA2 (CALLAHAN *et al.*, 2016) foi utilizado para remover ruídos de sequências e filtrar quimeras. Depois de construir a tabela de ASV e remover as quimeras, a taxonomia foi realizada contra o banco de dados referência UNITE (versão 01.12.2017) para dados de ITS e com silva-138-99-nb-classifier.qza para dados de 16S rDNA, considerando 99% de similaridade de sequência, usando o algoritmo de vizinho médio (padrão). Um fluxograma de trabalho a partir dos dados de sequenciamento oriundos da plataforma Illumina até a obtenção dos resultados está apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma de trabalho a partir de dados de sequências de brutas (*reads*) até as análises comparativas dos grupos estudados



Processamento dos dados em caixas laranjas. Análise taxonômica em vermelho. Análises estatísticas em verde. Perfil funcional em roxo.

Fonte: Próprio autor (2022)

As metodologias específicas para cada conjunto de dados (ITS ou 16S) estão descritas nos respectivos manuscritos, compondo diferentes capítulos. As análises das diversidades entre os grupos amostrais são compiladas em dois capítulos distintos. No primeiro, é abrangido o perfil fúngico encontrado na cérvix de vacas com sinais de infertilidade, sendo que este resultado se encontra publicado no periódico *Microbial Pathogenesis* (Capítulo 3 – doi:

10.1016/j.micpath.2021.105351). Já os dados referentes à diversidade bacteriana nos diferentes grupos amostrais compuseram um outro artigo científico, que se encontra submetido e sob revisão para publicação em um periódico de circulação internacional (Capítulo 4).

## **5 CAPÍTULO 1: Muco prepucial bovino congelado como amostra adequada para o diagnóstico molecular direto de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis***

### **Frozen bovine preputial mucus as a suitable sample for the direct molecular diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis***

Conforme mencionado anteriormente, *C. fetus* subsp. *venerealis* possui um crescimento fastidioso e, em condições de microaerofilia, interferem na viabilidade bacteriana nos processos de coleta, armazenamento, manutenção e diagnóstico (MONKE *et al.*, 2002). Portanto, a primeira etapa realizada nesse projeto foi a padronização do procedimento de coleta e tempo de transporte e armazenamento de material para diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Esse estudo resultou em um artigo científico, publicado em 2020, na revista científica *Journal of Microbiological Methods*, que se encontra publicamente disponível.





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Microbiological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jmimeth](http://www.elsevier.com/locate/jmimeth)

## Note

Frozen bovine preputial mucus as a suitable sample for the direct molecular diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

Silvia De Carli <sup>a,b</sup>, Bianca Saggin <sup>a</sup>, Maria Eduarda Dias <sup>a</sup>, Cassiane Elisabete Lopes <sup>a</sup>, André Gustavo Cabrera Dalto <sup>c</sup>, Veronica Machado Rolim <sup>d</sup>, Renato Zucco <sup>e</sup>, Giovani Pastre <sup>e</sup>, João Baptista Borges <sup>c</sup>, Franciele Maboni Siqueira <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Veronica: Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR290, km146, 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brazil

<sup>e</sup> Virbac Saúde Animal, São Paulo, Av. Queiroz Filho, 1560 - Vila Leopoldina, 05317-000 São Paulo, SP, Brazil



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Molecular diagnosis  
Sample conservation  
Bovine genital campylobacteriosis  
Bulls  
Reproductive disease

## ABSTRACT

Long transportation times remain a challenge to the satisfactory diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (Cfv). Here we demonstrated that samples of frozen bovine preputial mucus maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 10 days can be used as an alternative source for molecular diagnosis of Cfv. This approach will improve the analysis of this bacterium.

*Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) is the etiological agent of bovine genital campylobacteriosis (BGC), with bulls being considered to be asymptomatic carriers (Dekeyser, 1984). This bacterium is nutritionally fastidious and grows under microaerophilic conditions, which interfere with its collection, storage, maintenance, and diagnostic processes (Monke et al., 2002; Chaban et al., 2013). Therefore, an improvement in BGC control would be to avoid false-negative results, which are very common, particularly when viable organisms are needed (Monke et al., 2002).

The World Organization for Animal Health guidelines recommend the following as Cfv diagnostic techniques: culture isolation, indirect fluorescent antibody test, ELISA, and PCR assay (World Organisation for Animal Health, 2018). Although considered the gold standard, Cfv culture has very low sensitivity when sample transportation exceeds 24 h (Chaban et al., 2013; Michi et al., 2016). Therefore, PCR assays are widely used (Hum et al., 1997; Wang et al., 2002; Van Bergen et al., 2005; Abril et al., 2007; van Mcgoldrick et al., 2013; García-Guerra et al., 2014). However, the application of these tests is still restricted to areas close to the diagnostic laboratories. Thus, the aim of this study was to assess the viability of Cfv identification by PCR assay in bull preputial mucus samples frozen for 10 days followed by a simulation of 24 h

transportation.

Preputial samples were collected from 32 bulls (3 to 6 years old) originating from an infected and non-vaccinated herd in southern Brazil (Positive group), and from 10 bulls (3 to 7 years old) from a non-infected herd (Negative group). The animals had been previously confirmed as Cfv-positive or -negative by PCR and culture (by a filter-based method with nonselective medium according to Chaban et al. (2013); data not shown). Animals were deprived of sexual activity for at least 15 days before smegma collection.

For collection of preputial mucus, the scraping method was used (Tedesco et al., 1977). A soft brush coupled to a pipette was inserted into the prepuce of the animal and the sample collected by scraping the preputial and penile mucosa 15 times. Brushes were placed into a tube containing 1 mL of NaCl 0.9%. Two samples (brushes) were collected from each animal and transported in a cooled container (styrofoam box with ice packs) within 2 h. The order of the collection was sample A the first collected, while the sample B was the second collected. At the laboratory, the samples were maintained in two different ways prior to DNA extraction: i) Sample A: stored in a styrofoam box with ice packs for 24 h followed by DNA extraction; ii) Sample B: frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 10 days and then stored for 24 h in a styrofoam box with ice

\* Corresponding author at: Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: [franciele.siqueira@ufrgs.br](mailto:franciele.siqueira@ufrgs.br) (F.M. Siqueira).

<https://doi.org/10.1016/j.mimeth.2020.106101>

Received 29 September 2020; Received in revised form 5 November 2020; Accepted 6 November 2020

Available online 9 November 2020

0167-7012/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

packs prior to DNA extraction (Fig. 1).

DNA extraction was performed as follows: the samples were homogenized by vortex for 40 s, the brushes inside the tubes removed, and the remaining samples concentrated by centrifugation (10,000 g) for 5 min. Genomic DNA from pellets was extracted using a PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA integrity was evaluated by electrophoresis through an 0.8% agarose gel, while DNA was quantified by spectrophotometry. The nucleic acid extraction control (internal control) from all samples was performed by 16S rDNA amplification using the following sequence target: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTACCTGTTACGACTT-3') (Hammerschmitt et al., 2017).

Cfv molecular identification was performed by PCR assay (Van Der Graaf-Van Bloois et al., 2013) using a new forward primer designed to provide better specificity for the conventional amplification of the exclusive Cfv Insertion Sequence ISCFe1. The primer sequences, positioned within the ISCFe1 insertion element in the *C. fetus* subsp. *venerealis* (NCTC10354) genome, were: i) Forward: 5'-GGTGGAGAGCGTAGATA - TAAATTAG-3' at base position 112–136 and ii) Reverse: 5'-

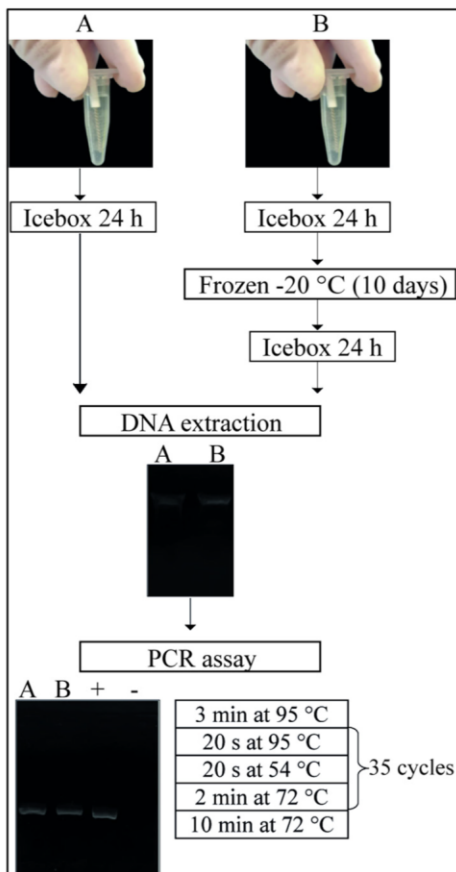


Fig. 1. Workflow of bull preputial mucus collection and processing. The samples were collected by brush scraping (two from each bull). A) One brush was stored in an icebox with ice packs for 24 h followed by DNA extraction. B) One brush was first frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 10 days and then stored for 24 h in an icebox with ice packs prior to DNA extraction. PCR cycling was performed as indicated. Amplicons from the specific Cfv genomic region have 455 bp (could be seen in the agarose gel from PCR assay). A and B: representative PCR amplification of Cfv from both samples from the same animal, processed immediately after collection and processed after being frozen for 10 days and stored for 24 h in a cooled container. "+": reaction positive control (DNA from *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC10354); "-": reaction negative control (without DNA). Sanger sequencing confirmed all generated amplicons as *C. fetus* subsp. *venerealis*.

CCATAAAGCCTAGCTGAAAAAAGT-3' at base position 542–566 (Van Der Graaf-Van Bloois et al., 2013). PCRs were optimized and carried out using GoTaq® DNA Polymerase and 30 ng of DNA. Thermal cycling conditions are illustrated in Fig. 1. The PCR assays were performed in triplicate. The specificity of the assay to *C. fetus* subsp. *venerealis* amplification was evaluated by a PCR reaction with the primers against *C. fetus* subsp. *fetus* (ATCC 27374). In addition, Sanger sequencing confirmed all generated amplicons as *C. fetus* subsp. *venerealis*. All samples with negative results in the three independent PCR assays were subject to PCR with DNA diluted to 1:10 and 1:50.

Table 1 shows the comparative results of molecular identification of Cfv both from samples processed 24 h after collection and processed after being frozen for 10 days and stored for 24 h in a box with ice packs. The longer storage condition (10 days frozen) was intended to mimic the storage of samples in field conditions with a far distance and inability of shipping in a few days. In addition after 10 days frozen the samples were stored for 24 h in a styrofoam box with ice packs, to simulate field conditions of shipping to the laboratory. Genomic DNA was recovered from all 84 samples (Table 1). The parameters that provide accuracy to

Table 1  
Detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in bovine preputial mucus.

Group	Animal ID	DNA quantification not frozen (ng/ul)	DNA quantification after frozen (ng/ul)	*PCR not frozen	PCR frozen
Positive group	1	260.2	70.5	+	+
	2	12.1	8.36	+	+
	3	250.2	160.2	+	+
	4	56.9	46.5	+	+
	5	350.2	220.9	+	–
	6	52	44.8	+	+
	7	32.7	17.8	+	+
	8	53.4	27.9	+	–
	9	86.6	48.9	+	+
	10	190.5	200.4	+	–
	11	83.1	38.3	+	+
	12	35.1	28.6	+	+
	13	22.9	15.5	+	–
	14	10.2	16.3	+	+
	15	18.1	13.5	+	+
	16	81.7	87.9	+	+
	17	38.6	25.4	+	+
	18	56.2	17.4	+	+
	19	71.7	98.6	+	+
	20	38.7	28.4	+	+
	21	31.5	49	+	+
	22	11.1	8.84	+	+
23	10.8	12.6	+	+	
24	53.2	29.3	+	+	
25	89.1	26	+	+	
26	49.6	30.6	+	+	
27	46.5	24.4	+	+	
28	36.7	15.1	+	+	
29	110	87.3	+	+	
30	22.6	14.9	+	+	
31	33.6	20.2	+	+	
32	72.7	23.8	+	+	
Negative group	1	22	24.7	–	–
	2	17.6	18.9	–	–
	3	100	37.4	–	–
	4	33.6	29.1	–	–
	5	17.8	13.4	–	–
	6	18.1	3.7	–	–
	7	9.76	27.2	–	–
	8	13.4	11.8	–	–
	9	26.2	28.8	–	–
	10	54.1	53.1	–	–

Not frozen: DNA extracted from samples stored in a cooled container for 24 h. Frozen: samples first frozen and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 10 days, and then stored by 24 h in a cooled container prior to DNA extraction.

\* "+" indicates the presence of Cfv by PCR assay. "-" indicates the absence of Cfv by PCR assay.



molecular diagnostic (DNA quality and quantity) showed satisfactory results independent of the storage methods analyzed (frozen or not frozen). Despite there being no significant differences in DNA integrity visualized on agarose gels, we observed a slight drop in DNA quantity in the frozen samples. However, this issue had no influence on the molecular identification, since the 16S rDNA was amplified in all extracted DNAs.

Cfv was identified positively in both analyzed samples in 87% (28/32) of the animals from the positive group (Table 1). These results support that the freezing method used for the storage of the preputial samples, and 24 h transportation in an icebox, can be used to obtain the direct molecular identification of Cfv. Since Cfv is both temperature- and atmosphere-sensitive, the transportation of samples can result in false-negative outcomes (Chaban et al., 2013), particularly when viable organisms are needed (Monke et al., 2002). Therefore, as molecular approaches are independent of bacterial viability, they are becoming the most useful and reliable methods to provide efficient BGC diagnosis.

The prevalence of BGC remains high worldwide, especially in large countries with no regulatory actions, such as Brazil. The low number of laboratories that perform BGC diagnosis, associated with longer distances of sample transportation, which previously had been indicated as factors that directly affected Cfv identification by both culture and by fluorescence procedures (Chaban et al., 2012; Hosseinzadeh et al., 2013), results in an underestimation of BGC disease. Thus, the freezing procedure and storage of samples that require long transportation periods can provide a good alternative in improving the under-detection of Cfv, especially in regions where the diagnostic is below that expected.

Although all 32 animals were PCR-positive in the non-frozen sample, four (13%) were PCR-negative in the frozen sample (Table 1). As these four samples were the second brush (sample B), less Cfv cells can be recovered yielding the negative results, since it has been previously described that there is significant variability among samplings in the number of Cfv organisms detected (Samuelson and Winter, 1966; García-Guerra et al., 2014; García-Guerra et al., 2016). This concern could be minimized by serial sample collection (with a minimum interval of seven days), and should be performed when animals are Cfv-negative in the first analysis. Since the amplification of the internal control supported the DNA integrity, Cfv-negative samples could also have reflected the loss of sensitivity to the test after mucus freezing. However, according to García-Guerra et al. (2016), despite limitations the freezing of preputial mucus at  $-20^{\circ}\text{C}$  could minimize the loss of sensitivity to PCR assays when long periods of storage are required.

In summary, the present study indicates that 10-day freezing of bovine preputial mucus represents a good alternative to the molecular diagnosis of BGC. Therefore, this approach would be very helpful in increasing the identification of Cfv in areas far from specialized laboratories, which has, up to now, resulted in an under-identification of positively infected animals.

#### Declaration of Competing Interest

There is no conflict of interest.

#### Acknowledgements

We thank the management team of the commercial farm

participating in this study for providing bull samples and giving us access to all production performance and sanitary data related to the sampled herd. This work was supported by the National Council of Technological and Scientific Development – CNPq (Grant no. 420590/2018-8 - CNPq-Universal/2018) and Coordination of Improvement of Higher Educational Personnel (CAPES) - Finance Code 001.

#### References

- Abril, C., Vilei, E.M., Brodard, I., Burnens, A., Frey, J., Miserez, R., 2007. Discovery of insertion element IS<sub>Cfe1</sub>: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 993–1000.
- Chaban, B., Chu, S., Hendrick, S.H., Waldner, C.L., Hill, J.E., 2012. Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Can. J. Veterin. Res.* 76, 166–173.
- Chaban, B., Guerra, A.G., Hendrick, S.H., Waldner, C.L., Hill, J.E., 2013. Isolation rates of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from bovine preputial samples via passive filtration on nonselective medium versus selective medium, with and without transport medium. *Am. J. Vet. Res.* 74 (8), 1066–1069.
- Dekeyser, J., 1984. In: Butzler, J.P. (Ed.), *Campylobacter Infections in Man and Animals*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- García-Guerra, A., Waldner, C.L., Pellegrino, A., Macdonald, N., Chaban, B., Hill, J.E., Hendrick, S.H., 2016. Effect of sample pooling and transport conditions on the clinical sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in preputial samples from bulls. *Can. J. Veterin. Res.* 80, 32–39.
- Guerra, A.G., Chaban, B., Hill, J.E., Waldner, C.L., Hendrick, S.H., 2014. Clinical sensitivity and specificity of a real-time PCR assay for *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in preputial samples from bulls. *Am. J. Vet. Res.* 75, 851–860.
- Hammerschmitt, M.E., Rolim, V.M., Snel, G.G.M., Siqueira, F.M., Driemeier, D., Pavarini, S.P., 2017. *Chromobacterium violaceum* infection in a horse. *J. Comp. Pathol.* 156, 334–338.
- Hosseinzadeh, S., Kafi, M., Pour-Teimouri, M., 2013. PCR detection of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in smegma samples collected from dairy cattle in Fars, Iran. *Veterin. Res. Forum.* 4 (4), 227–231.
- Hum, S., Quinn, K., Brunner, J., On, S.L.W., 1997. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.* 75, 827–831.
- Mcgoldrick, A., Chanter, J., Gale, S., Parr, J., Toszeghy, M., Line, K., 2013. Real time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. *J. Microbiol. Methods* 94, 199–204.
- Michi, A.N., Favetto, P.H., Kastelic, J., Cobo, E.R., 2016. A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology* 85, 781–791.
- Monke, H.J., Love, B.C., Wittum, T.E., Monke, D.R., Byrum, B.A., 2002. Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J. Vet. Invest.* 14, 35–39.
- Samuelson, J., Winter, A.J., 1966. Bovine vibriosis. The nature of the carrier state in the bull. *J. Infect. Dis.* 116, 581–592.
- Tedesco, L.F., Errico, F., Del Baglivi, P.L., 1977. Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.* 53, 470–472.
- Van Bergen, M.A.P., Dingle, K.E., Maiden, M.C., Newell, D.G., Van Der Graaf-Van Bloois, L., Van Putten, J.P., Wagenaar, J.A., 2005. Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5888–5898.
- Van Der Graaf-Van Bloois, L., Van Bergen, M.A.P., Van der Wal, F.J., Boer, A.G., Duim, B., Schmidt, T., Wagenaar, J.A., 2013. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods* 95, 93–97.
- Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., 2002. Colony multiplex PCR assay for the identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4744–4747.
- World Organisation for Animal Health, 2018. Bovine genital campylobacteriosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals (Terrestrial Manual)*. World Organisation for Animal Health, Paris.

## **6 CAPÍTULO 2: Vigilância de touros de corte no Brasil para avaliar o seu papel como fonte de agentes infecciosos relacionados à infertilidade das vacas**

### **Survey of beef bulls in Brazil to assess their role as source of infectious agents related to cow infertility**

O laboratório de bacteriologia veterinária da UFRGS (LaBacVet) realiza diagnóstico de agentes infecciosos reprodutivos de bovinos. O serviço dispõe de diagnóstico por ensaios de PCR para *C. fetus* subsp. *venerealis*, *Ureaplasma diversum*, *Tritrichomonas foetus*, *Mycoplasma bovigenitalium* e *Mycoplasma bovis*. A espécime clínica necessária para essa investigação é o raspado prepucial de touros ou muco cervicovaginal de vacas. Após a triagem de 210 touros para os agentes etiológicos mencionados acima, os resultados foram compilados, analisados e publicados. Os dados são referentes a todos os animais recebidos para análise no LaBacVet entre os anos de 2019 e 2020. Esse estudo resultou em um artigo científico, publicado em 2021 na revista científica *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, que se encontra publicamente disponível.





# Survey of beef bulls in Brazil to assess their role as source of infectious agents related to cow infertility

Silvia D. Carli,<sup>1</sup> Maria E. Dias, Maria E. R. J. da Silva, Gabriela M. Breyer, Franciele M. Siqueira<sup>1</sup>

**Abstract.** Poor reproductive performance in beef cattle caused by infectious agents results in major financial losses as a result of reduced pregnancy rates and extended calving intervals. Bulls can be subclinical chronic carriers of bacterial and protozoal agents involved in cow infertility, such as *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, and *Tritrichomonas foetus*. Bulls harbor these microorganisms in their preputial crypts and transmit the agents to cows during natural mating. To obtain an overview of the etiologic agents in the preputial mucus of bulls, we aimed to identify, by PCR assay, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *M. bovis*, *U. diversum*, *M. bovigenitalium*, and *T. foetus* in Brazilian bulls from farms with high infertility rates. We collected preputial mucus from 210 bulls on 18 beef cattle farms in Brazil between 2019 and 2020. We found at least one of the infectious agents that we were studying in bulls on 16 of the 18 beef cattle farms tested. We detected at least one infectious agent from 159 of 210 (76%) bulls tested, namely *C. fetus* subsp. *venerealis*, *M. bovis*, *U. diversum*, *M. bovigenitalium*, and *T. foetus* in 87 (55%), 84 (53%), 45 (28%), 28 (18%), and 1 (0.6%) animal, respectively. We found 95 bulls (60%) positive for only 1 etiologic agent (single infection) and 64 bulls (40%) carried multiple agents. Our results demonstrate the occurrence of bacterial and protozoal infectious agents that may be related to infertility in Brazilian beef cattle herds.

**Key words:** beef bulls; Brazil; infertility; reproductive infectious agents; venereal diseases.

Brazil is the second-largest beef producer in the world and the largest exporter, exporting 2 million tons in bovine carcass weight each year; a trade worth >\$5.4 billion per year.<sup>41</sup> For the beef industry worldwide, reproductive infections are a serious economic and health problem. The poor reproductive performance caused by infectious agents results in major financial losses as a result of reduced pregnancy rates and extended calving intervals.<sup>25</sup> In many countries, including Brazil, there are no official surveys of etiologic agents involved in poor reproductive performance; consequently, the economic losses are not quantified.<sup>3</sup> Taken together, these factors, and the lack of testing, result in lack of understanding of the effects of reproductive losses by infectious agents in the beef cattle industry.<sup>22</sup>

Bovine reproductive diseases, especially infertility, are related mainly to bacterial, viral, and protozoal infections.<sup>5,38</sup> Agents can be present in and infect the reproductive tract, leading to consequences either for the cow or the embryo.<sup>5,27</sup> The main described agents related to infertility in cows are the bacteria *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovigenitalium*, and *Mycoplasma bovis*,<sup>2,5,22,28</sup> and the protozoan *Tritrichomonas foetus*.<sup>6</sup> In addition, the viruses bovine viral diarrhea virus (BVDV; *Flaviviridae*, *Pestivirus A*) and bovine herpesvirus

1 (BoHV1; *Herpesviridae*, *Varicellovirus*, *Bovine alphaherpesvirus 1*) have an important role in bovine reproductive losses.<sup>38</sup>

Bulls can be subclinical chronic carriers of the bacterial and protozoal agents involved in the infertility of cows, harboring the pathogens in their preputial crypts, which enables transmission of agents to cows by natural breeding or via stored semen.<sup>10,15,22,27</sup> Therefore, epidemiologic surveillance and disease control are based, primarily, on identifying bulls carrying the infectious agents. In cows, the agents commonly colonize the genital mucosa, mainly in the vagina and uterus, initiating inflammatory reactions that result in an earlier return to estrus, infertility, and sporadic abortion.<sup>5,28</sup>

To obtain an overview of the main bacterial and protozoal etiologic agents that could be carried by bulls and cause

Laboratório de Bacteriologia Veterinária (Carli, Dias, da Silva, Breyer, Siqueira) and Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Carli, Breyer, Siqueira), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>1</sup>Corresponding author: Franciele M. Siqueira, Department of Veterinary Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090. Prédio 42704, Porto Alegre, RS 90040-060, Brazil. franciele.siqueira@ufrgs.br

**Table 1.** Primers used in PCR assays for detection of infectious agents in samples of preputial mucus from Brazilian bulls from herds with a history of poor reproductive performance, 2019–2020.

Infectious agent	Primer sequence	PCR amplicon	Reference*
<i>Ureaplasma diversum</i>	16SF-5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGAT-3'	838 bp	38
	16SR-5'-CTCATAAGCGAGCCGACATT-3'		
<i>Mycoplasma bovis</i>	16SF-5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGAT-3'	476 bp	
	16SR-5'-AAGGTACATTCAATATAGTGG-3'		
<i>Mycoplasma bovis</i>	16SF-5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGAT-3'	198 bp	
	16SF-5'-CAAACGCTTCCTTTTATATTAC-3'		
<i>Tritrichomonas foetus</i>	TFR3-5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3'	347 bp	14
	TFR4-5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3'		
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ISC1-F-5'-GGTGGAGAGCGTAGATATAAAATTAG-3'	454 bp	9
	ISC1-R-5'-CCATAAAGCCTAGCTGAAAAAACTG-3'		

\* Published description of the PCR reactions and analytical description of the assays.

possible poor reproductive performance in beef cattle, we aimed to identify *C. fetus* subsp. *venerealis*, *M. bovis*, *U. diversum*, *M. bovis genitalium*, and *T. foetus* in the preputial mucus of bulls from farms with high infertility rates.

## Materials and methods

### Selection of samples and DNA extraction

We invited farms with a history of poor reproductive performance, specifically high rates of reduced pregnancy and extended calving intervals (as determined by the staff of each farm), that submitted samples for diagnostic purposes of genital campylobacteriosis to our laboratory, to consent to the search for additional infectious agents in their bulls. The recruitment of convenience samples was during the winter of 2019–2020. The sampled bulls were randomly selected by either the farmer or the farm staff. Thus, we included 210 bulls from 18 beef cattle farms (A–R) in our study. The included farms were from the 2 largest beef cattle production regions in Brazil, the South Region (Rio Grande do Sul [RS] state) and the Midwest Region (Mato Grosso [MT] and Mato Grosso do Sul [MS] states).

Samples were collected after bulls had been sexually rested for at least 7 d. During the collection of biological material, the bulls were restrained carefully in a squeeze chute, and the preputial ostium was shaved, cleaned with water, and dried with paper towels. A soft brush coupled to a pipette was inserted into the animal's prepuce, and mucus was collected by scraping the preputial and penile mucosa, as described previously.<sup>9</sup> After collection, the mucus and brush were placed in 1.5-mL tubes with 1 mL of buffered PBS, pH 7.0. The samples were stored in a cool box with ice and sent to the laboratory within 48 h. Samples collected in farms far away from the laboratory were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for up to 10 d, and then sent to the laboratory as standardized previously by our group.<sup>9</sup> DNA extraction was performed

directly from the collected mucus (Biopur mini spin plus; Biometrix Diagnóstica), according to the manufacturer's instructions. DNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### Molecular detection of infectious agents in preputial mucus samples

Each extracted DNA sample was tested by singleplex PCR for *C. fetus* subsp. *venerealis* and *T. foetus*, and by multiplex PCR for *M. bovis*, *U. diversum*, and *M. bovis genitalium*, with PCR reactions that had been validated previously (Table 1). *C. fetus* subsp. *venerealis* ATCC 19438, and in-house isolates of *U. diversum*, *M. bovis genitalium*, *M. bovis*, and *T. foetus*, were used as positive controls for the respective PCR reactions. To provide confirmation of assay specificity, the PCR amplicons from each positive control were sequenced by the Sanger method, and further assembled using Geneious v.10.2.3 (Biomatters) and analyzed in the NCBI platform (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The singleplex PCRs carried out for *C. fetus* subsp. *venerealis* and *T. foetus* each contained 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Quatro G P&D), 1× reaction buffer, 1.25 μL (1.5 mM) of  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 μL (0.4 μM) of each primer, 2.5 μL (0.2 mM) of dNTPs, and 10 ng of template DNA. Conditions for amplification of *C. fetus* subsp. *venerealis* included initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 3 min, followed by 35 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 20 s, annealing at  $52^{\circ}\text{C}$  for 20 s, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 2 min, with a final extension of  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Conditions for *T. foetus* amplification were: initial denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by 40 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 90 s, with a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min.

The multiplex PCR assays used to detect *U. diversum*, *M. bovis genitalium*, and *M. bovis* contained 1 U of *Taq* DNA polymerase (Quatro G P&D), 1× reaction buffer, 1.25 μL (1.5 mM) of  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 μL (0.4 μM) of each primer, 2.5 μL



**Table 2.** Molecular detection of 5 reproductive etiologic agents in preputial mucus samples of bulls from 18 Brazilian cattle herds with poor reproductive performance between 2019 and 2020.

Farm	State	No. of animals	Positive (%)				
			<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	<i>Tritrichomonas foetus</i>	<i>Ureaplasma diversum</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
A	RS	5	1 (20)	0 (0)	2 (40)	1 (20)	4 (80)
B	RS	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
C	RS	8	1 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
D	RS	5	2 (40)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	1 (20)
E	RS	8	6 (75)	0 (0)	1 (13)	3 (38)	3 (38)
F	RS	18	0 (0)	1 (6)	8 (44)	4 (22)	11 (61)
G	RS	5	5 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	2 (40)
H	RS	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
I	RS	20	14 (70)	0 (0)	6 (30)	6 (30)	4 (20)
J	RS	2	2 (100)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)
K	RS	91	41 (45)	0 (0)	21 (23)	9 (10)	46 (51)
L	RS	4	1 (25)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
M	RS	9	3 (33)	0 (0)	2 (22)	0 (0)	2 (22)
N	RS	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
O	RS	12	8 (67)	0 (0)	0 (0)	3 (25)	3 (25)
P	MT	3	1 (33)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	1 (33)
Q	MS	7	1 (14)	0 (0)	1 (14)	0 (0)	4 (57)
R	MS	3	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (67)
Total (prevalence)		210	87 (55%)	1 (0.6%)	45 (28%)	28 (18%)	84 (53%)

Each column represents an investigated etiologic agent, and the numbers represents the total PCR-positive animals followed by herd prevalence in parentheses. State: MS=Mato Grosso do Sul; MT=Mato Grosso; RS=Rio Grande do Sul.

(0.2 mM) of dNTPs, and 10 ng of template DNA. The optimal PCR conditions were: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of 95°C for 1 min, 52°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min.

All PCR assays were carried out in a thermocycler (Mini-Amp thermal cycler; Applied Biosystems). Subsequently, the amplification confirmation was visualized by electrophoresis on 1% agarose gels stained with UniSafe dye (Uniscience).

### Statistical analyses

The PCR results were compiled and analyzed (SPSS v.26.0; IBM). Possible associations among etiologic agents (coinfection) were assessed by Pearson chi-square and Fisher exact tests. All estimates were 2-tailed with a pre-established significance level for the alpha error of 5% ( $p \leq 0.05$ ). The 95% CIs were calculated for the percentages of the infectious agents detected in bulls and farms.

## Results

### Molecular detection of 5 reproductive infectious agents

The generated sequences from positive controls were submitted to a BLASTn search and showed identity of 99.3–100% with the sequences available in GenBank. The

nucleotide sequences were deposited in GenBank as accessions MW725075, MW725076, MW725077, and MW726033, for *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *U. diversum*, and *T. foetus*, respectively. From the 18 Brazilian cattle farms tested, 16 had at least 1 of the etiologic agents analyzed (Table 2). Analyzing the distribution of the microorganisms in the 16 positive farms, *C. fetus* subsp. *venerealis* was present in 14 farms (78%; 95% CI: 58–98%), followed by *M. bovis* in 13 (72%; 95% CI: 51–94%), *U. diversum* in 11 (61%; 95% CI: 38–84%), *M. bovis genitalium* in 8 (44%; 95% CI: 21–68%), and finally, *T. foetus* in 1 farm (5%; 95% CI: –5–16%). No agents were identified in 2 of the analyzed farms (B and H) from the South Region (Table 2).

PCR assay results showed that 159 of 210 bulls (76%; 95% CI: 70–81%) had at least 1 infectious agent identified in the preputial mucus, including *C. fetus* subsp. *venerealis*, *M. bovis*, *U. diversum*, and *M. bovis genitalium*, in 87 (55%; 95% CI: 47–63%), 84 (53%; 95% CI: 45–61%), 45 (28%; 95% CI: 21–35%), and 28 (17%; 95% CI: 12–24%) of 159 bulls, respectively (Table 2).

### Codetection of agents in the preputial mucosa of bulls

We found that 95 of 210 bulls (60%; 95% CI: 52–67%) were positive for only 1 etiologic agent (single infection); 64 bulls (40%; 95% CI: 33–48%) carried multiple agents. Among

**Table 3.** Codetections of reproductive etiologic agents identified by PCR in the preputial mucus of Brazilian bulls.

	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>		<i>p</i>
	Negative ( <i>n</i> )	Positive ( <i>n</i> )	
<i>Ureaplasma diversum</i>			0.214
Negative	93	72	
Positive	30	15	
<i>Mycoplasma bovis</i>			0.07
Negative	111	71	
Positive	12	16	
<i>Mycoplasma bovis</i>			<0.01
Negative	63	63	
Positive	60	24	
<i>Tritrichomonas foetus</i>			0.586
Negative	122	87	
Positive	1	0	
	<i>Tritrichomonas foetus</i>		<i>p</i>
	Negative ( <i>n</i> )	Positive ( <i>n</i> )	
<i>Ureaplasma diversum</i>			0.785
Negative	164	1	
Positive	45	0	
<i>Mycoplasma bovis</i>			0.867
Negative	181	1	
Positive	28	0	
<i>Mycoplasma bovis</i>			0.600
Negative	125	1	
Positive	84	0	
	<i>Ureaplasma diversum</i>		<i>p</i>
	Negative ( <i>n</i> )	Positive ( <i>n</i> )	
<i>Mycoplasma bovis</i>			0.621
Negative	144	38	
Positive	21	7	
<i>Mycoplasma bovis</i>			<0.01
Negative	112	14	
Positive	53	31	
	<i>Mycoplasma bovis</i>		<i>p</i>
	Negative ( <i>n</i> )	Positive ( <i>n</i> )	
<i>Mycoplasma bovis</i>			0.115
Negative	113	13	
Positive	69	15	

The *p*-value was based on Pearson chi-square and Fisher exact tests as appropriate. Gray shaded area indicates significant positive correlation.

these codetection cases, 42 of 64 bulls (66%; 95% CI: 54–78%) harbored 2 of the screened agents; 22 bulls (34%; 95% CI: 23–46%) carried 3 of the screened agents.

From the 87 bulls positive for *C. fetus* subsp. *venerealis*, 55 bulls (63%; 95% CI: 53–73%) had codetections (Table 3). In addition to *C. fetus* subsp. *venerealis* infection, 24 bulls (28%; 95% CI: 18–37%) were also positive for *M. bovis*, 16

bulls (18%; 95% CI: 10–27%) were positive for *M. bovis*, and 15 bulls (17%; 95% CI: 9–25%) were positive for *U. diversum*. Moreover, a statistically significant association was identified between *C. fetus* subsp. *venerealis* and *M. bovis* ( $p < 0.01$ ; Table 3).

*M. bovis* was identified in 84 bulls, with 14 (17%; 95% CI: 9–25%) harboring the bacterium as a single pathogen.



Among the *M. bovis*-positive bulls, 31 (37%; 95% CI: 26–47%) also carried *U. diversum*, with a statistically significant association between the bacteria ( $p < 0.01$ ; Table 3).

## Discussion

Our analyses reveal a high frequency and diversity of reproductive bacterial and protozoal infectious agents circulating in Brazilian cattle herds with a history of poor reproductive performance. Altogether, 159 of the 210 bulls (76%) analyzed in our study were carriers of at least 1 of the agents investigated by PCR assay: *C. fetus* subsp. *venerealis*, *M. bovis*, *M. bovigentialium*, *T. foetus*, and/or *U. diversum*. In addition, 16 of 18 farms were identified as having at least 1 of the investigated agents. Our study provides prevalence information that may influence the management of infectious agents carried by bulls.

*C. fetus* subsp. *venerealis* was the infectious agent identified most frequently in the bulls tested (55%). This bacterium is considered an important cause of reproductive loss in beef herds; however, previous studies have reported occurrences of 1.8–51.7% among Brazilian cattle.<sup>36</sup> The variability in the frequencies of identification might be related to the difficulty in detecting *C. fetus* subsp. *venerealis* by both culture and fluorescence methods,<sup>24,35</sup> which were the most common approaches in the past. Molecular assays are now the most useful methods to identify *C. fetus* subsp. *venerealis* because they are independent of bacterial viability.<sup>9,16</sup> Moreover, the frequency of *C. fetus* subsp. *venerealis* that we observed is higher than previous reports from herds with an infertility history in other South American countries, such as Uruguay and Argentina.<sup>13,23</sup> In North American and Asian countries, *C. fetus* subsp. *venerealis* is rare among breeding bulls from herds with an infertility history, with frequencies of 1.1% and 8.8%, respectively.<sup>18,39</sup> The described level of infected bulls in herds with low pregnancy rates was 28.8% in Oceania.<sup>34</sup> Despite the absence of reliable data from many countries, campylobacteriosis is known to be distributed worldwide.<sup>25</sup>

*M. bovis*, *M. bovigentialium*, and *U. diversum* are members of the *Mycoplasmataceae* family. Interestingly, although *Mycoplasma* spp. can produce energy by metabolizing carbohydrates and amino acids as an alternative to urea, *Ureaplasma* spp. rely strictly on urea for their growth.<sup>20</sup> An increase of the blood urea concentration has a relationship with the presence of *U. diversum* in the vagina of cows; the authors hypothesized that the urea could be a substrate for *U. diversum* growth in the vagina.<sup>33</sup> The significant association that we found between *U. diversum* and *M. bovis* (19.5% of bulls were carriers of both pathogens) in preputial crypts might be the result of a synergistic effect between these bacteria. We hypothesize that *M. bovis* would promote a favorable colonization environment for *U. diversum* in the prepuce of bulls, and we intend to study this hypothesis in future *in vitro* research.

Even though *M. bovis* has been demonstrated to colonize the reproductive tract of cows, venereal transmission of *M. bovis* has not been defined.<sup>17</sup> As well, the reproductive consequences of *M. bovis* and other *Mycoplasma* spp. are poorly studied in cattle.<sup>8</sup> We found that 84 bulls (43%) harbored *M. bovis* in preputial crypts. The need for more study of how and if *M. bovis* interacts with other pathogens should be highlighted, given that we observed this pathogen in association with *C. fetus* subsp. *venerealis* (co-harbored in 15% of the animals) and with *U. diversum* (co-harbored in 19.5% of the animals).

The occurrence of *U. diversum* in 21% of the animals tested is very similar to results of an Australian study,<sup>1</sup> in which 21.2% of bulls with a history of breeding problems (including genital lesions) were positive. On the other hand, the frequency of *U. diversum* in subclinical bulls was even larger in Argentina, with 11 of 17 bulls (65%) harboring the agent in their crypts.<sup>37</sup> *Ureaplasma* has also been described as inhabiting the reproductive tract of bulls in the United States.<sup>40</sup> To our knowledge, few reports have investigated the epidemiology of *U. diversum* in bulls; our study demonstrated the presence of *U. diversum* in Brazilian bulls from herds with poor reproductive performance.

We found that 18% of bulls were positive for *M. bovigentialium*. The clinical signs of *M. bovigentialium* infections can be observed in cows that are infected from subclinical bulls.<sup>7,32</sup> Information on the distribution of *M. bovigentialium* is scarce, although this bacterium is associated with abortions, lesions in cow reproductive tracts, including granulopustular vulvovaginitis, and infertility problems in cattle.<sup>32,38</sup>

Bovine trichomoniasis depends on carrier bulls transmitting the agent to cows, consequently causing low fertility rates in herds.<sup>14,29,31</sup> According to our molecular screening, *T. foetus* was identified in only one bull (0.6%). Our results agree with the literature, which indicates a low prevalence of *T. foetus* in cattle in American countries.<sup>11,19,23,26,30</sup> Prevalence studies associating molecular approaches with protozoan culture showed the absence of *T. foetus* in bulls from Tennessee as well as the Eastern Caribbean.<sup>11,26</sup> A study using protozoan culture in Costa Rican bulls showed a prevalence of ~4%.<sup>30</sup> Prevalence of *T. foetus* in Switzerland and Spain, according to parallel analyses of culture and PCR reactions, was 0–32%.<sup>4,21</sup> Reports from Spain demonstrated a re-emergence of trichomoniasis in bulls, of 13–32%.<sup>12,21</sup> Interestingly, the recurrence of trichomoniasis occurred simultaneously with the return of natural mating as the predominant reproduction type in some places within Europe.<sup>12</sup>

Our data illustrate the presence of *C. fetus* subsp. *venerealis*, *M. bovis*, *M. bovigentialium*, *T. foetus*, and *U. diversum* in the prepuce of bulls from farms with poor reproductive performance, specifically infertility. The limitation of our convenience sampling in cattle herds with poor reproductive performance precludes conclusions about whether the infectious agents identified were directly responsible for

reproductive losses, especially by the lack of information on pregnancy rates, calving intervals, and diagnostic surveillance of the studied herds, as well the absence of tests for other infectious agents that are potentially involved in reproductive diseases. In addition, the codetections identified should be interpreted with caution because, although we demonstrated a statistically significant association among bacteria, these data do not prove synergy.


### Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

### Funding

Our work was supported by the Coordination of Improvement of Higher Educational Personnel (CAPES)—Finance Code 001; Propeq/UFRGS (Process 001/2019); and the National Council of Technological and Scientific Development—CNPq (Process 420590/2018-8—CNPq-Universal/2018).

### ORCID iD

Silvia D. Carli  <https://orcid.org/0000-0002-3440-2134>

### References

- Argue B, et al. Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population. *Aust Vet J* 2013;91:99–101.
- Azevedo JB, et al. Presence of *Ureaplasma diversum* in the genital tracts of female dairy cattle in Mato Grosso State, Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2017;49:311–316.
- Balzan C, et al. Bovine genital campylobacteriosis: main features and perspectives for diagnosis and control. *Cienc Rural* 2020;50:e20190272.
- Bernasconi Ch, et al. *Tritrichomonas foetus*: prevalence study in naturally mating bulls in Switzerland. *Vet Parasitol* 2014;200:289–294.
- BonDurant RH. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005;21:383–408.
- Botelho MPA, et al. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* among bulls slaughtered in the state of Minas Gerais, Brazil. *Semin Cienc Agrar* 2018;39:2039–2048.
- Brenner J, et al. Granulo-pustular vulvovaginitis (“jackal bite”) an emerging disease: *Mycoplasma bovigenitalium* and *M. canadense* infection of dairy cattle in Israel. *Isr J Vet Med* 2009;64:103–107.
- Calcutt MJ, et al. Gap analysis of *Mycoplasma bovis* disease, diagnosis and control: an aid to identify future development requirements. *Transbound Emerg Dis* 2018;65(Suppl 1):91–109.
- De Carli S, et al. Frozen bovine preputial mucus as a suitable sample for the direct molecular diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J Microbiol Methods* 2020;179:106101.
- Chiapparrone ML, et al. Characterization of the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* adhesion to bovine sperm cells. *Int J Morphol* 2016;34:1419–1423.
- Coker KE, et al. Freedom from *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in St. Kitts. *Trop Anim Health Prod* 2018;50:1171–1173.
- Collantes-Fernández E, et al. Prevalence of bovine trichomonosis and associated risk factors in bulls from Spanish beef herds. *Theriogenology* 2019;128:116–121.
- Delpiazzi R, et al. Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a *16S rRNA* gene sequence. *Vet Anim Sci* 2020;11:100163.
- Felleisen RS, et al. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J Clin Microbiol* 1998;36:513–519.
- Givens MD, Marley MSD. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. *Theriogenology* 2008;70:504–507.
- van der Graaf-van Bloois L, et al. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *J Microbiol Methods* 2013;95:93–97.
- Hazelton MS, et al. *Mycoplasma* species in vaginas of dairy cows before and after exposure to bulls and their association with conception. *J Dairy Sci* 2020;103:11795–11805.
- Hosseinizadeh S, et al. PCR detection of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in smegma samples collected from dairy cattle in Fars, Iran. *Vet Res Forum* 2013;4:227–231.
- Kennedy JA, et al. Pooled polymerase chain reaction to detect *Tritrichomonas foetus* in beef bulls. *J Vet Diagn Invest* 2008;20:97–99.
- Kenny GE, Cartwright FD. Effect of urea concentration on growth of *Ureaplasma urealyticum* (T-strain mycoplasma). *J Bacteriol* 1977;132:144–150.
- Mendoza-Ibarra JA, et al. High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. *Vet J* 2012;193:146–151.
- Michi AN, et al. A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology* 2016;85:781–791.
- Molina LL, et al. A retrospective epidemiological analysis of shared risk factors for bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Prev Vet Med* 2018;161:109–114.
- Monke HJ, et al. Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J Vet Diagn Invest* 2002;14:35–39.
- Mshelia GD, et al. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reprod Domest Anim* 2010;45:e221-30.
- Okafor CC, et al. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in Tennessee bulls. *Vet Parasitol* 2017;243:169–175.
- Ondrak JD. *Tritrichomonas foetus* prevention and control in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2016;32:411–423.
- Parker AM, et al. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *J Vet Intern Med* 2018;32:1241–1252.
- Parsonson IM, et al. The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection in the bull. *Aust Vet J* 1974;50:421–423.

30. Perez E, et al. Prevalence and risk factors for *Trichomonas foetus* infection in cattle in northeastern Costa Rica. *Prev Vet Med* 1992;14:155–165.
31. Rhyan JC, et al. Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. *Vet Pathol* 1999;36:406–411.
32. Saed OM, Al-Aubaidi JM. Infertility in heifers caused by pathogenic strain of *Mycoplasma bovis genitalium*. *Cornell Vet* 1983;73:125–130.
33. Sanderson MW, et al. Prevalence and reproductive effects of *Ureaplasma diversum* in beef replacement heifers and the relationship to blood urea nitrogen level. *Theriogenology* 2000;54:401–408.
34. Sanhueza JM, et al. Pregnancy rates of beef cattle are not affected by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* real-time PCR-positive breeding sires in New Zealand. *N Z Vet J* 2014; 62:237–243.
35. Schmidt T, et al. Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. *J S Afr Vet Assoc* 2010;81:87–92.
36. Silveira C da S, et al. Diagnosis of bovine genital campylobacteriosis in South America. *Front Vet Sci* 2018;5:321.
37. Sosa C, et al. Identificación de especies de *Mycoplasma* y de *Ureaplasma diversum* en rodeos lecheros de Argentina [Identification of species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma diversum* from Argentinian dairy herds]. *Rev Argent Microbiol* 2018;50:31–35. Spanish.
38. Tramuta C, et al. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *J Vet Diagn Invest* 2011;23:657–664.
39. Waldner CL, et al. Application of direct polymerase chain reaction assays for *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Tritrichomonas foetus* to screen preputial samples from breeding bulls in cow-calf herds in western Canada. *Can J Vet Res* 2017;81:91–99.
40. Wickware CL, et al. Composition and diversity of the preputial microbiota in healthy bulls. *Theriogenology* 2020;145:231–237.
41. Zu Ermgassen EKHJ, et al. The origin, supply chain, and deforestation risk of Brazil's beef exports. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117:31770–31779.

### **7 CAPÍTULO 3: Desempenhos reprodutivos das vacas e a ordem de paridade influenciam a comunidade fúngica cervicovaginal**

#### **Cows' reproductive performances and parity order influences the cervicovaginal fungal community**

Embora se saiba que os fungos possuem função essencial na estabilidade do trato reprodutivo bovino e no desenvolvimento de doenças reprodutivas, até o momento, a composição das comunidades fúngicas presentes na cérvix de vacas tanto saudáveis quanto inférteis não havia sido elucidada pela literatura consultada. Portanto, o nosso estudo fornece um amplo conhecimento sobre os fungos que habitam a cérvix de vacas com retorno ao cio. Além disso, sugerimos que o evento da parição pode alterar significativamente a composição da comunidade fúngica cervical, facilitando, talvez, a colonização por micro-organismos patogênicos. Esse estudo resultou em um artigo científico, publicado em 2022 na revista científica *Microbial Pathogenesis* (v.162, n. 105351; doi: 10.1016/j.micpath.2021.105351).

## **8 CAPÍTULO 4: Rumo à caracterização da microbiota cervicovaginal de vacas que carregam *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis***

### **Towards the characterization of the cervicovaginal microbiota of cows harboring *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis***

O presente capítulo descreve a microbiota cervicovaginal de 20 vacas com histórico de retorno ao cio (10 positivas e 10 negativas para a presença de *C. fetus* subsp. *venerealis*) e 10 novilhas sem qualquer contato sexual com machos, através do sequenciamento dos *amplicons* da região V4 do gene 16S rDNA. Embora a microbiota vaginal bovina já tenha sido explorada por diversos pesquisadores, até o momento, a composição das comunidades bacterianas presentes na cérvix de vacas carreadoras de *C. fetus* subsp. *venerealis* não foi elucidada pela literatura. Portanto, o nosso estudo fornece um amplo conhecimento sobre as bactérias que habitam a cérvix de vacas com retorno ao cio. Esse estudo resultou em um artigo científico, que no momento está submetido para publicação em um periódico de circulação internacional.

## 9 DISCUSSÃO GERAL

O setor da pecuária contribui ativamente com o rendimento financeiro do mercado brasileiro. Para o completo sucesso dessa cadeia produtiva, faz-se necessária uma eficiente performance reprodutiva dos bovinos, visando o aumento de terneiros nascidos para o aumento dos rebanhos e reposição dos animais (SILVA NETO; BACCHI, 2014). Portanto, manter uma performance reprodutiva de excelência é prioritário para a indústria bovina. No entanto, diversos fatores podem contribuir negativamente nesse quesito e perdas reprodutivas podem ocorrer por causas infecciosas e não infecciosas (SHELDON *et al.*, 2009; YOO, 2010; WAGENER *et al.*, 2014; DISKIN *et al.*, 2016). Entre as causas infecciosas, destaca-se a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*, uma bactéria venérea de ampla distribuição mundial, que causa retorno ao cio e redução do número terneiros nascidos (MICHII *et al.*, 2016). O estabelecimento da doença ocorre por diversos mecanismos patogênicos bacterianos e, apesar de serem conhecidos, existe uma lacuna no conhecimento sobre a interação deste patógeno com a microbiota cervicovaginal.

Nesse sentido, a nossa proposta foi padronizar o método de coleta, transporte e armazenamento de amostras prepuciais para o diagnóstico de CGB, seguido da descrição da microbiota cervicovaginal de vacas infectadas por *C. fetus* subsp. *venerealis*. Além disso, buscamos, com a obtenção de dados da microbiota, o reconhecimento das interações dos microorganismos, gerando informações sobre os patógenos que podem estar relacionados aos casos de infertilidade bovina. Os resultados apresentados são importantes para o entendimento do microambiente cervicovaginal na presença de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

O primeiro objetivo desta Tese foi padronizar os métodos de coleta, transporte e armazenamento de muco prepucial para diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*. *C. fetus* subsp. *venerealis* é uma bactéria fastidiosa e microaerofila, o que dificulta a viabilidade bacteriana para a detecção pela técnica padrão ouro, que é o cultivo bacteriano (OIE, 2019). Sendo assim, as técnicas moleculares começaram a ganhar destaque no diagnóstico de CGB e, atualmente, são empregadas rotineiramente para diagnóstico de amostras de campo (POLO *et al.*, 2021). No entanto, o transporte e o tempo de armazenamento das amostras para posterior investigação de *C. fetus* subsp. *venerealis* ainda não eram definidos. Assim, fizemos as seguintes perguntas científicas: 1) É possível congelar amostras de muco prepucial para posterior diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*? 2) Por quanto tempo os mucos podem ficar congelados antes da extração de DNA? A partir dos dados comparativos de detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* nas amostras refrigeradas e congeladas por 10 dias,



podemos concluir que o congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  de raspados prepuciais por até 10 dias não interfere na detecção do agente. Esses achados impactam não somente na pesquisa científica de CGB, mas diretamente na comunidade técnica. Visto que os nossos resultados provam que amostras de campo podem ser coletadas e armazenadas por até 10 dias para análise, as coletas distantes de centros de diagnóstico serão facilitadas e, conseqüentemente, a epidemiologia de CGB será melhor elucidada.

Após a consolidação do método de coleta e transporte das amostras de muco prepucial para diagnóstico de *C. fetus* subsp. *venerealis*, procedemos com uma triagem de agentes reprodutivos causadores de baixa performance nos rebanhos brasileiros. No Capítulo 2 desta Tese, abordamos uma triagem epidemiológica de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis* e *Tritrichomonas foetus*. Os touros são considerados portadores subclínicos crônicos desses agentes e os transmitem para as fêmeas por forma venérea, causando retorno ao cio e infertilidade (CHIAPPARRONE; SOTO; CATENA, 2016; GIVENS; MARLEY, 2008b; MICHII *et al.*, 2016). Evidenciamos que todos os agentes investigados circulam nos rebanhos bovinos brasileiros e, muitas vezes, coabitam o mesmo nicho.

Também constatamos a associação negativa entre os agentes, *C. fetus* subsp. *venerealis* com *M. bovis* e *Ureaplasma diversum* com *M. bovis*. Até o presente momento, não existem relatos que associem uma interação entre esses micro-organismos. O nosso estudo relacionou a interação entre os agentes apenas pela presença no mesmo sítio etiológico, porém, não sabemos se esses agentes podem agir sinergicamente, favorecendo multiplicação ou disseminação. *M. bovis*, *M. bovis*, e *U. diversum* são membros da família *Mycoplasmataceae*. Curiosamente, embora *Mycoplasma* spp. possa produzir energia pela metabolização carboidratos e aminoácidos como uma alternativa à ureia, *Ureaplasma* spp. depende estritamente da ureia para o seu crescimento (KENNY *et al.*, 1977). O aumento da concentração de ureia no sangue tem uma relação com a presença de *U. diversum* na vagina das vacas; os autores supõem que a ureia poderia ser um substrato para *U. diversum* no crescimento da vagina (SANDERSON *et al.*, 2000). Sendo assim, o manejo nutricional dos animais pode ser um fator chave no favorecimento da multiplicação de bactérias membros da família *Mycoplasmataceae*. A associação significativa que encontramos pode ser o resultado de um efeito sinérgico entre essas bactérias. A hipótese é que *M. bovis* promoveria um efeito favorável ambiente de colonização para *U. diversum*, no prepúcio dos touros. Vale destacar que *M. bovis* esteve presente em mais da metade dos animais investigados e a sua alta incidência pode estar

relacionada à coabitação com outros agentes e, não necessariamente, com o sinergismo entre as bactérias.

Objetivando elucidar a microbiota do trato reprodutivo bovino e correlacionar os agentes encontrados com os quadros de infertilidade, conduzimos os sequenciamentos de *metabarcoding* para caracterizar tanto o perfil fúngico quanto bacteriano, que é carregado na cérvix de vacas com sinais de infertilidade. Inicialmente, nós fizemos as seguintes perguntas científicas: 1) A composição da microbiota fúngica é responsável pelos quadros de infertilidade em fêmeas bovinas? 2) A ordem de paridade influencia na composição das comunidades fúngicas cervicovaginais de vacas? Pelo sequenciamento do fragmento ITS, pudemos determinar que as comunidades fúngicas cervicovaginais se diferem de acordo com a ordem de paridade das vacas e conforme a performance reprodutiva.

A nossa compreensão do complexo microbioma de ruminantes e o reconhecimento da importância da interação hospedeiro-microbioma se expandiram significativamente nos últimos anos (ONG *et al.*, 2021). A maioria dessas pesquisas descreveram a microbiota vaginal no pós-parto com ou sem metrite e não abordaram os casos de infertilidade causados por patógenos bacterianos e fúngicos. Sendo assim, o Capítulo 3 desta Tese objetivou descrever as comunidades fúngicas cervicovaginais nas vacas com infertilidade.

Pela análise das vacas férteis e inférteis pudemos constatar que o gênero fúngico *Candida* está associado ao fato das vacas desenvolverem quadros de infertilidade. Esse resultado já era esperado, uma vez que esse gênero foi descrito anteriormente como envolvido em doenças endometriais em vacas (SAINI *et al.*, 2019). De acordo com Saini *et al.* (2019), a contaminação das vacas com *Candida* spp. ocorreu após a primeira época de reprodução por acasalamento natural, inseminação artificial, após o parto ou após terapia antimicrobiana intrauterina local prolongada. Essas intervenções podem mudar o microambiente do trato reprodutivo, promovendo a colonização por agentes patogênicos.

Ao compararmos as vacas com retorno ao cio, vacas férteis, novilhas não sexualmente ativas, e por ordem de paridade (multíparas *versus* nulíparas), evidenciamos que a microbiota fúngica cervicovaginal sofre alterações significativas entre vacas multíparas (animais que experimentam mais de uma prenhez) e vacas nulíparas (nunca pariram). As vacas multíparas apresentam uma microbiota menos diversificada e rica em comparação às vacas nulíparas. Apesar de não termos acesso ao histórico clínico desses animais, acreditamos que as vacas multíparas, além de já terem experienciado a parição, podem já ter sido afetadas por outras doenças uterinas e, conseqüentemente, sido expostas a tratamentos antimicrobianos, uma vez que o protocolo padrão para infecções uterinas é o tratamento medicamentoso (JEON *et al.*,



2018). Além disso, apesar de todos os animais (vacas e novilhas) serem da mesma fazenda, os animais jovens (vacas nulíparas e virgens) recebem concentrações de concentrado e forrageiras de melhor qualidade e quantidade para garantir uma maturidade sexual mais precoce, enquanto as vacas múltíparas são mantidas em campo nativo. Sendo assim, a alimentação também pode ter influenciado nas diferenças entre os grupos, especialmente porque esse fator já é caracterizado como compositor da microbiota fecal (KHAFIPOUR *et al.*, 2016; APPIAH *et al.*, 2020) e essa, por sua vez, é parte fundamental da microbiota cervicovaginal.

Esses achados demonstram o efeito da parição na microbiota fúngica cervicovaginal e a possibilidade do impacto direto na colonização da microbiota por agentes patogênicos responsáveis por baixas taxas reprodutivas. Sendo assim, fica evidente a necessidade de um manejo pós-parto para evitar as consequências reprodutivas causadas por doenças uterinas. O uso de probióticos vaginais tem se tornado um aliado promissor na recuperação da microbiota saudável de vacas nos pós-parto, diminuindo a incidência de doenças reprodutivas (GARCÍA-GALÁN *et al.*, 2020).

Os estudos com o uso de probióticos intravaginais têm se apresentado como uma ferramenta promissora e o uso de *Lactobacillus* spp. promove a redução do pH vaginal, tornando, conseqüentemente, o ambiente menos propício para a multiplicação de alguns patógenos (GARCÍA-GALÁN *et al.*, 2020). Estudos nesse contexto parecem ser promissores para as reduções de perdas reprodutivas no setor da pecuária. O primeiro passo para alterar a microbiota com a adição de probióticos é conhecer as comunidades fúngicas e bacterianas vaginais das vacas e entender quais micro-organismos podem agir de forma benéfica para o microambiente vaginal.

Posteriormente, foi levantada a seguinte pergunta científica: “A microbiota bacteriana cervicovaginal de vacas com histórico de retorno ao cio sofre alterações tanto em composição quanto em diversidade quando *C. fetus* subsp. *venerealis* está presente”? No intuito de responder à esta pergunta, o Capítulo 4 desta Tese visou descrever as comunidades bacterianas da cérvix de vacas portadoras de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Para esse propósito, comparou-se 10 vacas com problemas de retorno ao cio na última estação reprodutiva e negativas para a presença de *C. fetus* subsp. *venerealis* (CVN), 10 vacas com retorno ao cio e positivas para *C. fetus* subsp. *venerealis* (CVP) e 10 novilhas virgens (NSA). Ao compararmos a composição das comunidades bacterianas cervicovaginais desses três grupos, constatamos que as vacas com retorno ao cio negativas e positivas para a presença de *C. fetus* subsp. *venerealis* apresentam um perfil composicional (tanto em taxonomia quanto em abundância de *reads*) significativamente diferente do grupo NSA. Além disso, constatamos que a presença de *C. fetus*

subsp. *venerealis* não alterou a composição da microbiota dos grupos CVN e CVP. Vale ressaltar também a presença de *C. fetus* subsp. *venerealis* na microbiota cervicovaginal de duas novilhas não sexualmente ativas. Essas novilhas compartilharam um padrão similar de composição bacteriana da microbiota, tanto na análise de diversidade quanto no perfil da via metabólica com o grupo CVP. Normalmente, as vacas infectadas com *C. fetus* subsp. *venerealis* retornam ao cio ou abortam. Entretanto, nos casos em que não ocorre retorno ao cio ou aborto, a bactéria pode migrar da mãe para a placenta (MILLER, 1977). Além disso, o gênero *Campylobacter* foi identificado na microbiota vaginal das vacas cuja prole desenvolveu doença no trato respiratório superior (LIMA *et al.*, 2019). Ademais, o gênero já foi verificado na microbiota vaginal de novilhas virgens saudáveis (QUEREDA *et al.*, 2020). Embora não haja relatos de transmissão vertical de *C. fetus* subsp. *venerealis*, especulamos que essa rota pode ser a explicação para as novilhas não sexualmente ativas, que tiveram resultados positivos nos ensaios de qPCR. Essa hipótese é reforçada pelo fato de as novilhas serem de uma fazenda positiva para *C. fetus* subsp. *venerealis*. Entretanto, são necessários mais estudos para provar a eficiência dessa rota de transmissão de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Além disso, alguns animais que testaram positivo para *C. fetus* subsp. *venerealis* na triagem inicial por ensaios de qPCR não tiveram *reads* afiliadas ao gênero *Campylobacter* no sequenciamento da região V4 do 16S rDNA. As técnicas usadas neste estudo (qPCR e sequenciamento V4 16S) têm diferenças na sensibilidade. A qPCR pode detectar uma quantidade menor de cópias de *C. fetus* subsp. *venerealis*, enquanto o sequenciamento pode ser afetado pela abundância de outras bactérias presentes no local alvo. Os casos de animais negativos para *C. fetus* subsp. *venerealis* na qPCR e com a presença de leituras para o gênero *Campylobacter* podem ser explicados por outras espécies do gênero na microbiota cervicovaginal das vacas.

De maneira geral, os nossos resultados da microbiota fúngica e bacteriana também destacam que os animais possuem características individuais na composição da microbiota cervicovaginal. Em outras palavras, possivelmente, fatores ambientais, genéticos e resposta individual frente aos desafios microbianos, alteram a composição da microbiota cervicovaginal das vacas. Desse modo, a descrição da microbiota cervicovaginal das fêmeas com diferentes performances reprodutivas, além da caracterização taxonômica das comunidades fúngicas e bacterianas, representa um passo importante para a consolidação do entendimento das interações entre micro-organismos, especialmente na presença de *C. fetus* subsp. *venerealis*, causador de quadros de infertilidade nas vacas.

## 10 CONTRIBUIÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DOS RESULTADOS ALCANÇADOS NESTA TESE

Visando contribuir com a comunidade técnico-científica, a presente Tese abordou a caracterização da microbiota cervicovaginal de vacas com Campilobacteriose Genital Bovina, pelo sequenciamento de *metabarcoding*. Duas grandes contribuições que trarão avanços para as áreas relacionadas à esta Tese são aqui destacadas: i) o desenvolvimento de *scripts* de bioinformática que permitem à pessoas menos experientes a realização, de forma simples, de análises de bioinformática de sequenciamento de *metabarcoding*; e ii) a padronização de um método efetivo, seguro, e de alta sensibilidade para coleta e armazenamento de amostras de muco para diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Para a análise desses resultados, foi necessário o emprego de diversas ferramentas de bioinformática e de conhecimentos de linguagem de programação. Visto que esses conhecimentos informáticos, muitas vezes, são limitados para alunos e profissionais das áreas biológicas, construímos um *script* (MetagenBarcod.py) em linguagem de programação *python* para facilitar a análise dos dados gerados em sequenciamentos de *amplicon* 16 rDNA e ITS. Além disso, disponibilizamos um *script* (BarcodAnaly.R) para análises complementares, construção de gráficos e estatística em linguagem R. Ambos estarão disponíveis pública e gratuitamente para a comunidade científica no GitHub (<https://github.com/silvia-decarli>) após o registro do programa de computador do *script* MetagenBarcod.py.

Dado o impacto tecnológico inovativo que estas ferramentas de bioinformática que desenvolvemos durante a Tese de doutorado podem alcançar, foi solicitado, com apoio da Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico (SEDETEC) da UFRGS, registro de programa de computador junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial em 02/03/2022. Esta ferramenta foi empregada nas análises do artigo científico intitulado *Cows' reproductive performances and parity order influences the cervicovaginal fungal community*, publicado na revista *Microbial Pathogenesis* (DE CARLI *et al.*, 2022– Capítulo 3), e também nas análises do Capítulo 4.

Resumidamente, o *script* MetagenBarcod.py foi desenvolvido para fazer a montagem das fitas sequenciadas *forward* e *reverse* por sequenciamento em equipamentos Illumina, remover sequências quiméricas e disponibilizar os *Amplicon Sequence Variants* (ASVs) do conjunto de dados fornecido. Posteriormente, infere-se a taxonomia dos ASVs identificados, geram-se gráficos de barra para visualização, bem como dados estatísticos sobre o conjunto de

dados. Por fim, o *script* executa a inferência estatística comparativa entre os grupos de dados. Todo o processo das análises ocorre dentro do ambiente QIIME2.

Já o *script* BarcodAnaly.R foi desenvolvido para descontaminar *in silico* as bibliotecas de *metabarcoding*, em caso de sequenciamento de *reads* em bibliotecas de *blank control*. Após a descontaminação *in silico* das *reads*, os dados descontaminados seguem para inferências estatísticas, análise de diversidade alfa, diversidade beta, *heatmap*, *Ramdon Forest* e correlação entre os gêneros identificados nas bibliotecas analisadas.

O presente trabalho também forneceu uma nova abordagem de coleta e armazenamento de amostras de muco prepuciais de touros para o diagnóstico de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Este método é de grande valia para o setor pecuário, e também científico, pois agora sabemos que as amostras de muco prepucial podem ser congeladas por até 10 dias, e após transportado refrigerado para o Laboratório, sem a perda de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Como a maioria das fazendas de bovinos são distantes de laboratórios, o diagnóstico de *C. fetus* subsp. *venerealis* sempre foi difícil e, em muitos casos impraticável, já que anteriormente ao nosso estudo era preconizado que as amostras após coleta fossem mantidas refrigeradas e processadas no Laboratório em até 48 h. Estes resultados estão publicados no artigo científico intitulado *Frozen bovine preputial mucus as a suitable sample for the direct molecular diagnosis of Campylobacter fetus subsp. venerealis*, publicado na revista *Journal of Microbiological Methods* (DE CARLI *et al.*, 2020 – capítulo 1).

## 11 CONCLUSÕES

Com os dados analisados até o presente momento, podemos concluir que:

- a) O congelamento de amostras clínicas de raspado muco prepucial de touros foi eficiente para o diagnóstico de *C. fetus* subsp. *venerealis*;
- b) Os touros são portadores assintomáticos dos principais agentes relacionados à infertilidade nas vacas;
- c) Fazendas com baixo desempenho reprodutivo tiveram a presença significativamente alta dos seguintes agentes infecciosos: *C. fetus* subsp. *venerealis*, *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e *U. diversum*;
- d) A composição da comunidade fúngica cervicovaginal entre vacas inférteis e férteis é muito semelhante;
- e) A composição da comunidade fúngica cervicovaginal é significativamente influenciada pela ordem de paridade;
- f) *C. fetus* subsp. *venerealis* não influencia na composição da microbiota bacteriana cervicovaginal;
- g) A microbiota cervicovaginal bacteriana das vacas com histórico de retorno ao cio se difere significativamente das novilhas virgens.

## 12 PERSPECTIVAS

- a) Avaliar comparativamente a microbiota cervicovaginal fúngica e bacteriana de vacas com histórico de retorno ao cio na última estação de monta;
- b) Avaliar detalhadamente as vias metabólicas encontradas por analogia ao perfil 16S rDNA cervicovaginal de vacas com histórico de retorno ao cio na última estação de monta, com e sem a presença de *C. fetus* subsp. *venerealis*;
- c) Determinar e investigar a interação dos micro-organismos bacterianos cervicovaginais e as influências nos quadros de retorno ao cio;
- d) Realizar estudos genômicos de *C. fetus* subsp. *venerealis* para determinar marcas genéticas evolutivas ao longo dos anos;
- e) Realizar estudos filogenômicos para traçar a epidemiologia molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

## REFERÊNCIAS

- ABRIL, C. *et al.* Discovery of insertion element *ISC<sub>fel</sub>*: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, Paris, v. 13, n. 1, p. 993-1000, ago. 2007.
- APPIAH, M. O.; WANG, J.; LU, W. Microflora in the reproductive tract of cattle: A review. **Agriculture**, Gainesville, v. 10, n. 6, p. 1-27, Jun. 2020.
- AZEVEDO, J. B. *et al.* Presence of *Ureaplasma diversum* in the genital tracts of female dairy cattle in Mato Grosso State, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Livingstone, v. 49, n. 2, p. 311-316, dez. 2017.
- BALZAN, C. *et al.* Bovine genital campylobacteriosis: Main features and perspectives for diagnosis and control. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 50, n. 3, p. 8478cr20190272, out. 2020.
- BERG, G. *et al.* Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, London, v. 8, n. 1, p. 1-22, jun. 2020.
- BICALHO, M. L.S. *et al.* Dynamics of the microbiota found in the vaginas of dairy cows during the transition period: Associations with uterine diseases and reproductive outcome. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 100, n. 4, p. 3043–3058, dez. 2017.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, ago. 2014.
- BOLYEN, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, New York, v. 37, n. 8, p. 852-857, ago. 2019.
- BONDURANT, R. H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. **Vet Clin Food Anim.**, Philadelphia, v. 21, p. 383-408, jul. 2005.
- BOTELHO, M. P. A. *et al.* Prevalence of *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* among bulls slaughtered in the state of Minas Gerais, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 2039-2048, set. 2018.
- CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, New York, v. 13, n. 7, p. 581-583, jul. 2016.
- CARLI, S. *et al.* Frozen bovine preputial mucus as a suitable sample for the direct molecular diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 179, p. 9-11, set. 2020.
- CHANG, W.; OGG, J. E. Transduction and mutation to glycine tolerance in *vibrio fetus*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 32, n. 4, p. 649-653, abr. 1971
- CHEE, W. J. Y.; CHEW, S. Y.; THAN, L. T. L. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. **Microbial Cell Factories**, London, v. 19, n. 1, p. 1–24, 2020.
- CHIAPPARRONE, M. L.; SOTO, P.; CATENA, M. Characterization of the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* adhesion to bovine sperm cells. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 34, n. 4, p. 1419–1423, 2016.

CLEMMONS, B. A. *et al.* Vaginal and uterine bacterial communities in postpartum lactating cows. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. JUN, p. 1–10, jun. 2017.

DELONG, E. F.; PACE, N. R. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Systematic Biology**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 470–478, ago. 2001.

DELPIAZZO, R. *et al.* Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a 16S rDNA gene sequence. **Veterinary and Animal Science**, Amsterdam, v. 11, p. e100163, dez. 2020.

DENG, F. *et al.* The vaginal and fecal microbiomes are related to pregnancy status in beef heifers. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019.

DEREJE, T. *et al.* Review of common causes of abortion in dairy cattle in Ethiopia. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, Nairobi, v. 10, n. 1, p. 1–13, nov. 2018.

DISKIN, M. G. *et al.* Pregnancy losses in cattle: Potential for improvement. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 28, n. 1–2, p. 83–93, 2016.

ERASMUS, K. H. J. *et al.* The origin, supply chain, and deforestation risk of Brazil's beef exports. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 117, n. 50, p. 31770–31779, dez. 2020.

ESCHER, R. *et al.* Clinical and epidemiological analysis of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* infections in humans and comparative genetic analysis with strains isolated from cattle. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 16, p. 198, maio 2016.

FITZGERALD, C. *et al.* *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. *nov.*, isolated from humans and reptiles. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, p. 2944–2948, set. 2014.

GARCÍA-GALÁN, A. *et al.* The addition of *Lactobacillus* spp. negatively affects *Mycoplasma bovis* viability in bovine cervical mucus. **BMC Veterinary Research**, London, v. 16, n. 1, p. 1–7, jul. 2020. Disponível em: <https://www.doi.org/10.1186/s12917-020-02454-9>.

GIANNATTASIO-FERRAZ, S. *et al.* A common vaginal microbiota composition among breeds of *Bos taurus indicus* (Gyr and Nellore). **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 1115–1124, out. 2019.

GIUFFRIDA, R. Infecções pelo gênero *Campylobacter*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C (EDS). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. São Paulo: Roca, 2016.

DANIEL GIVENS, M.; MARLEY, M. S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 3, p. 270–285, 2008a.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S.D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 3, p. 504–507, ago. 2008b.

HAZELTON, M. S. *et al.* *Mycoplasma* species in vaginas of dairy cows before and after exposure to bulls and their association with conception. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 103, n. 12, p. 11795–11805, jul. 2020.



HOFFER, M. A. Bovine campylobacteriosis: a review. **Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 22, n. 11, p. 327–330, nov. 1981.

HOQUE, N. *et al.* Economic loss associated with bovine campylobacteriosis in selected districts of Bangladesh. **International Journal of Livestock Production**, Nairobi, v. 12, n. 4, p. 183–194, dez. 2021.

HOSSEINZADEH, S.; KAFI, M.; POUR-TEIMOURI, M.. PCR detection of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in smegma samples collected from dairy cattle in Fars, Iran. **Veterinary research forum: an international quarterly journal**, Urmia, v. 4, n. 4, p. 227–231, dez. 2013.

HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 2, p. 1–8, jan. 2002.

HUM, S.; QUINN, K.; BRUNNER, J.; ON, S. L. W. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 75, n. 1, p.827–831, nov. 1997.

IBGE - Instituto Brasileiro de Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. IBGE, 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/31725-rebanho-bovino-cresce-1-5-e-atinge-218-2-milhoes-de-cabecas-em-2020>. Acesso em: 16 fev. 2022.

JAMES, A. D.; ESSLEMONT, R. J. The economics of calving intervals. **Animal Production**, Scotland, v. 29, n. 2, p. 157–162, out. 1979.

JEON, S. J. *et al.* Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n. 18, p. 6324–6332, set. 2015.

JEON, S. J. *et al.* Uterine microbiota and immune parameters associated with fever in dairy cows with metritis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 11, p. 1–17, nov. 2016.

JEON, S. J.; GALVÃO, K. N. An advanced understanding of uterine microbial ecology associated with metritis in dairy cows. **Genomics & Informatics**, Seoul, v. 16, n. 4, p. e21, dez. 2018.

JIMENEZ, D. F. *et al.* Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 101, n. 3–4, p. 157–162, mai. 2011.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, Amauri A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 289–329, mar. 2006.

KENNY, G. E.; FRANK, C. D. Effect of urea concentration on growth of *Ureaplasma urealyticum* (T-Strain *Mycoplasma*). **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 132, n. 1, p. 144–150, 1977.

KIENESBERGER, S. *et al.* Comparative genome analysis of *Campylobacter fetus* subspecies revealed horizontally acquired genetic elements important for virulence and niche specificity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 1, e85491, jan. 2014.

KHAFIPOUR, E. *et al.* Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. **Animal Frontiers**, London, v. 6, n. 2, p. 13–19, abr. 2016.

KHALIL, A.; BATOOL, A.; ARIF, S. Healthy cattle microbiome and dysbiosis in diseased phenotypes. **Ruminants**, [s. l.], v. 2022, n. 2, p. 134–156, 2022.

KLEIN-JÖBSTL, D. *et al.* Microbiota of newborn calves and their mothers reveals possible transfer routes for newborn calves' gastrointestinal microbiota. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 8, p. 1–18, ago. 2019.

KONOPKA, A. What is microbial community ecology? **ISME Journal**, London, v. 3, n. 11, p. 1223-1230, Ago. 2009.

KOZICH, J. J. *et al.* Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 79, p. 5112-5120, set. 2013.

LAGUARDIA-NASCIMENTO, M. *et al.* Vaginal microbiome characterization of Nellore cattle using metagenomic analysis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 11, p. 1-19, nov. 2015.

LEDERBERG, J.; MCCRAY, A. T. Ome sweet omics a genealogical. **The Scientist**, Philadelphia, v. 15, n. 1, p. 7-8, abr. 2001.

LIMA, S. F.; BICALHO, M. L. S.; BICALHO, R. C. The *Bos taurus* maternal microbiome: Role in determining the progeny early-life upper respiratory tract microbiome and health. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 3, p. 1-20, dez. 2019.

LOVELL, J. E. Genital vibriosis in Iowa cattle. **Iowa State University Veterinarian**, Ames, v. 26, n. 1, 1963.

MACHADO, V. S. *et al.* Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rDNA gene. **Veterinary Microbiology**, Ames, v. 159, n. 3–4, p. 460–469, abr. 2012.

MACÍAS-RIOSECO, M. *et al.* Causes of abortion in dairy cows in Uruguay. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 5, p. 325-332, maio 2020.

MC ENTEE, K.; HUGHES, D. E.; GILMAN, H.L. Experimentally produced vibriosis in dairy heifers. **Cornell Vet**, v. 44, n. 3, p. 376–394, 1954.

MCFADYEAN J.; STOCKMAN, S. Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III. Abortion in sheep. London: HMSO, 1913.

MEDEROS, A. *et al.* Performance of bovine genital campylobacteriosis diagnostic tests in bulls from Uruguay: a Bayesian latent class model approach. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 54, n. 1, p. 1–9, 2022.

- MICHI, A. N. *et al.* A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. **Theriogenology**, New York, v. 85, n. 5, p. 781-791, mar. 2016.
- MILLER, R. B. Pathogenetic mechanisms involved in bovine abortion. **Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 1, n. 4, p. 87-95, abr. 1977.
- MIRANDA-CASOLUENGO, R. *et al.* Delayed differentiation of vaginal and uterine microbiomes in dairy cows developing postpartum endometritis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 1, p. 1–23, jan. 2019.
- MOLINA, L. L. *et al.* Time series analysis of bovine venereal diseases in la pampa, Argentina. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 8, p. 1-17, ago. 2018.
- MONKE, H. J. *et al.* Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 14, n. 1, p. 35-39, jan. 2002.
- MORENO, C. G. *et al.* Vaginal microbial communities from synchronized heifers and cows with reproductive disorders. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 121, n. 5, p. 1232–1241, jul. 2016.
- MSHELIA, G. D. *et al.* Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: Geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, n. 5, p. e221-30, out. 2010.
- NGUYEN, T. T. *et al.* The relationship between uterine, fecal, bedding, and airborne dust microbiota from dairy cows and their environment: A pilot study. **Animals**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1–12, nov. 2019.
- OIE. **Bovine genital campylobacteriosis**. Terrestrial Animal Health Code. 2019. Disponível em: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-code/>. Acesso em: 7 dez. 2020.
- ON, S. L.W.; HARRINGTON, C. S. Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16s rDNA sequencing methods. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 285-293, fev. 2001.
- ONG, C. T. *et al.* Interrogating the bovine reproductive tract metagenomes using culture-independent approaches: a systematic review. **Animal Microbiome**, London, v. 3, n. 41, jun. 2021.
- PARKER, A. M. *et al.* A review of mycoplasma diagnostics in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 32, n. 3, p. 1241-1252, mar. 2018.
- PARSONSON, I. M.; CLARK, B. L.; DUFTY, J. The Pathogenesis of Trichomonas Foetus Infection in the Bull. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 50, n. 10, p. 421-423, out. 1974.
- PELLEGRIN, A. O. *et al.* Bovine genital campylobacteriosis in Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, Paris, v. 55, n. 1, p. 169-173, 2002.

POLO, C. *et al.* Evaluation of PCR assays for *Campylobacter fetus* detection and discrimination between *C. fetus* subspecies in bovine preputial wash samples. **Theriogenology**, New York, v. 172, p. 300–306, 2021.

PENA-FERNÁNDEZ, N. *et al.* Prevalence of Bovine Genital *Campylobacteriosis*, associated risk factors and spatial distribution in Spanish beef cattle based on veterinary laboratory database records. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 8, n. 12, p. 1–10, dez. 2021.

QUEREDA, J. J. *et al.* Vaginal microbiota changes during estrous cycle in dairy heifers. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 7, n. 371, Jul. 2020.

RHYAN, J. C. *et al.* Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v. 36, n. 5, p. 406-411, 1999.

SAED, O. M.; AL-AUBAIDI, J. M. Infertility in heifers caused by pathogenic strain of *Mycoplasma bovis genitalium*. **The Cornell veterinarian**, Ithaca, v. 73, n. 2, p. 125-130, Ago. 1983.

SAHIN, O. *et al.* *Campylobacter*-Associated Diseases in Animals. **Annual Review of Animal Biosciences**, Palo Alto, v. 5, p. 21-42, nov. 2017.

SAMUELSON, J. D.; J., W. A. Bovine Vibriosis: The nature of the carrier state in the bull. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 116, n. 5, p. 581–592, dez. 1966.

SANDERSON, M. W. *et al.* Prevalence and reproductive effects of *Ureaplasma diversum* in beef replacement heifers and the relationship to blood urea nitrogen level. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 3, p. 401-408, ago. 2000.

SANHUEZA, J. M. *et al.* Pregnancy rates of beef cattle are not affected by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* real-time PCR-positive breeding sires in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 62, n. 5, p. 237-243, set. 2014.

SCHMIDT, T.; VENTER, E.H.; PICARD, J.A. Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 81, n. 2, p. 87-92, jun. 2012.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, abr. 2012.

SHELDON, I. M. *et al.* Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 1025–1032, mai. 2009.

SILVA NETO, W. A.; BACCHI, M. R. P. Growth of Brazilian beef production: Effect of shocks of supply and demand. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 209-228, abr. 2014.

SILVA NETO, W. A.; RIBEIRO, V. P. Brazilian beef exports to the main destinations: a persistence to shocks analysis. **Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal**, Lisboa, v. 43, n. 1, p. 86-94, set. 2020.

SILVA, M. F. *et al.* Assessment of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* molecular diagnosis using clinical samples of bulls. **BMC Veterinary Research**, London, v. 2020, n. 16, p. 1-9, out. 2020a.

SILVA, M. F. *et al.* *Campylobacter portucalensis* sp. nov., a new species of *Campylobacter* isolated from the preputial mucosa of bulls. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 1, p. 1-16, jan. 2020b.

SILVA, M. F. *et al.* Genomic and phenotypic characterization of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* strains. **Microorganisms**, Basel, v. 9, n. 340, p. 1-18, fev. 2021.

SILVA, G. S. *et al.* Panorama da bovinocultura no Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 42, n. 1, 2014.

SILVEIRA, C. S. *et al.* Diagnosis of bovine genital campylobacteriosis in South America. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 5, p. 1-9, dez. 2018.

SMITH, T.; TAYLOR, M. S. Some morphological and biological characters of the spirilla (*vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal, membranes in cattle. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 30, n. 4, p. 299–311, Jun. 1919.

STOECK, T. *et al.* Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 21-31, mar. 2010.

STYNEN, A. P.R. *et al.* Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha - Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 6, p. 766-769, dez. 2003.

SWARTZ, Jeffrey D. *et al.* Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of *lactobacilli* and near-neutral pH. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 1, n. OCT, p. 1–10, out. 2014.

THOMPSON, S. A.; BLASER, M. J. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections, p. 321-347. *In*: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (ed.). **Campylobacter**. 2. ed. Washington, DC: ASM Press, 2000.

TULLY, J. G. *et al.* Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod associated *Mollicutes* to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 43, n. 3, p. 630-630, abr. 1993.

VAN BERGEN, M. A. P. *et al.* Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 12, p. 5888-5898, dez. 2005.

VAN BERGEN, M. A.P. *et al.* Molecular epidemiology of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on bovine artificial insemination stations using pulsed field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, Ames, v. 112, n. 1, p. 65–71, set. 2006.

VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L. *et al.* *Campylobacter fetus* subspecies contain conserved type IV secretion systems on multiple genomic islands and plasmids. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. 1-15, abr. 2016.

VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L. *et al.* Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p. 93-97, out. 2013.

VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L. *et al.* Inconsistency of phenotypic and genomic characteristics of *campylobacter fetus* subspecies requires reevaluation of current diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 52, n. 12, p. 4183-4188, dez. 2014.

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

WAGENER, K. *et al.* Dynamics of uterine infections with *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in post-partum dairy cows and their association with clinical endometritis. **Veterinary Journal**, London, v. 202, n. 3, p. 527–532, ago. 2014.

WALDNER, C. L. *et al.* Application of direct polymerase chain reaction assays for *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Tritrichomonas foetus* to screen preputial samples from breeding bulls in cow-calf herds in western Canada. **Can J Vet Res**, Ottawa, v. 81, n. 2, p. 91-99, abr. 2017.

WANG, G. *et al.* Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 40, n. 12, p. 4744-4747, dez. 2002.

WANG, Y. *et al.* Characterization of the cervical bacterial community in dairy cows with metritis and during different physiological phases. **Theriogenology**, New York, v. 108, p. 306-313, mar. 2018.

WICKWARE, C. L.; JOHNSON, T. A.; KOZIOL, Jennifer H. Composition and diversity of the preputial microbiota in healthy bulls. **Theriogenology**, New York, v. 145, p. 231-237, nov. 2019.

YOO, H. S. Infectious causes of reproductive disorders in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 56, n. 1, p. 53–60, 2010.

ZHANG, J. *et al.* Evaluation of different 16S rDNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 618, p. 1254-1267, mar. 2018.