

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

Quantificação de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em vacinas reprodutivas bovinas

Autora: Maria Eduarda Dias

PORTO ALEGRE

2022/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA**

Quantificação de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em vacinas reprodutivas bovinas

Autora: Maria Eduarda Dias

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para a obtenção da graduação em Medicina Veterinária

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Franciele Maboni Siqueira

Coorientadora: Msc. Gabriela Merker Breyer

PORTO ALEGRE

2022/2

CIP - Catalogação na Publicação

Dias, Maria Eduarda

Quantificação de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em vacinas reprodutivas bovinas / Maria Eduarda Dias. -- 2023.

42 f.

Orientadora: Franciele Maboni Siqueira.

Coorientadora: Gabriela Merker Breyer.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Aborto bovino. 2. Campilobacteriose genital bovina. 3. Doenças reprodutivas. 4. Infertilidade bovina. I. Siqueira, Franciele Maboni, orient. II. Breyer, Gabriela Merker, coorient. III. Título.

Maria Eduarda Dias

Quantificação de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em vacinas reprodutivas bovinas

Aprovado em 05 de abril de 2023

APROVADO POR:

Prof^a. Dr^a. Franciele Maboni Siqueira
Orientadora e Presidente da comissão

Msc. Gabriela Merker Breyer
Coorientadora e Membro da comissão

Prof. Dr. André Gustavo Cabrera Dalto
Membro da comissão

Dr^a. Ângela Junges
Membro da comissão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à toda a minha família, principalmente aos meus pais, Irinês e Ademilson, que sempre me apoiaram, me incentivaram a alcançar meus objetivos e me ensinaram a nunca desistir apesar de todas as dificuldades que eu pudesse encontrar no caminho. Nada disso seria possível se eu não tivesse os melhores pais do mundo comigo, eu amo vocês mais do que eu poderia colocar em palavras. Ao meu irmão, que desde sempre cuidou de mim, aguentou eu e minhas amigas incomodando-o incontáveis vezes, inclusive durante a minha graduação e foi uma grande inspiração pra mim na vida acadêmica. Te amo, maninho!

Aos meus avós que também sempre me apoiaram, ao meu tio Celso que foi um grande amigo e que eu tenho certeza de que estaria orgulhoso de ver tudo que eu já alcancei e à minha prima Sônia que sempre foi como uma segunda mãe para mim. Aos meus afilhados, Victor, Manuela e Catarina e às minhas priminhas Sofia e Nicole, que me fazem querer ser uma pessoa melhor a cada dia. Ao meu namorado, Pedro, que tem dividido a vida comigo, comemorando nossas vitórias e me acolhendo nos dias ruins.

À Lila, minha primeira cachorrinha, que me mostrou o real significado de lealdade, fez eu descobrir o amor que eu tenho por cães e foi o motivo do meu sonho em ser Médica Veterinária. À todos os meus pets que fizeram e fazem parte da nossa família, Layla, Zora, Tokinho, Fred, Dankan, Bandique e, principalmente, à Vicky que esteve comigo desde o primeiro semestre da graduação sempre me dando apoio nos momentos difíceis com seus “lambeijos” e os seus olhinhos de “morceguinha”, como eu gosto de dizer.

Às minhas melhores amigas, Anandra, Dani, Jaque e Manu, que nunca duvidaram do meu potencial e sempre estiveram do meu lado, seja pra dar bons conselhos, pra se divertir, pra chorar ou para puxar minhas orelhas quando necessário. Vocês são incríveis! À minha dupla de pesquisa, Cami, que fez com que o dia a dia no laboratório e na sala de aula se tornassem mais leves. Às “Gatas universitárias” e todos os integrantes do “No Limits” que me acompanham desde a adolescência e sempre torceram por mim, quero que saibam que todos os nossos debates, se assim posso dizer, contribuíram para eu ser quem sou hoje.

À toda a equipe do LaBacVet pelo companheirismo, aprendizados e conversas, principalmente, à minha orientadora, Fran, que realiza o seu trabalho de forma exemplar e ainda se tornou uma grande amiga ao longo desses anos e à minha coorientadora, Gabi, que sempre teve a paciência de me auxiliar em todos os meus projetos.

Amo muito todos vocês! Obrigada por todo o apoio!

“What’s the use of doing all this work if we don't get some fun out of this?”

Rosalind Franklin

RESUMO

Bactérias da espécie *Campylobacter fetus* são responsáveis por causar perdas reprodutivas em bovinos e ovinos. As infecções por *C. fetus* em bovinos podem ser causadas por duas das três subespécies: *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff) e *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv). A vacinação é a principal forma de controle das doenças causadas por Cff e Cfv, entretanto, no Brasil, não há instruções normativas que controlem a produção e eficácia das doses vacinais. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as vacinas reprodutivas bovinas comercializadas no Brasil quanto a quantificação de DNA genômico de Cff e Cfv. Para isso, as seis vacinas comercializadas no ano de 2022 no Brasil contendo antígenos para Cfv e Cff foram incluídas no estudo. O DNA genômico total de cada vacina foi extraído e empregado em reações de PCR quantitativa (qPCR) utilizando *primers* e sondas específicos para Cff e para Cfv. O número de cópias estimado em cada dose vacinal foi calculado a partir das regressões lineares obtidas através das curvas padrão geradas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 8*. O número de cópias genômicas variou significativamente entre as vacinas testadas, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Especificamente, o número de cópias de Cfv variou de 2 a 7×10^5 , enquanto, para Cff, o número de cópias variou de 2×10^2 a 4×10^6 . Os resultados observados demonstraram que não há semelhança do número de cópias de Cfv e Cff entre as vacinas atualmente comercializadas no Brasil ($p < 0,05$). Ainda, todas apresentaram diferença no número de cópias de Cfv e Cff na mesma vacina ($p < 0,05$). Com isso, estudos de eficácia, que definam a quantidade mínima de antígeno por dose, são necessários com o intuito de garantir além da eficácia das vacinas, as dosagens corretas, e, assim, reduzir o número de casos perdas reprodutivas por *C. fetus* nos rebanhos bovinos.

Palavras-chave: Aborto bovino. Campilobacteriose genital bovina. Doenças reprodutivas. Infertilidade bovina.

ABSTRACT

Bacteria of the species Campylobacter fetus are responsible for causing reproductive losses in cattle and sheep. C. fetus infections in cattle can be caused by two of the three subspecies: C. fetus subsp. fetus (Cff) and C. fetus subsp. venerealis (Cfv). Vaccination is considered the main method of controlling diseases caused by Cff and Cfv, however, in Brazil, there are no normative instructions that control the production and effectiveness of vaccine doses. In view of this, the objective of this work was to evaluate the bovine reproductive vaccines commercially available in Brazil regarding the quantification of genomic DNA of Cff and Cfv. For this, the six vaccines marketed in 2022 in Brazil containing Cfv and Cff antigens were included in the study. The total genomic DNA of each vaccine was extracted and used in quantitative PCR reactions (qPCR) using specific primers and probes for Cff and Cfv. The estimated number of copies in each vaccine dose was calculated from the linear regressions obtained through the generated standard curves. Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism 8 software. The number of genomic copies varied significantly among the tested vaccines, according to the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Specifically, the copy number for Cfv ranged from 2 to 7×10^5 , while for Cff, the copy number ranged from 2×10^2 to 4×10^6 . The observed results demonstrated that there is no similarity in the number of copies of Cfv and Cff among the commercially available vaccines in Brazil ($p < 0.05$). In addition, they all showed a difference in the number of copies of Cfv and Cff in the same vaccine ($p < 0.05$). Thus, efficacy studies, which define the minimum amount of antigen per dose, are necessary to guarantee in addition to the effectiveness of the vaccines, the correct dosages, and thus reduce the number of cases of productive losses due to C. fetus in cattle herds.

Key-words: *Bovine abortion. Bovine genital campylobacteriosis. Reproductive diseases. bovine infertility.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Coloração de Gram de <i>Campylobacter sputorum</i> cultivado em meio tioglicolato.....	13
Figura 2 –	Camada S (<i>surface layer</i>) de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> biovar <i>intermedius</i> 06-341.....	15
Figura 3 –	Vacinas nomeadas de A à F para realização do experimento às cegas.....	24
Figura 4 –	Alíquotas das vacinas e precipitado após centrifugação.....	25
Figura 5 –	Alinhamento dos genomas completos <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> no software <i>Artemis Comparison Tool</i> (ACT).....	29
Figura 6 –	Curvas padrões para estimativa de número de cópias das subespécies de <i>Campylobacter fetus</i>	31
Figura 7 –	Curvas de amplificação para <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> nas vacinas analisadas.....	32
Figura 8 –	Número estimado de cópias do genoma de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> por dose vacinal nas vacinas analisadas.....	33
Figura 9 –	Comparação entre o número estimado de cópias genômicas de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> na mesma vacina.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de <i>Campylobacter</i> de importância veterinária.....	14
Tabela 2 – Descrição das vacinas reprodutivas para bovinos incluídas no estudo.....	24
Tabela 3 – <i>Primers</i> e sondas de qPCR para quantificação de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Perdas reprodutivas na bovinocultura	12
2.2	Gênero <i>Campylobacter</i>	12
2.2.1	<i>Campylobacter fetus</i>	15
2.2.1.1	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	16
2.2.1.2	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	17
2.2.2	Diagnóstico de <i>C. fetus</i> em bovinos.....	19
2.2.3	Tratamento e controle de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> em bovinos	20
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	Vacinas reprodutivas bovinas empregadas no experimento	24
4.2	Extração do DNA genômico total	25
4.3	Quantificação de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> nas vacinas selecionadas	25
4.3.1	Desenvolvimento de <i>primers</i> e sonda para PCR quantitativa de <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	25
4.3.2	Quantificação por qPCR de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	26
4.3.3	Avaliação da especificidade <i>in vitro</i> dos <i>primers</i> utilizados no estudo.....	27
4.3.4	Análises estatísticas.....	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Desenvolvimento dos <i>primers</i> e sonda para qPCR de <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	29
5.2	Análises de especificidade dos <i>primers</i> para detecção de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	30
5.3	Quantificação estimada de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> e <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> em vacinas reprodutivas bovinas	30
6	DISCUSSÃO	35
7	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) estima que o rebanho mundial de bovinos atualmente se aproxima de um bilhão de cabeças de gado (USDA, 2023). No Brasil, em torno de 224 milhões de cabeças de gado compõem o rebanho do país, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), se destacando na produção mundial de bovinos de corte e leite (MALAFAIA *et al.*, 2021). Atualmente, o Brasil é o quinto maior produtor de leite (FAO, 2022) e o último levantamento indica-o como maior exportador de carne bovina do mundo, exportando aproximadamente um quinto de sua produção, resultando em um comércio de mais de US\$ 5,4 bilhões/ano (ZU ERMGASSEN *et al.*, 2020).

Para garantir a produtividade e a lucratividade na bovinocultura, excelência na eficiência reprodutiva é fundamental (BERRY; WALL; PRYCE, 2014). A avaliação da eficiência reprodutiva se dá pela análise de um conjunto de variáveis, como idade à puberdade, idade ao primeiro parto, gestação, o intervalo de partos, taxas de aborto, de concepção e de serviços (BERGAMASCHI; MACHADO; TAVEIRA BARBOSA, 2010). No entanto, na maioria dos rebanhos brasileiros, a eficiência reprodutiva é baixa (BARBOSA *et al.*, 2006). As perdas reprodutivas comprometem a eficiência reprodutiva, impactando economicamente o sistema de produção (BERGAMASCHI; MACHADO; TAVEIRA BARBOSA, 2010) e os níveis de produtividade do rebanho (RADOSTITS, 2001).

Dentre as causas de perdas reprodutivas em bovinos estão causas não infecciosas e infecciosas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Dentre as causas infecciosas estão *Campylobacter fetus*, *Leptospira* spp., *Haemophilus* spp., *Brucella*, herpesvírus bovino-1 (IBR), vírus da diarreia viral bovina (BVD), *Tritrichomonas foetus* e *Neospora caninum* (GIVENS, 2006). As infecções por *C. fetus* em bovinos podem ser causadas por duas subespécies: *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff), *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv). O Cff está associado a casos esporádicos de aborto bovino, enquanto Cfv está associado principalmente a problemas de fertilidade (WOAH, 2021).

As medidas de controle de *C. fetus* em bovinos incluem testes diagnósticos, relatórios de monitoramento do rebanho, tratamento ou eliminação dos animais infectados (MICHII *et al.*, 2016), além da vacinação de todos os touros, vacas e novilhas (GARD, 2016). Apesar da vacinação ser considerada a principal forma disponível de controle para Cff e Cfv, ela não é compulsória e não há instruções normativas que incluem a titulação dos agentes em cada dose vacinal. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar vacinas reprodutivas bovinas comercializadas no Brasil quanto a quantificação de Cff e Cfv, a fim de comparar as doses vacinais encontradas nas vacinas analisadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Perdas reprodutivas na bovinocultura

A gestação de bovinos inicia-se após a fecundação e pode variar de 280 a 296 dias (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2022) de acordo com a raça, sexo ou aporte nutricional (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007). A gestação se divide em: i) fase embrionária inicial, compreendendo o período após fecundação até o 21º dia; ii) fase embrionária tardia, do 22º ao 42º dia; e iii) fase fetal, 42º dia até o parto (BALL; PETERS, 2004).

A mortalidade gestacional, tanto embrionária como fetal, é uma das maiores causas de falhas reprodutivas (BERGAMASCHI; MACHADO; TAVEIRA BARBOSA, 2010). A maior parte das perdas gestacionais ocorre na fase embrionária, principalmente até o 30º dia (REESE *et al.*, 2020). Estudos relatam que a taxa de perda embrionária nos primeiros 8 dias após a fecundação é baixa, mas que há um aumento significativo de mortes embrionárias no período de 8 a 16 dias após a fecundação (SREENAN; DISKIN; MORRIS, 2001). Muitas mortes embrionárias não são diagnosticadas já que, nesses casos, não há presença de sinais clínicos indicativos e as fêmeas retornam ao cio regularmente, sendo consideradas como não prenhes ao exame diagnóstico (PARKINSON; VERMUNT; MALMO, 2019).

As causas de infertilidade, mortalidade embrionária e fetal são amplas, incluindo fatores ambientais, nutricionais, maternos, genéticos e infecciosos (GIVENS, 2006; VIEIRA, 2014; REESE *et al.*, 2020). Agentes infecciosos são capazes de reduzir as taxas de ovulação, fertilização, sobrevivência embrionária, fetal ou perinatal, resultando em uma má eficiência reprodutiva e consequente perda econômica. Entre os principais agentes infecciosos envolvidos em perdas reprodutivas estão *Campylobacter*, *Leptospira*, *Haemophilus*, *Brucella*, Herpesvírus Bovino-1 (IBR), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVD), *Tritrichomonas foetus* e *Neospora caninum* (GIVENS, 2006). Os agentes podem estar presentes e infectar o trato reprodutivo de fêmeas e machos, levando a consequências tanto para a vaca quanto para o embrião (DE CARLI *et al.*, 2021).

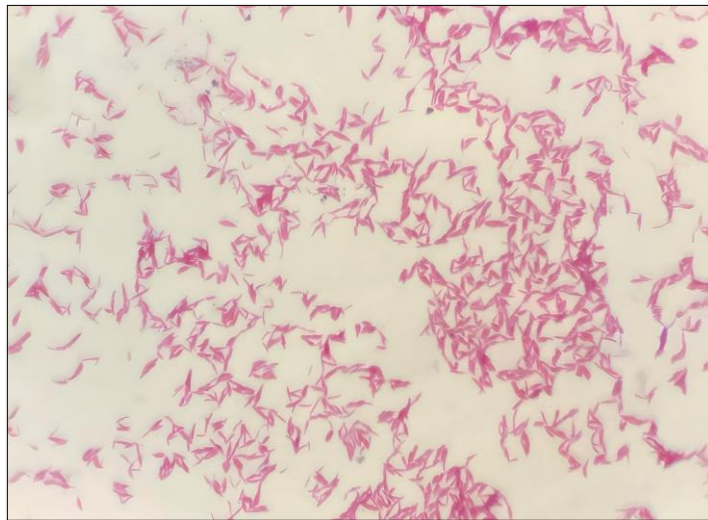
2.2 Gênero *Campylobacter*

A primeira infecção causada por *Campylobacter* foi identificada em 1913 por McFadyean, Stockman e Britain ao identificarem bacilos curvos causando aborto em ovinos e bovinos (MCFADYEAN; STOCKMAN; BRITAIN, 1913), mas apenas em 1919 a espécie foi nomeada de *Vibrio fetus* após ser isolada por Smith e Taylor de fluidos fetais abortados de bovinos (SMITH; TAYLOR, 1919). Três décadas depois, em 1963, esta espécie foi, de fato,

associada a baixa eficiência reprodutiva em bovinos. A nomenclatura se manteve até 1973, quando Véron e Chatelain propuseram o gênero *Campylobacter*, reclassificando *Vibrio fetus* como *Campylobacter fetus* (VERON; CHATELAIN, 1973).

As espécies pertencentes ao gênero *Campylobacter* são pequenos bacilos curvos Gram-negativos (Figura 1), geralmente apresentam extremidades pontiagudas e cápsula, não sendo capazes de formar esporos (SMIBERT, 1978; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013). Sua motilidade se dá por meio de um flagelo polar, podendo estar presente em ambas as extremidades (SMIBERT, 1978; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013). São bactérias microaerófilas, necessitando uma atmosfera que apresente de 3 a 10% de oxigênio e de 3 a 15% de dióxido de carbono. Possuem temperatura ótima de crescimento de 37 °C, apesar de algumas serem termotolerantes e crescerem em temperaturas superiores (SMIBERT, 1978; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013).

Figura 1 – Coloração de Gram de *Campylobacter sputorum* cultivado em meio tioglicolato



Fonte: Próprio autor (2021)

Atualmente, o gênero *Campylobacter* abrange um total de 33 espécies descritas e nove subespécies (COSTA; IRAOLA, 2019; WOA, 2021), sendo algumas consideradas comensais do trato gastrointestinal de humanos e outros animais, enquanto outras são causadoras de infecções genitais e gastrointestinal (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013). As infecções por algumas espécies de *Campylobacter* spp. são consideradas zoonoses de distribuição mundial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), no entanto, a relevância das bactérias desse gênero em humanos só foi descoberta em 1980, após o desenvolvimento de meios de

cultivo seletivos para o isolamento de *Campylobacter* de amostras fecais (COSTA; IRAOLA, 2019).

Na atualidade, a espécie mais relevante do gênero *Campylobacter* para humanos é *C. jejuni*, um dos principais agentes envolvidos em gastroenterites bacterianas (COSTA; IRAOLA, 2019). Em humanos, a transmissão se dá pela ingestão de alimentos e água contaminada, porém é incomum quando comparada a outras causas de gastroenterites bacterianas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013). Além disso, desde 2017, *Campylobacter* spp. foram incluídas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na lista de bactérias para as quais novos antibióticos são urgentemente necessários (OMS, 2017).

Atualmente, há 10 espécies de *Campylobacter* que apresentam reconhecidamente importância na medicina veterinária (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécies de *Campylobacter* de importância veterinária

Espécie	Hospedeiro(s)	Enfermidade em animais*	Enfermidade em humanos*
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	Ovinos, caprinos, bovinos	Aborto	Bacteremia, diarreia
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	Bovinos	Infertilidade, aborto	Nenhum relato
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>Jejuni</i>	Aves, ruminantes, cães, gatos, seres humanos	Aborto, diarreia, assintomático	Diarreia, bacteremia
<i>C. coli</i>	Suínos, aves, ovinos	Assintomático, aborto	Diarreia, bacteremia
<i>C. upsaliensis</i>	Cães, gatos, aves	Assintomático, diarreia	Diarreia, bacteremia
<i>C. lari</i>	Aves selvagens, cães	Nenhum relato	Diarreia, bacteremia
<i>C. hyointestinalis</i>	Bovinos, suínos, ovinos, aves, animais de companhia, pássaros	Nenhum relato	Diarreia
<i>C. helveticus</i>	Gatos, cães	Assintomático, diarreia	Nenhum relato
<i>C. sputorum</i>	Bovinos, ovinos	Nenhum relato	Diarreia
<i>C. mucosalis</i>	Suínos	Nenhum relato	Nenhum relato

*A primeira entrada é a mais comum

Fonte: adaptado de MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013 de p.172

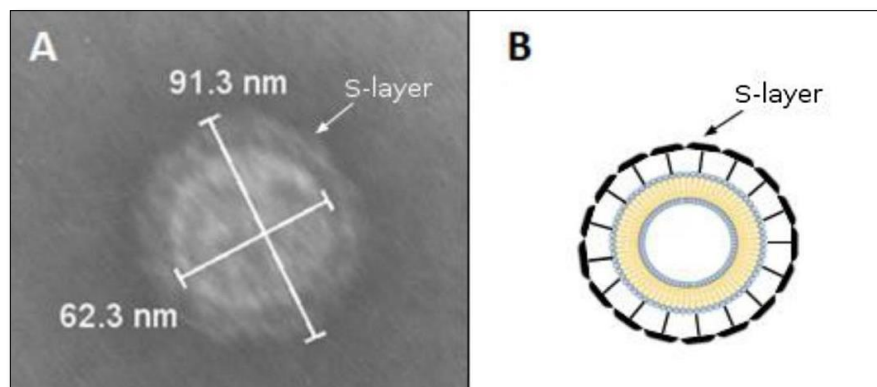
2.2.1 *Campylobacter fetus*

Campylobacter fetus é um patógeno historicamente reconhecido por causar problemas reprodutivos na pecuária, acometendo bovinos e ovinos. É uma espécie que se apresenta altamente adaptada à mucosa do trato intestinal e/ou urogenital de seus hospedeiros (SPRENGER; ZECHNER; GORKIEWICZ, 2012).

Atualmente, *C. fetus* apresenta três subespécies, *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff), *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) e *C. fetus* subsp. *testudinum*, sendo primariamente associadas à ovinos, bovinos e répteis, respectivamente (COSTA; IRAOLA, 2019). Apesar de exibirem preferências de nichos e hospedeiros notavelmente diferentes, Cff e Cfv apresentam alta similaridade genética e ambos são relacionados a problemas reprodutivos em ruminantes (PENNER, 1988; SKIRROW, 1994; SPRENGER; ZECHNER; GORKIEWICZ, 2012; BREYER *et al.*, 2021).

A maioria das cepas de *C. fetus* possui uma estrutura bidimensional, externa à parede celular, denominada camada S (*surface layer*) (Figura 2), que é um dos primeiros componentes bacterianos a interagir com o hospedeiro, possuindo diversas funções como adesão celular, além de propriedades antigênicas, receptores para fagos, entre outros (FARACE *et al.*, 2022). A camada S se caracteriza por uma cápsula proteica responsável por resistir à fagocitose e aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro, sendo capaz de variar a expressão das proteínas nela presentes com o objetivo de evitar a ação do sistema imune, atuando como um importante fator de virulência e persistência (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013; FARACE *et al.*, 2022).

Figura 2 – Camada S (*surface layer*) de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius* 06-341



(A) Morfometria de uma vesícula da membrana externa isolada de *C. fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius* 06-341. A seta mostra a camada S observada como a superfície mais externa. (B) Representação esquemática de uma vesícula da membrana externa cercada pela camada S.

Fonte: FARACE *et al.* (2022)

Além disso, bactérias da espécie *C. fetus* são capazes de produzir a única toxina comprovadamente produzida por bactérias do gênero *Campylobacter*, a toxina expansora citoletal (CDT). Esta toxina possui atividade desoxirribonuclease e determina o bloqueio do ciclo celular na fase G2 e fragmentação do núcleo resultando em morte celular. Contudo, sua contribuição na ocorrência de doença ainda não foi completamente estabelecida (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013; FACCIOLÀ *et al.*, 2017).

Embora Cfv e Cff possuam alta similaridade genética, as subespécies podem apresentar diferentes fatores de virulência. Em um estudo comparando 67 genomas de Cfv e 45 genomas de Cff, uma ilha genômica abrigando genes que codificam para o sistema de secreção tipo IV (T4SS) e mobilidade celular foi identificada em 76% dos genomas de Cfv analisados, porém ausente em genomas de Cff analisados (ALI *et al.*, 2012). O T4SS é considerado um sistema exclusivo de Cfv, sendo atribuído a capacidade de adaptação desta subespécie ao trato genital de bovinos (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013). Em detalhe, o T4SS está envolvido na transferência de plasmídeos, podendo disseminar horizontalmente genes de resistência (ESCHER *et al.*, 2016) e virulência (ALI *et al.*, 2012). Inclusive, já foi demonstrado que mutações nos genes T4SS reduzem a virulência de Cfv (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013).

A formação de biofilme fornece proteção contra fármacos e condições ambientais prejudiciais e tem sido sugerida como um meio pelo qual *Campylobacter* é capaz de persistir em um ambiente inóspito (GUNTHERIV; CHEN, 2009). Relatos de formação de biofilme por Cff ainda são raros, mas existem (LYNCH *et al.*, 2019), enquanto nenhum caso de formação de biofilme por Cfv foi descrito na literatura até então, podendo indicar se tratar de um fator de virulência diferencial entre as subespécies. Ademais, um isolado de Cff proveniente de um caso de endocardite infecciosa da prótese valvular foi capaz de formar biofilmes mais fortes do que *C. jejuni* NCTC 11168, cepa controle que foi previamente relatada como sendo um forte produtor de biofilme (LYNCH *et al.*, 2019).

2.2.1.1 *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*

O habitat natural de *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff) compreende o trato gastrointestinal e a vesícula biliar de ovinos e bovinos infectados, onde é considerado um comensal; porém, também já foi isolado em suínos, aves e répteis (SPRENGER; ZECHNER; GORKIEWICZ, 2012). Esta subespécie é considerada um patógeno emergente e agente etiológico de doenças extraintestinais, sendo responsável por doenças sistêmicas graves com taxas de mortalidade de até 14% (ESCHER *et al.*, 2016).

A infecção por este agente, em humanos e animais, ocorre através da ingestão de alimento ou água contaminada ou por meio da exposição a fluidos fetais e membranas de fetos abortados (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013). Normalmente, humanos acometidos por Cff relatam ter o costume de consumir leite cru, carne crua ou fígado bovino ou carne suína mal cozida (SPRENGER; ZECHNER; GORKIEWICZ, 2012).

Essa subespécie já foi isolada de múltiplos tipos de amostras de humanos, como sangue, fluido de abscesso, medula óssea, líquido cefalorraquidiano, próteses articulares ou cateteres implantados e biópsias (FARACE *et al.*, 2022). As infecções geralmente ocorrem em gestantes ou indivíduos imunocomprometidos (WOAH 2021). Estas bactérias apresentam predileção pelo endotélio vascular humano e a maioria dos relatos inclui infecção da corrente sanguínea e disseminação hematogênica (ESCHER *et al.*, 2016). Ainda, Cff já foi isolada de fezes de humanos com diferentes condições clínicas, como febre, colite, celulite, osteoartrite, trombose venosa, erisipela, meningite, peritonite, letargia, endocardite, fotofobia e problemas gastrointestinais (SPRENGER; ZECHNER; GORKIEWICZ, 2012; FARACE *et al.*, 2022). Abortos humanos resultantes de infecção por Cff são raros, mas também já foram relatados (SPRENGER; ZECHNER; GORKIEWICZ, 2012).

Nos animais, esta subespécie pode migrar para o trato genital através da via hematogênica, colonizando o trato reprodutivo e causando abortos em ovinos e esporadicamente em bovinos (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013). A subespécie Cff já foi identificada em fezes de gado de corte, ovinos, suínos, macacos e equinos (ESCHER *et al.*, 2016). Em ovinos, após a ingestão do patógeno, Cff alcança a corrente sanguínea, instalando-se na placenta de animais prenhes, o que leva a placentite, infecção fetal e aborto, que costuma ocorrer de 3 a 4 semanas após a infecção (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013).

Surtos de aborto por Cff em ovinos são frequentes e na maioria dos casos, a lesão macroscópica consiste apenas em placentite, que não é patognomônica da infecção por *Campylobacter*, mas é um indicativo de infecção bacteriana imune. Em vacas prenhes que são infectadas por Cff, ocorre aborto como casos isolados e esporádicos, indicando sua relevância também na clínica de bovinos (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013; WOAH, 2021).

2.2.1.2 *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

A subespécie Cfv, agente causador da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB), é a de maior importância na veterinária, quando comparando as subespécies de *C. fetus*, e por isso existem normas no comércio nacional e internacional que visam prevenir a transmissão da CGB por trânsito de animais e sêmen (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013; WOAH, 2021).

A CGB é uma doença venérea de ocorrência mundial e sua transmissão ocorre predominantemente durante a monta natural, mas a transmissão por meio de inseminação artificial com equipamento e/ou sêmen contaminado também é possível (WOAH, 2021). A prevalência de CGB é variável. Na Espanha, Cfv está presente em 12,2% dos rebanhos; enquanto, na Argentina, já foi relatada prevalência de Cfv em 32% dos rebanhos. No Brasil, os estudos atualmente publicados são com amostras de conveniência, e por isso, não é possível prever a real prevalência da doença.

O principal reservatório e habitat de Cfv são as criptas prepuciais de touros infectados, podendo ser isolado a partir do esmegma prepucial, muco vaginal ou órgãos internos de fetos abortados (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013; WOA, 2021). Os machos são portadores assintomáticos, sendo os principais responsáveis pela propagação da bactéria nos rebanhos (MICHI *et al.*, 2016), mas estudos já evidenciaram que as subespécies Cfv e Cff têm efeitos prejudiciais na qualidade do sêmen bovino *in vitro* (CAGNOLI *et al.*, 2020). Além disso, vacas que são infectadas podem se tornar portadoras persistentes de Cfv no canal vaginal transmitindo a infecção por um período que varia de 6 a 24 meses (CIPOLLA *et al.*, 1994) e são consideradas reservatórios deste patógeno (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013).

Os touros normalmente se infectam a partir da monta natural com as fêmeas infectadas, contudo, pode ocorrer contágio entre touros confinados onde há o comportamento de montaria. Touros mais jovens podem apresentar uma infecção transitória (GARD, 2016; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013), enquanto touros acima de 5 anos apresentam maior probabilidade de serem portadores permanentes de Cfv (HOFFER, 1981). Isso se deve, provavelmente, ao aumento do número e profundidade de criptas do epitélio escamoso estratificado não queratinizado da glândula do pênis e prepúcio proximal, além da maior chance de exposição ao agente etiológico devido ao maior número de montas realizadas (HOFFER, 1981; BONDURANT 2005; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013).

As vacas se infectam após a monta natural com um macho infectado ou pelo sêmen contaminado, sendo que os locais de colonização bacteriana incluem o lúmen vaginal, cérvix, útero e oviduto (BONDURANT, 2005). Após a infecção, em fêmeas bovinas, Cfv se multiplica no canal vaginal, mas não transpassa o útero antes do final do estro, não interferindo na fertilização, presumivelmente devido à alta concentração de neutrófilos no útero durante esta fase do ciclo estral (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013).

No entanto, após a fecundação, a bactéria alojada é capaz de desenvolver vaginite, cervicite, endometrite e salpingite, originando um ambiente inapropriado para a sobrevivência e implantação do embrião, que resulta em morte embrionária e fetal e infertilidade

(BONDURANT, 2005; JULIE GARD, 2016). Geralmente, o retorno ao cio ocorre após um período superior a 25 dias, sendo que o tempo normal do ciclo é de 21 dias (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013). Vacas ou novilhas infectadas desenvolvem uma resposta imune na mucosa aproximadamente de três a cinco meses após o início da infecção, sendo capazes de eliminar a infecção, recuperando a fertilidade (BONDURANT, 2005; JULIE GARD, 2016).

Embora o uso de inseminação artificial tenha possibilitado à reprodução bovina uma redução no risco de transmissão de patógenos venéreos, estes ainda são comuns em rebanhos onde se pratica a monta natural (BONDURANT, 2005). No Brasil, por exemplo, apenas 12% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas, sendo que nos 88% restantes é utilizado o método de monta natural (BARUSELLI *et al.*, 2018).

2.2.2 Diagnóstico de *C. fetus* em bovinos

Em machos, o esmegma para o diagnóstico de CGB pode ser obtido por raspagem, aspiração e lavagem (WOAH, 2021). Para as fêmeas, é coletado o muco cérvico vaginal por meio de aspiração, lavagem ou raspagem da cavidade vaginal. Fluido abomasal, pulmão e fígado de feto abortado também são utilizados tanto para o diagnóstico de infecções por Cfv quanto para o diagnóstico de Cff (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013; WOAH, 2021).

Para cultivo bacteriológico as amostras não devem ser congeladas, apenas refrigeradas; e, caso o tempo de transporte até o laboratório seja superior a 8 h, as amostras devem ser acondicionadas em meio de transporte gerador de microaerofilia, como o meio Clark ou Landers, ou em caldo de tioglicolato (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013). Além disso, é importante ressaltar que, para o diagnóstico de CGB, amostras coletadas de machos têm maior probabilidade de serem positivas do que amostras coletadas de fêmeas (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013).

A diferenciação das subespécies de *C. fetus* é realizada pela caracterização fenotípica através do teste de tolerância à glicina a 1% e produção de H₂S em meio rico em cisteína. Em vista da sua tolerância a glicina 1%, Cff é capaz de crescer em sua presença, e apresenta produção de H₂S, enquanto Cfv não (WOAH, 2021). Além disso, espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*) e testes de imunofluorescência direta podem ser utilizados para identificar *C. fetus*, entretanto, não são capazes de diferenciar as subespécies Cfv e Cff (BESSÈDE *et al.*, 2011; WOAH, 2021). Entretanto, o cultivo microbiológico de *Campylobacter* spp. apresenta grandes dificuldades,

visto o seu crescimento fastidioso. Assim, o diagnóstico microbiológico convencional vem caindo em desuso.

Com isso, métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos e empregados no diagnóstico e diferenciação das subespécies de *C. fetus*, tais como: a reação em cadeia da polimerase (PCR), o *Multilocus sequence typing* (MLST), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) e o *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) (WOAH, 2021). Além disso, o sequenciamento de genoma completo (WGS) de *C. fetus* é uma técnica altamente confiável para a diferenciação de cepas e subespécies (VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS *et al.*, 2014), entretanto, ainda é um método de custo elevado que, atualmente, não é amplamente utilizado na rotina de laboratórios de diagnóstico (WOAH, 2021), além é claro de depender do cultivo bacteriano prévio. Sendo assim, a WOAHA esclarece que os laboratórios de diagnóstico seriam mais bem atendidos por ensaios de PCR (WOAH, 2021) diretos do material clínico ou das bactérias pós-cultivo.

O diagnóstico molecular direto de espécimes clínicas é hoje o método mais empregado em diversos países (DE CARLI *et al.*, 2020; BREYER *et al.*, 2021; DELPIAZZO *et al.*, 2021; DE CARLI *et al.*, 2021; POLO *et al.*, 2021). Por outro lado, testes de imunofluorescência direta também são empregados especialmente na Argentina e Uruguai. Porém este método não diferencia as subespécies de *C. fetus*, e ainda requer a aquisição de anticorpos, os quais no Brasil, por exemplo estão indisponíveis.

2.2.3 Tratamento e controle de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* em bovinos

Tratamentos empregando antibióticos para Cfv têm um alto custo, mas podem ser empregados em animais de alto valor agregado. Os touros podem ser tratados pela administração de um a dois tratamentos de estreptomicina administrados por via subcutânea na dose de 20 mg/kg juntamente com a administração de uma suspensão tópica no prepúcio e pênis contendo 5 g de estreptomicina por três dias consecutivos, apesar de cepas resistentes já terem sido relatadas, sugerindo uma eficácia limitada (GARD, 2016; MICHI *et al.*, 2016). O tratamento de novilhas e vacas infectadas não é recomendado, visto que não é capaz de eliminar o micro-organismo do canal vaginal e do colo do útero (MSHELIA, 2007), e a maioria das fêmeas desenvolve imunidade protetora, permitindo-lhes resistir à reinfecção (TRUYERS *et al.*, 2014). A vacinação contra Cff em surtos de abortos tem se mostrado eficaz na redução das taxas de abortos, além disso, se aplicada antes do acasalamento, pode auxiliar a evitar a doença (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013).

Outra ferramenta de controle de Cfv é o emprego de inseminação artificial com sêmen de touros não infectados (GARD, 2016), entretanto, a monta natural ainda é amplamente

utilizada, sendo empregada em cerca de 80% a 95% do gado de corte comercial na América do Norte (BONDURANT, 2005). Como mencionado anteriormente, apenas 12% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas no Brasil (BARUSELLI *et al.*, 2018).

Na ausência de opções efetivas de tratamento, as infecções por *C. fetus* em bovinos são controladas por testes diagnósticos, relatórios para monitoramento do rebanho, isolamento e eliminação de animais infectados (MICHI *et al.*, 2016). Além disso, as medidas de controle incluem a vacinação de todos os touros, vacas e novilhas. Em rebanhos não infectados por Cfv, os touros devem ser vacinados inicialmente com pelo menos duas doses administradas de três a quatro semanas de intervalo, com a última dose aproximadamente 30 dias antes do início da estação de monta (GARD, 2016).

A imunização inicial das fêmeas requer duas doses, com a segunda ocorrendo pouco antes da exposição aos touros. Isto permite maximizar os níveis de anticorpos quando a exposição é mais provável. Reforços anuais devem ser realizados, sendo administrados não mais do que três semanas antes da exposição a touros (BONDURANT, 2005). Entretanto, a WOAHA relata que não está atualmente em posição de recomendar um padrão internacional para tais produtos, visto que não há estudos suficientes para afirmar a eficácia das vacinas (WOAH, 2021).

As vacinas reprodutivas, utilizadas na imunização de bovinos contra Cfv e Cff, conferem imunidade para outros patógenos que causam perdas reprodutivas nos bovinos além de Cfv e Cff. Estas vacinas incluem antígenos inativados de BVD, IBR, *Haemophilus somnus*, e *Leptospira* spp. Algumas cepas dos antígenos incluídos e adjuvante utilizado em cada vacina variam conforme o fabricante, mas o objetivo é o mesmo: a diminuição de perdas reprodutivas. A indicação de aplicação das vacinas reprodutivas costuma ser de duas doses com intervalo de duas a quatro semanas aplicados com reforço anual, sendo que para *C. fetus* é indicado que a vacinação seja realizada próximo à estação de monta (GASPAR; MINHO; DOS SANTOS, 2015)

No Brasil, há leis que regulamentam a produção e fiscalização de produtos de uso veterinário, incluindo a produção de vacinas. Ainda, há instruções normativas que aprovam os regulamentos técnicos para produção, controle e emprego de vacinas contra agentes específicos, como por exemplo contra o agente da febre aftosa (BRASIL, 2012). Ademais, a WOAHA também possui recomendações de produção de vacinas que, em alguns casos, inclui instruções de como determinar a titulação adequada a ser utilizada em cada dose vacinal (WOAH, 2021). Entretanto, não há recomendações específicas para a produção de vacinas contra *C. fetus*.

Em touros a infecção por Cfv é limitada à mucosa da glândula peniana, prepúcio e porção distal da uretra, não havendo um caráter invasivo. Portanto, nestes casos, não há uma intensa indução de produção de anticorpos (MICHII *et al.*, 2016) e, com isso, a resposta imune estimulada pela infecção natural não é efetiva (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013).

Há divergências sobre o uso de vacinas para *C. fetus* e a eficácia delas, especialmente em touros, contudo a vacinação para *C. fetus* foi considerada benéfica por alguns estudos (BONDURANT, 2005; TRUYERS *et al.*, 2014; GARD, 2016). A vacinação é capaz de estimular a produção de anticorpos IgG específicos no soro e na secreção mucosa, podendo reduzir a duração de infecção em machos e fêmeas (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2013; GARD, 2016). Ainda que o impacto econômico provocado de *C. fetus* na bovinocultura seja relevante, no Brasil, a vacinação para Cfv e Cff não é obrigatória (GASPAR; MINHO; DOS SANTOS, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o número de cópias genômicas de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* presentes nas doses vacinais de vacinas reprodutivas bovinas comercializadas no Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar o método de extração de DNA genômico total de vacinas reprodutivas bovinas;
- Desenvolver *primers* e sonda para PCR quantitativa de *C. fetus* subsp. *fetus*;
- Avaliar a especificidade dos *primers* e sondas utilizados no estudo;
- Estimar e comparar o número de cópias de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* em cada dose vacinal.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitam concluir que há ampla variação do número estimado de cópias de *C. fetus*, considerando Cfv e Cff, entre as vacinas atualmente comercializadas no Brasil. Também foi possível observar variação significativa no número estimado de cópias de Cfv e de Cff em uma mesma vacina, mesmo quando a bula indicava ter a mesma concentração para os dois antígenos, sugerindo que pode estar havendo falhas no controle da carga bacteriana adicionadas à estas vacinas. Portanto, mais estudos de eficácia, especialmente *in vivo*, se fazem necessários para a definição da quantidade mínima de antígeno por dose vacinal, visando diminuir mais efetivamente as perdas econômicas em rebanhos bovinos por *C. fetus*.

REFERÊNCIAS

- ALI, A. *et al.* *Campylobacter fetus* subspecies: Comparative genomics and prediction of potential virulence targets. **Gene**, [S.l.], v. 508, n. 2, p. 145–156, out. 2012.
- BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reproduction in Cattle**. 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2004. 242 p.
- BARBOSA, R. T. *et al.* **A redução da mortalidade embrionária - estratégia hormonal para otimizar a função luteínica em bovinos Introdução**. São Carlos, SP: Embrapa, 2006. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37273/1/Circular51.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2023.
- BARUSELLI, P. S. *et al.* Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **animal**, [S.l.], v. 12, n. s1, p. s45–s52, 1 jun. 2018.
- BERGAMASCHI, M. A. C. M.; MACHADO, R.; TAVEIRA BARBOSA, R. **Eficiência reprodutiva das vacas leiteiras**. São Carlos, SP: Embrapa, 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/880245/1/Circular642.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2023.
- BERRY, D. P.; WALL, E.; PRYCE, J. E. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. **Animal**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 105–121, abr. 2014.
- BESSÈDE, E. *et al.* Identification of *Campylobacter species* and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.l.], v. 17, n. 11, p. 1735–1739, nov. 2011.
- BONDURANT, R. H. Venereal Diseases of Cattle: Natural History, Diagnosis, and the Role of Vaccines in their Control. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, [S.l.], v. 21, n. 2, p. 383–408, jul. 2005.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2012. 401 p.
- BREYER, G. M. *et al.* *Campylobacter fetus* in Abomasal Fluid from Spontaneously Aborted Bovine and Ovine Fetuses. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v. 49, n. 1834, jan. 2021.
- CAGNOLI, C. I. *et al.* Effects of *Campylobacter fetus* on bull sperm quality. **Microbial Pathogenesis**, [S.l.], v. 149, p. 104486, dez. 2020.
- CANTÓN, G. J. *et al.* Spatial–temporal trends and economic losses associated with bovine abortifacients in central Argentina. **Tropical Animal Health and Production**, [S.l.], v. 54, n. 4, 30 jul. 2022.
- CARVER, T. J. *et al.* ACT: the Artemis comparison tool. **Bioinformatics**, [S.l.], v. 21, n. 16, p. 3422–3423, 23 jun. 2005.

CIPOLLA, A. *et al.* Persistence of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in experimentally infected heifers. **Veterinary Record**, [S.l.], v. 134, n. 24, p. 628–628, 11 jun. 1994.

COSTA, D.; IRAOLA, G. Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species. **Clinical microbiology reviews**, [S.l.], v. 32, n. 4, p. e00072-18, set. 2019.

DE 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**, [S.l.], v. 179, p. 106101, dez. 2020.

DE CARLI, S. *et al.* Survey of beef bulls in Brazil to assess their role as source of infectious agents related to cow infertility. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S.l.], v. 34, n. 1, p. 54–60, 7 out. 2021.

DELPIAZZO, R. *et al.* Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a 16S rRNA gene sequence. **Veterinary and Animal Science**, [S.l.], v. 11, [S.l.], p. 100163, mar. 2021.

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**, [S.l.], v. 16, n. 1, 14 maio 2016.

FACCIOLÀ, A. *et al.* *Campylobacter*: from microbiology to prevention. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, [S.l.], v. 58, p. E79–E92, jun. 2017.

FAO. **Emerging trends and outlook 2022**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cc3418en/cc3418en.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2023.

FARACE, P. *et al.* *Campylobacter fetus* releases S-layered and immunoreactive outer membrane vesicles. **Revista Argentina de Microbiología**, [S.l.], v. 54, n. 2, p. 74–80, abr. 2022.

GALLUP, J. M.; ACKERMANN, M. R. The 'PREXCEL-Q Method' for qPCR. **International journal of biomedical science**, [S.l.], v. 4, n. 4, p. 273-293, dez. 2008.

GARD, J. Bovine Genital *Campylobacteriosis* - A Review. **International Journal of Veterinary Science and Research**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 029–031, 25 maio 2016.

GASPAR, E. B.; MINHO, A. P.; DOS SANTOS, L. R. **Manual de Boas Práticas de Vacinação e Imunização de Bovinos**. Bagé, RS: Embrapa Pecuária Sul, ago. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1022172/manual-de-boas-praticas-de-vacinacao-e-imunizacao-de-bovinos>>. Acesso em: 21 jan. 2023.

GIVENS, M. D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, [S.l.], v. 66, n. 3, p. 648–654, ago. 2006.

GUNTHERIV, N.; CHEN, C. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiology**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 44–51, fev. 2009.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. Ed. Barueri, SP: Manole, 2004. 530 p.

HOFFER, M. A. Bovine Campylobacteriosis: A Review. **Canadian Veterinary Journal**, [S.l.], v. 22, n. 11, p. 327–330, nov. 1981.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal** | IBGE. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

LYNCH, C. *et al.* First reported detection of biofilm formation by *Campylobacter fetus* during investigation of a case of prosthetic valve endocarditis. **Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 72, n. 8, p. 554–557, 4 maio 2019.

MALAFAIA, G. C. *et al.* The Brazilian beef cattle supply chain in the next decades. **Livestock Science**, [S.l.], v. 253, p. 104704, nov. 2021.

MALE, D. *et al.* **Imunologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. 488 p.

MCFADYEAN, J.; STOCKMAN, S.; BRITAIN, G. **Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Appendix to part III, Abortion in sheep**. London: H.M.S.O, 1913.

MCVEY, S.; KENNEDY, M. A.; CHENGAPPA, M. M. **Veterinary microbiology**. 3. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. 656 p.

MICHI, A. N. *et al.* A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. **Theriogenology**, [S.l.], v. 85, n. 5, p. 781–791, mar. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE APOIO À GESTÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Campylobacter***: Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.

MSHELIA, G. Bovine venereal campylobacteriosis: an overview. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, [S.l.], v. 2, n. 080, 1 abr. 2007.

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. 856 p.

WOAH. **Terrestrial Manual Online Access**. Disponível em: <<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>>. Acesso em: 14 jan. 2023.

OMS. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>.

PARKINSON, T. J.; VERMUNT, J. J.; MALMO, J. **Diseases of cattle in Australasia**. Auckland, New Zealand: Massey University Press, 2019. 1976 p.

PENNER, J. L. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 1, n. 2, p. 157, 1 abr. 1988.

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

PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022. 59 p.

RADOSTITS, O. M. **Herd health: food animal production medicine**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 2001. 890 p.

REESE, S. T. *et al.* Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 212, p. 106251, 1 jan. 2020.

SKIRROW, M. B. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter*, and related bacteria. **Journal of Comparative Pathology**, [S.l.], v. 111, n. 2, p. 113–149, ago. 1994.

SMIBERT, R. M. The Genus *Campylobacter*. **Annual Review of Microbiology**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 673–709, out. 1978.

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**, [S.l.], v. 30, n. 4, p. 299–311, 1 out. 1919.

SPRENGER, H.; ZECHNER, E. L.; GORKIEWICZ, G. So close and yet so far — Molecular microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies. **European Journal of Microbiology and Immunology**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 66–75, mar. 2012.

SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. **BSAP Occasional Publication**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 93–104, fev. 2001.

TRUYERS, I. *et al.* Diagnosis and management of venereal campylobacteriosis in beef cattle. **BMC Veterinary Research**, [S.l.], v. 10, n. 1, 27 nov. 2014.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 40, n. 15, p. e115–e115, 21 jun. 2012.

USDA. **Cattle Stocks - Selected Countries Summary**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/reporthandler.ashx?reportId=2740&templateId=23&format=html&fileName=Cattle%20Stocks%20-%20Selected%20Countries%20Summary>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

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**, [S.l.], 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**, [S.l.], v. 52, n. 12, p. 4183–4188, dez. 2014.

VERON, M.; CHATELAIN, R. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S.l.], v. 23, n. 2, p. 122–134, 1 abr. 1973.

VIEIRA, R. J. Obstetrics in Cattle: from conception to puerperium. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S.l.], v. 8, n. supl.2, p. 361–368, 2 jun. 2014.

YE, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, [S.l.], v. 13, n. 1, 18 jun. 2012.

YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. **Current therapy in large animal theriogenology**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. 1088 p.

ZU ERMGASSEN, E. K. H. J. *et al.* The origin, supply chain, and deforestation risk of Brazil's beef exports. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 117, n. 50, p. 31770–31779, 1 dez. 2020.