

T636.089 69

P386c

2001

Aiesca Oliveira Pellegrin

**CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA NA SUB-REGIÃO DA
NHECOLÂNDIA DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE E PROPOSIÇÃO
DE NOVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal

Área de concentração: Epidemiologia e Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte
UFMG- Escola de Veterinária
2001

P386C
2001

Pellegrin, Aiesca Oliveira. 1960-

Campilobacteriose genital bovina na sub-região da Nhecolândia do Pantanal Sul-Mato-Grossense e proposição de novas técnicas de diagnóstico / Aiesca Oliveira Pellegrin. – Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2001.

80 p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Infecções por Campylobacter – Diagnóstico – Teses. 3. Campylobacter – Teses. I. Título.

CDD – 636.089 693 6

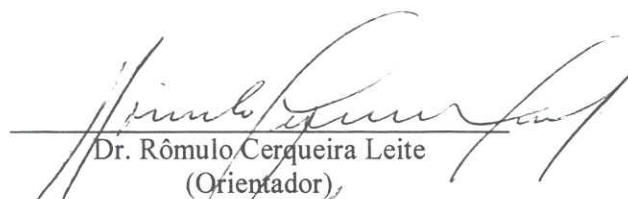
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

27/11/01

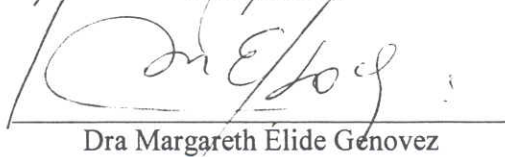
1592001-01

0321-58060

Tese defendida em 22 de março de 2001, pela Comissão Organizadora constituída por:



Dr. Rômulo Cerqueira Leite
(Orientador)



Dra Margareth Élide Genovez



Dr. Vitor Salvador Picão Gonçalves



Dr. Francisco Carlos Faria Lobato



Dr. Andrey Pereira Lage



Para o meu pai e para Beto, pelo apoio e exemplo.

Para Luiza e Julia, razão de tudo.

Agradecimentos

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, um Mestre contemporâneo com habilidade de passar conhecimento e formar equipes.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage, pela amizade, apoio incondicional e por todas as horas que dedicou aos meus questionamentos.

À Josely, pelo exemplo de dedicação, companheirismo e persistência na busca da verdade.

À Ana Paula, amiga fundamental na minha chegada.

À Edel, pela amizade, confiança e me fazer acreditar que eu iria chegar até aqui.

Aos meus colegas do Laboratório, Cid, Ricardo, Karina, Carol, Raquel, João Paulo, Kika, Simone e Paulinho, porque conseguimos formar uma equipe.

Ao Ricardo, Cristiano e Geder, amigos sempre prontos a ajudar.

Ao Prof. Romário Cerqueira Leite, que faz com que todos se sintam parte da equipe.

Aos Profs. Francisco, Zélia, Maurílio e Elvio que disponibilizaram seus laboratórios sempre que necessário.

À Sueli, que com seu carinho e espírito materno nos tornou parte da família.

Aos colegas de Curso, bolsistas, estagiários e a todos os funcionários do DMVP e da FEP-MVZ, particularmente ao Jorge, Luciana, Renata, Creuza, Toninho, Joãozinho e Wendel, que direta ou indiretamente colaboraram no trabalho.

À EMBRAPA/Pantanal, na pessoa do Dr. Mário Dantas, pela oportunidade de realizar o curso.

Aos colegas do laboratório de Sanidade Animal do Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, pelo auxílio nas coletas e processamento do material.

Aos funcionários da Fazenda Nhumirim pelo apoio durante a execução dos experimentos de campo.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

À Fapemig pelo apoio financeiro.

À FEP-MVZ pelo apoio financeiro e infraestrutura para a realização dos experimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	11
SUMMARY	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. O SISTEMA PRODUTIVO DO PANTANAL	13
2.2. CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA	14
2.3. EPIDEMIOLOGIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CAMPILOBACTERIOSE.	14
2.4. PATOGENIA DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA	15
2.5. RESPOSTA IMUNE AO <i>C. fetus</i>	16
2.6. ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE	16
2.7. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	17
2.8. OBJETIVOS	18
3. PREVALÊNCIA DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA EM TOUROS DE CORTE NO PANTANAL SUL MATO-GROSSENSE	19
3.1. RESUMO	19
3.2. SUMMARY	19
3.1. INTRODUÇÃO	19
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.2.1. Amostragem	20
3.2.2. Lavados Prepuciais	21
3.2.3. Imunofluorescência Direta	21
3.2.4. Área das propriedades e idade dos animais	21
3.2.5. Análise Estatística	21
3.3. RESULTADOS	21
3.4. DISCUSSÃO	22
3.5. AGRADECIMENTOS	26

4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO E “IMUNOBLOTTING” PARA DETECÇÃO DE	27
IMUNOGLOBULINAS A ANTI- <i>CAMPYLOBACTER FETUS</i> EM MUCO CÉRVICO -	
VAGINAL DE FÊMEAS BOVINAS	
RESUMO	27
SUMMARY	27
4.1. INTRODUÇÃO	28
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.2.1. Coleta de muco cérvico- vaginal	28
4.2.2. Animais	28
4.2.3 Amostras de referência e condições de cultivo	29
4.2.4. Antígeno produzido por extração em tampão glicina (pH 2,2)	29
4.2.5. Antígeno sonicado	29
4.2.6. Procedimento da técnica	29
4.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	30
4.2.8. “Imunoblotting”	30
4.2.9. Análise estatística	30
4. 3. RESULTADOS	30
4. 3.1. Padronização do Elisa IgA e comparação entre diferentes preparações antigênicas.	30
4.3.2. Comparação entre preparações antigênicas de <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ,	31
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> e <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> .	
4. 3.3. Eletroforese e reconhecimento das proteínas dos antígenos de <i>C. fetus</i> subsp.	31
<i>Venerealis</i> , <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> e <i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> através do “immunoblotting”	
4.4. DISCUSSÃO	32
4.5. AGRADECIMENTOS	45
5. DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA PELO ELISA	46
IgA	
RESUMO	46
SUMMARY	46
5.1. INTRODUÇÃO	46
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	47
5.2.1. Amostragem	47
5.2.2. Controles Negativos	47
5.2.3. Coleta de muco cérvico- vaginal	47
5.2.4. Elisa IgA anti- <i>C.fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	47
5.2.5. Análise Estatística	48
5.3. RESULTADOS	48
5.4. DISCUSSÃO	51
5.5. AGRADECIMENTOS	54

6. EFICIÊNCIA REPRODUTIVA E RESPOSTA IMUNE LOCAL EM NOVILHAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO *Campylobacter fetus*

RESUMO	55
SUMMARY	55
6.1. INTRODUÇÃO	55
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	56
6.2.1. Animais experimentais	56
6.2.2. Local e duração do experimento	56
6.2.3. Avaliação do desempenho reprodutivo	56
6.2.4. Coleta de muco cérvico- vaginal	57
6.2.5. Imunofluorescência para detecção do <i>Campylobacter fetus</i> em lavado prepucial	57
6.2.6. Detecção de imunoglobulinas A anti- <i>C. fetus</i>	57
6.2.7. Diagnóstico de gestação	57
6.3. RESULTADOS	57
6.3.1. Acompanhamento do estado de portador dos touros	57
6.3.2. Desempenho reprodutivo	57
6.3.3. Dinâmica da produção de Imunoglobulinas A anti- <i>Campylobacter fetus</i> em muco cérvico- vaginal	58
6.4. DISCUSSÃO	62
6.5 AGRADECIMENTOS	64
7. DISCUSSÃO GERAL	65
8. CONCLUSÕES	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1- Frequência de animais infectados pelo <i>Campylobacter fetus</i> no Brasil	15
3. PREVALÊNCIA DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA EM TOUROS DE CORTE NO PANTANAL SUL MATO-GROSSENSE	
Tabela 1. Frequência de touros positivos à imunofluorescência direta para <i>Campylobacter fetus</i> em propriedades do Pantanal Mato-grossense e área das propriedades amostradas	25
Tabela 2. Frequência de touros positivos à imunofluorescência direta para <i>C. fetus</i> segundo a área das propriedades.	25
Tabela 3. Frequência de touros positivos à imunofluorescência direta para <i>C. fetus</i> nas diferentes faixas etárias em três propriedades da sub-região da Nhecolândia do Pantanal Mato-grossense.	26

5. DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA PELO ELISA

IgA

Tabela 1. Frequência de fêmeas portadoras e valores médios e máximos de leituras de DO₄₅₀ de imunoglobulinas A anti- *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em propriedades do Pantanal Mato-grossense 49

Tabela 2. Frequência de fêmeas portadoras de imunoglobulinas A anti- *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em propriedades sem histórico de Campilobacteriose Genital Bovina 50

6. EFICIÊNCIA REPRODUTIVA E RESPOSTA IMUNE LOCAL EM NOVILHAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO *Campylobacter fetus*

Tabela 1 Estado das novilhas cobertas por touros infectados por *C. fetus* duante uma estação de monta de quatro meses, ao final da estação de parição 58

Tabela 2. Repetição de cio de um grupo de 54 novilhas cobertas com touros infectados pelo *C. fetus* durante uma estação de monta de quatro meses. 59

Tabela 3. Valores de DO₄₅₀ em muco cérvico vaginal de novilhas que abortaram. 60

LISTA DE FIGURAS

4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO E "IMUNOBLOTTING" PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS A ANTI- *Campylobacter fetus* EM MUCO CÉRVICO - VAGINAL DE FÊMEAS BOVINAS

Figura 1. Perfil eletroforético de antígeno sonicado de *C.fetus* subsp. *venerealis*, 33

Figura 2. Perfil eletroforético de antígeno de extração ácida em tampão glicina *C.fetus* subsp. *venerealis* e *C.fetus* subsp. *fetus* 35

Figura 3 Perfil eletroforético de amostra de *C. jejuni* subsp. *jejuni* 37

Figura 4. "Immunoblott" de proteínas de antígeno obtido por extração ácida de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C.fetus* subsp. *fetus* 39

Figura 5. "Immunoblott" de proteínas de extrato ácido de *C. fetus* subsp.*venerealis*, *C.fetus* subsp. *fetus* e *C. jejuni* subsp. *jejuni* utilizando diferentes diluições de muco cérvico vaginal 41

5. DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA PELO ELISA

IgA

Figura 1. Dispersão dos valores de DO em amostras de muco vaginal de fêmeas provenientes de rebanhos do Pantanal Mato-grossense. 50

Figura 2. Dispersão dos valores de DO em amostras de muco vaginal de fêmeas provenientes de rebanhos negativos 51

6. EFICIÊNCIA REPRODUTIVA E RESPOSTA IMUNE LOCAL EM NOVILHAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO *Campylobacter fetus*

Figura 1 Valores mínimos, médios e máximos de leituras de DO obtidas no muco vaginal de novilhas naturalmente infectadas 59

Figura 2. Valores médios de leituras de DO₄₅₀ obtidas através de Elisa IgA em muco vaginal de novilhas que repetiram e não repetiram cio 61

Figura 3. Média das leituras de DO₄₅₀ de novilhas que abortaram e que pariram 61

RESUMO

A estimativa da prevalência da Campilobacteriose Genital Bovina no rebanho do Pantanal foi realizada em 19 conglomerados pela imunofluorescência direta em lavados prepuciais obtendo-se 52.3%(170) de prevalência em touros (CI 95%: 42.6% - 62.0%) e 89.5% (17) de propriedades positivas. Foi padronizado um ensaio imunoenzimático para detecção de imunoglobulinas A anti-*Campylobacter fetus* (*C. fetus*) em muco cérvico vaginal com um antígeno extraído com tampão glicina. A média das leituras de densidade ótica (DO₄₅₀) foi 0.143 ± 0.09 . Pelo "immunoblotting as proteínas mais imunorreativas no antígeno de of *C. fetus* subsp. *venerealis* (*C. fetus* subsp. *venerealis*) e de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* (*C. fetus* subsp. *fetus*) migraram em 45kDa mas a proteína de 97kDa foi reconhecida exclusivamente pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*. O ensaio imunoenzimático foi utilizado para detectar IgA anti- *C. fetus* em 311 amostras de muco vaginal de fêmeas provenientes de 18 rebanhos da região do Pantanal e a especificidade do Elisa IgA foi estimada em 94.4%. Para avaliar o desempenho reprodutivo e a resposta imune ao *C. fetus* em fêmeas naturalmente infectadas, 54 novilhas com cerca de três anos de idade foram cobertas com dois touros infectados, testados pela imunofluorescência direta. A taxa de parição foi de 59.3% mas sete novilhas abortaram e a taxa de repetição de cio foi de 44.4%. O valor médio da DO₄₅₀ no Elisa IgA do muco vaginal no início da estação de monta foi de 0.097 e o pico de 0.507, que ocorreu em torno de 4^o mês da estação de monta.

Palavras-chave: Campilobacteriose- Pantanal- Reprodução - Diagnóstico- Elisa IgA

SUMMARY

The estimated prevalence of the disease in the herd was performed in 19 clusters and tested by fluorescent antibody technique prepuccial washings and 170 bulls from 17 (89.5%) ranches were positive in DFAT given an prevalence of 52.3% (CI 95%: 42.6% - 62.0). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay was developed to detect antigen specific secretory IgA antibodies to *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in bovine vaginal mucus with a glycine extractable antigen fraction used in the solid fase. Mean of optical density measurements ($\lambda=450$ nm) was 0.143 ± 0.09 . By "immunoblotting" the most immunoreactive proteins of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* migrates in 45kDa but protein of 97 kDa was recognized exclusively by *C. fetus* subsp. *venerealis*. The indirect enzyme immunosorbent assay were used to detect antigen specif secretory IgA in 311 bovine vaginal mucus from cows of 18 beef cattle herds of the Brazilian Pantanal and the specificity was estimated as 94.4%. In order to evaluate reproductive performance and immune response to *C. fetus* in naturally infected bovine females, 54 heifers around three years old breed individually with 2 infected bulls, confirmed by fluorescent antibody test were observed. The calving rate was 59.3% of females but 7 heifers aborted and the repeat breeding rate was 44.4%. Mean value of the optical density measured in Elisa IgA of the vaginal mucus in the beggining of breeding season was 0.097 and the production IgA peak was 0.507 and occurred around the 4th month of breeding.

Key-words: Bovine Campilobacteriosis- Pantanal- Reproduction- Diagnosis- Elisa IgA

1. INTRODUÇÃO

O Pantanal é, por tradição, uma das maiores regiões de cria do país e nos anos mais recentes tem procurado incrementar esta vocação com investimentos em tecnologias sustentáveis e adaptadas a região. Entretanto, a eficiência reprodutiva na região ainda é bastante baixa, sendo estimadas em 56% a taxa de natalidade a taxa de desmama em 42% e em 42 meses a idade a primeira cria. Como o retorno econômico em gado de corte está baseado na produção de bezerras, a eficiência reprodutiva das matrizes deve ser otimizada e investigados os fatores que determinam estes baixos índices.

A Campilobacteriose Genital Bovina é uma enfermidade de caráter eminentemente venéreo causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* cujo habitat natural é o trato reprodutivo dos bovinos: no touro ele coloniza a mucosa prepucial e na vaca a mucosa da vagina, cérvix, útero e ovidutos. Sob condições naturais, a subsp. *C. fetus* subsp. *venerealis* é transmitida de macho a fêmea pelo coito, ou pelo uso de sêmen contaminado. A transmissão por touros infectados para fêmeas alcança quase 100% e a infertilidade, representada pela repetição de cio atinge mais comumente as novilhas, sendo que o aborto, em torno do 5º mês, ocorre em menos que 10%.

A porta de entrada do *C. fetus* subsp. *venerealis* no organismo é o trato genital, colonizado de forma ascendente sendo que as defesas orgânicas se iniciam também neste sítio. Seguindo-se uma infecção natural, quando cobertas por um touro portador do *C. fetus*, as fêmeas produzem anticorpos locais que estarão presentes no muco cérvico-vaginal entre seis semanas e dez meses. Estes anticorpos, rotineiramente, tem sido detectados no muco cérvico-vaginal pelo teste de muco-aglutinação e, mais recentemente, pelo ELISA IgA.

Este trabalho teve por objetivos estimar a prevalência da Campilobacteriose em touros de rebanhos de corte da sub-região da Nhecolândia do Pantanal Sul Mato-grossense; desenvolver e avaliar um ensaio imunoenzimático para detecção de imunoglobulinas A como teste individual e de rebanhos para diagnóstico de *C. fetus* em matrizes; determinar o perfil de

produção de imunoglobulinas A anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* em muco cérvico-vaginal de animais naturalmente infectados e avaliar o efeito da infecção natural pelo *C. fetus* sobre o desempenho reprodutivo de novilhas zebuínas criadas sob manejo extensivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O SISTEMA PRODUTIVO DO PANTANAL

O Pantanal é uma imensa planície sedimentar com área de 138.183 Km², abrangendo os estados de Mato Grosso (35,36%) e Mato Grosso do Sul (64,64%). A região é sujeita a inundações periódicas que regulam todo o ecossistema, com implicações sobre os sistemas biológicos e sócio-econômicos. Está subdividido em 11 sub-regiões (Fig. 1), de acordo com suas características hidrológicas, fitofisionômicas e edáficas, sendo as maiores o Paiaguás (19,6%) e a Nhecolândia (19,48%), situadas no Mato Grosso do Sul e Barão de Melgaço (13,15%) e Poconé (11,63%) situadas no Mato Grosso (Silva et al., 1995).

O município de Corumbá contribui para 44,74% da área do Pantanal, possuindo 99,2% de sua área na planície. De acordo com dados do censo agropecuário de 1985, o efetivo bovino do Pantanal é da ordem de 3.026.694 cabeças, com 1.282.857 destas somente no município de Corumbá (Silva et al., 1995). Cadavid Garcia (1986) efetuando estudo sobre a estrutura fundiária do município de Corumbá observou que 12% das propriedades do Pantanal, tem área igual ou superior a 10.000 ha, correspondendo a 56% da área total da região. Sendo assim, grandes propriedades são as que caracterizam a estrutura fundiária da região Pantaneira.

Em levantamento efetuado em 1993, Silva et al. (1995), evidenciaram uma área média dos estabelecimentos agropecuários no Pantanal Sul Mato-grossense de 6027 ha com taxa média de lotação animal de 4,6 ha/cab.

A economia da região baseia-se na exploração da pecuária bovina de corte, sendo o regime do tipo extensivo e concentrado principalmente na atividade de cria e recria, em áreas de pastagem nativa. Os animais são manejados geralmente

duas vezes por ano, em maio e dezembro, durante o que é denominado "trabalho de gado", ocorrendo nesse período a desmama dos bezerros, marcação, vermifugação, castração, descarte e outras práticas comuns ao manejo (Cadavid Garcia, 1996).

A comercialização, até meados da década de 1980, era realizada uma vez por ano, geralmente de bois magros de 3 a 4 anos de idade ou vacas de descarte e tinha os preços, definidos pelos compradores. A melhoria dos meios de comunicação e de serviços de informação de preços, e a realização de leilões proporcionaram vendas com preços melhores, inclusive de outras categorias animais, durante todo o ano. Um dos grandes obstáculos ainda é o transporte, geralmente feito a pé, ou combinado com via fluvial, rodoviária ou ferroviária, implicando em perdas de peso, fugas e mortes (Cadavid Garcia, 1996).

A consolidação do MERCOSUL vem induzindo sensíveis mudanças no nível tecnológico das fazendas da região e na tendência dos preços da carne nos países participantes, o que, aliado à implementação de uma possível hidrovía Prata-Paraná-Paraguai, poderá acelerar esse processo de mudança (EMBRAPA, 1993).

Até o final do século passado, nos últimos 20 anos, os problemas sanitários do rebanho bovino da região estavam restritos a estudos epidemiológicos das nematodioses (Catto & Furlong, 1981; Catto et al., 1994) e brucelose (Brasil, 1977) além de informações sobre programas profiláticos para raiva e aftosa (EMBRAPA, 1987b), conduzidos pelo órgão de defesa sanitária do Estado. Baseando-se nessas informações, Cadavid Garcia (1996) observou que " aparentemente o rebanho bovino não apresenta problemas sérios de sanidade, apesar dos programas profiláticos serem irregulares e, muitas vezes ineficientes". O mesmo autor, por outro lado, observa que, " qualquer que seja o ciclo hidrológico, a pecuária bovina tem perspectivas de aumento da produção através do aprimoramento tecnológico e o manejo ecossustentado dos recursos naturais" , significando que, mesmo que exista uma incorporação de áreas de pastagem cultivada, minimizando a estacionalidade na oferta de alimento, esta deve ter um limite, compatível com a conservação do meio ambiente.

A idade a primeira cria, considerada também uma medida da eficiência reprodutiva foi estimada em 4.1 anos (Abreu & Pena, 1996) e a proporção de vacas inférteis no rebanho é de aproximadamente 17% das vacas de cria, considerando-se a proporção de fêmeas que passam mais de dois anos sem parir (Almeida et al. 1996).

2.2. CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA

A Campilobacteriose Genital Bovina é uma enfermidade de caráter eminentemente venéreo causada pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*. O habitat natural deste agente é o trato reprodutivo dos bovinos; no touro ele coloniza a mucosa prepucial e na vaca a mucosa da vagina, cérvix, útero e ovidutos. Por outro lado, o *C. fetus* subsp. *fetus* tem seu habitat no intestino e causa abortos esporádicos em bovinos, aborto enzoótico em ovinos e septicemia no homem (Dekeiser, 1984).

C. fetus são bactérias Gram negativas microaerofílicas, que interferem com a função reprodutiva em ungulados e são patógenos oportunistas no homem. A espécie *C. fetus* está dividida em duas subespécies *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis*, cujo DNA possui homologia de aproximadamente 98%, sendo similares também nas patologias causadas (Dworkin & Blaser, 1997)

2.3. EPIDEMIOLOGIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CAMPILOBACTERIOSE.

Os touros são portadores do *C. fetus* subsp. *venerealis*, mantendo-o num microhabitat representado pelas criptas da mucosa prepucial e o transmitem venerealmente para as vacas susceptíveis causando cervicite e endometrite o que resulta em infertilidade (Garcia & Brooks, 1983). O ciclo da enfermidade é completado pela transmissão do *C. fetus* subsp. *venerealis* a um touro susceptível onde o agente vai colonizar a mucosa prepucial.

O *C. fetus* subsp. *fetus* tem uma maior amplitude de hospedeiros, colonizando a mucosa de ungulados, aves, répteis sendo que o

agente tem como principal habitat o trato gastrointestinal destas espécies (Dworkin & Blaser, 1997). O ciclo da infecção pelo *C. fetus* subsp. *fetus* se inicia pela ingestão oral do agente através do alimento ou água e após a colonização da mucosa do trato gastrointestinal ocorre uma bacteremia transiente e em vacas prenhas o aborto pode ocorrer.

D'Ápice, em 1956, foi o primeiro pesquisador que isolou o então denominado *Vibrio fetus* de um feto abortado, relatando a presença da "Vibriose" no rebanho nacional (Tab. 1). Esta doença foi intensamente pesquisada até o final da década de 1970 quando foram realizados vários trabalhos de levantamento epidemiológico em rebanhos, utilizando inicialmente a técnica de muco-aglutinação em fêmeas

Os fatores de risco considerados mais importantes para a infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* em sistemas de produção utilizados em países tropicais são: a utilização de manejo reprodutivo com monta natural; uso de touros

com idade superior a 4-5 anos no rebanho; presença de touros sem controle sanitário para a Campilobacteriose Genital Bovina (Stoessel, 1982) e manejo reprodutivo que utiliza monta o ano inteiro ao invés de um período limitado de estação de monta.

A transmissão do *C. fetus* subsp. *venerealis* de touros infectados para fêmeas pode chegar a 100% e a infertilidade temporária, representada pela repetição de cio, atinge mais comumente as novilhas e vacas jovens, sendo que a taxa de prenhez de fêmeas infectadas pode estar em torno de 20% (Newsan, 1960).

Em sistemas de produção de gado de corte o impacto da Campilobacteriose Genital Bovina recai principalmente sobre o intervalo entre partos, reflexo do grande número de vacas que falham em conceber ou concebem tardiamente no período de monta, produzindo os chamados bezerras refugos, mais leves, desmamados tardiamente, que compõem lotes pouco uniformes, prejudicados quando da comercialização (Kasari & Gleason, 1996).

Tabela 1. Frequência de animais infectados pelo *Campylobacter fetus* no Brasil.

Ano	Estado	Autores	Técnica	Índice
1956	SP	D'Apice	Isolamento	1º isolamento
1960	RS	Mies Filho	Muco-aglutinação	27 %
1967	SP	Pestana de Castro et al.	Muco-aglutinação	8.2 %
1977	MG	Leite	IFD	28.9 %
1971	PR, RS, MG	Pestana de Castro et al.,	Muco-aglutinação	8 %
1978	RJ	Ramos e Guida	Muco-aglutinação	12 %
1986	SP	Genovez et al.	Isolamento	23.9 %
1997	MG	Lage et al.	IFD	27.9 %
1999	MG	Jesus et al.	Muco-aglutinação	46.9 %
1999	RJ	Jesus et al.	Muco-aglutinação	22.3 %
1999	MG	Jesus et al.	Isolamento	16.7 %
1999	RJ	Jesus et al.	Isolamento	42.3 %
1999b	MS	Pellegrin et al.	IFD	52.3%

2.4. PATOGENIA DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA

Nas fêmeas, a bactéria penetra no sistema genital durante a fase ovulatória, pelo coito ou inseminação artificial (Dekeyser, 1986). O microorganismo localiza-se na parte anterior da

vagina, invade o útero e oviduto, induzindo a síntese local de imunoglobulinas detectáveis no muco cervico-vaginal, aos 30 dias de infecção (Corbeil, et al., 1974a).

A mortalidade embrionária, com conseqüente repetição de cio, é ocasionada por um processo de cervicite aguda difusa, endometrite e

salpingite decorrentes da infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*. Histologicamente, pode ser observada uma endometrite mucopurulenta difusa, aumento do exudato no lúmen das glândulas uterinas com grande aporte de polimorfonucleares. Em decorrência deste fenômeno inflamatório, o embrião não recebe o suprimento de oxigênio necessário a sua sobrevivência que, neste ambiente hostil, fica fatalmente comprometida. Eventualmente, ocorrendo uma salpingite bilateral, o comprometimento da fertilidade é total (Dekeyser, 1984).

O aborto esporádico é uma decorrência da infecção do sistema genital pelo *C. fetus* subsp. *fetus* por via sistêmica, estando este agente entre as principais causas de aborto identificadas no país (Genovez et al., 1983). Os mecanismos pelos quais ocorre a bacteremia e a colonização do útero prenhe por este agente não estão bem claros mas o aborto ocorre por morte fetal (anoxia do feto), em virtude do processo inflamatório instaurado (Dekeyser, 1984).

O *C. fetus* subsp. *venerealis* também pode causar aborto entre o 4º e 6º mês de idade (Dekeyser, 1984), sendo comprovado que este pode passar da vagina para o útero em qualquer momento da prenhez (Stoessel, 1982). No entanto não está claro, se o agente permanece localizado na vagina ou no útero, até o momento de interromper a gestação (Stoessel, 1982).

2.5. RESPOSTA IMUNE 'A INFECÇÃO PELO *C. fetus*

A cinética da imunidade contra o *C. fetus* na mucosa vaginal foi investigada por diversos autores (Corbeil et al. 1974a, Corbeil et al., 1974b, Van Aert et al., 1977). A classe de imunoglobulinas que aparece inicialmente em novilhas infectadas experimentalmente é a IgM, seguida da IgA, e por último da IgG1. Em novilhas infectadas por via vaginal o aparecimento das classes IgM e IgA é quase simultâneo, precedendo a IgG1, que ocorre aproximadamente na 8ª semana após a infecção. Isto indica importância da imunidade conferida pela IgA para a resistência à infecção natural pelo *C. fetus*, uma vez que, em fêmeas imunizadas por via sistêmica as classes de imunoglobulinas que ocorrem são a IgM, a IgG1 e

IgG2, não sendo detectada a IgA, nem no soro, nem nas secreções vaginais (Corbeil et al. 1974b).

A IgG é a primeira classe ativa de anticorpos no útero, após a infecção natural, enquanto a IgA predomina na vagina. A IgG imobiliza e opsoniza o *C. fetus* permitindo a morte intracelular pelos macrófagos e neutrófilos no endométrio (Corbeil et al. 1980).

A IgA aparece logo em seguida a IgM, entre três a cinco semanas após a infecção. É a imunoglobulina que apresenta um título maior e por mais tempo, podendo persistir por mais de 40 semanas. É a principal imunoglobulina responsável por impedir o início da infecção, prevenindo a bactéria de ascender ao útero, apesar de não ser opsonizante. Dessa forma, a colonização da vagina pode persistir por um período que varia de 6 a 24 meses. Este constante estímulo ao sistema imune local promove elevados níveis protetores de anticorpos, o que permite o retorno da fertilidade do animal, após três a seis meses do início do processo, ou seja, em torno de três meses após a infecção (Corbeil et al. 1974a; Corbeil et al., 1980).

2.6. ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE

Os estudos de fatores de virulência têm sido realizados principalmente com estirpes de *C. fetus* subsp. *fetus*, porém vários deles são de relevância na patogenia da Campilobacteriose Genital Bovina causada por *C. fetus* subsp. *venerealis* (Garcia & Brooks, 1993).

O *C. fetus* persiste no hospedeiro porque possui um sistema eficiente de colonização sendo esta habilidade dependente da presença de uma espécie de microcápsula denominada camada "S", que possui arranjos de subunidade de proteína conhecida como SAP ("surface array proteins"). A camada "S" recobre estruturas imunogênicas da bactéria, incluindo o lipossacarídeo, tornando-o inacessível às defesas do hospedeiro. A localização dessas proteínas na superfície bacteriana sugere sua importância na interação patógeno-hospedeiro (Garcia & Brooks, 1993; Dunn et al., 1987).

A manutenção da camada "S" tem vantagens para o *C. fetus*, tornando-o evasivo a fagocitose, o que facilita a sua persistência no hospedeiro por impedir a ligação da proteína C3b do complemento (Dworkin & Blaser, 1997). Mudanças na camada S da bactéria podem explicar a produção de componentes de superfície com diferentes especificidades antigênicas caracterizando-se como um mecanismo de defesa do agente contra resposta imune do hospedeiro (Garcia & Brooks, 1993).

Essas pequenas variações antigênicas das proteínas SAP, que ocorrem durante a infecção também podem explicar o fenômeno observado em vacas portadoras, pois a resposta imunológica do animal não é tão rápida quanto a variação nos epítomos desta proteína no curso da infecção.

Os antígenos de superfície de *C. fetus* incluem também um componente proteico de membrana externa (OMP) e dois outros antígenos proteicos superficiais que são facilmente extraídos em tampão glicina (pH 2,2) e o extrato obtido tem sido amplamente utilizado na detecção de anticorpos contra este agente (Logan & Trust, 1983).

Blaser et al., (1987) analisando proteínas de parede de *C. fetus* observaram que em 10 amostras analisadas os padrões proteicos em gel de poliacrilamida eram bastante similares com as OMP's migrando de 45-47 kDa e as proteínas flagelares em 63 kDa bem como banda proteica maior de aproximadamente 100 kDa, todas passíveis de obtenção sob extração ácida, sendo esta última presente apenas em amostras resistentes a atividade bactericida mediada pelo complemento.

A caracterização das proteínas de membrana de *C. fetus* tem demonstrado a existência de uma banda de 63 kDa representada pela proteína flagelar, comum a todas as espécies de *Campilobacter spp* que apresentam flagelo e uma forma isomérica de 45-47kDa que compreende 90% das proteínas de membrana externa (Dunn et al., 1987).

Tem sido observado que uma glicoproteína de superfície de *C. fetus* de 23 kDa, extraída sob baixo pH tem a capacidade de inibir a fagocitose por neutrófilos bovinos (McCoy et

al., 1975; Winter et al., 1978). Blaser et al. (1985) e Blaser et al. (1987) evidenciaram uma glicoproteína ácida com migração a 100 kDa associada com padrão de resistência ao soro, mas lábeis quando extraídas sob baixo pH.

2.7. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A Campilobacteriose Genital Bovina tem seu diagnóstico bastante dificultado pela baixa taxa de sobrevivência do *C. fetus* fora do hospedeiro, quando se utilizam métodos tradicionais de isolamento e cultura pois o organismo é microaerófilo e de crescimento demorado (Clark & Dufty, 1972; Lander, 1990).

O diagnóstico associa métodos laboratoriais e clínico-epidemiológicos, baseando-se na detecção do agente, por isolamento e métodos moleculares ou ainda por métodos imunológicos, como imunofluorescência ou imunoperoxidase (Genovez, 1997).

Até a década de 1960/1970 dois métodos, respectivamente para detecção do agente em touros e de anticorpos específicos em fêmeas eram bastante utilizados: a imunofluorescência direta e a mucoaglutinação. No entanto, há limitações destes métodos em termos de sensibilidade e especificidade.

No Brasil, raros têm sido os estudos objetivando diminuir as dificuldades do diagnóstico e que privilegiem formas de coleta e transporte adequados às distâncias entre a propriedade e o laboratório (Genovez et al., 1989). No Pantanal, onde as condições de coleta e transporte são retritivas a um diagnóstico por isolamento, alternativas devem ser viabilizadas.

O teste de imunofluorescência direta, utilizado pela primeira vez no Brasil em 1977, por Leite, apresenta grandes vantagens, tendo permitido avançar no conhecimento da epidemiologia da Campilobacteriose Genital Bovina. Embora não tenha a capacidade de distinguir as duas subespécies de *C. fetus*, o *C. fetus* subsp. *fetus* e o *C. fetus* subsp. *venerealis* apresenta igual sensibilidade ao teste da novilha virgem, com a conveniência de ser muito mais prático e econômico (Leite, 1977). O diagnóstico pela imunofluorescência direta, quando comparado

com a cultura, é efetuado em curto espaço de tempo, a presença de contaminantes não se constitui um problema e as condições de coleta e tempo entre esta e o diagnóstico não precisam ser tão rígidas (Philppot, 1968).

É um aspecto primordial para o sucesso do diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina uma coleta apropriada do material. A sensibilidade do diagnóstico está diretamente relacionada ao método e frequência de coleta e, principalmente, ao acondicionamento e transporte do material, sendo que coletas repetidas no mesmo animal diminuem a probabilidade de resultados falsos negativos (Stoessel, 1982). Leite et al. (1995) adaptaram uma técnica de coleta de lavado prepucial, comparando-a com a técnica de coleta pelo swab prepucial concluíram que ambas eram igualmente eficientes quando utilizado como método de diagnóstico a imunofluorescência direta (IFD).

A coleta de muco cérvico-vaginal por tampão intra-vaginal, descrita por Fernandes & Gomes (1992) consiste na aplicação de um tampão vaginal acoplado a um aplicador metálico, ambos previamente esterilizados, que é inserido no canal vaginal, chegando próximo à cervix. Após um período de 20–30 min este tampão é retirado e acondicionado em frasco estéril, sendo transportado ao laboratório sob refrigeração, onde será devidamente processado de acordo com a técnica requerida (mucoaglutinação, ELISA ou isolamento). Quando se deseja isolar o agente, entretanto, a técnica de coleta por aspiração do muco ou secreção cérvico-vaginal com pipeta de inseminação parece ser a mais indicada por obter um material mais concentrado.

De todos aspectos a serem considerados no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina devemos enfatizar o repouso sexual dos touros, no mínimo de 15 dias, antes e durante o intervalo entre as coletas e a frequência das coletas, no mínimo de três para que um animal seja considerado negativo (Lage & Leite, 2000).

O teste de muco-aglutinação, muito utilizado para diagnóstico de rebanhos infectados, não é ideal para detectar portadores individuais, além de apresentar outras desvantagens. Resultados falso negativos podem ocorrer quando são

coletadas amostras durante a fase de estro (Lawson & Mac Kinnon, 1952) bem como falso positivos em amostragem repetitiva (Clark, 1971). Por outro lado, preparações do antígeno auto-aglutinantes podem interferir no resultado também ocasionando o aparecimento de falsos positivos, sendo que antígenos produzidos com diferentes amostras podem variar em sensibilidade (Hewson, 1985).

Os ensaios imunoenzimáticos usados para detecção da resposta imune são amplamente aceitos como técnicas sensíveis e específicas, e a utilização de um teste diagnóstico que detecte imunoglobulinas da classe IgA pode ter ampla utilidade no diagnóstico de rotina e em estudos epidemiológicos da Campilobacteriose Genital Bovina, para acompanhamento da infecção. Vários autores (Hum et al. 1991, Hum et al. 1994) têm proposto um ensaio imunoenzimático para imunoglobulina A (ELISA IgA) como um teste mais sensível e específico para detecção de fêmeas portadoras do *C. fetus*, podendo inclusive distinguir animais enfermos dos imunizados, uma vez que a IgA não é detectada no muco cérvico-vaginal em resposta a uma infecção experimental pela via parenteral (Corbeil et al. 1974a).

2.8.OBJETIVOS

O trabalho teve por objetivos estimar a prevalência da Campilobacteriose em touros de rebanhos de corte do Pantanal Matogrossense; desenvolver e avaliar um ensaio imunoenzimático para detecção de imunoglobulinas A como teste individual e de rebanhos para diagnóstico de *C. fetus* em matrizes, determinar o perfil de produção de imunoglobulinas A anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* em muco cérvico-vaginal de animais naturalmente infectados e avaliar o efeito da infecção natural pelo *C. fetus* sobre o desempenho reprodutivo de novilhas neloradas criadas sob manejo extensivo.

3. PREVALÊNCIA DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA EM TOUROS DE CORTE NO PANTANAL SUL MATO-GROSSENSE

Pellegrin, A. O.^{1,2*}; Lage, A. P.²; Sereno, J. R. B.¹; Ravaglia, E.¹; Costa, M.S.¹; Leite, R.C.²

1 - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal
Rua 21 de setembro, 1880
Corumbá- MS - 79320-900
Fax : (31)231-1011

Endereço eletrônico: aiesca@cpap.embrapa.br

2 - Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia Aplicada
Núcleo de Pesquisa em Saúde Animal
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais
Autor para correspondência

RESUMO

A prevalência de Campilobacteriose Genital Bovina foi estimada em touros do Pantanal Sul Mato-grossense. Foram testados para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina por imunofluorescência direta (IFD) 327 lavados prepuciais de touros provenientes de 19 propriedades. Cento e setenta touros de 17 (89,5%) propriedades foram positivos à IFD para *Campylobacter fetus*, resultando em uma prevalência de 52,3% (IC95%: 42,6% - 62,0%). A frequência de touros positivos à IFD para *C. fetus* não foi significativamente diferente nas categorias de idade estudadas, entretanto houve uma maior frequência de touros positivos à IFD para *C. fetus* nas propriedades com mais de 15.000 ha ($\chi^2= 6,40$; gl= 1; P= 0,01), quando comparadas com as propriedades menores que 15.000 ha, sendo estimado o risco relativo em 1,33 (1,07 <RR <1,66). Estes resultados demonstram que a Campilobacteriose Genital Bovina apresenta uma alta prevalência na região do Pantanal, estando esta provavelmente relacionada ao manejo utilizado na região.

SUMMARY

Prevalence of Bovine Venereal Campilobacteriosis were estimated in bulls of Pantanal Sul Mato-grossense, Brazil. Prepuccial washings of 327 bulls from 19 ranches were assayed by the direct fluorescent antibody test (DFAT). One hundred seventy bulls from 17 (89,5%) ranches were positive in DFAT and the

estimated prevalence was 52,3% (IC 95%: 42,6% - 62,0%). The frequency of positive bulls did not differ among the different age groups studied but were different in ranches with a surface greater than 15,000 ha ($\chi^2= 6,40$; df= 1; P= 0,01) with an estimated relative risk of 1,33 (1,07 < RR < 1,66). These results indicates that Bovine Venereal Campilobacteriosis is widespread and has a high prevalence in Pantanal Sul Mato-grossense probably due to the management practices.

3.1. INTRODUÇÃO

O Pantanal é a região que apresenta a maior planície alagada na América do Sul e há quase dois séculos tem na pecuária de corte a sua mais importante atividade econômica com um rebanho de aproximadamente 3,8 milhões de cabeças (Cadavid Garcia, 1996). A região, é uma imensa planície sedimentar com área de 139.558 km², abrangendo os Estados do Mato Grosso (35,36%) e Mato Grosso do Sul (64,64%) (Silva et al., 2001).

O manejo reprodutivo dos bovinos da região utiliza principalmente touros Nelore, puros ou cruzados com outras raças zebuínas, sendo a maioria deles provenientes de descarte de áreas criadoras nas margens da planície ou, em maior frequência, escolhidos dentre os tourinhos do próprio rebanho (Rosa & Melo, 1995). Nestes animais raramente é feito o exame andrológico, teste de libido ou diagnóstico de doenças venéreas ou doenças que interfiram na

reprodução, com exceção da Brucelose. A relação touro: vaca adotada no Pantanal varia de 1:10 a 1:17 que se configura numa condição restritiva para a aquisição de touros melhoradores (Rosa & Melo, 1995).

No Pantanal, a inseminação artificial é de uso limitado, devido aos problemas relacionados a infra-estrutura e carência de mão-de-obra qualificada, o que reforça a necessidade de uma boa seleção do reprodutor (Rosa, 1997).

A Campilobacteriose Genital Bovina é uma doença venérea causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* caracterizada principalmente por infertilidade e mortalidade embrionária evidenciadas pela repetição de cio, a intervalos irregulares e aborto. (Dekeyser, 1984). O touro é portador assintomático do *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, albergando-o na mucosa prepucial e sob condições naturais pode transmiti-lo pelo coito ou pelo sêmen contaminado a praticamente todas as fêmeas susceptíveis (Garcia & Brooks, 1993).

A ocorrência de Campilobacteriose Genital Bovina tanto em touros quanto em vacas já foi relatada em várias regiões do país, apresentando índices de infecção de 8 a 72,3% (Lage & Leite, 2000). Entretanto, os dados relativos ao Pantanal são muito escassos (Pellegrin et al., 1998).

O presente estudo teve por objetivos estimar a prevalência de Campilobacteriose Genital Bovina em touros do Pantanal Sul Mato-grossense e avaliar o efeito da idade dos animais e do tamanho da propriedade nos índices encontrados.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Amostragem

Para a determinação da prevalência da Campilobacteriose Genital Bovina no Pantanal Sul Mato-grossense, foi utilizada a amostragem por conglomerado, utilizando-se uma prevalência estimada de 56% (Pellegrin et al. 1998), 95% de confiança e 11% de erro (Bennet et al., 1991). A opção recaiu sobre uma amostragem por conglomerado em relação a

uma amostragem simples pelas características da região, onde não existe um cadastro geral de animais que possam ser individualizados para um sorteio em uma amostragem aleatória simples. Uma amostragem simples iria requerer visitas a um grande número de propriedades e a necessidade de perfazer grandes distâncias, onerando demasiadamente os custos do inquérito. A média de animais amostrados por conglomerado foi estimada em 20. Para o cálculo do efeito de delineamento foi utilizado um coeficiente de correlação intraconglomerado de 0.20 (Otte & Gumm, 1997).

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com Cochran (1977), utilizando-se a fórmula:

$$n = (t \cdot s^2 / L)^2$$

onde:

t = 1,96 (valor de Z para 95% de nível de confiança);

L a precisão absoluta representada por 11%.

s é o desvio padrão calculado para a amostragem aleatória simples: $s^2 = \sqrt{P(1-P)}$

A correção para amostragem por conglomerado utilizou a fórmula (Cochran, 1977): $1 + (m-1) \rho$

O número de conglomerados foi calculado utilizando-se a fórmula (Otte & Gumm, 1977):

$$c = \frac{P(1-P)D}{s^2 n}$$

onde:

Onde:

c é o número de conglomerados;

P é a prevalência esperada (56 %);

D é o efeito de delineamento;

s é o desvio padrão

n é o nº de animais por conglomerado (20)

Isto resultou numa amostra de 380 animais em 19 propriedades. As propriedades foram

escolhidas por sorteio dentre aquelas cadastradas na EMBRAPA-Pantanal. Foram coletadas amostras em 19 propriedades do Pantanal Sul-Mato-grossense.

3.2.2. Lavados Prepuciais

Os lavados prepuciais foram coletados segundo Leite et al. (1995) em solução salina fostatada (PBS, pH 7.4) e armazenados a 4° C até o momento do exame. As coletas foram realizadas após um período de repouso sexual de, no mínimo, 15 dias.

3.2.3. Imunofluorescência Direta

A imunofluorescência direta (IFD) foi realizada conforme as recomendações de Mellick et al. (1963) e Winter et al. (1967). Os lavados prepuciais foram submetidos a duas centrifugações: a primeira a 600 x g, por 10 min, obtendo-se um sobrenadante que era então centrifugado a 13000 x g por 30 min. O sedimento da segunda centrifugação foi ressuspendido em PBS (pH 7.4), homogenizado e 20 µl da suspensão foram então colocados, em duplicata, nas demarcações da lâmina para imunofluorescência. As lâminas foram secas na temperatura ambiente e fixadas em acetona a -20° C por 30 min. Após a fixação as lâminas foram cobertas com 20 µl de uma diluição 1/128 de soro anti-*C. fetus* subsp. *venerelialis* preparado em coelho com a amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 e conjugado com fluoresceína (Sigma, USA) segundo Ruckerbauer et al. (1974). Após incubação por 30 min à 37° C em câmara úmida, as lâminas foram submetidas a três lavagens com PBS (pH 7.4) por 10 min, para a retirada do excesso de conjugado. Para a montagem das lâminas foi utilizada glicerina tamponada (pH 9.2) e o material foi coberto com lamínula. Como controle positivo foi utilizado o *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 cultivado em ágar BHI (Difco, USA) por 48 h à 37° C em atmosfera de microaerofilia. Os esfregaços foram examinados em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Germany) com objetivas de 40x e 100x. Foram considerados positivos os lavados prepuciais que apresentavam bactérias fluorescentes com morfologia típica de *C. fetus*, ou seja, bactérias espiraladas em forma de "S", vírgula ou asa de gaivota.

3.2.4. Área das propriedades e idade dos animais

Para se estudar o efeito da área das propriedades (Tab 1) na frequência de animais positivos à IFD para *C. fetus*, as propriedades foram agrupadas em duas categorias: < 15.000 e ≥ 15.000 ha.

A influência da idade na frequência de animais positivos para *C. fetus* à IFD foi estudada em 90 animais provenientes de 3 propriedades, que foram agrupado em duas categorias: maior de 6 anos e menor ou igual a 6 anos, considerando-se que, no Pantanal, a maior frequência de touros encontra-se nesta faixa etária (Pellegrin et al., 1998).

3.2.5. Análise Estatística

A prevalência, o intervalo de confiança, o efeito do delineamento e o coeficiente de correlação intraconglomerado foram calculados segundo Putt et al. (1987) e Bennett et al. (1991).

A prevalência real foi estimada de acordo com Martin et al. (1987) ajustando-se o valor de prevalência obtida para uma especificidade de 88.9% e sensibilidade de 92.6% determinadas anteriormente para o teste de imunofluorescência direta (Figueiredo, 2001).

A distribuição de frequência de touros positivos à IFD para *C. fetus* nas diversas categorias de idade e área de propriedade foram analisados pelo teste do Qui-quadrado, empregando-se erro $\alpha = 0,05$ (Sampaio, 1998) e o Risco Relativo estimado (Martin et al., 1987).

3.3. RESULTADOS

Das 380 amostras previstas, apenas 327 lavados prepuciais foram processados, pois houve perda de amostras durante o transporte até o laboratório e em algumas propriedades não foi possível amostrar 20 touros. Lavados prepuciais de 171 animais (52.3%) foram positivos à IFD para *C. fetus* com um intervalo de confiança de 95% entre 42.6% e 62.0% (Tab. 1).

A prevalência real foi estimada em 51.65, o que está dentro do intervalo de confiança calculado.

O efeito de delineamento (D) e o coeficiente de correlação intraconglomerado (ρ) encontrados foram respectivamente 3.20 e 0.14.

Foi observada diferença entre a frequência de touros positivos à IFD para *C. fetus* entre as duas categorias de área de propriedades ($\chi^2=6.40$; gl= 1; P= 0.011) (Tab. 2). O Risco relativo foi estimado em 1.33 (1.07 <RR <1.66).

Não houve diferença significativa na suscetibilidade a infecção considerando animais com idade superior ou inferior a 6 anos. ($\chi^2=1.24$; P= 0.26, gl = 1) (Tab. 3).

3.4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que no Pantanal Mato-grossense a Campilobacteriose Genital Bovina é bastante freqüente em touros de corte utilizados na monta natural, sendo a prevalência de 52.3% (IC 95%: 42.6% - 62.0%) mais elevada que em outras regiões do país (Genovez et al., 1996; Lage et al., 1997, Jesus et al., 1999). Entretanto, embora alguns resultados sejam similares, em alguns casos eles não são comparáveis visto que alguns autores utilizaram tipos de amostragem não probabilística por demanda (Lage et al., 1997) ou exclusivamente em rebanhos com histórico recente da doença (Jesus et al., 1999).

Na Argentina, onde o manejo reprodutivo em sua grande parte é por monta natural, semelhante ao empregado no Brasil, a Campilobacteriose Genital Bovina também se apresenta bem distribuída com índices de rebanhos positivos que variam de 21 à 43% e de touros portadores do *C. fetus* subsp. *venerealis* variando entre 15 e 23% (Vilar & Spina, 1982; Cipolla et al., 1984; Soto e Di Roco, 1984).

A sensibilidade e especificidade da técnica de IFD, estimadas em 92,6 e 88,9% (Figueiredo, 2001), tornam a técnica extremamente adequada para uso em testes de triagem de populações.

A sensibilidade do diagnóstico, tanto por isolamento quanto pela imunofluorescência direta está diretamente relacionada ao método e frequência de coleta e, principalmente, ao

acondicionamento e transporte do material (Stoessel, 1982). As coletas repetidas no mesmo animal diminuem a probabilidade de um resultado falso negativo (Stoessel, 1982). Dessa forma tem sido recomendado que para se obter uma sensibilidade máxima na imunofluorescência direta, eliminando a possibilidade de um resultado falso negativo, devem ser efetuadas três coletas repetidas no mesmo animal, em intervalos quinzenais, com o animal em repouso sexual prévio e entre as coletas (Lage & Leite, 2000).

Neste experimento, entretanto, a prevalência aparente (52.3%) não foi superestimada, uma vez que a prevalência real, de 51.65%, ficou dentro do intervalo de confiança calculado (IC 95%: 42.6 - 62%), por ter sido utilizada uma precisão mais flexível (11%) para a estimativa da prevalência.

Os estudos de prevalência podem ser baseados no exame de um grupo de animais em determinado momento (prevalência no ponto) ou no exame de grupos de animais durante um intervalo de tempo (prevalência no período). Ambos são expressões válidas de prevalência fornecendo tão somente informações sobre o risco de um animal naquela população ser acometido pela doença (Smith, 1984). Neste experimento, foi estimada a prevalência no período, sendo amostradas as 19 propriedades no intervalo de tempo compreendido entre abril de 1995 e novembro de 1996, com exceção do intervalo entre dezembro a março, onde não foram realizadas coletas pela impossibilidade de acesso as propriedades, causada pela cheia na região.

Na região do Pantanal, a maioria das propriedades não utiliza estação de monta, permanecendo os touros com as matrizes durante o ano inteiro (Tullio, 1986). Apesar disso, existem picos de parição que, normalmente, sugerem a existência de uma estação natural de coberturas na primavera e início do verão, de outubro a janeiro (Almeida et al., 1996), provavelmente coincidindo com a maior oferta de pastagens que permite às vacas ganharem peso e entrarem em cio. As coletas realizadas no experimento ocorreram principalmente nos meses de outono e inverno, aproveitando tanto o período natural de repouso sexual dos touros quanto as facilidades de

locomoção, uma vez que só nesta época é possível o acesso terrestre a todas as propriedades.

Os touros, no presente experimento foram amostrados apenas uma vez, devido a ausência de identificação dos animais, dificuldades de manejo e aumento dos custos do experimento, decorrentes do retorno à propriedade. A prevalência encontrada poderia, portanto, ter sido superior, se dois ou três lavados prepuciais tivessem sido coletados de cada animal (Stoessel, 1982).

O valor de ρ encontrado neste trabalho está próximo ao índice estimado por Otte & Gumm (1997) para doenças moderadamente contagiosas, confirmando que o valor de ρ de 0,20 é uma boa estimativa para se utilizar no cálculo do tamanho de amostra (número de conglomerados) quando o verdadeiro ρ não é conhecido. Por outro lado, McDermott & Schukken (1994) indicaram que a amplitude do coeficiente de correlação intraconglomerado pode variar de 0,0017 a 0,46, embora para a maioria das doenças esteja entre 0,01 e 0,15, o que confirma o sugerido por Otte & Gumm (1997) e o que foi encontrado neste trabalho, significando, na prática, que a Campilobacteriose Genital Bovina se distribui homogeneamente na população na região, com alta taxa de rebanhos positivos.

O coeficiente de correlação intraconglomerado também influenciou o cálculo de intervalo de confiança de 95%, que teve maior precisão (9,7%) que a inicialmente utilizada para o cálculo do número de conglomerados.

Como a Campilobacteriose Genital Bovina é uma doença que está relacionada a certas práticas de manejo, como a monta natural, é compreensível que em propriedades que utilizam a monta natural seja maior a sua prevalência. Isto foi o observado no presente estudo, em que todas as propriedades se serviam da monta natural.

O efeito de delineamento, que é calculado em função do erro amostral, que é maior na amostragem por conglomerado (Bennett et al. 1991), foi influenciado pelo número de conglomerados amostrados e pela amostragem

de tamanho irregular dentro de cada um, em virtude da perda de material entre a coleta e a chegada ao laboratório e das dificuldades de se reunir, ao mesmo tempo, 20 touros em algumas propriedades.

A execução de estudos epidemiológicos no Pantanal que requeiram extensas amostragens, principalmente em número de propriedades, esbarra em problemas de transporte do material. O trajeto entre a sede do município e as propriedades é percorrido em vias não pavimentadas ou mesmo trilhas, o que aumenta o tempo necessário para o acesso aos locais de coleta, impedindo que várias propriedades sejam visitadas em curto espaço de tempo, aumentando os custos de amostragem. Outro agravante é que a falta de energia elétrica na região torna difícil o armazenamento do material sob refrigeração, sendo necessário o transporte de gelo, rapidamente perecível, do laboratório até a propriedade, para o acondicionamento do material coletado à temperatura ideal. Isto sugere, como observado neste estudo, que altos valores para o efeito de delineamento devem ser utilizados no cálculo de amostras para estudos a serem realizados na região.

Em duas propriedades não foram encontrados touros infectados e esta amostragem reduzida foi provavelmente insuficiente para a detecção da doença naquelas propriedades. Esta alta frequência de propriedades com animais infectados mostra mais uma vez que a Campilobacteriose Genital Bovina está amplamente distribuída na região.

A prevalência da Campilobacteriose Genital Bovina na Argentina (Soto & Di Roco, 1984) variou também de acordo com a fertilidade dos rebanhos sendo de 65,2% em propriedades com problemas de fertilidade e 35,2% em propriedades de fertilidade desconhecida, tendo os autores considerado que a Campilobacteriose Genital Bovina estava influenciando diretamente este índice reprodutivo. Nas propriedades estudadas no Pantanal, todavia, não foi considerada a taxa de fertilidade dos rebanhos por ser um índice parcialmente desconhecido, uma vez que o diagnóstico de gestação não é prática de rotina na região. No Pantanal Mato-grossense, a taxa de natalidade é estimada pela observação do número de fêmeas

em lactação ou com bezerro ao pé, entretanto a mortalidade perinatal também é desconhecida, pois os animais abortados, bezerros fracos ou que morrem ao nascer são rapidamente predados pela ação dos carnívoros selvagens existentes na região.

A fertilidade do rebanho pode ser sensivelmente reduzida pela presença de touros infectados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* (Newsan, 1960). Na avaliação de um grupo de novilhas virgens cobertas por touros infectados realizada na mesma região (Pellegrin, 2001) foi observada também uma baixa taxa de parição, com 59,3% de nascimentos e taxa de prenhez aos 90 e 120 dias de 37 e 63%, respectivamente.

O efeito do tamanho das propriedades sobre a ocorrência de touros positivos provavelmente está relacionado ao número de touros utilizados na propriedade e o número de subdivisões das propriedades. Foi observado por Cadavid Garcia (1986) que propriedades com área entre 1000 e 3600 ha possuem um número médio de 4 subdivisões enquanto que naquelas acima de 14400 ha este número é de 8,17, o que significa que o tamanho da propriedade quadruplica mas o número de subdivisões não cresce proporcionalmente. Nas propriedades entre 1000 e 3600 ha observa-se um número médio de vacas de cria e touros de, respectivamente, 325 e 30, enquanto que nas propriedades com área acima de 14400 ha este número se eleva para 3210 e 224. Dessa forma, como no Pantanal é utilizado o acasalamento múltiplo, as propriedades maiores utilizam praticamente o dobro do número de touros por subdivisão que as propriedades menores. Há também um aumento proporcional no número de touros velhos (>8 anos), estimado em 25% do total de touros da propriedade (Tab. 3), o que possivelmente também ocorre no restante das propriedades amostradas, uma vez que pela falta de identificação dos animais não foi possível a obtenção deste dado em todas elas. Como os touros mais velhos exercem uma dominância social no rebanho (Barling et al., 1997),

cobrindo um maior número de fêmeas, isto pode aumentar o risco de infecção pelo *Campylobacter fetus* (Phillpot, 1968; Clark, 1971; Soto & Dick, 1983).

Os touros mais velhos têm maior susceptibilidade à infecção pelo *C. fetus* principalmente pelo aumento das criptas prepúciais, o que otimiza as condições de microaerofilia necessárias à sobrevivência do agente no prepúcio (Clark, 1971). Embora possa haver em alguns casos uma relação direta entre idade dos animais e infecção pelo *C. fetus* (Phillpot, 1968; Clark, 1971; Soto & Dick, 1983) isso nem sempre tem sido observado (McCool et al., 1988; Bier et al., 1977), provavelmente por se considerar jovens os touros com 2 a 3 anos, uma vez que 50% dos tourinhos são introduzidos no Pantanal com 30 meses. Um touro com idade igual ou superior a 5 anos já realizou coberturas em no mínimo dois períodos de estação de monta (Rosa & Melo, 1995), sendo considerado ainda um touro jovem. Os dados obtidos em três das propriedades testadas não indicaram diferença significativa entre frequência de infecção em touros velhos e jovens, talvez pelo fato de que no Pantanal os touros mais jovens efetivamente iniciem a monta entre 3,5 e 4 anos de idade, quando provavelmente as criptas prepúciais já estejam bem desenvolvidas.

A alta prevalência observada nos rebanhos estudados sugere que a Campilobacteriose Genital Bovina participe como uma das principais doenças responsáveis pelos baixos índices reprodutivos dos rebanhos bovinos do Pantanal (Cadavid Garcia, 1986; Almeida et al., 1996). Além disso, leva à necessidade de um maior contingente de reprodutores no rebanho, uma vez que uma vaca infectada pode requerer várias coberturas para ficar prenhe (Leite, 1977), elevando o custo de produção, o intervalo entre partos e a idade da primeira cria, contribuindo assim para diminuir a rentabilidade da exploração pecuária na região.

Tabela 1. Frequência de touros positivos à imunofluorescência direta para *Campylobacter fetus* em propriedades do Pantanal Mato-grossense e área das propriedades amostradas.

Propriedade	Tamanho (ha)	Imunofluorescência Direta		
		Animais Testados	Positivos	%
F1	6.732	9	4	44,4
F2	20.000	19	9	47,3
F3	12.300	19	12	63,2
F4	14.600	7	1	14,3
F5	112.000	44	33	75,0
F6	9.000	2	1	50,0
F7	36.700	2	0	0,0
F8	16.400	19	12	63,2
F9	13.781	2	0	0,0
F10	1.800	9	3	33,0
F11	25.500	18	13	72,2
F12	21.000	31	11	35,5
F13	4.400	39	20	51,3
F14	25.000	15	11	73,3
F15	14.300	19	10	52,6
F16	26.000	12	4	33,3
F17	29422	20	13	65,0
F18	9600	21	3	14,3
F19	14000	20	11	55,0
Total	412535	327	171	52,3

95% IC (42.6%- 62%)

Tabela 2. Frequência de touros positivos à imunofluorescência direta para *C. fetus* segundo a área das propriedades.

Área (ha)	Negativos	Positivos
≤15.000	82	65
>15.000	74	106
Total	327	171

$\chi^2 = 6,40$; gl= 1; P= 0,011; RR =1,33 [(1,07< RR < 1,66)]

Tabela 3. Frequência de touros positivos à imunofluorescência direta para *C. fetus* nas diferentes faixas etárias em três propriedades da sub-região da Nhecolândia do Pantanal Mato-grossense.

Idade(anos)	Imunofluorescência Direta		
	Positivos	Negativos	Total (%)
≤ 6	20	8	28
> 6	35	27	62
Total	55	35	90

$\chi^2 = 1,24$; P = 0,26, gl = 1

3.5.AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Embrapa Pantanal, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig e da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva – FEP/MVZ Coordenação

Preventiva e dos produtores de gado de corte do Pantanal

O apoio logístico nas coletas de material foi dado pelos operários rurais e técnicos agrícolas da Embrapa Pantanal.

4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO E “IMUNOBLOTTING” PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS A ANTI- *CAMPYLOBACTER FETUS* EM MUCO CÉRVICO - VAGINAL DE FÊMEAS BOVINAS

Pellegrin, A.O.^{1,2*}, Figueiredo, J.F.², Barbosa, E.F.³, Leite, R.C.² Lage, A.P.²

1 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal

Rua 21 de setembro, 1880

79320-900 - Corumbá- MS

Correio eletrônico: aiesca@cpap.embrapa.br

2 - Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia Aplicada

Núcleo de Pesquisa em Saúde Animal

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627 - Caixa Postal 567

30123-970 – Belo Horizonte – MG

Fax: (31) 34 99 20 80

3- Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

* Autor para correspondência

RESUMO

Foi padronizado um ensaio imunoenzimático do tipo indireto para detecção de imunoglobulina A (ELISA IgA) anti- *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em muco cérvico- vaginal bovino utilizando um extrato proteico de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* produzido pelo método de extração ácida pelo tampão de glicina (0,2M; pH2,2). A média dos valores de densidade ótica (DO₄₅₀) foi de 0,143±0,09. As bandas proteicas dos antígenos de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* melhor reconhecidas pela IgA do muco cérvico- vaginal migraram em 42,6 kDa mas a proteína evidenciada em 93 kDa foi reconhecida exclusivamente pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Os anticorpos presentes na amostra de muco vaginal testada no “immunoblotting” que apresentou resultado positivo no ELISA IgA, reconheceu antígenos de *C. jejuni* subsp. *jejuni* e *C. fetus* subsp. *fetus*.

SUMMARY

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay was developed to detect antigen specific secretory IgA antibodies to *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in bovine vaginal mucus with a proteic extract of the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* by the acid glicine extraction method. Mean of optical density measurements ($\lambda=450$ nm) was 0,143 ±0,09. The most immunoreactive proteic bands of the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* or *Campylobacter fetus* subsp *fetus* recognized by IgA in “immunoblotting”, using bovine vaginal mucus samples migrate on 42,6kDa and the protein that migrate at 93 kDa was recognized exclusively by *C. fetus* subsp. *venerealis*. A positive vaginal mucus of a cow from negative herd recognized antigens of *C. jejuni* subsp. *jejuni* e *C. fetus* subsp. *fetus*.

4.1. INTRODUÇÃO

A Campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma enfermidade específica da reprodução que pode causar morte embrionária produzindo cios irregulares, e, em menor número, abortos (Dekeyser, 1986). A imunidade contra a Campilobacteriose Genital Bovina é basicamente local, com a produção de imunoglobulinas da classe IgA na mucosa vaginal e uterina, investigada em fêmeas bovinas tanto infectadas de forma natural quanto experimentalmente (Corbeil et al., 1974b).

Na cinética da imunidade contra o *C. fetus* na mucosa vaginal já foi observado que a classe de imunoglobulinas que aparece inicialmente em novilhas infectadas experimentalmente é a IgM, seguida da IgA, e por último da IgG1 (Corbeil et al. 1974a, Corbeil et al., 1974b, Van Aert et al., 1977). Em novilhas infectadas por via vaginal o aparecimento das classes IgM e IgA é quase simultâneo, precedendo a IgG1, que ocorre aproximadamente na 8ª semana pós infecção. Isto indica a importância da imunidade conferida pela IgA para a resistência a infecção natural pelo *C. fetus*, uma vez que, em fêmeas imunizadas por via sistêmica as classes de imunoglobulinas que ocorrem são a IgM, a IgG1 e IgG2 (Corbeil et al. 1974a).

Dentre as técnicas sorológicas usadas para detecção de resposta imune o ensaio imunoenzimático é amplamente aceito como uma das técnicas mais sensíveis e portanto um teste muito conveniente para utilização em laboratório. No entanto esta sensibilidade e especificidade dependem basicamente da preparação do antígeno utilizado no teste (Hirschl & Rotter, 1990) e do ponto de corte estabelecido (Smith, 1994).

Vários autores tem utilizado na fase sólida do ensaio imunoenzimático antígenos obtidos por extração ácida (Dunn et al.: 1987; Blaser et al., 1983) através de sonicação (Dunn et al., 1987; Hewson, 1985) ou por extração com água destilada (Garcia et al., 1995). Estes antígenos, que podem ser classificados como antígenos parcialmente purificados e produzem testes de elevada sensibilidade e especificidade, em contraste aos antígenos não purificados que apresentam menor especificidade, e aos

altamente purificados, que tem menor sensibilidade (Hirschl & Rotter, 1990).

A utilização de um ensaio imunoenzimático para detecção de fêmeas portadoras de *C. fetus* subsp. *venerealis* já foi descrito anteriormente, sendo este teste indicado como mais sensível que o teste de muco-aglutinação para a detecção de imunoglobulinas da classe G anti-*Campylobacter fetus* em estágios recentes de infecção (Hewson, 1985). Por outro lado, ele apresenta boa especificidade na detecção de imunoglobulinas A específicos em fêmeas bovinas que abortaram como resultado da infecção natural pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* (Hum et al., 1991).

Os objetivos deste trabalho foram padronizar um ensaio imunoenzimático, comparando um antígeno de extração ácida por tampão glicina e um antígeno sonicado para uso na fase sólida, na detecção de imunoglobulinas A anti-*C. fetus* e avaliar a resposta imune humoral em muco cérvico vaginal de novilhas virgens.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Coleta de muco cérvico- vaginal

Para a coleta de muco cérvico- vaginal utilizou-se um tampão absorvente (Sempre Livre, Johnson & Johnson, São Paulo) previamente pesado, que foi introduzido na vagina dos animais com o auxílio de um tubo metálico e aplicador acoplado sendo deixado na parede da cavidade vaginal por, no mínimo, 30 min, para saturação (Fernandes & Gomes, 1992). O tampão foi então colocado em frasco estéril e transportado em gelo para o laboratório, onde foi pesado e o peso da amostra anotado para posterior cálculo da quantidade de diluente (PBS + 0.05% Tween 20, pH 7.4) a ser utilizado para se obter uma diluição inicial 1/10. Após a adição do diluente, o tampão foi comprimido com bastão de vidro estéril para retirada do muco cérvico- vaginal, que foi dividido em alíquotas e mantido sob refrigeração até o momento do uso.

4.2.2. Animais

Foram coletadas amostras de muco cérvico- vaginal de 44 novilhas virgens, com idade entre

12 e 24 meses oriundas de rebanho livre de Campilobacteriose Genital Bovina, cujo manejo reprodutivo era exclusivamente por inseminação artificial.

4.2.3. Amostras de referência e condições de cultivo

As amostras *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 (sorotipo A) e *C. fetus* subsp. ATCC 27354 (sorotipo B) e de *C. jejuni* subsp. *jejuni* : NCTC 11351 foram utilizadas na produção de antígeno. As amostras foram cultivadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion, Difco, USA) com 10% de sangue equino por 48 horas à 37° C, em atmosfera de microaerofilia contendo (85% N₂, 10%CO₂ e 5% O₂)

4.2.4. Antígeno produzido por extração ácida em tampão glicina (pH 2.2)

Para produção do antígeno por extração ácida foi utilizado o procedimento proposto por McCoy et al. (1975). Após cultivo as colônias foram retiradas das placas com PBS (pH 7.4) e lavadas com o mesmo tampão por três vezes consecutivas em centrífuga à 10.000 X g por 20 minutos, em temperatura de 4° C. Após a terceira lavagem o sedimento foi suspenso em tampão glicina-HCl (0.2 M, pH 2.2), obedecendo uma proporção de 100 µl de tampão para 4 µg de massa bacteriana úmida e colocada sob agitação por 30 minutos. A suspensão foi novamente centrifugada a 13.000 X g, por 20 min e o sobrenadante dializado contra água destilada e deionizada por 48 horas e posteriormente concentrado aproximadamente 10 vezes em gradiente de sacarose. A proteína foi estimada pelo método de Lowry (Sambrook, 1989) utilizando-se albumina bovina (Sigma, USA) como padrão. Posteriormente, o antígeno de extração ácida em tampão glicina foi dividido em alíquotas e armazenado a -20° C.

4.2.5. Antígeno sonicado

O antígeno sonicado foi preparado segundo protocolo descrito por Hewson (1985), reduzindo-se o tempo de incubação da amostra de 72 para 48 horas, em condições de cultivo já descritas anteriormente, utilizando-se uma amostra padrão de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (NCTC10354).

O cultivo foi recolhido do meio com salina fosfatada tamponada (PBS, pH 7.4) utilizando-se alça de Drigalski e lavado por centrifugação utilizando-se uma força centrífuga de 13.000 X g por 20 min, por 3 vezes, recolhendo-se o sedimento a cada lavagem. Após a 3ª lavagem o sedimento foi ressuspensionado em 10 ml de um tampão contendo cloreto de potássio 0.5M e 0.1% (vol/vol) de hidrocloreto de cisteína. O material foi submetido a sonicação durante 6 ciclos de 30 seg, com intervalos de repouso por 1 min e 70-80Hz de potência. Posteriormente o material foi concentrado e alíquotado.

4.2.6. Procedimento da técnica

O antígeno de extração ácida foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 (Voller, 1979) e adsorvido na placa (Maxisorp, Nunc) durante 18 h à 4° C, em câmara úmida. Após a lavagem da placa esta foi tratada com PBS Tween 20 (0.05%) (PBST) acrescido de 5% de leite em pó desnatado por 30 min à 37°C para bloqueio de sítios inespecíficos.

Os tempos e temperaturas de incubação utilizados foram: para a amostra (muco cérvico-vaginal) de 1h à 37° C, em câmara úmida; para o conjugado, 1h à 37° c, câmara úmida e para o substrato de 15 min, à temperatura ambiente em ambiente escuro. Para as etapas de lavagem foi utilizado o PBST acrescido de 1% de leite em pó desnatado. Para a padronização do teste foi utilizado o método de titulação em bloco em que foram testadas duas concentrações de antígeno (500 e 250ng/100ul) e duas diluições de conjugado anti IgA bovina, conjugada a peroxidase (Bethyl) nas diluições 1/10.000 e 1/20.000 com a diluição 1/50 de muco cérvico-vaginal que, testada anteriormente, foi selecionada como a mais adequada. Foi utilizado o 3, 3',5, 5'-Tetramethylbenzidina (TMB, Sigma, USA) como substrato cromogênico e H₂SO₄ 1M como solução de parada da reação, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro com filtro de 450nm. Os melhores resultados foram obtidos com as diluições de 250ng para o antígeno e 1/10.000 do conjugado anti-IgA, com o muco diluído 1/50.

4.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Foi utilizado 10µg do antígeno produzido por extração ácida, de cada uma das espécies de *Campylobacter* sp (*C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis*; *C. jejuni* subsp. *jejuni*) estudadas, em cada canaleta, e os componentes proteicos dos antígenos foram separados eletroforéticamente através do sistema descrito por Laemmli (1970).

Os géis de concentração e separação foram preparados com 6% e 12% de poliacrilamida e a técnica foi executada em um equipamento Mini Protean (Bio Rad, USA), utilizando 110V e amperagem variável, durante 1h e 40min. Para a comparação do peso molecular das proteínas foi utilizado um padrão de peso molecular Low Range (BioRad, USA) ou Broad Range (BioRad, USA), conforme o caso. Os géis foram corados pelo método do Azul de Coomassie (Sambrook et al., 1989).

Os géis foram desidratados, fotografados e analisados pelo "software" TotalLab (Amersham Pharmacia Biotech, Bélgica) e os pesos moleculares determinados pela intensidade dos "pixels" das bandas proteicas, em comparação com pesos moleculares conhecidos.

4.2.8. "Imunoblotting"

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Sigma, USA) utilizando-se o tampão Tris glicina, contendo 20% de metanol, em sistema Transblot (BioRad, USA) por 1h30min à 100V (Bjerrum & Heegaard, 1988). Após a transferência, os sítios inespecíficos foram bloqueados com Tampão Tris-NaCl Tween 20 (0,05%) (TBS) contendo 5% de leite em pó desnatado por 18 h, à 4° C. Previamente, foram testadas várias diluições de muco cérvico vaginal, 1/10; 1/20, 1:25, 1:50 e a melhor diluição selecionada para utilização no "imunoblotting". Para o reconhecimento das proteínas dos antígenos foi utilizado como controle positivo uma mistura de muco cérvico-vaginal de dez animais positivos no teste de ELISA IgA, diluída 1/10 em TBS e como controle negativo uma mistura de muco cérvico

vaginal de dez animais negativos ao Elisa IgA, amostrados dentre as novilhas virgens utilizadas como controle negativo.

O conjugado anti-IgA bovina Peroxidase (Bethyl, USA), foi empregado em diluição 1/1000 e o substrato utilizado foi o 4-cloronaftol (Sigma, USA). Os tempos de reação utilizados foram respectivamente 1h e 30min para o anticorpo, 1h para o conjugado e 10 min para o substrato, sendo que entre cada uma das fases de reação foram efetuadas três lavagens, de 10 min cada, da membrana com tampão TBS.

4.2.9. Análise estatística

As preparações antigênicas utilizadas foram comparadas através da análise da variância para delineamento em blocos ao acaso ($P \leq 0.05$) e as preparações ácidas, utilizando diferentes antígenos foram comparadas através da análise da variância para delineamento inteiramente ao acaso ($P \leq 0.05$) (Sampaio, 1998).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Padronização do Elisa IgA e comparação entre diferentes preparações antigênicas.

Pela titulação em bloco verificou-se que os melhores resultados foram obtidos com 250ng/100µl de antígeno, diluição de 1/50 para a amostra de muco cérvico-vaginal e de 1/10000 para o conjugado.

O ponto de corte foi calculado pela média dos resultados obtidos em amostras de muco cérvico-vaginal de 44 novilhas virgens (0,143 DO_{450}) acrescido de dois desvios padrão (0,09 DO_{450}), portanto foram consideradas positivas as amostras que apresentaram leituras a 450nm igual ou superior a 0.323.

Para a comparação dos antígenos sonificado e de extração ácida, 36 amostras de muco cérvico-vaginal foram escolhidas ao acaso e testadas no Elisa IgA, utilizando preparações antigênicas produzido pela extração ácida em tampão glicina e extrato sonificado. Os resultados demonstraram não haver diferença significativa ($p > 0.05$) entre os valores de absorvância de cada antígeno, dentro de fazendas positivas ou

negativas, sendo que a diferença entre as médias foi de 0,3806 e 0,3391 respectivamente e a diferença mínima significativa calculada (dms) foi de 0,150 DO_{450} , menor que a diferença entre as médias dos dois antígenos, que foi de 0,0415 DO_{450} . O antígeno produzido mediante a extração glicínica ácida, foi utilizado para avaliar a resposta humoral de novilhas virgens pela sua facilidade de produção, em relação ao sonificado e pelos resultados obtidos com ambos serem similares.

4.3.2. Comparação entre preparações antigênicas de *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. jejuni* subsp. *jejuni*.

Na fase sólida do ensaio de comparação foram utilizados antígenos obtidos por extração ácida da espécie *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. jejuni* subsp. *jejuni*, respectivamente, em diferentes placas de poliestireno "Maxisorb" com 96 cavidades (Nunc, USA). Foram obtidas médias gerais das leituras de densidade ótica de 0,253, 0,226 e 0,209 respectivamente, para o *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. jejuni* subsp. *jejuni*, sendo a diferença mínima significativa calculada de 0,027. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na detecção de imunoglobulinas A quando utilizado o *C. fetus* subsp. *venerealis* comparando-se com as demais amostras mas esta diferença não foi observada quando comparados o *C. fetus* subsp. *fetus* e o *C. jejuni* subsp. *jejuni* ($p > 0,05$).

4.3.3. Eletroforese e reconhecimento das proteínas dos antígenos de *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. jejuni* subsp. *jejuni* através do "immunoblotting"

O perfil do antígeno sonificado (Fig. 1) produzido com a amostra NCTC 10354 demonstrou a presença de várias bandas proteicas de diferentes intensidades, com peso molecular entre 131,7 e 24,8, sendo que as mais evidentes migraram em 90,8, 57,5, 49,0, 45,5, 40,0 e 36,4, utilizando-se como padrão de peso molecular o Broad Range (BioRad, USA).

Na canaleta 1, da Fig. 2, pode ser observado o antígeno de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 obtido por extração ácida, com tampão de glicina (pH 2,2). Neste antígeno as bandas mais evidentes migraram em 93, 56,6, 42,8,

40,1, 32,8, 28,9 e 25,7 kDa. No antígeno de *C. fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374 (Fig 1, can.2) foram detectadas visualmente 10 bandas proteicas entre 56,7 e 25,8 kDa. As mais evidenciadas apareceram entre 45 e 31 (42,8, 40,1 e 37,8 kDa) e imediatamente abaixo (28,5 e 25,8 kDa). Analisando-se conjuntamente estes dois antígenos podem ser observadas várias proteínas com peso molecular semelhante, migrando em 56,7, 42,8, 40,1, 25,8 e 25,7 kDa, dentre as que são visualmente mais distintas.

Na canaleta 1, da Fig. 3, no antígeno de *C. jejuni* subsp. *jejuni* NCTC1135, foram observadas 11 bandas distintas variando entre 84,5 kDa e 24,8 kDa, sendo que as maiores bandas migraram em 84,5, 58,9, 53,6, 49,5, 37,4, 34,2, 26,4 e 24,8 kDa, embora a análise tenha demonstrado a existência de bandas em 41,7, 32,4 e 27,8 kDa.

No "immunoblotting" houve reconhecimento pelas imunoglobulinas A do muco-cérvico vaginal, de sete proteínas do antígeno de *C. fetus* subsp. *venerealis* que migraram, principalmente em 93, 56,7, 49,8, 40,1, 36,0 e 28,9 kDa e uma banda intermediária entre 28,9 e 25,7 kDa, quando o muco cérvico vaginal foi diluído 1:10 (4-A), e em maior diluição (1:20) só foram evidenciadas duas bandas principais, de 93 e 43 kDa (Fig. 4-B) No antígeno de *C. fetus* subsp. *fetus* quando testado frente ao muco cérvico vaginal diluído 1:20, foram imunoreativas seis proteínas, de 56,7, 49,6, 42,6, 29,5 e 25,8 kDa, e quando a amostra era diluída somente as proteínas com pesos moleculares de 42,6, 29,5 e 25,8 kDa foram visualizadas na membrana de nitrocelulose (Fig. 4-B). As bandas reconhecidas em ambos os antígenos foram de 56,7 kDa, em torno de 49 kDa (49,8, no Cfv e 49,6 no Cff) e de 29 kDa (28,9 no Cfv e 29,5 no Cff). Abaixo de 25 kDa no *C. fetus* subsp. *venerealis* houve também reconhecimento de várias proteínas.

Uma amostra de muco cérvico-vaginal positivo, no Elisa IgA, proveniente de animais de propriedade leiteira sem histórico de CGB e com manejo por inseminação artificial foi testada frente a preparações antigênicas ácidas produzidas com amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. jejuni* subsp. *jejuni*, por "immunoblotting", em três diluições: 1:25; 1:50 e 1:100, que apresentaram

padrões similares de reconhecimento por anticorpos da classe IgA tanto para o *C. fetus* subsp. *venerealis* quanto para o e o *C. jejuni* subsp. *jejuni*. Na diluição 1:25 foram observadas bandas de 56.7, 42.6, 29.5 e 25.7 kDa em todos os três antígenos e de 42.6 kDa no *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*, que foi, provavelmente representada no *C. jejuni* subsp. *jejuni* pela banda de 41.7 kDa. Quando a diluição foi elevada para 1:50 as bandas de 56.7 e 42.6 kDa continuaram visíveis mas de 29.5 e 25.7 kDa não mais puderam ser observadas. A maior imunoreatividade ocorreu no *C. fetus* subsp. *fetus*, na proteína de 42.6 kDa (Fig 4).

4.4. DISCUSSÃO

O perfil antigênico, demonstrado na eletroforese em gel de poliacrilamida, tanto do antígeno sonicado quanto do extrato ácido apresentaram semelhanças, em proteínas que migraram em torno de 97 kDa e abaixo (93 kDa), e em 63, 42.6, 29 e 25 kDa. Estas proteínas, no "immunoblot", foram imunorreativas, sendo reconhecidas pelas imunoglobulinas A presentes no muco vaginal testado, quando utilizado o extrato ácido de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Isto confirma os resultados semelhantes ($P > 0.05$) obtidos no ensaio imunoenzimático onde foram comparados os antígenos sonicado e extrato ácido quanto a detecção de imunoglobulinas A anti-*Campylobacter fetus* em muco cervice vaginal, indicando desta forma o antígeno sonicado como alternativa para utilização na fase sólida de ensaios imunoenzimáticos que tenham este objetivo.

Uma comparação entre a sensibilidade e especificidade de várias preparações antigênicas (Lewalla-Guruge et al., 1992) na detecção de anticorpos IgG anti-*Helicobacter pylori* concluiu que estas propriedades do teste eram equivalentes para o antígeno de extração ácida e sonicado, o que foi reafirmado neste trabalho.

Para os ensaios utilizados no restante do trabalho foi selecionado o antígeno proteico

obtido pela extração ácida em tampão glicina 0.2M, pH 2.2 (McCoy et al., 1985) indicado, principalmente, pela facilidade de técnica, que dispensou a utilização do sonificador.

A interpretação dos resultados de um ensaio imunoenzimático depende principalmente do ponto de corte estabelecido para o teste e do objetivo do ensaio (Smith, 1994). O Elisa IgA anti *C. fetus* subsp. *venerealis* padronizado neste trabalho foi interpretado utilizando-se o valor do ponto de corte acrescido de dois desvios-padrão, objetivando aumentar a sensibilidade do teste e diminuindo o número de resultados falsos negativos.

Para o estabelecimento do ponto de corte foi utilizada a média das leituras de densidade ótica de 44 amostras de muco cervice vaginal de novilhas virgens, com idade entre 12 e 24 meses, de propriedades sem histórico da doença. Foi utilizado este procedimento devido a não disponibilidade de amostras de animais comprovadamente positivos, uma vez que o isolamento do *C. fetus* subsp. *venerealis* nos rebanhos suspeitos não obteve sucesso.

Procedimentos similares foram utilizados por Hewson (1985) e por Hum et al. (1991) para o estabelecimento do ponto de corte. Hewson (1985) considerou para o ponto de corte do ensaio uma média dos valores de DO_{450} de 54 fêmeas com diagnóstico negativo de Campilobacteriose, por isolamento, acrescido de três desvios-padrão. Hum et al. (1991), por sua vez, expressaram os resultados do teste em valores de Elisa ou EV (Elisa Values), baseados na leituras de DO_{450} corrigidas para os valores de DO_{450} de controles positivos ($DO_{450} = 1.430$) e negativos ($DO_{450} = 0.180$) acrescidos de dois desvios-padrão, com o objetivo de detectar casos de abortamento devido ao *C. fetus* subsp. *venerealis*. Um outro ponto de corte estabelecido posteriormente pelos mesmos autores foi mais elevado, utilizando três desvios-padrão, com o objetivo de imprimir maior especificidade ao teste no diagnóstico de fêmeas portadoras de *C. fetus* subsp. *venerealis* em rebanhos (Hum et al., 1994).

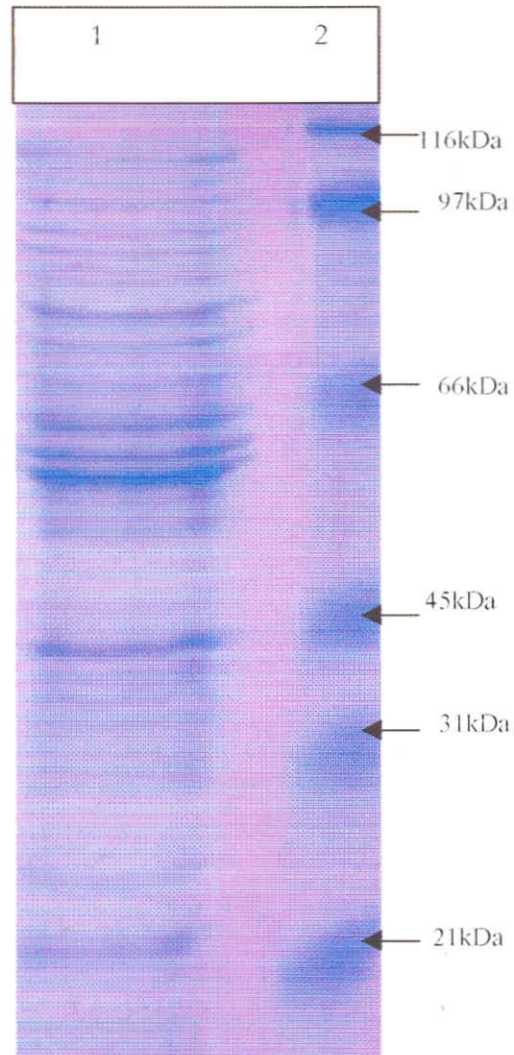


Fig.1. Gel com 12% de acrilamida corado com azul de Coomassie, utilizando-se 10 µg de antígeno por canaleta. 1- *C.fetus* subsp. *venerealis*, antígeno sonicado ; 2- Padrão Broad Range (Sigma, USA)

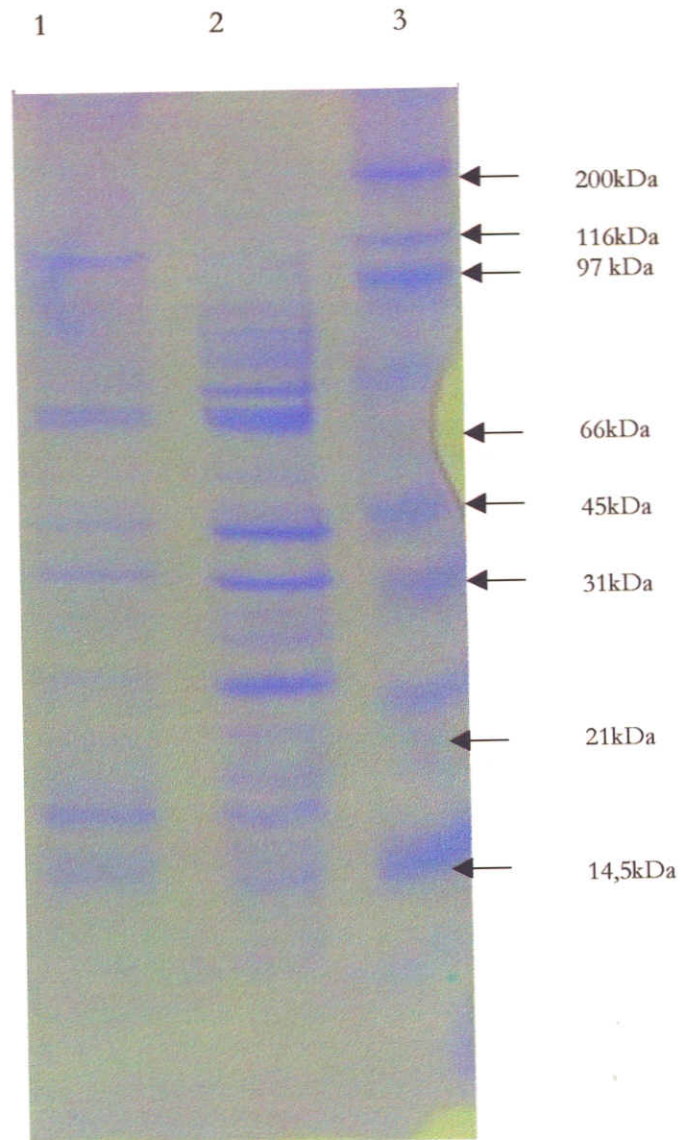


Fig.2. Gel com 12% de acrilamida corado com azul de Coomassie, utilizando-se 10 μ g de antígeno por canaleta. 1- *C.fetus* subsp. *venerealis*, antígeno de extração ácida em tampão glicina; 2- *C. fetus* subsp. *fetus*; antígeno de extração ácida em tampão glicina 3- Padrão Broad Range, BioRad,

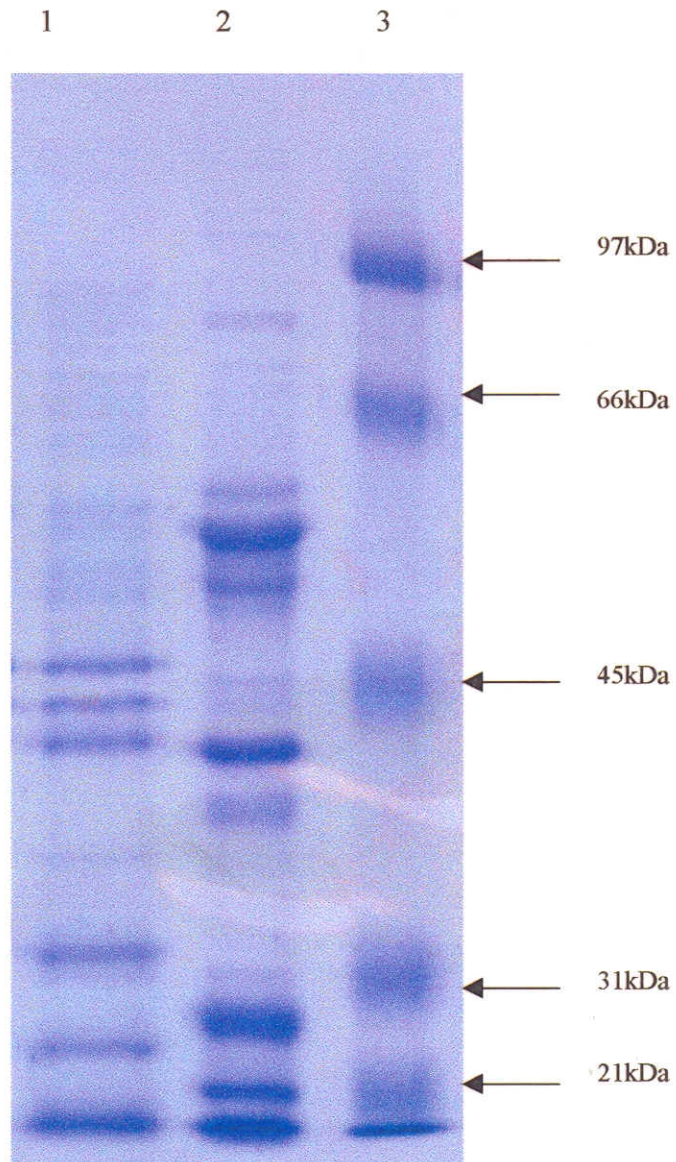


Fig.3. Gel com 12% de acrilamida corado com azul de Coomassie, utilizando-se 10 µg de antígeno por canaleta. 1- *C.fetus* subsp. *fetus*, extração ácida. 2- *C. jejuni* subsp. *jejuni*, extração ácida. 3- Padrão Low Range (BioRad, Sigma)

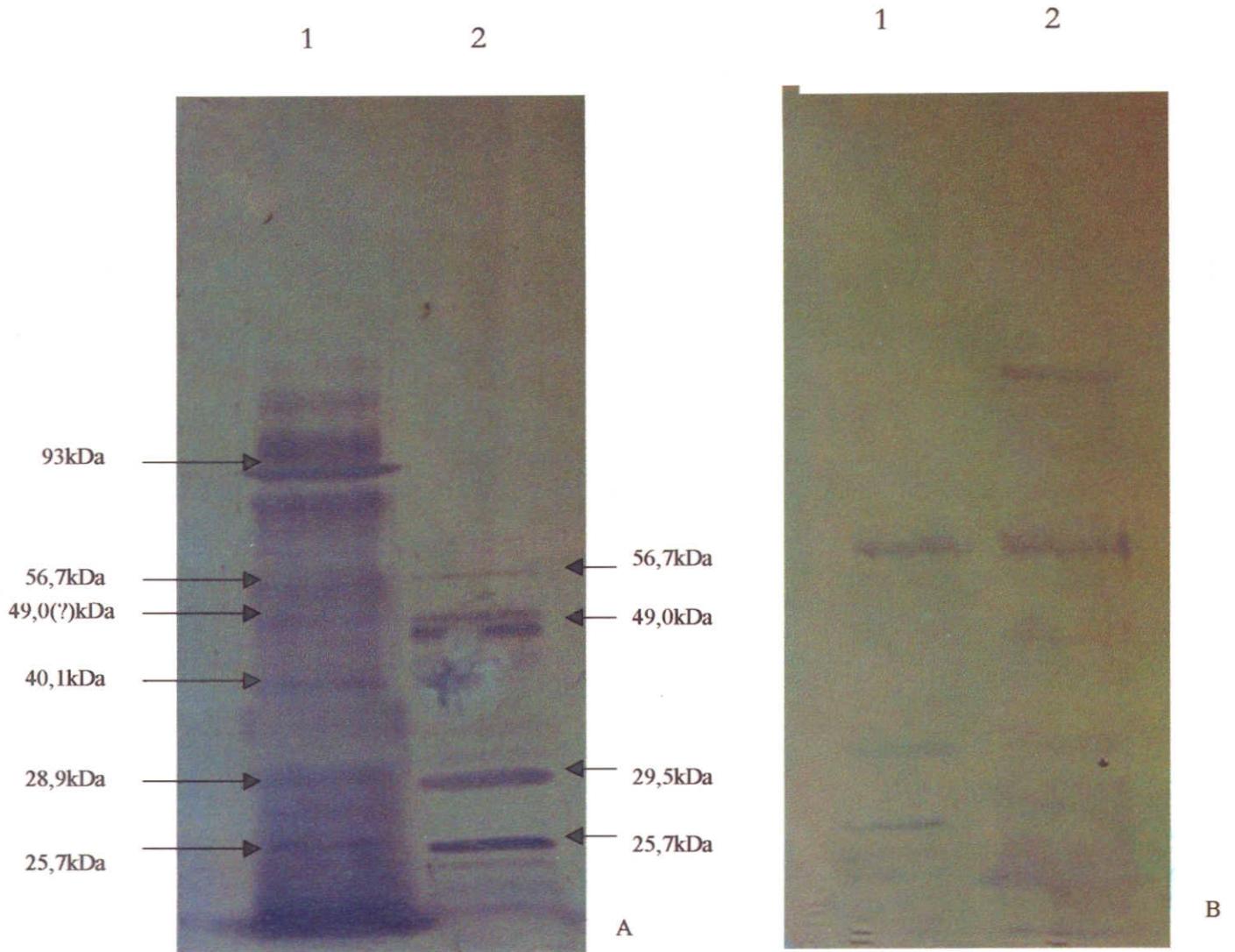


Fig.4. "Immunoblot" de proteínas de antígeno obtido por extração ácida de *C. fetus venerealis* (1) e *C.fetus fetus* (2), utilizando 10µg de antígeno por canaleta e muco vaginal positivo ao Elisa IgA diluído 1:10 (A) e mistura de amostras de muco vaginal positivo ao Elisa IgA diluído 1:20 (B). Os imunoblots foram visualizados utilizando um soro anti-IgA bovina (Bethyl) conjugado com peroxidase em diluição 1:1000 e revelação com 4-cloronaftol.

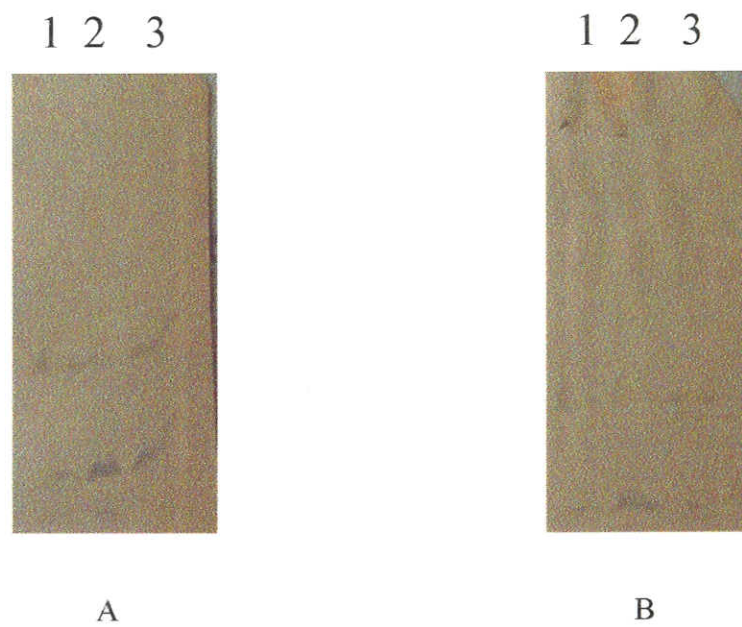


Fig. 5. "Immunoblot" de proteínas de extrato ácido de *C. fetus* subsp. *veneralis* (1) e *C. fetus* subsp. *fetus* (2), *C. jejuni* subsp. *jejuni* (3) utilizando 10µg de antígeno por canaleta e muco vaginal positivo ao Elisa IgA diluído 1:25 (A) e 1/50(B).

Tanto os resultados encontrados por Hewson (1985) quanto por Hum et al. (1991) e Hum et al. (1994) entretanto, não são totalmente comparáveis aos observados neste trabalho, pois, no ensaio padronizado por Hewson (1985) foi utilizado o antígeno sonicado e avaliada a resposta local mediada por IgG e no de Hum et al. (1991) um antígeno bruto, sendo este último considerado menos específico que antígenos semi-purificados (Hirschl & Rotter, 1990), como o preparado antigênico de extração ácida utilizado neste ensaio.

Os resultados encontrados no Elisa IgA demonstraram que existe um reconhecimento de proteínas antigênicas de *Campylobacter sp* por imunoglobulinas A presentes em muco cervico-vaginal, tanto de animais sadios quanto infectados. As novilhas virgens utilizadas no estabelecimento do ponto de corte tinham idade entre 12 e 24 meses e eram provenientes de propriedades com manejo por inseminação artificial. Apesar de não estarem submetidas ao risco de infecção pelo *C. fetus*, entretanto, a média das leituras de DO₄₅₀ obtidas no Elisa IgA foi de 0.143, com um desvio padrão de 0.09, indicando a ocorrência de uma razoável amplitude nos valores de densidade ótica encontrados. Por outro lado, os dados apresentados por Hum et al., (1994) indicaram também maior amplitude de valores de DO₄₅₀, uma vez que a média dos valores detectados no Elisa IgA em novilhas virgens foi de 10 VE (valores de Elisa) com um desvio padrão de 15.

O papel dos antígenos de membrana externo nos ensaios imunoenzimáticos tem sido ser elucidados através do "immunoblotting" utilizando soros monoclonais ou policlonais para identificação das proteínas imunorreativas (Hirschl & Rotter, 1990). Neste ensaio, ao invés de um soro policlonal, foi utilizada como amostra teste no "immunoblotting" uma mistura de amostras de muco cervico vaginal, uma vez que um dos objetivos do trabalho era padronizar o teste para detecção da resposta local ao *C. fetus* subsp. *venerealis* mediada pela IgA. A importância da IgA na resposta imune local ao *C. fetus* subsp. *venerealis* tem sido invariavelmente discutida, tanto para fêmeas naturalmente infectadas pelo agente ou fêmeas que abortam quanto aquelas que somente mantêm a infecção

(Wilkie et al., 1972; Corbeil et al. 1975; Corbeil & Winter, 1978; Winter, 1982; Hum et al., 1991; Hum et al., 1994).

O "immunoblotting" realizado com os antígenos de extração ácida das amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC10354 e *C. fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374 revelou a presença de proteínas de pesos moleculares semelhantes, em ambas as subespécies. Houve coincidência no reconhecimento de proteínas que migraram em torno de 49 kDa, respectivamente as proteínas de 49.8kDa do *C. fetus* subsp. *venerealis* e de 49.6 do antígeno de *C. fetus* subsp. *fetus*, que são supostamente similares (Fig 4, Fig 5). Esta proteína que migrou em torno de 49 kDa teve correspondência em todos os perfis eletroforéticos, variando de 49.4kDa (no *C. jejuni* subsp. *jejuni*) a 49.8kDa (em e *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*).

As proteínas com pesos moleculares em torno de 29kDa (28.9 e 29.5) foram evidenciadas tanto no *C. fetus* subsp. *venerealis* quanto no *C. fetus* subsp. *fetus* (Fig 4), assim como as demonstradas abaixo de 25.7, em ambos os antígenos.

De acordo com o estudo de perfis proteicos de várias preparações de antígenos de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. subsp. jejuni* uma forma isomérica de OMP de 43kDa (ou 45kDa). No *C. jejuni* este monômero pode variar entre 43 e 45 kDa, dependendo da amostra estudada mas esteve invariavelmente presente em todas as amostras analisadas por Dunn et al., (1987), representando 70% do componente capsular de membrana externa. Pela observação do perfil do *C. fetus* subsp. *fetus* obtido neste experimento pode-se supor que as proteínas sejam semelhantes, embora isto possa ser esclarecido apenas com a utilização de uma eletroforese em gel de poli-acrilamida bi-dimensional.

Houve detecção, por parte das imunoglobulinas A presentes no muco cervico vaginal, de um grande número de proteínas do antígeno de extração ácida. Foram reconhecidas as proteínas de 28.9 e 25.7kDa dentre o painel proteico do *C. fetus* subsp. *fetus*, mas não do *C. fetus* subsp. *venerealis* através do "immunoblotting" (Fig 4). Estudos indicam que as proteínas que migram entre 29 e 31 kDa são expostas superficialmente

e bastante antigênicas, podendo ser extraídas sob baixo pH. Estas proteínas foram observadas em todas as amostras de *C. jejuni* estudadas por Dunn et al. (1987), sendo sugerido anteriormente por Trust & Logan (1984) que sejam um componente microcapsular, com boa especificidade de grupo, permitindo detectar tanto *C. jejuni* quanto *C. coli* em espécimes clínicos humanos, podendo mesmo serem utilizadas para produção de uma vacina específica (McCoy et al., 1975; Logan & Trust, 1986; Dunn et al., 1987).

Duas proteínas com baixos pesos moleculares, entre aproximadamente 21 e 31kDa foram fortemente imunogênicas em nosso imunoblotting, utilizando antígenos glicínicos de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* e muco cérvico vaginal de fêmeas positivas provenientes de rebanhos suspeitos/positivos, sendo sugerido por Dunn et al., 1987 que representem, um componente capsular em *C. jejuni*, que na verdade é representado por várias proteínas (Trust & Logan, 1984), semelhante ao que foi observadas no perfil proteico do *C. jejuni* subsp. *jejuni* (Fig 3)

O aparecimento de falsos positivos, resultantes do teste de animais sem sinais clínicos da doença e provenientes de propriedades sem histórico da CGB pode ser atribuída ao reconhecimento, no Elisa IgA, das proteínas microcapsulares com peso molecular em torno de 31kDa (28,9 e 25,7kDa). Imunoglobulinas A podem estar presentes em animais sadios sensibilizados pelo *C. fetus* subsp. *fetus*, sorotipo B (Hum et al., 1994). Isto fica muito evidente quando se observa que a amostra de *C. fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374 pertence ao sorotipo B. Isto pode ser confirmado pela observação de que o gênero *Campylobacter*, principalmente as espécies *C. fetus*, *C. jejuni* e *C. coli*, tem vários antígenos de parede com peso molecular semelhante (Logan & Trust, 1983; Logan & Trust, 1986).

Uma proteína que migrou aproximadamente em 63kDa, possivelmente o antígeno de flagelo foi observada no perfil eletroforético das três subespécies utilizadas neste trabalho, mas os resultados do "immunoblotting" indicaram um fraco reconhecimento da mesma IgA anti-*Campylobacter fetus*, presente no muco vaginal testado, quando utilizou-se o antígeno produzido com amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* não

tendo sido reconhecida pela amostra de *C. fetus* subsp. *fetus*, quando utilizado muco de fêmeas positivas. Embora seja uma proteína comum as três subespécies, neste ensaio é provável que tenha sido um antígeno especificamente reconhecido pelos anticorpos produzidos contra o *C. fetus* subsp. *venerealis*, embora Logan & Trust, (1983) afirmem que ela seja reconhecida por imunoglobulinas G no "immunoblotting" realizado com proteínas de *C. jejuni*.

Avaliando os extratos ácidos de amostras de *C. fetus*, Dunn et al. (1987) supõem que inúmeras bandas entre 50 e 63 kDa representem produtos de degradação do antígeno flagelar. Neste ensaio, o perfil eletroforético das amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* indicaram a presença, respectivamente de uma e duas bandas com peso molecular semelhante (Fig 2). No "immunoblotting" houve um reconhecimento pouco individualizado desta banda no *C. fetus* subsp. *venerealis*, indicando talvez uma degradação da proteína, tendo esta sido reconhecida, como uma banda bastante nítida, de 56,7 kDa no *C. fetus* subsp. *fetus*, o que só poderá ser esclarecido através de um gel bi-dimensional.

O papel da proteína com migração eletroforética de 97 kDa, provavelmente um antígeno SAP (Blaser et al 1985), não foi claro em nosso ensaio enzimático ELISA IgA, pois ela foi reconhecida somente pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* podendo ter sido uma das responsáveis pela especificidade do teste, na detecção de animais infectados verdadeiramente por esta subespécie e na imunidade duradoura ao *C. fetus* subsp. *venerealis*, que permite aos animais resistirem a re-infecções. Blaser et al (1985) e Blaser et al. (1987) demonstraram que sua migração é de aproximadamente 100kDa e ela está associada com a resistência do *C. fetus* a anticorpos humanos, sendo lábeis quando extraídas por ácidos. Por outro lado ela pode ser perdida espontaneamente quando a bactéria é cultivada in vitro (Winter et al. 1978; Blaser et al., 1987), o que pode ter ocorrido na amostra de *C. fetus* subsp. *fetus* (Fig 2).

Em ovinos, foi sugerido que o a proteína de 97kDa da camada S seja essencial a colonização e passagem do *C. fetus* subsp. *fetus* pela placenta mas não é responsável pelo injúria fetal diretamente e após o aborto é produzida uma

imunidade duradoura para o *C. fetus* subsp. *fetus* com anticorpos sistêmicos específicos para as proteínas da camada S (Grogono-Thomas et al., 2000)

O fenômeno das fêmeas persistentemente infectadas pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* parece estar relacionado a alterações nas proteínas SAP, que migram em torno de 97kDa, que foram fortemente reconhecidas neste ensaio de "immunoblotting". Isto torna promissora sua utilização como teste alternativo, que permita identificar fêmeas com infecção persistente pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*. Por outro lado, se considerarmos também a participação relevante destas proteínas no mecanismo de evasão do *C. fetus* ao sistema imune isto as torna potenciais candidatas como vacinas de mucosa para controle da Campilobacteriose Genital Bovina.

O ensaio padronizado apresenta grande potencial de utilização para a identificação de animais infectados pelo *C. fetus*, sendo mais indicada como uma prova de rebanho, devido ao aparecimento de falsos positivos, em rebanhos sem histórico da doença, devendo portanto o

diagnóstico ser apoiado no histórico reprodutivo do rebanho e na ocorrência de sinais clínicos indicadores da presença da Campilobacteriose Genital Bovina.

No diagnóstico de Campilobacteriose Genital Bovina em rebanhos negativos sem histórico da doença, a utilização do "immunoblotting" em amostras de muco vaginal é promissora para a elucidação de resultados falsos positivos no Elisa IgA.

4.5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Embrapa Pantanal, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig e da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva – FEP/MVZ Coordenação Preventiva. A. O. Pellegrin, A. P. Lage e R. C. Leite são bolsistas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. J.F. Figueiredo é bolsista da CAPES.

5. DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA PELO ELISA IgA

Pellegrin^{1,2}, A.O., Figueiredo¹, J.F.; Leite¹, R.C.; Miranda¹, K.L.; Ravaglia², E., Lage^{1*}, A.P.

1 - Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia Aplicada
Núcleo de Pesquisa em Saúde Animal
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - Caixa Postal 567
30123-970 - Belo Horizonte - MG
Fax: (31) 34 99 20 80

Endereço eletrônico: alage@vet.ufmg.br
2 - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal
Rua 21 de setembro, 1880
79320-900 - Corumbá- MS

* Autor para correspondência

RESUMO

Um ensaio imunoenzimático do tipo indireto para detecção de imunoglobulinas A (ELISA IgA) anti-*Campylobacter fetus* foi avaliado em 311 amostras de muco cérvico-vaginal de matrizes provenientes de 18 rebanhos de corte do Pantanal Mato-grossense. A especificidade do Elisa IgA foi estimada em 94,4% com base no teste de 143 controles negativos, representados por amostras de muco cérvico-vaginal coletadas em 5 rebanhos leiteiros sem histórico da doença e com manejo reprodutivo por inseminação artificial. Nos 18 rebanhos testados no Pantanal, 23,8% (74 animais) (IC 95%: 19,5% - 28,1%) das amostras foram positivas ao ELISA IgA para *C. fetus* subsp. *venerealis*. Das fêmeas provenientes de rebanhos negativos, 5,6% foram reagentes ao Elisa IgA. As médias das leituras de DO₄₅₀ nos rebanhos testados no Pantanal variaram de 0,072 e 0,563 e nos rebanhos negativos variaram de 0,111 à 0,202.

SUMMARY

An indirect enzyme immunosorbent assay was used to detect antigen specific secretory IgA were evaluated in 311 bovine vaginal mucus from cows of 18 beef cattle herds in the Brazilian Pantanal. Specificity of the teste was estimated in 94.4% by test of 143 negative controls, samples of cervicovaginal mucus collected in 5 dairy

herds without history of the disease and artificially inseminated. In the 18 beef herds tested in the Pantanal region, 23.8% (74) (IC 95%: 19.5% - 28.1%) of the samples were positive to *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in Elisa IgA and 5.59% of the samples from negative herds. The mean optical density measurements (OD₄₅₀) of the herds tested in Pantanal region was between 0.072 e 0.563 and of the negative herds was 0.111 à 0.202.

5.1. INTRODUÇÃO

A Campilobacteriose Genital Bovina é uma enfermidade causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* cuja principal característica é a presença de repetições de cio com intervalos aumentados e irregulares (Stoessel, 1982; Dekeyser, 1986; Lage & Leite, 2000).

Esta doença ainda é muito importante em países e áreas onde existem grande efetivos bovinos e o manejo reprodutivo é baseado na monta natural uma vez que leva a uma taxa de retorno ao cio entre 37,5% e 60% e que a taxa de parição entre novilhas varia de 35% à 50% (Mc Cool et al., 1988; Pellegrin, 2001). Está presente em várias regiões do Brasil (Jesus et al., 1999; Lage & Leite, 2000; Pellegrin, 2001, Cap. 3) como no Pantanal Mato-Grossense onde verificou-se uma prevalência de 52,3% dos touros portadores do *C. fetus* (Pellegrin et al., 2001), o que indica que

a Campilobacteriose Genital Bovina está disseminada na região, podendo ser uma das principais causas sanitárias que contribuem para a manutenção dos índices de fertilidade baixos e a idade a primeira cria e a relação touro: vaca elevadas nos rebanhos bovinos da região.

O padrão ouro para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina é o isolamento e identificação do agente tanto em touros quanto fêmeas ou mesmo em fetos abortados. Devido as limitações desta técnica, que restringe o seu uso a locais onde a infraestrutura laboratorial pode ser acessada em tempo ideal para o processamento das amostras, os estudos epidemiológicos ficam bastante onerados e os resultados são, em geral subestimados (Hum et al., 1991; Pellegrin, 1999a)

O diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina na fêmea é feito basicamente pela demonstração da presença do agente no trato reprodutivo, mediante as técnicas de isolamento ou imunofluorescência direta ou pela presença de anticorpos específicos no muco cérvico-vaginal, detectados pelas técnicas de muco-aglutinação ou Elisa IgA (Stocsscl, 1982; Hum et al., 1991). A maioria dos levantamentos epidemiológicos de rebanhos ocorridos nas décadas de 1960 e 1970, em nosso país, utilizou a técnica de muco-aglutinação, obtendo-se índices que variaram de 12,95%, encontrado no Rio de Janeiro (Ramos & Guida, 1978) à 46,9%, encontrado por Jesus (1999) no Estado de Minas Gerais.

A utilização de um ensaio imunoenzimático para detecção de fêmeas portadoras de *C. fetus* subsp. *venerealis* já foi descrito anteriormente sendo indicado como mais sensível que o teste de muco-aglutinação para a detecção de anticorpos da classe IgG anti-*C. fetus* em estágios recentes de infecção (Hewson, 1985) mas a demonstração de anticorpos específicos da classe IgA em fêmeas bovinas como resultado da infecção natural pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* só foi demonstrada posteriormente (Hum et al. 1991).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar um Elisa IgA anti-*C. fetus* no diagnóstico de Campilobacteriose Genital Bovina, estimando a

prevalência de fêmeas portadoras de anticorpos anti- *C. fetus* no muco cérvico-vaginal e a especificidade do teste em amostras provenientes de rebanhos com histórico negativo para Campilobacteriose Genital Bovina.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Amostragem

Para a determinação da prevalência da Campilobacteriose Genital Bovina na sub-região da Nhecolândia do Pantanal Mato-grossense, foi calculada uma amostra por conglomerado, considerando-se uma uma prevalência estimada de 56% (Pellegrin et al. 1998), 95% de confiança e 11% de erro, de acordo com metodologia descrita por Bennet et al. (1991). Isto resultou numa amostra de 380 matrizes em reprodução, fêmeas acima de 3 anos de idade, em 19 propriedades. A média de animais amostrados por conglomerado foi fixada em 20 e o coeficiente de correlação intraconglomerado em 0,20 (Otte & Gumm, 1997). As propriedades foram sorteadas dentre aquelas cadastradas na EMBRAPA-Pantanal e dentro de cada rebanho a amostragem das fêmeas foi aleatória.

5.2.2. Controles Negativos

Como controles negativos para a determinação da especificidade do teste foram sorteadas 165 matrizes em cinco rebanhos leiteiros sem histórico de problemas reprodutivos sugestivo de Campilobacteriose Genital Bovina, submetidas a manejo reprodutivo por inseminação artificial e amostras de muco cérvico-vaginal foram coletadas de todos as matrizes sorteadas.

5.2.3. Coleta de muco cérvico-vaginal

A coleta de muco cérvico-vaginal foi realizada segundo Fernandes & Gomes (1992). O muco coletado foi separado em alíquotas e estocado a -196° C até o momento da realização dos testes.

5.2.4. Elisa IgA anti- *C. fetus* subsp. *venerealis*

As imunoglobulinas A anti-*C. fetus* subsp. *venerealis* foram pesquisadas por um ensaio imunoenzimático (ELISA IgA) utilizando na fase sólida antígeno obtido por meio de extração ácida com tampão de glicina (McCoy et al.,

1975) preparado com a amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 (Pellegrin, 2001).

5.2.5. Análise Estatística

A prevalência, o intervalo de confiança, o efeito do desenho e o coeficiente de correlação intra-conglomerado foram calculados segundo Bennet et al. (1991) para as coletas realizadas no Pantanal Mato-grossense. A especificidade do teste foi calculada segundo Hum et al. (1994).

5.3. RESULTADOS

Das 380 amostras previstas, apenas 311 amostras de muco cérvico-vaginal, provenientes de 18 rebanhos foram coletadas, pois houve perda de amostras durante o transporte até o laboratório e em uma propriedade, inicialmente prevista, não foi possível a coleta do material.

Mucos cérvico-vaginais de 77 animais, 23,8% (IC 95%: 19,5% - 28,1%) foram positivas ao teste de ELISA IgA anti- *C. fetus* subsp. *venerealis* (Tab. 1). As médias de leituras de DO₄₅₀ nos rebanhos do Pantanal variaram entre 0,072 e 0,563 e os valores extremos de DO₄₅₀ obtidos nas diferentes propriedades variaram de 0,150 à 1,587 (Fig. 1). A média e o desvio padrão do Elisa IgA no muco cérvico vaginal dos

animais do Pantanal, sem considerar o rebanho de origem, foram de 0,249 e 0,318, respectivamente.

Em 5,6% das amostras de muco cérvico-vaginal (8 animais) coletadas nos rebanhos com histórico negativo para Campilobacteriose Genital Bovina foram detectados anticorpos anti-*C. fetus* pelo Elisa IgA, sendo que três rebanhos apresentaram animais positivos e dois foram totalmente negativos. As médias de leituras de DO₄₅₀ nos rebanhos negativos variaram de 0,111 à 0,202, os valores máximos entre 0,234 e 0,681 (Tab. 2). A dispersão dos valores de densidade ótica encontrados estão na Fig.2. A média dos valores de DO₄₅₀, considerando todos os controles negativos testados foi de 0,141 e o desvio padrão de 0,110.

A especificidade foi estimada em 94,4% com base na ocorrência de oito resultados positivos (5,59%) em 143 animais provenientes dos rebanhos considerados livres da doença.

O coeficiente de correlação intraconglomerado (ρ) e o efeito de delineamento (D) encontrado para a infecção pelo *C.fetus* em levantamento realizado em fêmeas de rebanhos do Pantanal Mato-grossense foram respectivamente 0,02 e 1,68.

Tabela 1. Frequência de fêmeas portadoras de imunoglobulinas A anti- *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em propriedades do Pantanal Mato-grossense e valores médios e máximos de leituras de DO₄₅₀ no Elisa IgA observados em amostras de muco cérvico-vaginal de acordo com o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina em touros.

Fazenda	Total	Positivos ¹	Diagnóstico de Campilobacteriose ²	DO ₄₅₀ Média	DO ₄₅₀ Máxima
F1	10	7(70.0%)	P ³	0.563	1.113
F2	27	11(40.0%)	P	0.318	1.441
F3	23	0(0.0%)	N ⁴	0.075	0.274
F4	19	4(21.0%)	P	0.222	0.589
F5	21	2(9.5%)	NT ⁵	0.155	0.649
F6	12	2(16.6%)	P	0.124	0.605
F7	5	0(0.0%)	N	0.072	0.150
F8	20	9(45%)	P	0.475	1.451
F9	16	4(25%)	NT	0.236	0.729
F10	17	3(17.6%)	P	0.207	0.894
F11	15	4(26.6%)	P	0.289	1.086
F12	15	6(40%)	P	0.356	1.454
F13	21	1(4.76%)	P	0.195	1.587
F14	22	7(31.8%)	P	0.249	0.740
F15	15	9(60.0%)	P	0.508	1.539
F16	20	2(10.0%)	NT	0.122	0.371
F17	19	1(5.2%)	P	0.169	1.542
F18	14	2(14.3%)	P	0.188	0.929
Total	311	74(23.8%)	-	-	-

1-Animais cuja leitura de densidade ótica (DO₄₅₀) obtida no Elisa IgA em amostras de muco cérvico-vaginal

foi ≥ 0.323 ; 2-Touros da propriedade testados anteriormente pela imunofluorescência direta; 3- Positivo;

4- Negativo; 5- Não Testado.

Tabela 2. Frequência de fêmeas portadoras de imunoglobulinas A anti- *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em propriedades sem histórico de Campilobacteriose Genital Bovina e com manejo reprodutivo por inseminação artificial.

Fazenda	Animais Testados	Positivos ¹	DO ₄₅₀ Média	DO ₄₅₀ Máxima
F19	32	1(3.12)	0.142	0.510
F20	21	0 (0.00%)	0.102	0.239
F21	24	0 (0.00%)	0.105	0.234
F22	30	6(20.0%)	0.211	0.681
F23	36	1(2.7%)	0.129	0.333
Total	143	8 (5.59%)		

1- Animais cuja leitura de densidade ótica (DO₄₅₀) obtida no Elisa IgA em amostras de muco cérvico-vaginal foi $\geq 0,323$.

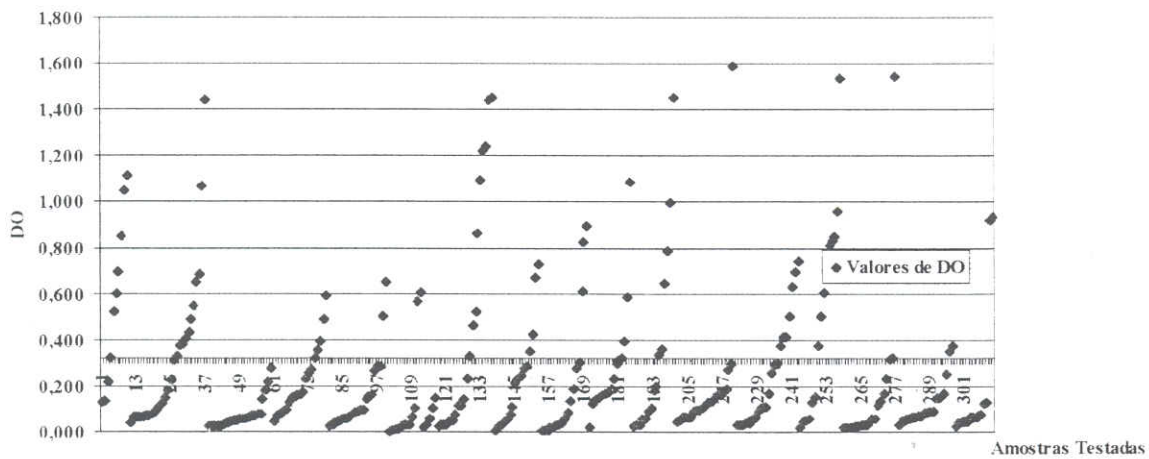


Figura. 1. Dispersão dos valores de DO em amostras de muco vaginal de fêmeas provenientes de rebanhos do Pantanal Mato-grossense.

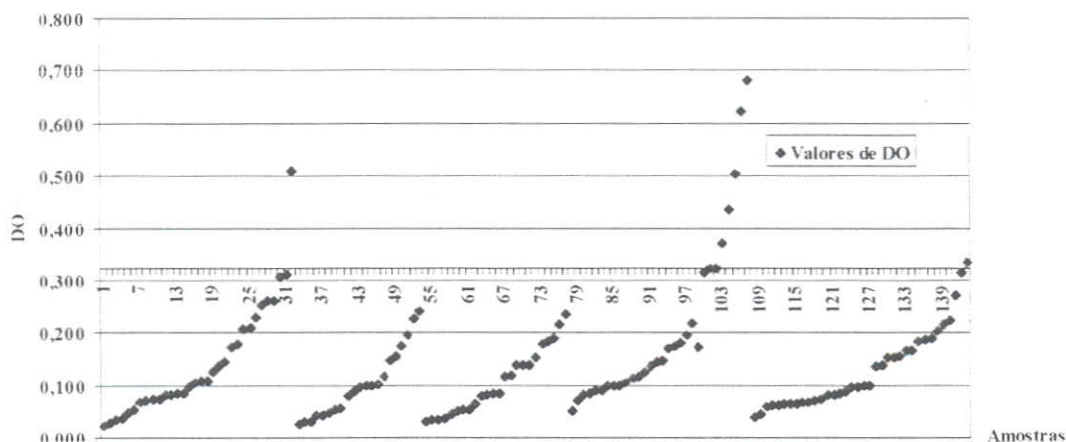


Figura 2. Dispersão dos valores de DO em amostras de muco vaginal de fêmeas provenientes de rebanhos com histórico negativo para Campilobacteriose Genital Bovina

5.4. DISCUSSÃO

A especificidade do Elisa IgA encontrada, de 94,4% é semelhante à observada por Hum et al. (1994), de 98,5% utilizando um antígeno bruto de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Estes dados mostram que o Elisa IgA é um teste bastante específico para a detecção de fêmeas que tiveram contato com o *C. fetus* subsp. *venerealis*. Entretanto, da mesma forma que o relatado por Hum et al. (1994), não foi possível estimar a sensibilidade do teste pela impossibilidade de confirmação dos resultados pelo isolamento.

Neste experimento, nos rebanhos com manejo por inseminação artificial e sem histórico de Campilobacteriose Genital Bovina, os oito animais positivos ao Elisa, foram considerados falso negativos, reagindo no Elisa IgA possivelmente por um contato prévio com antígenos de superfície de *C. fetus* subsp. *fetus* ou *C. jejuni* subsp. *jejuni*, que podem habitar o Trato Gastroentérico (Butzler, 1994). Devido a circulação de células no sistema imune de mucosas, é possível células do sistema imune sensibilizadas no intestino pelo contato com *C. ou C. fetus* subsp. *fetus* se encontrarem na mucosa do sistema genital. Foi observado pelos estudos tanto pelo Elisa IgA quanto no "immunoblotting" que animais provenientes de rebanhos livres de Campilobacteriose Genital

Bovina reagiram no Elisa IgA, mas os antígenos reconhecidos eram comuns tanto ao *C. jejuni* subsp. *jejuni* quanto ao *C. fetus* subsp. *fetus* (Pellegrin, 2001).

As amostras consideradas falso- negativas, neste trabalho, não foram testadas frente as outras espécies de *Campylobacter spp* apesar de Hum et al. (1994) observarem que amostras testadas no Elisa IgA utilizando na fase sólida amostra de sorotipo B de *C. fetus* subsp. *fetus* apresentaram leituras de DO₄₅₀ mais elevadas que quando utilizado o *C. fetus* subsp. *venerealis*.

A especificidade de ensaios imunoenzimáticos depende principalmente do ponto de corte estabelecido e do tipo de antígeno utilizado no teste (Hirschl & Rotter, 1990). Considerando que a sensibilidade e a especificidade tem uma relação inversamente proporcional, o Elisa IgA anti *C. fetus* subsp. *venerealis* foi interpretado utilizando-se o valor do ponto de corte acrescido de dois desvios-padrão, objetivando detectar na população estudada o maior número de fêmeas com imunoglobulinas A anti- *C. fetus* subsp. *venerealis*, ou seja, uma maior sensibilidade do teste.

Hum et al. (1991) e Hum et al. (1994) utilizaram diferentes pontos de corte, expressando os resultados do teste em valores de Elisa ou EV

(Elisa Values), baseados na leituras de DO_{450} corrigidas para os valores de DO_{450} de controles positivos ($DO_{450} = 1.430$) e negativos ($DO_{450} = 0.180$) acrescidos de dois desvios-padrão, imprimindo maior sensibilidade ao teste com o objetivo de detectar casos de abortamento devido ao *C. fetus* subsp. *venerealis* (Hum et al., 1991) e utilizando três desvios-padrão, com o objetivo imprimir maior especificidade ao teste no diagnóstico de fêmeas portadoras de *C. fetus* subsp. *venerealis* em rebanhos (Hum et al., 1994). Entretanto os resultados encontrados por Hum et al. (1991) e Hum et al., (1994) foram realizados com um antígeno bruto de *C. fetus* subsp. *venerealis*, considerado por Hirschl & Rotter, (1990) menos específico que antígenos semi-purificados, como o preparado antigênico de extração ácida, utilizado neste ensaio. No entanto, em ensaio comparativo realizado com diferentes preparações antigênicas para a detecção de IgG anti-*Helicobacter pylori*, Lewalla-Guruge (1992) acusaram sensibilidade e especificidades estatisticamente similares entre estes dois tipos de antígenos, o que permitiria a comparação entre os resultados encontrados por Hum et al. (1994) e os deste trabalho.

Os valores de leituras de DO_{450} mais elevados encontrados em animais provenientes de rebanhos negativos podem ter sido também decorrentes de problemas na diluição do material ou por influência da temperatura ambiente, caso o material tenha sido inadequadamente acondicionado, uma vez que em temperaturas elevadas este pode se desidratar, concentrando assim as imunoglobulinas (Hum et al., 1991).

Neste experimento, considerou-se positiva ao Elisa IgA uma amostra que apresentasse leitura de densidade ótica igual ou maior a 0,323 (Pellegrin et al., 2001) e com base nesse ponto de corte, definido com base na média dos valores de DO_{450} do muco cérvico-vaginal de 44 novilhas virgens testadas (0,143) acrescida de dois desvios-padrão (0,09). Entre as 311 amostras de muco cérvico vaginal testados no Pantanal, 23,8% (IC 95%:19,5% - 28,1%) dos mucos testados foram positivos ao *C. fetus* subsp. *venerealis* pelo teste de ELISA IgA.

Os resultados do Elisa IgA das fêmeas de rebanhos do Pantanal não podem ser comparados com os obtidos por outros autores que empregaram o teste de muco-aglutinação (Mies

Filho, 1960; Pestana de Castro et al., 1971; Ramos & Guida, 1978; Jesus et al., 1999), devido ao fato deste teste possuir limitações em relação a sensibilidade e especificidade se comparados aos ensaios imunoenzimáticos (Hewson, 1985) ou devido as diferenças quanto ao delineamento experimental utilizado.

Embora não tenham sido possível o acesso ao histórico reprodutivo dos rebanhos do Pantanal, a relação entre a presença de anticorpos locais anti-*C. fetus* e baixa fertilidade já tem sido comprovada por vários autores (Newsan & Monsborough, 1967; Jesus et al., 1999; Pellegrin et al., 2001, Cap. 6). Newsan & Monsborough (1967) analisaram, por muco-aglutinação, 4706 amostras de muco cérvico-vaginal de 700 fêmeas não expostas à infecção natural pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* e sem problemas reprodutivos e 217 amostras de fêmeas cobertas por touros infectados com detecção, respectivamente de 0,5% e 61% de amostras positivas ao *C. fetus* subsp. *venerealis*, salientando que a presença de anticorpos no muco cérvico-vaginal é um forte indicativo de infecção, recente ou não, pelo agente. Da mesma forma, Jesus et al. (1999) detectaram aglutininas anti-*C. fetus* em 22,3% de 170 fêmeas testadas no Estado do Rio de Janeiro e em 46,9% (15) no Estado de Minas Gerais em 95,2% de 21 propriedades com histórico de problemas de fertilidade como repetições de cio e abortamentos em torno do 4º mês, sendo que estas propriedades associavam a monta natural à inseminação artificial.

Os índices de animais infectados nas propriedades do Pantanal indicaram que existe um efeito de propriedade, observando-se que 16 (88,8%) dos 18 rebanhos testados tinham pelo menos um animal positivo ao Elisa IgA. Em duas propriedades onde não foram detectadas fêmeas positivas ao Elisa IgA, os touros também foram negativos pela técnica de imunofluorescência direta. Em uma delas, pelo pequeno número de animais examinados, é sugestivo que a amostragem tenha sido insuficiente para detecção de pelo menos um indivíduo positivo, entretanto, na segunda propriedade, onde foram coletados 23 amostras de muco cérvico-vaginal é muito provável que a propriedade estivesse livre da Campilobacteriose Genital Bovina.

Os ensaios imunoenzimáticos padronizados por Hewson (1985) e Hum et al. (1994)

demonstraram boa sensibilidade na detecção de animais infectados em rebanhos com problemas reprodutivos por *C. fetus*. Nachankin & Yang (1992) indicaram uma relação direta entre a presença de imunoglobulinas A anti- *C. jejuni* em grupos de pacientes infectados por este agente. Estes dados indicam que o Elisa IgA pode ser empregado com sucesso para estudos epidemiológicos e detecção de grupos de risco para estas doenças. Neste trabalho, houve uma relação entre presença de touros infectados no rebanho, testados previamente por imunofluorescência direta, e a ocorrência de fêmeas com anticorpos anti- *C. fetus*, pois em dois rebanhos onde o diagnóstico dos touros foi negativo não foram observadas fêmeas com reação positiva no Elisa IgA ($\chi^2=7.59$; gl=1; p=0.06). Por outro lado, esta relação não ocorreu em termos quantitativos, uma vez que houve grande variação entre as frequências de fêmeas positivas entre rebanhos.

Comparando-se os valores médios e desvio padrão de DO₄₅₀ encontrados nos controles negativos, de 0.141 e 0.110, e os encontrados nos rebanhos com histórico da infecção (Pantanal), de 0.249 e 0.318, pode ser observado que nos rebanhos do Pantanal estes foram mais elevados, embora estatisticamente esta variação não tenha sido significativa (P>0.05). Entretanto, em um rebanho negativo foi encontrado um animal com DO₄₅₀ igual a 0.610, indicando provavelmente uma reatividade cruzada com antígenos da subespécie *fetus* ou ao *C. jejuni* subsp. *jejuni* como anteriormente demonstrado (Pellegrin, 2001)

Não foi possível estimar a sensibilidade do Elisa IgA pelo insucesso das tentativas de isolamento, considerado o padrão ouro no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina, que impossibilitou a definição de controles positivos. Considerando que a doença é auto-limitante e que apenas 10% das fêmeas se tornam persistentemente infectadas (Clark, 1971), a validação de um ensaio enzimático, que detecte anticorpos, não pode ser baseado somente no isolamento do agente etiológico (Hum et al., 1994), uma vez que as imunoglobulinas locais são detectáveis meses após o desaparecimento do *C. fetus* no organismo (Corbeil, 1974a, Corbeil, 1974 b). No Pantanal, as condições da região não permitem a utilização de técnicas de diagnóstico que necessitem rápido processamento do

material, como é o caso do isolamento, pelas grandes distâncias entre os locais de coleta e a inexistência de infraestrutura local que permita acondicionamento e conservação adequados das amostras.

O coeficiente de correlação intra- conglomerado calculado para a amostragem realizada no Pantanal foi de 0.02 e o efeito de delineamento (D) igual a 1.68. O valor estimado de ρ indicou que a Campilobacteriose é uma doença distribuída homogênea na população estudada. A presença de imunoglobulinas A anti- *C. fetus* subsp. *venerealis* nas fêmeas pode significar, por outro lado, um contato prévio com antígenos de *C. fetus* subsp. *fetus* não indicando necessariamente a presença do *C. fetus* subsp. *venerealis* no rebanho (Hum et al., 1991), embora tenha sido observada uma relação entre a presença de touros positivos ao *C. fetus*, pela IFD e propriedades com fêmeas positivos pelo Elisa IgA.

O efeito de delineamento, que é calculado em função do erro amostral, maior na amostragem por conglomerado (Otte & Gumm, 1997), teve influência do número de amostras coletadas em cada conglomerado, que foi desigual. Na amostragem realizada no Pantanal uma média de 17.3 animais testados por propriedade influenciou o efeito de delineamento, reduzindo-o, embora o número de conglomerados e de amostras tenham ficado abaixo do inicialmente recomendado (Otte & Gumm, 1997).

No Pantanal, existe uma grande dificuldade de condução de experimentos que envolvam amostragem. As coletas só podem ser realizadas no período de seca ou no início do período das chuvas, muito dificilmente no período em que o Pantanal está em cheia, uma vez que determinadas propriedades tornam-se inacessíveis, por via terrestre, durante este período. No Pantanal, o período de coletas foi na época seca, de abril a outubro, quando a maioria das fêmeas já estão prenhes ou, se vazias, já afastadas dos touros devido ao período natural de acasalamento que ocorre na região (Almeida et al., 1996) ou ainda, pela restrição alimentar sofrida durante o período de seca (Pott et al., 1989) podem não ter apresentado cio. A diferença entre a prevalência observada anteriormente nos touros (52.6%) (Pellegrin, 2001) e nas fêmeas (23.8%) indica, que a

situação de portador nesta categoria é transitente, o que já tem sido largamente comprovada (Clark, 1971; Dekeiser, 1984; Hum et al., 1991) existindo uma variação na imunidade local ao *Campylobacter fetus*.

A época da coleta do material, principalmente nos rebanhos que são submetidos a monta natural, pode ter influenciado os resultados, diminuindo a sensibilidade do teste. Em humanos, de acordo com a fase do ciclo estral pode haver variações tanto no isotipo quanto na localização das imunoglobulinas, uma vez que no período pré-ovulatório se estabelece o pico de produção de imunoglobulinas na mucosa uterina, enquanto que no oviduto encontra-se nesta fase o seu mais baixo nível (Wira & Kaushic, 1996). Por outro lado, resultados falso negativos podem ocorrer quando são coletadas amostras durante o cio (Lawson e Mac Kinnon, 1952) bem como falsos positivos em amostragem repetitiva (Clark, 1971). A excessiva quantidade de muco produzida durante o estro pode também induzir resultados falso negativos pela diluição das imunoglobulinas, portanto amostras coletadas 3 a 4 dias após o estro podem dar resultados falsos positivos (Roberts, 1971).

A flutuação nos níveis de IgA anti-*C. fetus* em fêmeas naturalmente infectadas tem sido investigada sendo que o pico máximo de imunoglobulina A é observado entre o 3-5º mês, após o contato com o touro. A partir do 4º mês, os níveis de IgA no muco cérvico-vaginal decrescem (Pellegrin, 2001), o que também tem sido registrado por outros autores (Andrews & Frank, 1984; Corbeil et al., 1975; Hum et al., 1991; Hum et al., 1994), podendo manter-se, em alguns casos por até 10 meses após (Corbeil, 1974a) ou mais (Cippola et al., 1994). Isto pode explicar, em parte, as diferenças observadas nas frequências de amostras positivas observadas nas propriedades, uma vez que na maioria delas não adota uma estação de monta definida.

Os resultados deste experimento indicaram que é elevado o número de animais, no Pantanal, que tem contato com o *Campylobacter fetus*, uma vez que nenhum dos rebanhos havia sido vacinado,

apesar de na vacinação haver somente produção local de IgG não interferindo com os resultados do teste (Hum et al., 1994). Os níveis de anticorpos muito elevados detectados em algumas propriedades, poderiam até mesmo ser indicadores de aborto ou mesmo infecção recente, pois já tem sido comprovado que animais que abortam apresentam níveis de imunoglobulinas A anti-*C. fetus* significativamente mais elevados em relação aos que levam a gestação a termo (Hum et al., 1991).

Considerando a inexistência de um histórico reprodutivo ou de casos clínicos que permitissem suspeitar da presença da doença no rebanho, o teste não pode ser indicado para o diagnóstico individual de Campilobacteriose Genital Bovina, devendo ser validado em vários rebanhos, com e sem histórico de problemas reprodutivos, comparando-se ao isolamento como padrão ouro do diagnóstico. Os resultados indicaram que o Elisa IgA pode ser um teste complementar no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina em rebanhos, pela sua facilidade de execução e rapidez na obtenção do resultado, servindo como triagem de rebanhos, para embasar medidas preventivas de manejo reprodutivo. A não detecção de fêmeas com anticorpos anti-*C. fetus* realizada em uma amostragem bem delineada e conduzida pode ser um indicativo seguro de que a doença não está presente no rebanho, embora o mais adequado seja associar os resultados obtidos nas fêmeas a detecção do agente no touro (Pellegrin, 2001).

5.5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Embrapa Pantanal, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig e da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva – FEP/MVZ Coordenação Preventiva e dos produtores de gado de corte do Pantanal. A. O. Pellegrin, A. P. Lage, R. C. Leite e K.L. Miranda são bolsistas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. J.F.Figueiredo é bolsista da CAPES.

6. EFICIÊNCIA REPRODUTIVA E RESPOSTA IMUNE LOCAL EM NOVILHAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO *Campylobacter fetus*

Pellegrin*, A.O.^{1,2*}; Figueiredo J.F.²; Sereno, J.R.B.¹ Leite,R.C.²; Lage, A.P.²

1 – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal
Rua 21 de setembro, 1880
Corumbá- MS
79320-900

aiesca@cpap.embrapa.br

2 - Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia Aplicada
Núcleo de Pesquisa em Saúde Animal
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais

*Autor para correspondência

RESUMO

Para avaliação dos índices de desempenho reprodutivo e monitoramento da resposta imune em fêmeas naturalmente infectadas pelo *Campylobacter fetus* foram acompanhadas 54 novilhas virgens cobertas com touros nos quais foi diagnosticado o *fetus* pela imunofluorescência direta (IFD). As fêmeas foram acompanhadas para observação de cio, abortamentos e quanto a resposta imune local à infecção pelo *C. fetus* avaliada pelo ELISA IgA. Os resultados indicam que apenas 59,3% das fêmeas(32) levou a gestação a termo, tendo sido estimada a ocorrência de 7 abortos. A frequência de repetição cio foi de 44,4%, sendo que 4 animais (7,41%) repetiram o cio mais de uma vez. O valor médio de leitura de densidade ótica (DO₄₅₀) do muco vaginal coletado no início da estação de monta foi de 0,097 e o pico de produção média de imunoglobulinas A, de 0,507, ocorreu no 4º mês, após o início da estação de monta.

SUMMARY

In order to evaluate the reproductive performance of beef cattle and evaluate the immune response to *Campylobacter fetus* in naturally infected bovine females, 54 heifers with three years of age and breed with 2 infected bulls, confirmed by fluorescent antibody test.

Heat detection and abortion were detection twice daily. The local immune response to *Campylobacter fetus* was evaluated by Elisa IgA. The results indicated that only 59,3% of the females calved normally, 7 heifers aborted and 44,4% repeat breeding, with 4 (7,41%) heifers repeating breeding twice. Mean value of the optical density measured by the Elisa IgA of the vaginal mucus in the beginning of breeding season was 0,097 and the peak of IgA was 0,507 and occurred in the 4th month of breeding season.

6.1. INTRODUÇÃO

A Campilobacteriose Genital Bovina é uma enfermidade de caráter eminentemente venéreo causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* que pode elevar as taxas de retorno ao cio e causar abortos. Os ciclos estrais são irregulares, de em média 35 dias, devido a ocorrência de morte embrionária (Dekeyser, 1984). Sob condições naturais, o agente é transmitido do touro infectado para a fêmea susceptível pelo coito, ou pelo uso de sêmen contaminado, sendo que a transmissão pode atingir até 100% das novilhas (Garcia & Brooks, 1993).

Em sistemas de produção de gado de corte o impacto da Campilobacteriose Genital Bovina recai principalmente sobre o intervalo entre partos, reflexo do grande número de vacas que

falham em conceber ou concebem tardiamente no período de monta, produzindo os chamados bezerras refugos, com menor peso, desmamados tardiamente, que compõem lotes pouco uniformes, prejudicados quando da comercialização (Kasari & Gleason, 1996).

As imunoglobulinas da classe A são as principais responsáveis em impedir o início da infecção, por serem capazes de imobilizar o *C. fetus* e impedir a colonização da mucosa (Corbeil et al., 1974a; Corbeil et al., 1974b). O estudo da cinética de produção de imunoglobulinas em animais infectados naturalmente pelo *C. fetus* indica que a IgA aparece logo em seguida à IgM entre 3 a 5 semanas após a infecção, predominando no muco cérvico-vaginal com títulos maiores e mais duradouros, podendo persistir por mais de 40 semanas

Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-*C. fetus* em muco cérvico-vaginal utilizados por alguns autores (Hewson, 1985, Hum et al. 1987, Hum et al., 1991, Pellegrin et al., 2001) foram considerados superiores ao teste de muco-aglutinação em sensibilidade e especificidade (Hewson, 1885) e efetivos na detecção de fêmeas que abortam devido a infecção pelo *C. fetus* (Hum et al., 1991).

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho reprodutivo e a dinâmica da produção de imunoglobulinas A no muco cérvico-vaginal em novilhas expostas naturalmente a infecção pelo *C. fetus*.

6.2. Material e métodos

6.2.1. Animais experimentais

Foram utilizados dois touros Nelore e a confirmação da infecção dos touros pelo *C. fetus* foi realizada pela imunofluorescência direta (Mellick et al. 1963; Winter et al. 1967). O lavado prepucial (Leite et al., 1995) foi coletado em três ocasiões intervaladas de 15 dias, antes do início do período de monta e os animais ficaram em repouso sexual durante todo o período das coletas.

Os touros selecionados satisfizeram as condições de libido (escore ≥ 6), exame andrológico

(circunferência escrotal ≥ 32 cm e consistência testicular ≥ 3), espermograma (motilidade $\geq 60\%$, turbilhonamento ≥ 3 , vigor ≥ 3) e patologia espermática (defeitos maiores e menores $\leq 30\%$) propostos por Crudelli et al., (1992).

Quinze dias antes do início do experimento os touros receberam buçais marcadores para identificação das coberturas realizadas.

No decorrer do período de observação dos animais, foram efetuadas coletas de lavados prepuciais dos touros nos dias 4, 12, 27, 38, 98, 111, 123 e 159 dias após o início da cobertura, para a realização de imunofluorescência direta.

Foi constituído um grupo de 54 novilhas virgens, em torno de 3 anos de idade, criadas em internada de pastagem nativa, utilizando-se uma taxa de lotação média de 0,28 UA/ha, equivalente a média utilizada na região do Pantanal, onde o experimento foi realizado. As novilhas tinham peso ≥ 250 Kg e escore corporal ≥ 3 (Kilkeny, 1978) e possuíam resultado negativo à prova de soro-aglutinação rápida para Brucelose. As fêmeas receberam brincos de identificação e foram vacinadas contra Leptospirose (Leptovac, FEP-MVZ, Minas Gerais), Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Diarréia Bovina à Vírus, Vírus Respiratório Sincicial Bovino e Parainfluenza 3 (Cattlemaster 4, Pfizer, São Paulo) 30 dias antes do início do experimento, com as doses recomendadas pelo fabricantes.

6.2.2. Local e duração do experimento

O experimento foi realizado em uma propriedade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, situada na sub-região da Nhecolândia do Pantanal Mato-grossense/MS. A estação de monta ocorreu em um período de 4 meses, tendo sido iniciada em 1º de novembro de 1996 e concluída em 1º de março de 1997. As fêmeas participantes do estudo foram acompanhadas até o parto.

6.2.3. Avaliação do desempenho reprodutivo

Para a avaliação qualitativa e quantitativa dos efeitos da infecção pelo *C. fetus* sobre o

desempenho reprodutivo dos animais, foram estimados:

a) taxa de repetição de cio: foi determinada pelo registro da data de observação de cio. As novilhas foram acompanhadas diariamente, pela manhã e no final da tarde para verificação de fêmeas em cio que porventura tenham sido cobertas.

b) taxa de abortos: foi medida pelo registro de sinais do aborto ou pelo resultado do diagnóstico de gestação: quando uma fêmea, com uma prenhez confirmada em um diagnóstico de gestação, foi considerada vazia no diagnóstico de gestação seguinte, ou quando esta não pariu.

c) taxa de prenhez: foi determinada pelos resultados do diagnóstico de gestação por palpação retal, aos 90 e 120 dias do início da estação de monta.

d) taxa de parição: foi determinado o número de vacas que pariram até o final do período de observação.

6.2.4. Coleta de muco cérvico-vaginal

Foram realizadas coletas de muco cérvico-vaginal durante e após a estação de monta nos dias 0, 34, 47, 69, 82, 98, 111, 139, 170, 200, 231, 292, 334, 361 do experimento totalizando 14 coletas. O material coletado foi separado em alíquotas e conservado a -96° C, em nitrogênio líquido, até o momento da realização do ELISA IgA.

Para a coleta de muco cérvico-vaginal utilizou-se um tampão absorvente (Johnson & Johnson, São Paulo) previamente pesado, que foi introduzido na vagina da vaca com o auxílio de um tubo metálico e aplicador acoplado, sendo deixado na cavidade vaginal por, no mínimo, 30 min para saturação. O tampão foi então colocado em frasco estéril e transportado em gelo para o laboratório, onde foi pesado e o peso da amostra anotado para posterior cálculo da quantidade de diluente (PBS, 0,05%, Tween 20 pH7,4- PBST) a ser utilizado para obter-se uma diluição inicial de 1/10. Após a colocação do volume adequado, o tampão foi comprimido com bastão de vidro estéril para retirada do muco cérvico-vaginal (Fernandes & Gomes, 1992). O muco cérvico-

vaginal diluído foi dividido em alíquotas e mantido sob refrigeração até o momento do uso.

6.2.5. Imunofluorescência para detecção do *Campylobacter fetus* em lavado prepucial

A imunofluorescência direta para a detecção de *C. fetus* foi realizada de acordo com Mellick et al. (1963) e Winter et al. (1967) com soro anti-*C. fetus* produzido em coelhos com a amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 e conjugado ao tiocianato de fluoresceína (Ruckerbauer et al., 1974).

6.2.6. Detecção de imunoglobulinas A anti- *C. fetus*

As imunoglobulinas A anti-*C. fetus* foram pesquisadas por um ensaio imunoenzimático (ELISA IgA) utilizando na fase sólida um antígeno obtido por extração ácida com tampão de glicina 0,2M, pH2,2, preparado com a amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 (Pellegrin et al., 2001, Cap. 4).

6.2.7. Diagnóstico de gestação

Foi efetuado o diagnóstico de gestação por palpação retal aos 90 e 120 dias do início do experimento para determinar a taxa de prenhez do grupo observado.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Acompanhamento do estado de portador dos touros

Um dos touros foi positivo em todas as coletas mas o outro foi negativo nas coletas realizadas no 111^o e 123^o dias do experimento.

6.3.2. Desempenho reprodutivo

A taxa de prenhez aos 90 dias foi de 37% e aos 120 dias de 63%. Das 54 fêmeas acompanhadas, apenas 32 levaram a gestação a termo, tendo sido observada a ocorrência de perda de sete conceptos, sendo 6 fetos e uma reabsorção embrionária (13%), até os 60 dias de gestação (Tabela 1).

Tabela 1. Estado das novilhas cobertas por touros infectados por C. fetus durante uma estação de monta de quatro meses, ao final da estação de parição.

Estado das novilhas	Número de animais	%
Vazia	15	27.7
Aborto	7	13
Parida	32	59.3

Dos animais observados, 24 novilhas (44.4%) (24 animais) apresentaram repetição de cio, sendo que 4 animais (7.40%) repetiram o cio duas vezes (Tabela 2).

O retorno ao cio foi em média de 33.5 dias entre o primeiro e segundo cio e de 32 dias entre o segundo e o terceiro cio.

Das 22 fêmeas que chegaram vazias ao final do experimento, 11 (50%) não haviam repetido o cio, sete (31.8%) haviam repetido o cio apenas uma vez e 4 (18.2 %) duas vezes.

Estimando-se a data da concepção pela data do parto foi observado que 6 (22.2%) e 21 (77.8%) das fêmeas que pariram haviam concebido no primeiro e segundo mês da estação de monta, respectivamente.

6.3.3. Dinâmica da produção de Imunoglobulinas A anti-Campylobacter fetus em muco cérvico-vaginal

O valor médio das leituras de densidade ótica no muco cérvico-vaginal do grupo experimental no dia 0 da estação de monta foi de 0.097, com uma fêmea apresentando o valor máximo de 0.201. Nas coletas seguintes a média das leituras foi de 0.507 obtida no 98º dia e o valor máximo de DO₄₅₀ observado em um animal foi de 1.850 obtido na coleta posterior, no 111º dia. (Fig 2).

Para as fêmeas que não repetiram cio, o valor máximo de média das leituras de densidade ótica obtido foi de 0.554, no 98º dia após o início das coberturas. Para as fêmeas que apresentaram um segundo cio este valor foi de 0.553, no 111º dia e para as que apresentaram 3 cios (duas repetições) foi de 0.760, observado no 69º dia do início das coletas do experimento (Fig. 2).

Os animais que abortaram apresentaram um pico máximo de produção de IgA no 98º dia, com queda brusca na coleta subsequente. Houve um segundo pico, bem menor que o primeiro no 334º dia. Os animais que pariram normalmente apresentaram um pico de IgA na 111ª coleta e queda na subsequente, não havendo picos de IgA observados até o final das coletas (Fig. 3).

Dos sete animais que abortaram, três apresentaram, próximo a data provável do aborto, valores de DO₄₅₀ menores que o ponto de corte previamente estabelecido. A razão entre a DO₄₅₀ máxima obtida durante todo o período no qual o animal foi testado e o ponto de corte utilizado no ensaio (0.323) variou de 1.33 a 5.15, com uma média de 2.97. Na Tab. 4 os resultados de valores de DO₄₅₀ apresentados pelos animais que abortaram indicaram que a produção de imunoglobulinas A registrou valores máximos em períodos que variaram entre 13 dias antes do data provável do aborto até 111 dias depois, com uma média de 47 dias após.

Tabela 2. Repetição de cio de um grupo de 54 novilhas cobertas com touros infectados pelo *C. fetus* durante uma estação de monta de quatro meses.

	Repetição de Cio		Nº de cios	
	Sim	Não	2	3
No de animais	24	30	20	4
%	44.4	55.6	37.03	7.40

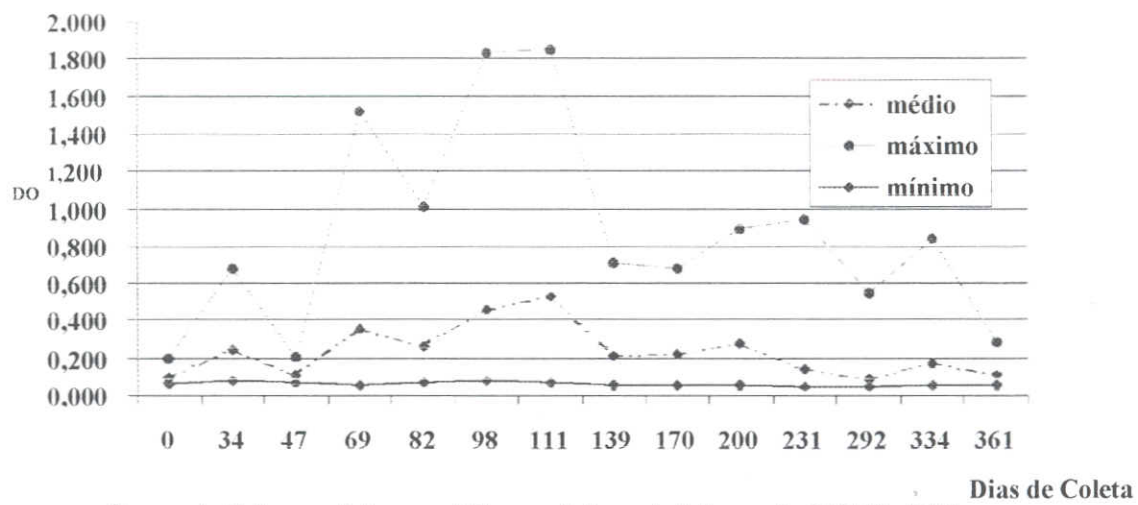


Figura. 1. Valores mínimos, médios e máximos de leituras de DO450 obtidas de novilhas naturalmente infectadas pelo *C. fetus*

Tabela 3. Valores de DO_{450} em muco cérvico vaginal de novilhas que abortaram.

Animal	No cios	de Idade do feto/ embrião*	Dias de Coleta													Valores Máximos de DO	Razão***
			0	34	69	82	98	111	139	170	200	231	292				
1	1	85	0,123	0,333	0,430	0,080	0,264	0,291	0,155	0,105	NIR	0,063	0,066	0,430	1,33		
2	1	48	0,090	0,240	NIR**	NIR	0,964	0,367	0,059	0,195	0,271	0,115	0,066	0,964	2,98		
3	3	33	0,119	0,539	0,276	0,160	0,106	0,106	NIR	0,688	NIR	0,318	NIR	0,688	2,10		
4	1	68	0,102	0,443	NIR	0,718	0,083	0,206	0,520	0,451	0,599	0,059	0,060	0,718	2,22		
5	1	65	0,072	0,248	0,433	NIR	NIR	0,600	0,219	0,681	NIR	0,562	0,070	0,992	3,07		
6	2	78	0,105	0,350	0,235	NIR	1,215	0,217	0,651	NIR	0,220	0,161	0,077	1,215	3,76		
7	3	31	0,138	0,581	1,145	0,945	1,665	NIR	NIR	0,149	NIR	0,057	NIR	1,665	5,15		
Médias			0,107	0,390	0,503	0,475	0,716	0,297	0,320	0,378	0,363	0,190	0,067				

* Em dias ** NIR- Não Realizado ***Razão entre a DO_{450} máxima obtida e o ponto de corte utilizado (0,323)

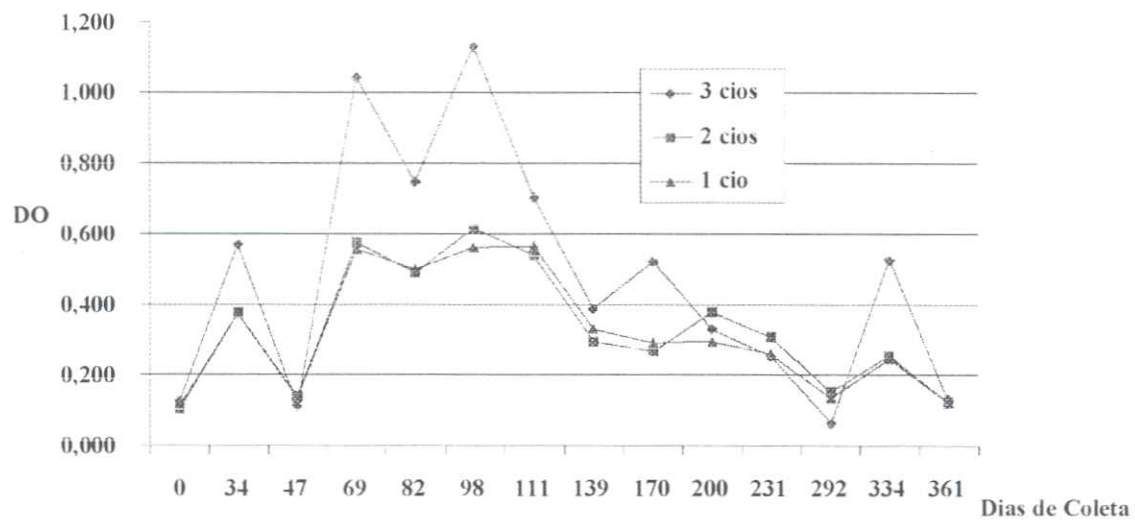


Figura 2. Valores médios de leituras de DO450 obtidas através de ELISA IgA em muco vaginal de novilhas cobertas com touros infectados pelo *C. fetus*

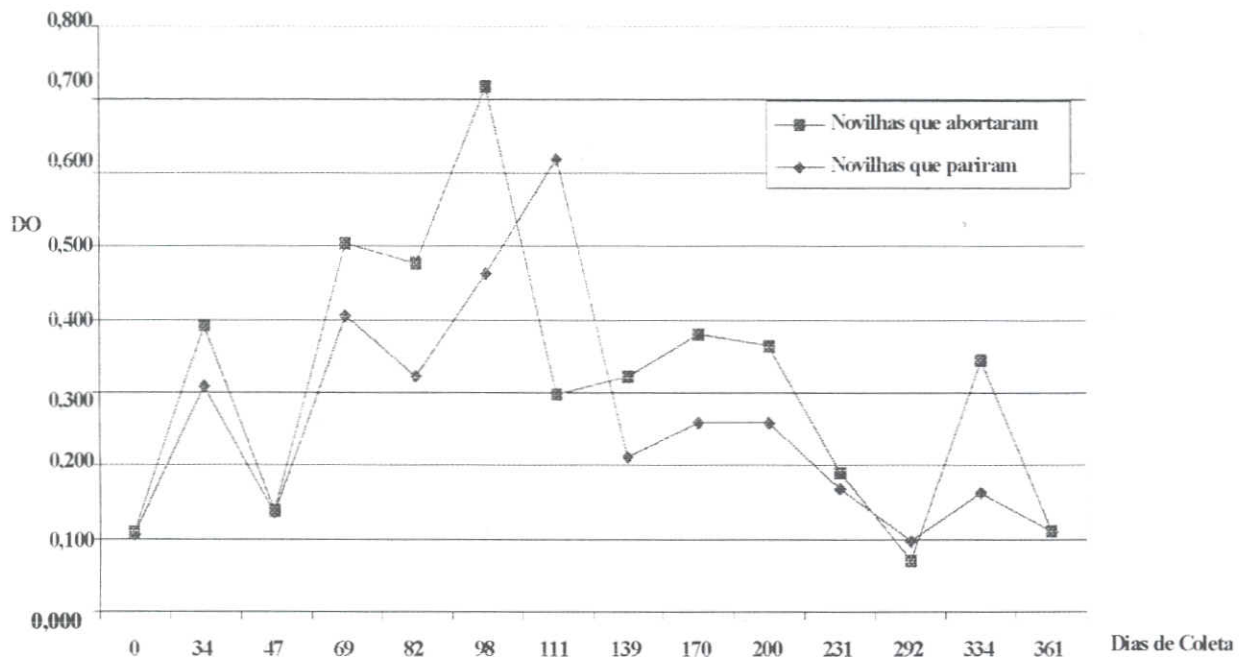


Figura 3. Média das leituras de DO450 no Elisa IgA do muco cérvico vaginal das novilhas que abortaram e que pariram

6.4. DISCUSSÃO

A análise dos registros de cobertura e parições indicou que a taxa de parição do grupo estudado foi de 59,3%. Este índice, embora de acordo, com o observado no Pantanal (Cadavid Garcia, 1986) está aquém do obtido em estudos mais recentes (Sereno et al., 1998a; Sereno et al., 1998b) e mesmo da taxa de prenhez observada na região, de 56%. A proporção sexual utilizada foi de 1:27, utilizando uma taxa de lotação média, de 0,28 UA/ha em pastagem nativa, compatível com a média utilizada na região que equivale a 3,6 cabeças/ha, significando que não foi oferecido aos animais experimentais uma condição de manejo nutricional que pudesse causar um viés nos resultados.

A taxa de prenhez aos 90 dias foi de 37% e aos 120 dias de 63% tendo sido observada a ocorrência de sete abortos, em média até os 60 dias de gestação. Tem sido observado que taxas de prenhez podem ser sensivelmente reduzidas em animais naturalmente infectados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* (Newsan, 1960; Donaldson & Clark, 1970; Hum et al., 1994) o que foi observado no grupo de novilhas acompanhado neste trabalho. Observações efetuadas, anteriormente, na mesma propriedade também registraram baixas taxas de prenhez, entre 15,9% (novilhas) e 65,7% (vacas) no período de 1991 à 1993 (Sereno, comunicação pessoal). Posteriormente, em experimento conduzido para testar diferentes proporções sexuais, utilizando touros negativos para Campilobacteriose Genital Bovina e grupos de vacas e novilhas não testadas, obtiveram taxas de prenhez que variaram de 61% à 68%, similares à encontradas para vacas nos anos anteriores (Sereno et al., 1998a). Entretanto, estes mesmos índices podem ter tido influência da Campilobacteriose Genital Bovina, que já havia sido diagnosticada em 51% dos touros daquela mesma propriedade (Pellegrin et al., 1994), uma vez que o experimento utilizou uma proporção de vacas com histórico desconhecido para Campilobacteriose Genital Bovina não sendo descartada a hipótese de ter sido selecionadas na amostragem fêmeas persistentemente infectadas Clark, 1971)

A taxa de repetição de cio foi de 44,4%, com apenas 4 animais repetindo o cio uma segunda vez. Já tem sido bem descrito que a repetição de

cio é um dos principais sinais clínicos evidentes em rebanhos infectados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* (Stoessel, 1982; Dekeyser, 1986; Leite et al., 1977) com intervalos irregulares em torno de 35 dias (Roberts, 1971).

O retorno ao cio foi em média de 33,5 dias entre o primeiro e segundo cio e de 32 dias entre o segundo e o terceiro cio. Em novilhas ou vacas de 1ª ou 2ª cria os intervalos em que os cios se repetem são em geral regulares, em torno de 35 dias podendo chegar a 120 dias, em alguns casos (Stoessel, 1982). Os abortos, que foram ocasionais são assim relatados por alguns autores, podendo tanto ser atribuídos ao *C. fetus* subsp. *venerealis* quanto ao *C. fetus* subsp. *fetus* (Hum, 1987; Genovez et al., 1993) sendo que Hum et al. (1987) sugerem que não existam diferenças patológicas ou epidemiológicas entre o aborto causado por uma ou outra subspécie.

O maior valor de DO₄₅₀ de imunoglobulinas A em fêmeas infectadas ocorreu entre o 4º e 5º mês, a partir do início do período de cobertura e estes resultados são, em muitos aspectos, similares aos apresentados por Hum et al. (1994). Estes dados corroboram as observações de que títulos de imunoglobulinas anti- *C. fetus* em muco cérvico-vaginal de animais que abortam costumam ser elevados, entre 4 e 10 meses após a infecção natural pelo agente (Corbeil et al., 1974a; Hum et al., 1991). Foram observados picos de IgA aos 69, 111 e 139 dias do início do experimento, com quedas de produção observadas nas coletas realizadas no 82º e 170º dias (Fig.1, Cap.6), o que indica haver uma flutuação na produção de anticorpos locais entre o 3º e o 6º mês, respondendo a variação antigênica de epitopos superficiais da bactéria, numa tentativa de evasão das defesas imunológicas específicas (Corbeil et al., 1974a; Hum et al., 1991).

A cinética de produção de IgA semelhante a observada neste experimento tem sido registrada, por muitos autores (Corbeil et al., 1974a; Corbeil et al., 1974b; Corbeil et al., 1985; Hum et al., 1991; Hum et al., 1994). Uma análise dos dados apresentados por Corbeil

(José Robson Bezerra Sereno é pesquisador da Embrapa/Pantanal).

(1975) indicam que os valores máximos na curva de anticorpos locais, indistintamente de classe, ocorreram na 14°, 28°, 56°, 70/77°, 160°, 154°, 182° e 224° dias após a infecção, para anticorpos contra o antígeno O (lipopolissacarídeo) de *Campylobacter fetus* e na 28°, 119°, 147° e 224° dias, para anticorpos contra o antígeno W (de superfície). Os achados de Corbeil et al. (1974a) são bastante aderentes aos deste experimento, principalmente quando a curva registra valores das coletas dos dias 69, 111/139 e quando dos períodos de platô na produção de IgA. Considerando-se que ambos os antígenos estimulam a produção de IgA é sugestivo que os valores máximos encontrados por Corbeil et al. (1975) sejam, devido as flutuações na produção desta classe específica de imunoglobulinas, refletindo as tentativas do organismo de estabelecer condições imunológicas ideais para que a mucosa possa adquirir integridade e o embrião se fixar

Comparando estes resultados com obtidos por Corbeil et al. (1974a) e Corbeil et al. (1974b) é possível observar uma estreita relação entre os títulos de anticorpos muco-aglutinantes encontrados por aqueles autores em torno do 69º dia, entre o 98º e 111º dias e em torno do 133º dia, e os presentemente apresentados, ficando esta semelhança também evidente quando são analisados os períodos em que a curva descreve um platô.

Coincidentemente, os dados apresentados por Corbeil et al. (1975) e Hum et al. (1991) com um número menor de animais indicam que a curva de produção tem características individuais, de modo que cada animal responde diferente em termos quantitativos, o que pode ser confirmado neste trabalho, utilizando um grupo experimental bem maior de animais.

Os animais que não repetiram cio apresentaram médias de leituras de DO₄₅₀ mais elevadas que os que repetiram o cio duas vezes, o que não pode ser comprovado estatisticamente. Entretanto, já tem sido descrito por vários autores (Clark, 1971; Garcia, & Brooks, 1993; Dekeyser, 1984) que animais infectados podem emprenhar após adquirir imunidade, o que supostamente tenha ocorrido com os animais acompanhados neste experimento.

As novilhas que abortaram apresentaram um

pico de IgA maior do que as que pariram normalmente, sendo este observado no 56º dia e as que emprenharam normalmente apresentaram este pico no 111º dia, com queda na produção na IgA do grupo que abortou, neste período. O grupo que pariu normalmente sofreu uma queda na produção de IgA, no 139º dia, mantendo-se, a partir, daí sempre abaixo dos níveis detectados nas novilhas que abortaram. Como a resposta medida pela produção de IgA no muco vaginal significa uma resposta da mucosa genital aos antígenos apresentados pelo *C. fetus*, esta classe de imunoglobulina atua prevenindo, de forma efetiva, a penetração do *C. fetus* através da cérvix e impedindo novo processo de endometrite, na tentativa de restabelecimento da integridade tecidual, para que ocorra a nidadação. Como os picos na produção de IgA correspondem a uma apresentação de novos antígenos, os platôs que se seguem, por sua vez parecem indicar que o organismo está respondendo de forma eficiente a estas mudanças (Pellegrin, 2001).

Como a média da idade dos fetos abortados foi de 58 dias, em decorrência do período de estação de monta que foi de apenas 120 dias, as fêmeas que abortaram não tiveram oportunidade de emprenhar posteriormente, embora o organismo tivesse aparentemente retornado a fertilidade, considerando-se que a imunidade teria sido suficiente para tal.

Dos animais que abortaram, três apresentaram, próximo a data provável do aborto, valores de DO₄₅₀ menores que o ponto de corte previamente estabelecido, o que também foi registrado por Hum et al. (1991) para uma das fêmeas que abortaram. Entretanto outros quatro animais apresentaram neste mesmo período uma elevação nas imunoglobulinas A, o que indica que a resposta imune local não segue um padrão e tem uma certa característica individual, embora os valores de Elisa obtidos possam ter influência de fatores externos (Pellegrin, 2001)

As razões entre a DO₄₅₀ máxima, obtida durante todo o período em que foi acompanhada a cinética de produção de IgA, e o ponto de corte utilizado no ensaio (0,323) variou de 1,33 a 5,15, com uma média de 2,97, que, podem ser comparadas com as razões obtidas por Hum et al. (1991), para animais que abortaram, sendo, inclusive mais elevados do que os registrados

por aqueles autores, que variaram de 0,85 à 2,6, concluindo-se que realmente os animais estavam infectados e respondendo especificamente ao *C. fetus*.

Os resultados de valores de DO_{450} apresentados pelos animais que abortaram indicaram que a IgA alcança níveis elevados em períodos que variam entre 13 dias antes do data provável do aborto (um animal) até 111 dias depois, com uma média de 47 dias após. Embora em alguns casos estes dados possam conter desvios, pois em algumas ocasiões não foi possível efetuar a coleta do material (Tab. 3, Cap. 6) eles são bastante similares as descrições feitas por Plastringe et al. (1955) para fêmeas que abortaram.

Neste trabalho, as fêmeas que ficaram vazias tiveram maior produção de IgA do que a média dos valores das fêmeas que abortaram. Os achados deste trabalho não estiveram totalmente de acordo com o observado por Hum et al. (1991), para os quais os níveis de IgA nos animais que abortaram foram maiores que os que pariram, havendo uma maior produção de IgA cerca de 15 dias após o aborto, o que levou aqueles autores a recomendar o ELISA IgA como um teste adequado para identificar fêmeas que abortam. Neste trabalho, contudo, os dados obtidos não permitem concluir sobre esta indicação para o teste, mas sim que ele pode ser utilizado para indicar resposta da fêmea à infecção pelo *C. fetus*, indistintamente da subespécie.

Apesar de não terem sido obtidos isolados de *C. fetus* dos animais experimentais, o rebanho já havia sido considerado positivo (Pellegrin, 2001) e os touros utilizados no experimento eram comprovadamente positivos sendo que as conclusões do trabalho foram baseadas no pressuposto de que as novilhas que responderam com produção de IgA em níveis acima do ponto de corte anteriormente estabelecido se infectaram.

Pelos resultados do experimento é sugestivo que a Campilobacteriose Genital Bovina tenha influenciando de forma prioritária o desempenho reprodutivo das novilhas, o que provavelmente esteja ocorrendo no restante das propriedades da região, onde a Campilobacteriose Genital Bovina já foi

diagnosticada. O trabalho realizado por Almeida et al. (1996) indicou que um descarte de matrizes por critérios de fertilidade elevou a taxa de natalidade de 47% para 67% em uma propriedade da região. Apesar de não ter feito nenhum levantamento do estado sanitário dos animais, isto indica que a fertilidade do rebanho pode ser melhorada pelo controle dos problemas reprodutivos existentes, dentre eles, a Campilobacteriose Genital Bovina.

Embora não exista a confirmação de quais antígenos são realmente efetivos na proteção contra o *C. fetus*, a cinética de IgA ao longo do período acompanhado pressupõe uma resposta eficiente da mucosa cérvico-vaginal, e o restabelecimento de sua integridade uma vez que pelo menos 59,3% das novilhas levaram a gestação a termo. Isto não indica, necessariamente, que novilhas restantes não tenham restabelecido a fertilidade, uma vez que podem, apenas, não ter tido oportunidade posterior de emprenhar.

Os resultados levam a sugerir que a proteção conferida por uma vacina de mucosa utilizando os antígenos de *C. fetus* subsp. *venerealis*, selecionados dentre os que demonstraram maior imunogenicidade em ensaio anterior (Pellegrin, 2001) possa ter sucesso como um substituto das bacterinas utilizadas até o momento sendo a imunidade local acompanhada através do Elisa IgA.

6.5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Embrapa Pantanal, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig e da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva – FEP/MVZ Coordenação Preventiva e dos produtores de gado de corte do Pantanal

O apoio logístico nas coletas de material foi dado pelos operários rurais e técnicos agrícolas da Embrapa Pantanal.

A. O. Pellegrin, A. P. Lage e R. C. Leite são bolsistas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. J. F. Figueiredo é bolsista da CAPES.

7. DISCUSSÃO GERAL

O baixo índice de natalidade no Pantanal é histórico, podendo ser considerado uma consequência direta do regime hidrológico da região. (Cadavid Garcia, 1986) o que não permitiria que produtividade alcance níveis competitivos com o das outras regiões do país.

Segundo Almeida (1996), o baixo índice de natalidade observado no Pantanal pode ser atribuído também a outros fatores, como o número reduzido de matrizes lactantes que é fecundado devido à restrição alimentar na seca (julho a setembro) e na cheia (dezembro a março), o baixo valor nutritivo das pastagens e a ausência de um estação de monta que propicie o nascimento de bezerros em épocas inadequadas e a inexistência de uma prática de desmama. Principalmente o inadequado manejo reprodutivo determinado pela ausência de uma estação de monta acarreta a amamentação dos bezerros até idade avançada depauperando as matrizes e impedindo nova concepção (Almeida et al., 1996).

Agentes patogênicos podem também ter grande influência em perdas no início do período gestacional (Genovez, 1997). A cada ano, a indústria sofre perdas econômicas de grande magnitude, devido a grande percentagem de abortos e dos fetos submetidos ao diagnóstico laboratorial, entre 23 e 46% tem a causa do aborto elucidada e a maioria destes pode ser atribuídos à patógenos específicos (Barr et al., 1993).

Pelos resultados encontrados neste trabalho, é sugestiva a participação da Campilobacteriose Genital Bovina no cenário da produção pecuária regional, como uma das causas do baixo índice reprodutivo. Apesar dos sinais de sua presença passarem despercebidos, em função da falta de maior controle dos índices reprodutivos, a prevalência de rebanhos (89%) e de touros portadores (52,3%; IC 95%: 42,6% -62,0%) do *C. fetus* subsp. *venerealis* estimadas foram altamente sugestivas.

Em regiões onde existem propriedades de difícil acesso e com baixo nível tecnológico, os levantamentos de prevalência que utilizem amostragem aleatória simples esbarram em dois tipos principais de limitações: a falta de registro

e identificação dos animais a serem coletados e as longas distâncias entre as propriedades onerando, sobremaneira os custos da coleta de material. Por isso, deve-se utilizar preferencialmente uma amostragem por conglomerado, considerando-se dois níveis de amostragem: a de propriedades (conglomerado) e a individual (Martin et al., 1987). Uma vez que a amostragem é realizada em dois níveis, a estimativa de prevalência também deve considerar estes níveis, obtendo-se então uma prevalência de conglomerado, neste caso, rebanhos e uma prevalência individual. A prevalência de conglomerados indica a proporção de conglomerados que tem pelo menos um animal infectado e a individual a proporção de animais em todos os conglomerados que estão infectados.

O estudo de prevalência baseia-se no exame de um grupo de animais em determinado intervalo de tempo, ou seja, a prevalência no período. Na prática este estimador fornece o risco de um animal, dentro de uma determinada população, ser acometido pela doença (Smith, 1984). Neste experimento foram amostradas 19 propriedades no intervalo de tempo compreendido entre abril de 1995 e novembro de 1996, com exceção do intervalo entre dezembro a março, onde não foram realizadas coletas pela impossibilidade de acesso as propriedades, causada pela cheia na região. Pelos elevados custos e dificuldades de acompanhamento individual dos animais, optou-se pela realização de somente uma coleta, uma vez um diagnóstico prévio da doença na região já havia sugerido que a prevalência da doença alcançava 50% (Pellegrin et al., 1998).

A probabilidade (individual) de um touro, amostrado na região do Pantanal, estar infectado pelo *C. fetus* foi estimada em 52,3% e a probabilidade, com 95% de certeza, de encontrar um rebanho com pelo menos um animal infectado foi de 89%. Estas estimativas podem ser consideradas elevadas, visto que em outras regiões do país a probabilidade individual está entre 23,9% (Genovez et al., 1996) e 42,3% (Jesus et al., 1999). Estes resultados, entretanto, não são comparáveis com os obtidos neste trabalho visto que os autores não utilizaram um delineamento experimental com o objetivo de estimar prevalência.

A prevalência de rebanhos infectados no país, por outro lado, tem sido mais elevada que a prevalência individual, variando de 27% (Mies Filho, 1960) à 72% (Guida & Langenegger, 1989). Na Argentina, onde o manejo reprodutivo em sua grande parte ainda é por monta natural, a Campilobacteriose Genital Bovina também é elevada a probabilidade de rebanhos infectados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* varia de 20.9 à 43% e de touros portadores, está entre 14.6 e 23% (Vilar & Spina, 1982; Cipolla et al., 1984; Soto e Di Roco, 1984). Na Austrália, Mc Cool et al. (1988) apontaram a ocorrência de 87% de rebanhos de corte infectados, percentual, este, muito semelhante ao encontrado neste trabalho. Considerando que a Austrália e a Argentina são países onde a pecuária ainda é praticada de forma extensiva, com manejo por monta natural é pressuposto que a presença do touro seja o mais importante fator de risco para a Campilobacteriose Genital Bovina.

Os procedimentos para estimativa da prevalência de uma doença em populações animais estão muito bem estabelecidos. O tamanho da população da qual a amostra é selecionada tem, na prática um pequeno efeito sobre a precisão da estimativa (prevalência) (Bennet et al., 1991). Uma amostra obtida por método probabilístico é submetida a um teste com conhecida sensibilidade (S) e especificidade (E) e estimada a prevalência bruta, que é a razão entre o número de indivíduos presentes na amostra que possuem a característica estudada, no caso portadores de *C. fetus*, e o número total de indivíduos da amostra. Esta estimativa deve, então, ser ajustada para eliminar os desvios induzidos pela especificidade e sensibilidade do teste empregado, quando estas forem menores que 100% (Donald, 1993).

Neste trabalho, foi utilizado o estimador da prevalência bruta, a partir do qual foi calculado o intervalo de confiança (IC) e o estimador da prevalência real (ajustada), uma vez que a sensibilidade e especificidade da técnica de IFD já terem sido anteriormente estimadas em 92,6 e 88,9% (Figueiredo, 2001). Os valores da sensibilidade e especificidade encontrados tornam a técnica extremamente adequada para uso em testes de triagem de populações negativas ou de baixa prevalência, uma vez que

em rebanhos com elevado número de positivos os resultados falsos positivos podem estar aumentados, superestimando os índices encontrados.

A utilização do estimador da prevalência real, calculado a partir da prevalência aparente (52,3%) indicou que esta não foi superestimada, uma vez que a prevalência real, de 51,65%, ficou dentro do intervalo de confiança calculado para a prevalência aparente (IC 95%: 42,6 – 62%), provavelmente por ter sido utilizada uma precisão mais flexível (11%) para esta estimativa.

A sensibilidade do diagnóstico, tanto por isolamento quanto pela imunofluorescência está diretamente relacionada ao método e frequência de coleta e, principalmente, ao acondicionamento e transporte do material (Stoessel, 1982). As coletas repetidas no mesmo animal diminuem a probabilidade de um resultado falso negativo (Stoessel, 1982). Tem sido recomendado que para se obter uma sensibilidade máxima na imunofluorescência direta, eliminando a possibilidade de um resultado falso negativo, devem ser efetuadas três coletas repetidas no mesmo animal, em intervalos quinzenais, com o animal em repouso sexual prévio e entre as coletas, de 15 dias (Lage & Leite, 2000).

O coeficiente de correlação intraconglomerado calculado (ρ) é uma medida que indica a variabilidade entre os conglomerados, quanto a determinado atributo que está sendo medido (ex. indivíduos infectados pelo *C. fetus*). O efeito de um coeficiente de correlação intraconglomerado elevado é aumentar a propabilidade de conglomerados concordantes, ou seja, todos os elementos sadios ou todos os elementos doentes. Se o ρ for igual a zero significa que o atributo medido está igualmente distribuído em todos os conglomerados (Bennet et al., 1991; Donald, 1993).

O coeficiente de correlação intra- conglomerado no levantamento de prevalência em touros do Pantanal foi 0,14 e o efeito de delineamento de 3,20. O valor do coeficiente de correlação encontrado, de 0,14, de acordo com Otte & Gumm (1997) indica que a Campilobacteriose Genital Bovina é uma doença que está muito

bem disseminada em todos os rebanhos sendo a transmissão entre rebanhos bastante elevada, o que indica a necessidade de uma estratégia de manejo profilático que atinja a maioria dos rebanhos não devendo ficar restrita apenas as propriedades amostradas.

O baixo coeficiente de correlação intraconglomerado estimado no levantamento realizado nas fêmeas, por sua vez, pode significar uma distribuição mais homogênea, na população, de animais sensibilizados pelo *C. fetus* subsp. *fetus*, sorotipo B, ou *C. jejuni* subsp. *jejuni*, e não, necessariamente que a Campilobacteriose Genital Bovina esteja presente no rebanho (Hum et al., 1991). Por sua vez, McDermott & Schukken (1994) observaram a existência de uma amplitude do coeficiente de correlação intra-conglomerado, podendo variar de 0,0017 a 0,46, embora para a maioria das doenças esteja entre 0,01 e 0,15, o que confirma o sugerido por Otte & Gumm (1997) e o encontrado no neste trabalho.

O coeficiente de correlação intra-conglomerado mais baixo teve também influencia no cálculo de intervalo de confiança (IC 95%: 42,6% - 62%), estimado na prevalência de touros positivos para o *C. fetus*, que teve maior precisão (9,7%) que os 11% inicialmente utilizados para o cálculo do número de conglomerados.

O tamanho de propriedade parece ter influenciado os índices de touros infectados, provavelmente porque propriedades com mais de 15000 ha não possuem número de invernações comparativamente maior que as de menor tamanho (Cadavid Garcia, 1986), o que gera uma demanda maior de touros por invernação, e um aumento proporcional de touros velhos no rebanho (Pellegrin, 2001) que exercem uma dominância social no rebanho cobrindo um maior número de fêmeas (Barling et al., 1997) o que, segundo alguns autores (Phillpot, 1968; Clark, 1971; Soto & Dick, 1983) pode aumentar o risco de infecção pelo *C. fetus*.

Esta elevada prevalência de touros infectados pelo *C. fetus* observada na região pode estar tendo também reflexo direto sobre a relação touro: vaca utilizada atualmente na região, que está entre 1:15 e 1:17 (Rosa & Melo, 1995), uma vez que o touro, quando a fêmea está

infectada pode ter que realizar mais de uma cobertura para que prenhez alcance sucesso.

A baixa proporção sexual, utilizada na região, pode estar contribuindo também para elevar a taxa de difusão da doença no rebanho, pois aumenta a oferta de touros susceptíveis que se tornarão infectados, dada a elevada probabilidade dos animais se tornarem infectados (52,3%) quando expostos ao risco (cobertura).

Uma forma viável de controle para a região poderia ser através da implantação de estação de monta, permitindo as fêmeas quando infectadas o período necessário de repouso sexual para o desenvolvimento de imunidade local e o retorno a fertilidade. Com esta estratégia de controle a proporção sexual utilizada na região poderá ser reduzida para até 1:40 (Serenio et al. 1998a) sendo, entretanto, imperativo que se controle a Campilobacteriose Genital Bovina antes que seja implantado um manejo reprodutivo diferenciado, do contrário as perdas iniciais, em termos de produtividade, poderiam ser muito elevadas.

A análise da distribuição das idades dos touros positivos à imunofluorescência direta para *C. fetus* nos animais das três propriedades nas quais esta informação foi registrada não indicou diferença significativa entre as duas categorias de idade (Tab. 3, Cap. 3) o que concorda com o encontrado por McCool et al. (1988) e Bier et al., (1977). A estratificação foi realizada com base no fato que um touro de 6 anos de idade trabalhou, no máximo, em duas estações de monta, sendo considerado um touro jovem, além do que, a maioria dos reprodutores na região encontra-se nesta faixa etária (Pellegrin et al., 1998).

Os resultados não significativos de relação entre idade e frequência de touros infectados podem indicar que a utilização exclusiva de manejo profilático que contemple a cobertura de novilhas apenas com touros jovens pode ser ineficaz. No Pantanal os touros mais jovens iniciam efetivamente a monta entre três e quatro anos de idade, quando provavelmente as criptas prepucias já estão bem desenvolvidas. Por outro lado, touros mais velhos exercem uma dominância social no rebanho (Barling et al., 1997), precedendo os touros mais jovens na

cobertura e cobrindo com mais frequência, o que é frequentemente demonstrado em sistema de acasalamento múltiplo, no Pantanal (Serenó et al., 1998).

O diagnóstico de Campilobacteriose Genital Bovina é bastante dificultado pela baixa sobrevivência do agente quando utilizados os métodos tradicionais de coleta e pela falta de métodos sorológicos sensíveis e específicos o suficientes para diagnóstico individual. Por este motivo, prioritariamente, e por sua rapidez, praticidade, sensibilidade e baixo custo a técnica de eleição para este trabalho foi a imunofluorescência direta.

Apesar do isolamento ser o padrão ouro no diagnóstico da Campilobacteriose, pelas condições de infra-estrutura e difícil acesso às propriedades, esta técnica não foi bem sucedida tendo sido descartado seu uso para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina, uma vez que poderia subestimar os verdadeiros índices de ocorrência da doença nos rebanhos estudados.

Para o diagnóstico da infecção por patógenos de mucosa, os métodos imunológicos baseados em detecção de imunoglobulinas A parecem ser bastante promissores, apesar de haver uma controvérsia sobre a concentração de imunoglobulinas no muco cérvico-vaginal que pode variar durante o estro, por uma influência hormonal (Wira & Kaushic, 1996) ou não (Hum et al., 1994). A aplicabilidade de um ensaio imunoenzimático que detecte este isotipo está embasado também no fato de sua representatividade na produção de anticorpos, em termos quantitativos pois a IgA compreende 80% de todos os anticorpos produzidos no organismo e é por excelência o anticorpo de proteção das mucosas.

Neste trabalho, o ensaio imunoenzimático padronizado comparou inicialmente dois antígenos produzidos com a amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC10354: um obtido por extração ácida em tampão glicina (pH2.2) e um extrato sonificado. Os antígenos não demonstraram diferir significativamente quanto a detecção de IgA em muco cérvico-vaginal (Pellegrin, 2001) mas apresentaram um perfil antígeno diferenciado, quantitativamente, uma vez que o antígeno

sonificado, como era esperado, demonstrou maior número de bandas proteicas (Fig. 1, Cap.4).

Coincidências foram observadas nas bandas que migraram em 93kDa, e em 63, 42,6, 29 e 25 kDa. Estas demonstraram ser imunogenicamente as mais importantes, pois no "immunoblotting" foram altamente reativas, sendo reconhecidas pelas imunoglobulinas A presentes no muco vaginal testado, quando utilizado o extrato ácido de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Os antígenos produzidos por sonicação, seguido de ultracentrifugação ou extraído por tampão glicina podem ser classificados como parcialmente purificados e produzem testes com resultados de elevada sensibilidade e especificidade, em contraste aos antígenos não purificados que apresentam menor sensibilidade e os altamente purificados que tem a sua sensibilidade diminuída (Hirschl & Rotter, 1990).

O antígeno de extração ácida por tampão glicina pH 2.2 foi empregado visando principalmente selecionar os antígenos de superfície de maior imunogenicidade, baseado nas observações de alguns autores que detectaram, em ovinos que abortaram, uma imunidade duradoura para *C. fetus* subsp. *fetus* com anticorpos sistêmicos específicos para as proteínas de superfície (Jensen et al., 1957; Grogono-Thomas et al., 2000).

Um teste que objetive a detecção de um grupo populacional (rebanho) que apresente determinado atributo ou característica, por ex., animais infectados pelo *C. fetus*, deve selecionar um critério que permita distinguir entre os grupos com (positivos) e sem (negativos) esta característica. Este critério, denominado ponto de corte, deve considerar: (1) a distribuição dos resultados em duas diferentes grupos populacionais, a dos indivíduos normais e daqueles acometidos pela infecção; (2) a prevalência de portadores da infecção na população estudada e (3) custos dos resultados falso-positivos e falso-negativos para o controle da infecção (Smith, 1994).

Apesar da tentativa inicial de utilização do isolamento como o teste padrão, para comprovação de rebanhos positivos, a

alternativa foi estabelecer o ponto de corte com base na média das leituras de densidade ótica de animais sabidamente negativos, procedimentos que foram, em parte, utilizados anteriormente por Hewson (1985) e Hum et al. (1991), Hum et al. (1994).

Neste trabalho, a construção do ponto de corte teve por base uma média dos resultados do Elisa IgA. Para a padronização deste ensaio imunoenzimático foi estabelecido o ponto de corte também com base nas médias de leituras de Densidade Ótica (DO₄₅₀) de amostras negativas de muco cérvico-vaginal, provenientes de novilhas virgens, com idade entre 12 e 24 meses, de propriedades com manejo por inseminação artificial e sem histórico clínico da doença, uma vez que o isolamento do *C. fetus* subsp. *venerealis* nos rebanhos positivos, cujos touros foram testados pela imunofluorescência direta, não obteve sucesso.

A média das leituras de DO das 44 amostras, foi de 0,143 e o desvio padrão de 0,09, sendo consideradas positivas as amostras que expressassem uma DO \geq 0,323 (0,143 + 2s). A utilização deste ponto de corte teve por objetivo imprimir maior sensibilidade do teste proporcionando o reconhecimento do maior número de animais com resposta ao *C. fetus* subsp. *venerealis*, semelhante ao que foi sugerido por Hum et al. (1991), para detecção de animais que abortaram devido a infecção pelo agente.

O estabelecimento do ponto de corte de um ensaio tem reflexo direto na sua sensibilidade e especificidade e a interpretação dos resultados de um ensaio imunoenzimático depende principalmente do ponto de corte e do objetivo do estudo. Neste trabalho a especificidade estimada do Elisa IgA, quando utilizado para o diagnóstico de Campilobacteriose Genital Bovina, foi de 94,4%, considerando que em 143 animais provenientes de rebanhos negativos foram detectados 8 (5,59%) resultados falsos positivos, em decorrência, provavelmente de sensibilização anterior pelo *C. fetus* subsp. *fetus* ou *C. jejuni* subsp. *jejuni*, como já comprovado anteriormente (Cap. 3). Hum et al. (1994) estimaram a especificidade do Elisa IgA, em 98,5%, com base no aparecimento de 5 resultados falso positivos, obtidos nos testes

realizados em 334 animais considerados livres da doença, utilizando como ponto de corte, a média dos animais negativos acrescida de dois desvios-padrão.

No "immunoblotting" houve reconhecimento das proteínas do antígeno por imunoglobulinas A presentes no muco cérvico-vaginal. As proteínas de 93, 56,7, 49kDa e 28,9/29,5 e 25,7kDa, demonstraram intensa imunoreatividade tanto para o *C. fetus* subsp. *venerealis* quanto para o *C. fetus* subsp. *fetus* (Fig. 4, Cap. 4). A proteína de 93kDa não foi evidenciada no "immunoblotting", quando utilizado antígeno de *C. jejuni* subsp. *jejuni* (Fig. 4, Cap.4) ou de *C. fetus* subsp. *fetus* mas entre 28,9 e 25,7 kDa kDa houve forte reconhecimento de 2 bandas no *C. fetus* subsp. *fetus* paralelamente representadas no *C. fetus* subsp. *venerealis* por bandas menores e mais difusas (Fig. 4, Cap. 4).

A sensibilidade e especificidade do teste são, também dependentes do antígeno utilizado na fase sólida da reação e vários autores tem utilizado na fase sólida do ensaio imunoenzimático antígenos proteicos ácidos extraídos em tampão glicina (Dunn et al.; 1987; Blaser et al., 1983), antígenos obtidos através de ruptura da bactéria por ultrassom (Hewson, 1985; Dunn et al., 1983) ou extração com água destilada (Garcia et al., 1995). Embora tenha sido um processo de semi-purificação, o método que utilizou o tampão glicina extraiu com sucesso a proteína de 93kDa, que, pelos resultados observados no immunoblotting, foi a responsável pela especificidade do antígeno de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Isto ficou claramente evidenciado quando foram comparados, no ensaio imunoenzimático, os antígenos produzidos com as amostras de *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. jejuni* subsp. *jejuni*, pois houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na detecção de imunoglobulinas A quando utilizado o *C. fetus* subsp. *venerealis* comparando-se com as demais preparações antigênicas não tendo esta mesma diferença sido observada quando comparados os antígenos preparados com a amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* ou *C. jejuni* subsp. *jejuni* ($p > 0,05$). De fato, esta resposta diferenciada ao antígeno de *C. fetus* subsp. *venerealis* pode ser atribuída a presença da proteína de superfície que migrou em 93kDa, uma vez que esta foi

evidenciada apenas no "immunoblotting" em que foi testado o antígeno de *C. fetus* subsp. *venerealis*.

A observação de que o gênero *Campylobacter*, principalmente as espécies *C. fetus* e *C. jejuni* e *C. coli*, partilham vários antígenos de parede tem sido feita por vários autores (Logan & Trust, 1983; Logan & Trust, 1986) cujo pesos moleculares podem ser considerados semelhantes ao evidenciados no perfil antigênico das amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. jejuni* subsp. *jejuni* comparadas neste trabalho.

A similaridade de reconhecimento entre *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. jejuni* subsp. *jejuni* parece ser atribuída ao antígeno proteico com peso molecular de 29.5 kDa, que pode ter sido, neste ensaio, o responsável pelo aparecimento de resultados falso positivos, animais infectados pelo *C. fetus* subsp. *fetus* ou *C. jejuni* subsp. *jejuni*, sem sinais clínicos da doença e provenientes de propriedades sem histórico da Campilobacteriose Genital Bovina. Isto foi confirmado no "immunoblotting", em que foram utilizadas diferentes diluições de muco vaginal de uma fêmea positiva no Elisa IgA, mas clinicamente normal e proveniente de rebanho considerado negativo. Na diluição 1:25 foram observadas bandas de 56.7, 42.6, 29.5 e 25.7 kDa em todos os antígenos preparados com amostras das três espécies/subespécie.

As bandas de 42.6 kDa observadas no *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* provavelmente foram representadas no *C. jejuni* subsp. *jejuni* pela banda de 41.7 kDa, embora isto somente possa ser confirmado por meio de uma eletroforese bidimensional (Dunn et al., 1987). Quando a diluição do muco, no "immunoblotting" foi elevada para 1:50 as bandas de 56.7 e 42.6 kDa continuaram visíveis mas as de 29.5 e 25.7 kDa não mais foram observadas. A maior imunoreatividade foi apresentada pela proteína de 42.6kDa da amostra de *C. fetus* subsp. *fetus* (Fig 5, Cap. 4) e na maior diluição testada não mais foram reconhecidas proteínas do antígeno de *C. fetus* subsp. *venerealis* (Fig. 5, Cap. 4).

Utilizando-se o Elisa IgA para detecção de imunoglobulinas A em muco cérvico- vaginal, foram identificados 18 rebanhos positivos na

sub-região da Nhecolândia do Pantanal Sul Mato-grossense. Com uma prevalência de 23.8% (IC 95%:19.5% - 28.1%) o coeficiente de correlação intra-conglomerado foi calculado em 0.02 e o efeito de delineamento (D) igual a 2.03. O coeficiente de correlação intra-conglomerado, já descrito acima, pode ser considerado baixo, indicando que na população existe uma distribuição homogênea de fêmeas sensibilizadas por antígenos de *C. fetus* subsp. *fetus* ou mesmo *C. jejuni* subsp. *jejuni*, não indicando necessariamente que a infecção seja pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* (Hum et al., 1991; Pellegrin, 2001)

A diferença nas taxas de prevalência observadas nas diferentes propriedades foram decorrentes, principalmente, do fato das coletas terem sido bem distribuídas ao longo do período e da considerável flutuação nos níveis de anticorpos locais que pode ocorrer em fêmeas naturalmente infectadas, descrita por Corbeil et al. (1974a) e Corbeil et al. (1974 b) e no Cap. 6 deste trabalho. Desta forma, somente algumas propriedades foram coletadas no período em que as fêmeas apresentavam o pico de produção de imunoglobulinas, provavelmente situado entre os meses de janeiro e abril (Pellegrin, 2001), se considerarmos que, na região, ocorre naturalmente uma estação natural de coberturas, na primavera e início do verão (Almeida et al. (1996).

A resposta imune da mucosa à infecção pelo *C. fetus* também foi acompanhada pelo Elisa IgA, durante um período de dez meses. Um grupo de 54 novilhas virgens foram submetidas, durante quatro meses, a cobertura por touros positivos, comprovados por meio da IFD. Para acompanhamento da cinética de produção de imunoglobulinas A na mucosa vaginal foram coletadas amostras de muco vaginal em intervalos quinzenais, até o 3º mês, e mensais, a partir deste período. No início da estação de monta as novilhas apresentaram um valor médio de leitura de densidade ótica de 0.097, menor do que a média apresentada pelas leituras do grupo controle utilizado para estabelecimento do ponto de corte, indicando que os animais não haviam ainda tido contato com o agente. Por sua vez, mesmo o valor máximo de 0.201, apresentado por uma novilha ficou abaixo do ponto de corte estabelecido anteriormente.

Nas coletas imediatamente posteriores, os valores médios do grupo experimental atingiram seu valor máximo de DO₄₅₀ no 98º dia (0,507) após o início das coberturas e o valor máximo de DO₄₅₀ foi de 1,850 obtido no 111º dia. (Fig. 2, Cap. 6). O pico de produção de imunoglobulinas A em fêmeas infectadas ocorreu entre o 4º e 5º mês, a partir do início do período de cobertura com o touro infectado. Pelos resultados indicados no Cap.5, em que animais de vários rebanhos foram testados é conclusivo que os níveis de anticorpos locais em fêmeas naturalmente infectadas estão sujeitos a considerável flutuação, com picos de produção de imunoglobulinas A entre o 3-5º mês após o início da estação de monta, como descrito por vários autores (Wilkie et al., 1972; Corbeil, 1974a, Corbeil, 1974b; Van Aert et al., 1977) podendo manter-se a produção de IgA, em alguns casos, por até 10 meses (Corbeil, 1974a).

O perfil de produção de imunoglobulinas A obtido neste trabalho foi similar ao apresentado por Hum et al. (1994), que acompanharam cinco novilhas cobertas com touro no qual foi isolado o *C. fetus* subsp. *venerealis*. Aqueles autores, entretanto, acompanharam os animais somente a partir do 3º mês, e utilizaram uma estação de monta de 45 dias, portanto já na primeira coleta foi registrado um pico de IgA, voltando a cair no mês seguinte. Vários picos e quedas foram observadas nas coletas subsequentes, indicando provavelmente tentativas do sistema imune de responder as constantes alterações em epítomos do agente, com o objetivo de se evadir ao sistema imune do hospedeiro. Do grupo ao qual pertenciam os animais, 90% (27) apresentavam nível de Imunoglobulinas A anti-*C. fetus* no muco cérvico-vaginal considerado positivo pelo ELISA padronizado por Hum et al. (1991)

A análise do desempenho reprodutivo do grupo indicou que apenas 59,3% (32) das fêmeas levaram a gestação a termo, sendo observada a ocorrência de sete abortos, no terço inicial da gestação (Tab. 1, Cap.6). Pode-se concluir que a taxa de parição registrada no presente trabalho não diferiu do índice historicamente registrado na região, de 56% (Cadavid Garcia, 1986; Almeida et al., 1996), o que permite suspeitar, devido a elevada prevalência da Campilobacteriose Genital Bovina, que o índice de natalidade esteja incorporando as perdas

reprodutivas devidas a disseminação da infecção pelo *C. fetus* no rebanho do Pantanal.

Experimentos efetuados em 1998, na mesma propriedade onde foi realizado o trabalho, obtiveram taxas de prenhez entre 61 e 68% (Sereno et al., 1998 a), índices também similares ao do grupo de novilhas acompanhado neste trabalho. Apesar dos touros utilizados naquele experimento serem livres da infecção, o fato do rebanho ter sido anteriormente considerado positivo pode ter tido alguma influência nos resultados, pois as fêmeas utilizadas no experimento apresentavam histórico reprodutivo e sanitário desconhecido, podendo ter sido sorteadas vacas persistentemente infectadas, para compor os grupos experimentais, que acabaram por transmitir o *C. fetus* aos touros.

É suposto que em propriedades livres da doença as taxas de prenhez sejam mais elevadas. Como o histórico dos rebanhos onde foram testadas tanto as fêmeas quanto os machos era desconhecido, não se pode fazer inferências a este respeito.

Os abortos decorrentes da infecção tem sido descritos ocasionalmente por alguns autores, podendo tanto ser causados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* quanto pelo *C. fetus* subsp. *fetus* (Hum et al., 1987; Genovez et al., 1993). Uma média das leituras de DO₄₅₀ dos animais que abortaram evidenciou o pico de produção de IgA no 98º dia, com queda brusca na data subsequente de coleta. Houve um segundo pico, bem menor que o primeiro, no 334º dia.

Os animais que pariram normalmente apresentaram um pico de IgA no 111ª dia de coleta e queda na subsequente, não havendo picos na produção de IgA até o final das coletas (Fig.3, Cap. 6). Embora não tenham sido acompanhadas as variações nos antígenos de superfície por não terem sido isoladas amostras dos animais do grupo experimental, a presença de IgA produzidas contra uma proteína de 93kDa, evidenciada no antígeno de *C. fetus* subsp. *venerealis*, indica que estas alterações tenham ocorrido e tenham sido exatamente expressas pela flutuação nos picos de produção de IgA descritos no trabalho.

Dos animais observados, 24 novilhas (44,4%)

(24 animais) apresentaram repetição de cio, sendo que 4 animais (7,41 %) repetiram o cio mais de uma vez, o que foi esperado, uma vez que a repetição de cio é um dos principais sinais clínicos evidentes em rebanhos infectados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* (Stoessel, 1982; Dekeyser, 1984; Leite et al., 1977) ocorrendo em intervalos irregulares em torno de 35 dias (Roberts, 1971) mais frequentemente em novilhas ou vacas de 1^a ou 2^a cria.

O retorno ao cio foi em média de 33,5 dias entre o primeiro e segundo cio e de 32 dias entre o segundo e o terceiro. Nas análises de desempenho reprodutivo de rebanhos do Pantanal são inexistentes as informações sobre frequência e intervalos de repetição de cio, o que não permitiu uma comparação com os seus parâmetros normais. Vários autores, entretanto, tem evidenciado que a Campilobacteriose Genital Bovina causa repetição em intervalos irregulares (Plastridge et al., 1955; Roberts, 1971; Stoessel, 1982; Dekeiser, 1986), padrão que foi observado neste trabalho.

Os animais que não repetiram cio apresentaram médias de leituras de DO₄₅₀ mais elevadas que os que repetiram o cio duas ou três vezes (Fig. 2, Cap.6), indicando que a imunidade se estabeleceu efetivamente, permitindo a concepção e prenhez, quando ainda havia a possibilidade de nova cobertura. As médias de leituras de DO₄₅₀, ocorreram nas fêmeas que ficaram vazias e que não abortaram significando que nestas provavelmente as várias alterações antigênicas por parte do agente foram mais eficazes que a resposta imune por parte da fêmea no sentido de burlar as defesas orgânicas impedindo o retorno a integridade da mucosa genital.

O grupo de animais que abortaram apresentaram um pico de IgA observado no 56^o dia e os que emprenharam normalmente apresentaram este pico no 111^o dia, com queda na produção do grupo que abortou neste dia. O grupo que pariu normalmente sofreu uma queda na produção de IgA no dia 139, mantendo-se a partir daí sempre abaixo dos níveis detectados nas novilhas que abortaram, indicando provavelmente que nos animais que pariram a imunidade já havia estabelecido um patamar de efetividade para o restabelecimento da fertilidade. Achados semelhantes foram

registrados por Hum et al. (1994) que evidenciavam maior produção de IgA cerca de 15 dias após o aborto, recomendando o ELISA IgA como um teste adequado para identificar fêmeas que abortavam.

Neste trabalho, os dados obtidos não permitem concluir que o teste possa ser utilizado para diagnóstico de abortamento por Campilobacteriose Genital Bovina, a presença de elevados valores de leituras de DO₄₅₀ em fêmeas que não lograram a prenhez após um período de estação de monta em torno de 120 dias pode ser um forte indicativo de que esta infertilidade temporária seja decorrente da infecção pelo *C. fetus* spp.

Embora não exista a confirmação de quais antígenos são realmente efetivos na proteção contra o *C. fetus*, os resultados permitem inferir sobre a importância da proteína de 93 kDa na resposta imune da mucosa cérvico vaginal ao *C. fetus* subsp. *venerealis* uma vez que pelo menos 59,3% das novilhas levaram a gestação a termo. Isto sugere que a proteção conferida por uma vacina de mucosa utilizando os antígenos de *C. fetus* subsp. *venerealis*, selecionados dentre os que demonstraram maior imunogenicidade (Pellegrin, 2001) possa vir a substituir as bacterinas utilizadas até o momento, podendo a resposta imune local ser acompanhada pelo Elisa IgA.

8. CONCLUSÕES

A prevalência de touros positivos para o *C. fetus* no Pantanal Mato-grossense é elevada, estando, provavelmente, relacionada ao tipo de manejo utilizado na região e exigindo medidas de controle severas para a redução dos índices de rebanhos infectados.

O ensaio imunoenzimático para IgA bovina pode ter aplicação na pesquisa de rebanhos tiveram contato com o *C. fetus*, identificando fêmeas portadoras e para avaliação da imunidade local ao agente.

Extratos proteicos semi-purificados como o antígeno obtido por extração com tampão de glicina ou antígeno sonificado são recomendados para uso na fase sólida do Elisa IgA anti-*C. fetus* pois produzem resultados similares na

deteção de imunoglobulinas A em muco cérvico-vaginal.

A proteína de 93 kDa. expressa na amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* utilizado como antígeno no Elisa IgA demonstrou ser a responsável pela especificidade do teste.

O "immunoblotting" pode ser utilizado como um teste complementar na pesquisa da Campilobacteriose Genital Bovina em rebanhos

com histórico negativo que apresentem resultados falsos positivos.

Em torno do 4º mês após o início da infecção existe um pico de produção de imunoglobulinas A que parece coincidir com o período de restabelecimento da integridade da mucosa uterina permitindo a concepção, uma vez que 67% dos animais emprenharam e 59,3% levaram a gestação a termo.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABREU, U. G. P. de & PENA, L. M. O. Reconcepção de vacas aneloras Nelore x brangus no Pantanal - sub-região da Nhecolândia. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias. 15. Campo Grande. 1996. **Abstracts**. p.375.
- ALMEIDA, I. L. de; ABREU, U. G. P. de; LOUREIRO, J.M.F. et al. Introdução de tecnologias na criação de bovinos de corte no Pantanal - Sub-região dos Paiaguás. Corumbá, MS : EMBRAPA-CPAP. 1996. 50p. (**EMBRAPA-CPAP. Circular Técnica**. 22).
- ANDREWS, P.J. & FRANK, F.W. Comparison of four diagnostic tests for detection of Bovine Genital Vibriosis. **J.Am.Vet.Med.Ass.**, v. 165, p.695-697, 1974.
- BARR, B. & ANDERSON, M.L. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. **Vet. Clin. Nort.Am.**, v.9, p. 343- 368, 1993.
- BARLING, K.; WIKSE, S.; MAGEE, D. et al. Managemen of beef bulls for high fertility. **Compend.Contin. Educ.Pract.Vet.**, v. 19, 888-893, 1997.
- BENNET, S.; WOODS, T.; LIYANAGE, W.M. et al. A simplified general method for cluster surveys of health in developing countries. **Rapp. Trimest.Statist.Sanit.Mond.** v.44, p.98-106, 1991.
- BIER, P.J.; HALL, C.E.; DUNCAN, J.R. Experimental infections with *Campylobacter fetus* in bulls of different ages. **Vet.Microbiol.**, v. 2, p.13-27, 1977.
- BJERRUM, O.J. & HEEGAARD, N.H.H. **Handbook of Immunoblotting of Proteins**. Raton: CRC Press, 1988, v. 2, 214p.
- BLASER, M.J.; HOPKINS,J.A; BERKA,R.M.; VASIL, M. L.; WANG,W.L.L. Identification and characterization of *Campylobacter jejuni* outer membrane proteins. **Infect.Immn.**, v.42, p.276-284, 1983.
- BLASER, M.J.; SMITH, P.F.; HOPKINS,J.A.; BRYNER,J.; HEINZER,I.; WANG,W.L.L. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. I. Serum resistance associated with high molecular weight surface proteins. **J.Infect.Dis.** v.155, p.696-706, 1987.
- BLASER, M.J.; SMITH, P.F.; KOHLER, P.F. Susceptibility of *Campylobacter* isolates to the bactericidal activity in human serum. **J.Infect.Dis.** v. 151, p.227-235, 1985.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Programa Nacional de Saúde Animal**. Diagnóstico de Saúde Animal. Brasília, 1977, pag 602.
- BUTZLER, J-P. **Campylobacter Infection in Man and Animals**. Boca Raton: CRC Press, 1984, 181-191p.
- CADAVID GARCIA, E.A. **Estudo técnico-econômico da pecuária bovina de corte do Pantanal Mato-grossense**. Corumbá, EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, 1986, 150 p. (EMBRAPA/CPAP, Documento, 4).
- CATTO, J.B.; COSTA, A.F.; BARROS, A.T.M.de. **Avaliação de anti-helmínticos em bovinos de corte no Pantanal**. Corumbá, MS : EMBRAPA-CPAP, 1994, 4p. (EMBRAPA-CPAP, Comunicado Técnico, 13).
- CATTO, J.B.; FURLONG, J. **Epidemiologia da helmintose bovina no Pantanal Mato-grossense. 2.Sub-região da Nhecolândia, 1978/79**. Corumbá : EMBRAPA-UEPAE de Corumbá, 1981, 6p. (EMBRAPA-UEPAE de Corumbá, Comunicado Técnico, 5).
- CIPOLLA, A.L., CASARO, A.P., TERZOLO, H.R. et al. Persistence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in experimentally infected heifers. **Vet.Rec.**, v.134, p.628, 1994.

- CLARK, B. L. Review of bovine vibriosis. *Aust. Vet. J.* v. 47, p. 103-107, 1971.
- CLARK, B. L. & DUFTY, B.V. A method for maintaining the viability of *Vibrio fetus* var. *venerealis* in samples of prepuccial secretion collected from carrier bulls. *Aust. Vet. J.*, v. 48, p. 462-464, 1972.
- COCHRAN, W.G. **Sampling Techniques**. Wiley, Toronto, 1977.
- CORBEIL, L. B.; SCHURIG, G.G.; DUNCAN, J.R. et al. Immunity in the female bovine reproductive tract based on response to *Campylobacter fetus*. *Adv.Exp.Med.Biol.*, v.137, p.729-743, 1980.
- CORBEIL, L.B.; DUNCAN, J.R.; SCHURING, G.G.D. et al. Bovine venereal vibriosis: variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infect. Immun.*, v.10, p. 1084-1090, 1974a.
- CORBEIL, L.B.; SCHURIG, G.G.D.; BIER, P.J. et al. Bovine Venereal Vibriosis: Antigenic variation of the bacterium during infection. *Infect. Immun.*, v. 11, p. 240-244, 1975.
- CORBEIL, L.B.; SCHURING, G.G.D.; DUNCAN, J.R. et al. Immunoglobulin classes and biological functions of *Campylobacter (Vibrio) fetus* antibodies in serum and cervico-vaginal mucus. *Infect. Immun.*, v.10, p.422-429, 1974b.
- DÁPICE, M. Ocorrência de aborto bovino no Estado de São Paulo. *Biológico.*, v.22, p.15-18, 1956.
- DEKEYSER, J. Bovine Genital Campylobacteriosis. IN: BUTZLER, J-P. **Campylobacter Infection in Man and Animals**. Boca Raton: CRC Press, 1984, 181-191p.
- DEKEYSER, P.J. Bovine genital campylobacteriosis. In: MORROW, D.A. (Ed.) **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1986. p.263-266.
- DOMEIKA, M.; GANUSAUSKAS, A.; BASSILI, M. et al. Comparison of polymerase chain reaction, direct immunofluorescence, cell culture and enzyme immunoassay for the detection of *Chlamidia psittaci* in bull semen. *Vet.Microbil.*, v. 42, p. 273-280, 1994.
- DONALD, A. W. Prevalence estimation using diagnostic tests when there are multiple correlated disease states in the same animal or farm. *Prev.Vet.Med.*, v.15, p.125-145, 1993.
- DONALDSON, L. E. & CLARK, B.L. Bovine vibriosis in two herds of beef cattle in northern Queensland. *Aust. Vet. J.*, v. 46, p.500-502, 1970.
- DUNN, B.E.; BLASER, M.J.; SNYDER, E.L. Two dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter* outer membrane proteins. *Infect. Immun.*, v. 55, p.1564-1572, 1987.
- DWORKIN, J. & BLASER, M.J. Molecular mechanisms of *Campylobacter fetus* surface layer protein expression. *Mol. Microbiol.*, v.19, p.1241-1253, 1997.
- EMBRAPA-CENARGEN. Brasília, DF. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal mato-grossense**. Por Antonio Costa Alem e José Francisco Montenegro Valls. Brasília, 1987a. 339p.il. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 8).
- EMBRAPA- CPAP. (Corumbá, MS). **Programa Nacional de Pesquisa Agropecuária do Pantanal**. Corumbá, MS, 1987b, 90p.
- EMBRAPA-CPAP. (Corumbá, MS). **Plano Diretor do Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal**. Corumbá, MS, 1993, 41p.
- FERNANDES, J.C.T. & GOMES, M.J.P. Campylobacteriose Genital Bovina In: CHARLES, T.P. & FURLONG, J. Eds. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, pág. 141 -150, 1992.

- FIGUEIREDO, J.F. **Avaliação da imunofluorescência direta no diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina.** UFMG. 2001. 34p Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- GARCIA, M. M. & BROOKS, B. W. *Campylobacter*. In: R.L. GYLES, C.L., THOEN, C.D. (Ed) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ed.2. Iowa State University Press. p.262-272. 1993.
- GARCIA, M.M., LUTZE WALLACE, C.L.; DENES, A.S. EAGLESOME, M.D.; HOLST, E; BLASER, M.J. Protein shift and antigenic variation in the S-layer of *Campylobacter fetus subsp venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of sapA homologs. **J.Bacteriol.**, v.177, p.1976-1980. 1995.
- GENOVEZ, M.E. Campilobacteriose Genital Bovina. In: Simpósio Pfizer sobre doenças infecciosas e vacinas para bovinos. 2. Caxambu, 1997, **Anais**, Belo Horizonte, MG. p.49-53.
- GENOVEZ, M.; SCARCELLI, L.; PICONE, A.B.B. Avaliação de dois métodos de coleta de muco prepucial no diagnóstico da Campilobacteriose genital em touros. **Arq. Inst.Biol.**, v.6, p. 7-11, 1996.
- GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos no examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992, **Bras.J.Vet.Res.**, v.30, p.107-112, 1993.
- GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S. Campilobacteriose Genital Bovina: Proposta de um diagnóstico mais sensível em touros. **Arq. Inst. Biol.**, v.56, p.5-7, 1989.
- GRIFFITHS, I. B.; GALLEGU, M. I; DE LEON, L. S. Levels of some reproductive diseases in the dairy cattle of colombia. **Trop. Anim. Hlth.** V. 16, p. 219 - 223, 1984.
- GROGONO-THOMAS, R.; DWORKIN, J. ; BLASER, M. J. ; NEWEL, D.G. Roles of the surface layer proteins of *Campylobacter fetus subsp fetus* in ovine abortion. **Infect.Imun.**, v.68, p. 1687-1691. 2000.
- GUIDA, H. G. & LANGENEGER, J. Doenças infecciosas da reprodução reduzem produtividade do rebanho leiteiro. **Gado Holandês**, v. 54, p. 67. 1960.
- HEWSON, P. I. Enzyme - linked immunosorbent assay for antibodies to *Campylobacter fetus* in bovine vaginal mucus. **Res.Vet.Sci**, v. 38, p. 41-45. 1985.
- HIRSCHL, A.M. & ROTTER, M.L. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections: suitability of various antigen preparations. In: MALFERTHEINER, P. and DITSCHUNEIT, H. **Helicobacter pylori, Gastritis and Peptic Ulcer**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990, p.141-146.
- HUM, S. Bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. **Aust.Vet.J.**,v.64, p. 319-320, 1987.
- HUM, S.; QUINN, C.; KENNEDY, D. Diagnosis of bovine campylobacteriosis by ELISA. **Aust. Vet. J.**, v. 71, p.140-143, 1994.
- HUM, S.; STEPHENS, L.R.; QUINN, C. Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. **Aust. Vet. J.**, v. 68, p.272-275, 1991.
- JENSEN,R.; MULLER, V.A.; HAMMERLUND, M.A. ; GRAHAM, W.R. Vibronic abortion in sheep. I Transmission and immunity. **Am.J.Vet.Res.**, v.18, p.326-329, 1957.
- JESUS, V.L. T.; TRÉS, J. E.; JACOB, J.C.F.; LATORRE, L.B.L.M; SANTOS Jr, J.C.B. Campilobacteriose genital bovina: ocorrência nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. **Rev.Bras.Ci.Vet.**, v.6, p.133-136, 1999.

- KASARI, T., GLEASON, D. Herd management practices that influence total beef calf production. Part 1. **Compend.Contin. Educ. Pract. Vet.**, v.18, p. 1358-1366, 1996.
- KILKENNY, J.B. Reproductive performance of beef cows. **World Review Anim. Prod.**, v.4, n.3, p.65-74, 1978.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAGE, A. P. PELLEGRIN, A. O., COSTA, G. M. et al. Campilobacteriose genital bovina: 21 anos de diagnóstico na Escola de Veterinária da UFMG. **Rev. Bras. Repr. Anim.**, v. 21, n. 2, p. 164-166, 1997.
- LAGE, A.P. ; LEITE, R.C. Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). *Pecuária de Corte*, v.100, p.50-54, 2000.
- LAGE, A.P.; GODFROID, E.; FAUCONNIER, A. et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection fo *cagA* gene in gastric biopsy specimens. **J. Clin. Microbiol.**, V. 33, p.2752-2756, 1995.
- LANDER, K.P. The application of transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. **Br. Vet. J.**, 146: 334-340, 1990.
- LAWSON, J.R & MacKINNON, D.J. *Vibrio foetus* infection in cattle. **Vet. Rec.**, v. 64, p.763-773, 1952.
- LEITE, R.C.; HADDAD, J.P.; COSTA, G.M.; PELLEGRIN, A.O.; RIBEIRO, A.C.C.L. Técnica modificada para coleta de lavado prepucial de touros, para exame de tricomonose e ou campilobacteriose. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 19, p.434, 1995.
- LEITE, R.H.M., PELLEGRIN, A.O. , BRITO, C.P.T., LOBATO, Z.I.P., LAGE, A.P., LEITE, R.C. Rinotraqueíte Infecciosa bovina na região do Pantanal Matogrossense. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. 27. **Resumos**, Águas de Lindóia, 2000, no prelo.
- LEITE, R.C. **Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG, 1977. 38p Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- LEWALA-GURUGE, J.; NILSSON, I., LJUNGH, Å.; WADSTRÖM, T. Cell surface proteins of *Helicobacter pylori* as antigens in an Elisa and a comparison with three commercial ELISA. **Scand. J.Infect.Dis.**, v.24, p.451-465, 1992.
- LOGAN, S.M. & TRUST, T.J. Molecular identification of surface protein antigens of *Campylobacter jejuni*. **Infect. Immun.** V.42, p.675- 682, 1983.
- LOGAN, S.M. & TRUST, T.J. Location of epitopes on *Campylobacter jejuni* flagella. **J. Bacteriol.**, v. 168, p.739-745, 1986.
- MARTIN, S.W.; MEEK, A.L.; WILLBERG, P. *Veterinary Epidemiology. Principles and methods.* Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1987, 343p.
- McCOOL, C.J.; TOWSEND, M.P.; WOLFE, S.G. SIMPSON, M.A. OLM, T.C.; JAYAWARDHANA, G.A. CARNEY, J.V. Prevalence of bovine venereal disease in the Victoria River District of the Northern Territory likely economic effects and praticable control measures. **Aust. Vet. J.** , v.65, n.5, p.153-156, 1988.
- McCOY, E.C.; DOYLE, D.; BURDA, K.; CORBEIL, L.B.; WINTER, A.J. Superficial antigens of *Campylobacter (Vibrio) fetus*: characterization of an antiphagocitic component. **Infect. Immun.**, v.11, p.517-525, 1975.
- McDERMOTT, J. J. & SCHUKKEN, Y. H. A review of methods used to adjust for cluster effects in explanatory epidemiological studies of animal populations. **Prev. Vet. Med.**, v. 18, p.155-173, 1994.

- MELLICK, P. W. . WINTER, A. J. . McENTEE, K. Diagnosis of vibriosis in the bull by the use of the fluorescent antibody technic. **Cornell Vet.**, v. 55, n. 2. p. 280 - 294.
- MIES FILHO, A. Incidência da vibriose bovina em alguns rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. **Rev. Fac. Agron. Vet. UFRGS**, v. 3. p.195-199, 1960.
- NACHAMKIN, I. & YANG, X.H. Local immune responses to the *Campylobacter* flagellin in acute *Campylobacter* gastrointestinal infection. **J.Clin.Microbiol.** v.30, p.509-511, 1992.
- NEWSAN, I.D.B. Experimental *Vibrio fetus* infection in heifers. Part. I . Infection and conception rates. and diagnosis. **Aust. Vet. J.** v.36. p.426-431, 1960.
- NEWSAN, I.D.B. & MONSBOURGH, M. Diagnosis of bovine vibriosis. Part. 1. The production and use of standard suspensions of *Vibrio fetus* agglutinating antigens. **Aust. Vet. J.** v. 43, p.237-242, 1967.
- OTTE, M.J. & GUMM, I.D. Intracluster correlation coefficient of 20 infections calculated from the results of cluster-sample surveys. **Prev.Vet.Med.**, v.31, p.147-150, 1997.
- PELLEGRIN, A. O.; COSTA, G.M. ; SERENO, J.R.B. LEITE, R. C; SILVA, R. A. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos de corte do estado de Mato Grosso do Sul: resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL..11 Belo Horizonte, 1994. **Resumos**. Belo Horizonte, p. 442
- PELLEGRIN, A.O. A Campilobacteriose e Tricomonose são doenças reemergentes? **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, n.4, p.479-566, 1999a.
- PELLEGRIN, A.O. **Campilobacteriose Genital Bovina na sub-região da Nhecolândia do Pantanal Sul Mato-grossense e proposição de novas técnicas de diagnóstico**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária. UFMG. 2001. 82p Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- PELLEGRIN, A.O., LAGE, A.P., BARBOSA, E.F.B et al. Ensaio imunoenzimático para detecção de imunoglobulinas A em muco cérvico- vaginal de fêmeas bovinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999b. Salvador. **Anais...** . Salvador: CBM, 1999. p.166.
- PELLEGRIN, A.O.; SERENO, J.R.B.; LEITE, R.C et al. Campilobacteriose genital bovina em touros do mato grosso do sul. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, n1, p.43-46, 1998.
- PESTANA DE CASTRO, A.F.P, GIORGI, W. AOKI, D. et al. Pesquisas de aglutininas anti-*Vibrio fetus* em mucos vaginais de rebanhos bovinos dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. **Biológico**,v.37, p.115-118, 1971.
- PESTANA DE CASTRO, A.F.P.; GIORGI, W.; ROSA, C.A.S., et al. Vibriose bovina no Estado de São Paulo. Isolamento de novas amostras de *Vibrio fetus* e pesquisa de aglutininas anti-*Vibrio fetus* no muco vaginal. **Arq. Inst. Biol.**,v. 34, p.30-43, 1967.
- PHILPOTT, M. Diagnosis of *Vibrio fetus* infection in the bull. **Vet. Rec.**, v. 82, p. 458 - 463, 1968.
- PLASTRIDGE , W. N., EASTERBROOKS, H.L., WILLIAMS, L. F. et al. Reproductive efficiency and serological findings in heifers experimentally infected with *Vibrio fetus*. **Am. J. Vet. Res.** V.16, p. 493-498, 1955.
- POTT, A.; CATTO, J. B.& BRUM, P. A. R. Períodos críticos de alimentação para bovinos em pastagens nativas, no Pantanal Mato- grossense. **Pesq. Agrop. Bras.**, v.24, p. 1427-1432, 1989.

- PUTT, S.N.H., SHAW, P.M., WOODS, A.J. et al., Veterinary epidemiology and economics in Africa. University of Reading, Reading, UK, 1987, 130p.
- RAMOS, A. & GUIDA, H.G. Aglutininas anti-*Campylobacter fetus* em mucos vaginais de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 2, p.715, 1978.
- ROBERTS, S.J. Vibriosis. In: Roberts, S.J. **Veterinary Obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**, 2nd ed. Ithaca: Edward Bros, Inc. p.412, 1971.
- ROSA, A. do N., MELO, J. de. **Levantamento da situação atual da produção de touros para o Pantanal Mato-grossense**. EMBRAPA, CPAP, 1995, 9p. (EMBRAPA, CPAP, Comunicado Técnico, 14).
- ROSA, A.N. Manejo e melhoramento genético. In: **Tecnologia e Informações para a pecuária de corte no Pantanal**. Catto, J.B.; Sereno, J.R.; Comastri Filho, J.A. (Orgs). EMBRAPA, MS: EMBRAPA-CPAP, 1997, p.85- 110.
- RUCKERBAUER, G.M; MALKIN, K.; MITCHELL, D. et al. Vibriosis: demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubalus* organisms in preputial fluid by immunofluorescence and culture techniques. *Can. J. Comp. Med.*, v.38, p.321-327, 1974.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning**. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
- SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada a experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221p.
- SERENO, J.R.B. & PELLEGRIN, A.O. Validação de técnicas de manejo no Pantanal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30, Rio de Janeiro, 1993. **Resumos**, Rio de Janeiro, p.198.
- SERENO, Jose Robson Bezerra, SILVA, E V C. Avaliação da redução da proporção touro:vaca no Pantanal, em acasalamento individual. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu.. Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.. Botucatu.: SBZ., 1998, v.35, p.137-139.
- SERENO, Jose Robson Bezerra, SILVA, E V C. Avaliação da redução da proporção touro:vaca no Pantanal, em acasalamento múltiplo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu.. Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Botucatu.: SBZ., 1998, v.35, p.146-148.
- SILVA, J. DOS S. V. DA; ABDON, M. DE M. E SILVA, M. P da. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. Encontro sobre sensoriamento remoto aplicado a estudos no Pantanal. **Livro de resumos**, Corumbá. São José dos Campos, INPE, 1995, p.9-10.
- SILVA, J. dos S. V. DA; MORAES, A.S.; SEIDL, A. F. **Evolução da agropecuária no Pantanal Brasileiro**, 1975-1995. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2001.
- SMITH, R.D. **Veterinary Clinical Epidemiology**. Boca Raton: CRC Press, 1994, 234p.
- SOTO, P. & Di ROCO, M.J. Campylobacteriosis bovina: Prevalência em diversas zonas de la Republica Argentina. **Rev. Invest. Agropec.**, v. 19, p. 273- 279, 1984.
- SOTO, P. & DICK, A. Campylobacteriosis: infección experimental de toros jóvenes. **Rev.Med.Vet.Bs.As.**, v.64, p.166-169, 1983.
- STOESSEL, F. **Las enfermedades venereas de los bovinos: Trichomoniasis y vibriosis genital**. Zaragoza Acribia, 1982, 163 p.

- TRUST, T.J. & LOGAN, S.M. Outer membrane and surface structure of *Campylobacter jejuni*. IN: BUTZLER, J-P. **Campylobacter Infection in Man and Animals**. Boca Raton: CRC Press. 1984. p.133-142.
- TULLIO, R. R. **Período de monta para o Pantanal Mato-grossense, sub-região dos Paiguás**. EMBRAPA/ CPAP. 1986. 4p. (EMBRAPA, CPAP, Pesquisa em Andamento, 7)
- VAN AERT, A.; DEKEYSER, P., FLORENT, A.F.; BOUTERS, R. et al. Nature of *Campylobacter fetus* agglutinins in vaginal mucus from experimental infected heifers. **Br.Vet. J.**, v. 133, p. 88-94. 1977.
- VILLAR, J. A. & SPINA, E. M. *Campylobacteriosis* (Vibriosis) Bovina. Una recopilación de datos sobre su incidencia en el periodo 1966-1981. **Gac. Vet. B. Aires**, v. 44, p. 659-657. 1982.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. **The enzyme -linked immunosorbent assay**. Guernsey. Dynatech Europe. . 1979.
- WILKIE, B.N & WINTER, A.J. Bovine vibriosis the distribution and specificity of antibodies induced by vaccination and infection and the immunofluorescent localization of the organism in infected heifers. **Can.J.Comp.Med.**, v.35, p.301-312. 1971.
- WILKIE, B.N; DUNCAN, J.R; WINTER, A.J. The origin, class and specificity of immunoglobulin in bovine cervico-vaginal mucus: variation with parenteral immunization and local infection with *Vibrio fetus*. **J. Reprod. Fertil.**, v. 31, p.359-365. 1972.
- WINTER, A. J. Microbial immunity in the reproductive tract. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 173, p.1069-1073. 1982.
- WINTER, A. J.; SAMUELSON, J.D.; ELKANA, M. A comparison of immunofluorescence and cultural techniques for demonstration of *Vibrio fetus*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 150, n. 8, p. 498 - 502. 1967.
- WINTER, A.J.; McCOY,E.C.; FULLMER, C.S.; BURDA,K.; BIER, P.J. Microcapsule of *Campylobacter fetus*: chemical and physical characterization. **Infect.Immun.** v.22, p.963-971. 1978.
- WIRA, C.R & KAUSHIC, C. Mucosal immunity in the female reproductive tract: Effect of Sex hormones on immune recognition and response. In: Kiyono, H.; Ogra, P.; Mc.Ghee, J.R. (Eds) **Mucosal vaccines**. Academic Press. 1996, p.345-386.