

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

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

SILVIA DE CARLI

PORTO ALEGRE

2022

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

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

Autora: Silvia De Carli

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

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

PORTO ALEGRE

2022

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

CIP - Catalogação na Publicação

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

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

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

Silvia De Carli

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

Aprovado em: 28/03/2022

APROVADO POR:

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

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

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

Dr^ª. Fabiana Quoos Mayer
Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - IPVDF
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Agradeço à minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Franciele por todos os ensinamentos, orientação e constante incentivo.

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGB: Campilobacteriose Genital Bovina

TGB: Tricomonose Genital Bovina

DFAT: Imunofluorescência direta

DNA: Ácido desoxirribonucleico

MLST: *Multilocus sequence typing*

PBS: Tampão salina fosfato

PCoA: Análise da Coordenada Principal

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFGE: *Pulsed field gel electrophoresis*

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

OIE: Organização Mundial da Saúde Animal

WGS: *Whole genome sequencing*

ITS: *Internal transcribed spacer*

ASV: *Amplicon sequence variant*

pb: pares de base

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Epidemiologia da Campilobacteriose Genital Bovina.....	14
2.2 Características do agente etiológico causador da Campilobacteriose Genital Bovina	17
2.3 Diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina	19
2.4 Diagnóstico diferencial de Campilobacteriose Genital Bovina	22
2.5 Avanços na caracterização de populações microbianas	24
2.6 Microbiota central do trato reprodutivo de bovinos	25
2.7 Microambiente do trato reprodutivo de fêmeas bovinas e influências na microbiota	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Metodologia de seleção dos animais, amostragem e processamento das amostras	33
4.1.1 Seleção e visita às propriedades para coleta de muco cervicovaginal de vacas	33
4.1.2 Coleta das amostras de muco cervicovaginal	33
4.1.3 Identificação molecular de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> nas amostras de muco cervicovaginal	33
4.1.4 Amplificação do alvo V4 do gene 16S rDNA nas amostras de muco cervicovaginal das vacas e sequenciamento dos amplicons	34
4.1.5 Amplificação da região intergênica ITS1 nas amostras de muco cervicovaginal das vacas e sequenciamento dos amplicons.....	35
4.1.6 Análises in silico da diversidade de bactérias e micro-organismos eucarióticos obtidos da cérvix das vacas analisadas.....	36
5 CAPÍTULO 1: Muco prepucial bovino congelado como amostra adequada para o diagnóstico molecular direto de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	39
6 CAPÍTULO 2: Vigilância de touros de corte no Brasil para avaliar o seu papel como fonte de agentes infecciosos relacionados à infertilidade das vacas.....	40

7	CAPÍTULO 3: Desempenhos reprodutivos das vacas e a ordem de paridade influenciam a comunidade fúngica cervicovaginal	41
8	CAPÍTULO 4: Rumo à caracterização da microbiota cervicovaginal de vacas que carregam <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	42
9	DISCUSSÃO GERAL	43
10	CONTRIBUIÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DOS RESULTADOS ALCANÇADOS NESTA TESE	48
11	CONCLUSÕES.....	50
12	PERSPECTIVAS	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia da Campilobacteriose Genital Bovina

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

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

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

* Dados coletados em 26/02/2022.

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

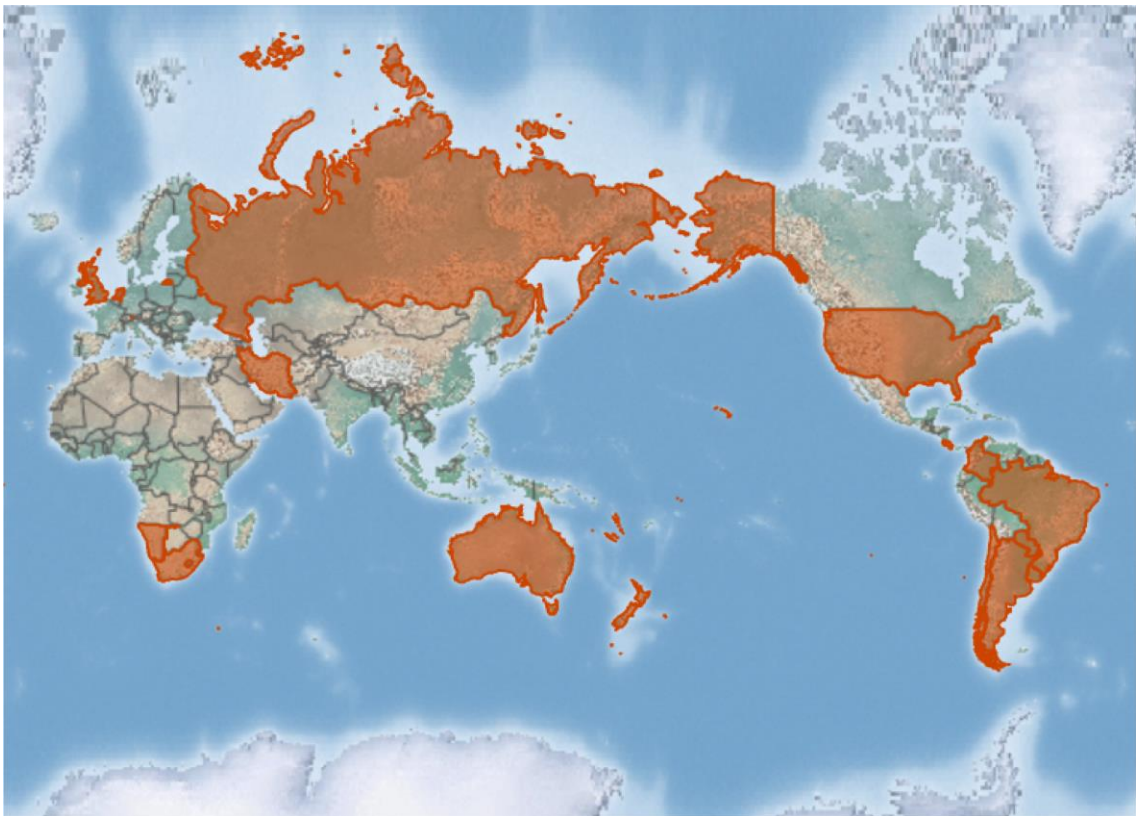
DFAT: Imunofluorescência direta; I: Isolamento bacteriano; PCR: Reação em cadeia da Polimerase. NI: Não informado.

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

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

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

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



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

Fonte: OIE (2019)

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

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

2.2 Características do agente etiológico causador da Campilobacteriose Genital Bovina

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3 Diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4 Diagnóstico diferencial de Campilobacteriose Genital Bovina

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

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

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

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

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

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

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

Fonte: Adaptado de Givens e Marley (2008)

2.5 Avanços na caracterização de populações microbianas

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

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

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

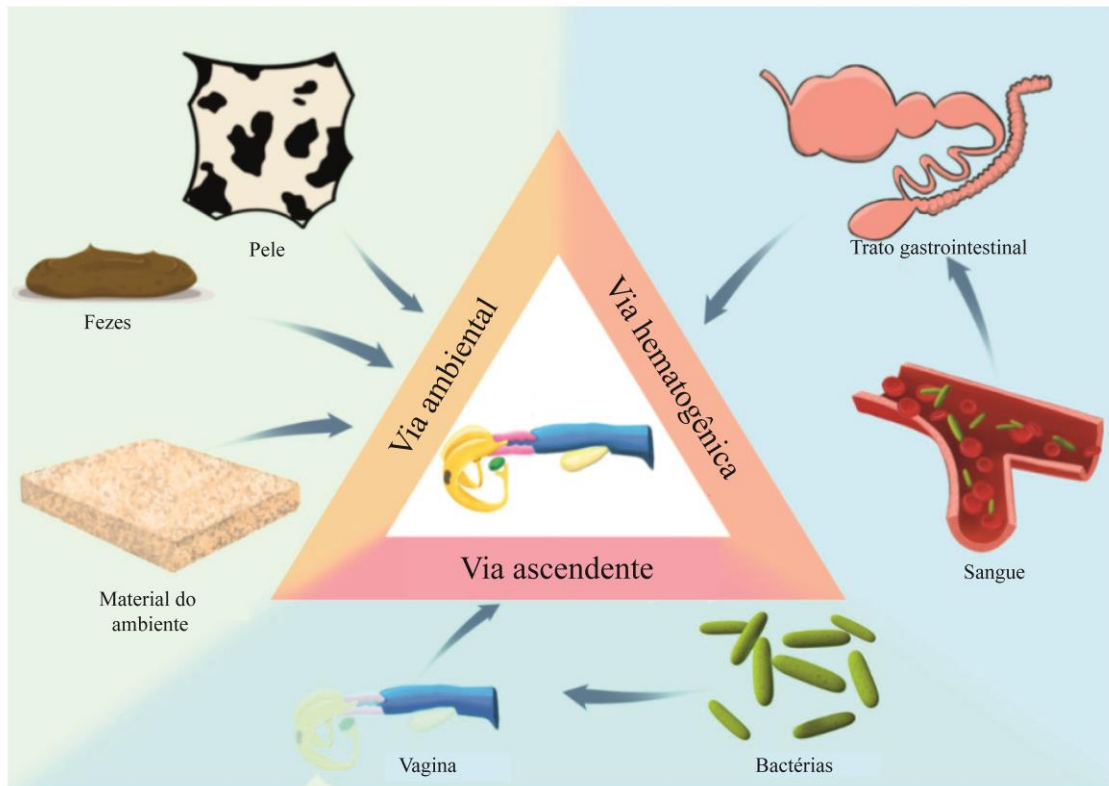
Essas análises possibilitam um melhor entendimento da diversidade taxonômica, da estrutura das populações e das funções ecológicas dos micro-organismos em um dado ambiente

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

2.6 Microbiota central do trato reprodutivo de bovinos

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

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

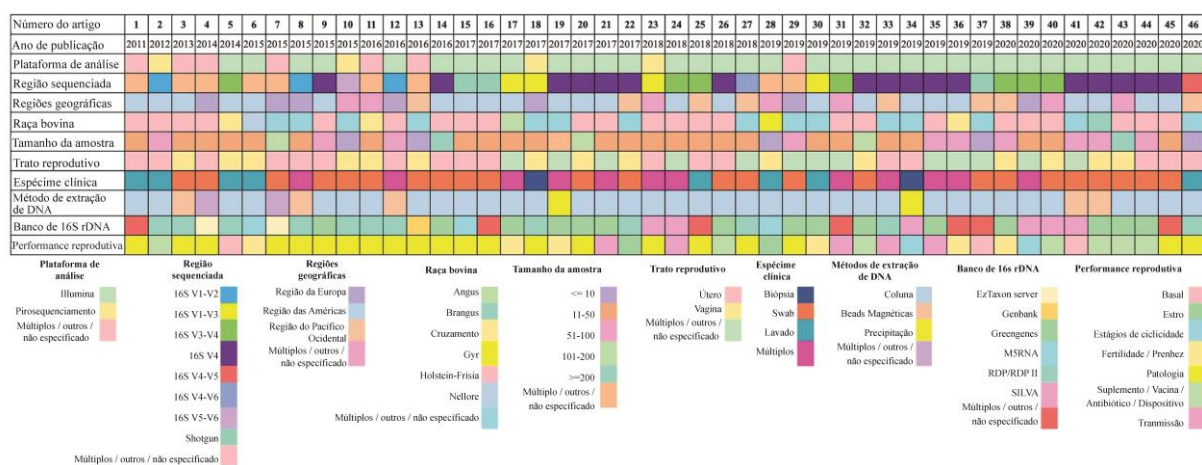


Fonte:

Adaptado de Appiah *et al.* (2020)

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

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

3.2 Objetivos específicos

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

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

Os critérios para a seleção das propriedades participantes foram:

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

4.1.2 Coleta das amostras de muco cervicovaginal

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

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

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

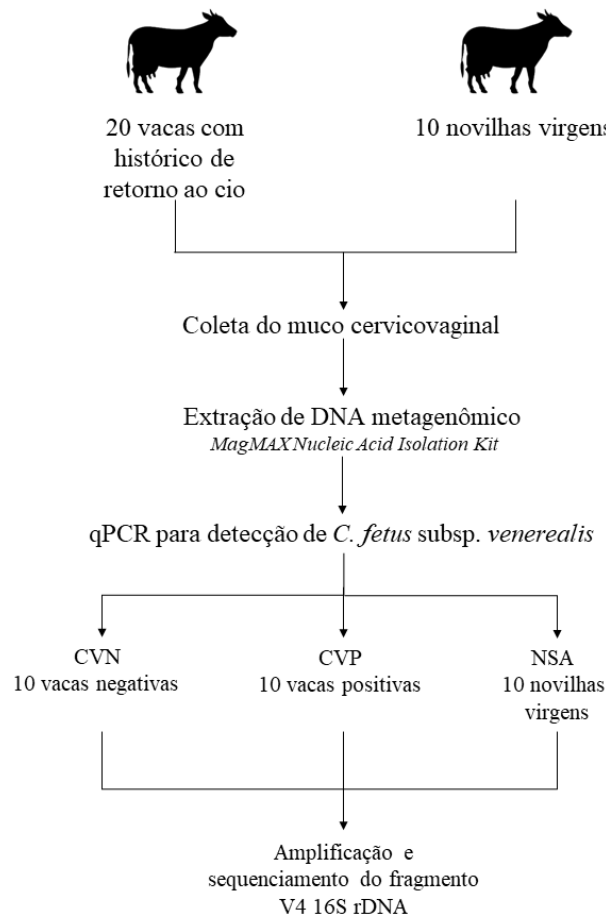
4.1.4 Amplificação do alvo V4 do gene 16S rDNA nas amostras de muco cervicovaginal das vacas e sequenciamento dos *amplicons*

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

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

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

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



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

Fonte: Próprio autor (2022)

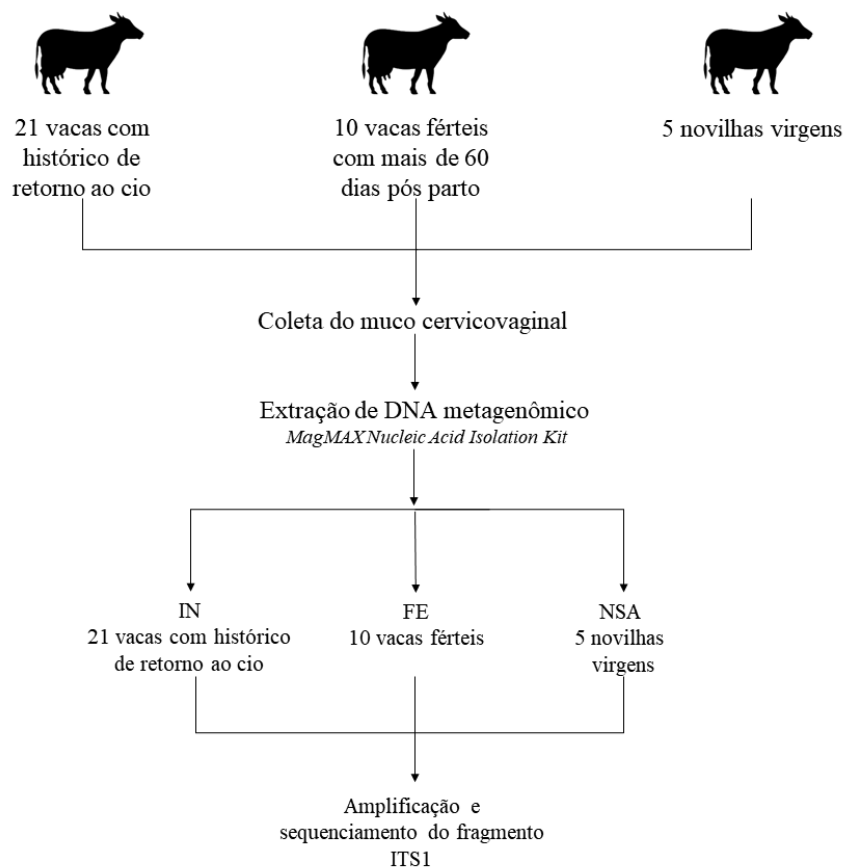
4.1.5 Amplificação da região intergênica ITS1 nas amostras de muco cervicovaginal das vacas e sequenciamento dos *amplicons*

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

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

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

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



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

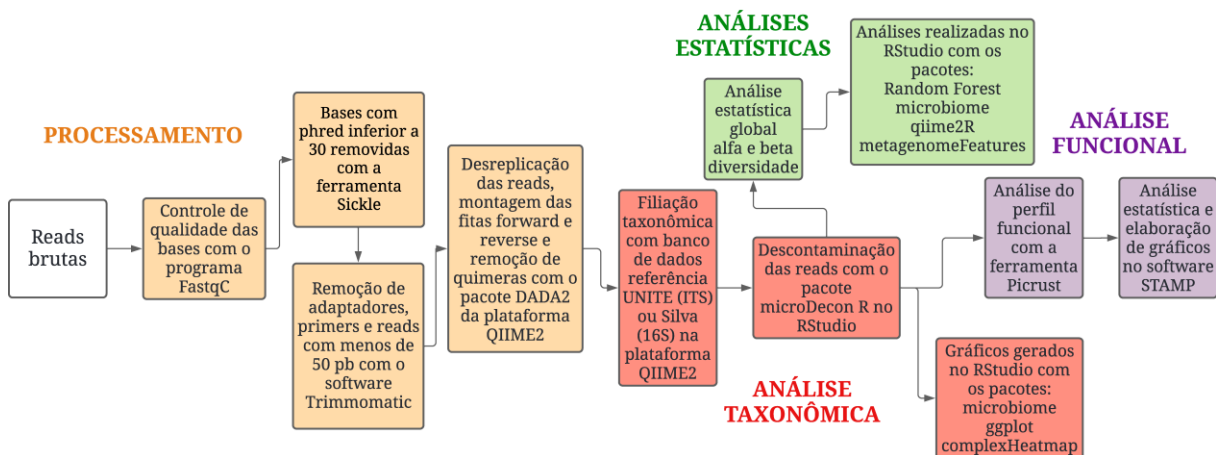
Fonte: Próprio autor (2022)

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

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

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

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



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

Fonte: Próprio autor (2022)

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

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

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

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

Conforme mencionado anteriormente, *C. fetus* subsp. *venerealis* possui um crescimento fastidioso e, em condições de microaerofilia, interferem na viabilidade bacteriana nos processos de coleta, armazenamento, manutenção e diagnóstico (MONKE *et al.*, 2002). Portanto, a primeira etapa realizada nesse projeto foi a padronização do procedimento de coleta e tempo de transporte e armazenamento de material para diagnóstico molecular de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Esse estudo resultou em um artigo científico, publicado em 2020, na revista científica *Journal of Microbiological Methods*, que se encontra publicamente disponível (v. 179, n. 106101; doi: 10.1016/j.mimet.2020.106101).

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

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

O laboratório de bacteriologia veterinária da UFRGS (LaBacVet) realiza diagnóstico de agentes infecciosos reprodutivos de bovinos. O serviço dispõe de diagnóstico por ensaios de PCR para *C. fetus* subsp. *venerealis*, *Ureaplasma diversum*, *Tritrichomonas foetus*, *Mycoplasma bovigenitalium* e *Mycoplasma bovis*. A espécime clínica necessária para essa investigação é o raspado prepucial de touros ou muco cervicovaginal de vacas. Após a triagem de 210 touros para os agentes etiológicos mencionados acima, os resultados foram compilados, analisados e publicados. Os dados são referentes a todos os animais recebidos para análise no LaBacVet entre os anos de 2019 e 2020. Esse estudo resultou em um artigo científico, publicado em 2021 na revista científica *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, que se encontra publicamente disponível (v. 34, n. 1; doi: 10.1177/10406387211050636).

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

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

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

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

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

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

9 DISCUSSÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 CONTRIBUIÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DOS RESULTADOS ALCANÇADOS NESTA TESE

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

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

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

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

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

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

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

11 CONCLUSÕES

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

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

12 PERSPECTIVAS

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

REFERÊNCIAS

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

- CLEMMONS, B. A. *et al.* Vaginal and uterine bacterial communities in postpartum lactating cows. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. JUN, p. 1–10, jun. 2017.
- DELONG, E. F.; PACE, N. R. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Systematic Biology**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 470–478, ago. 2001.
- DELPIAZZO, R. *et al.* Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a 16S rDNA gene sequence. **Veterinary and Animal Science**, Amsterdam, v. 11, p. e100163, dez. 2020.
- DENG, F. *et al.* The vaginal and fecal microbiomes are related to pregnancy status in beef heifers. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019.
- DEREJE, T. *et al.* Review of common causes of abortion in dairy cattle in Ethiopia. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, Nairobi, v. 10, n. 1, p. 1–13, nov. 2018.
- DISKIN, M. G. *et al.* Pregnancy losses in cattle: Potential for improvement. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 28, n. 1–2, p. 83–93, 2016.
- ERASMUS, K. H. J. *et al.* The origin, supply chain, and deforestation risk of Brazil's beef exports. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 117, n. 50, p. 31770–31779, dez. 2020.
- ESCHER, R. *et al.* Clinical and epidemiological analysis of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* infections in humans and comparative genetic analysis with strains isolated from cattle. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 16, p. 198, maio 2016.
- FITZGERALD, C. *et al.* *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. *nov.*, isolated from humans and reptiles. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, p. 2944–2948, set. 2014.
- GARCÍA-GALÁN, A. *et al.* The addition of *Lactobacillus* spp. negatively affects *Mycoplasma bovis* viability in bovine cervical mucus. **BMC Veterinary Research**, London, v. 16, n. 1, p. 1–7, jul. 2020. Disponível em: <https://www.doi.org/10.1186/s12917-020-02454-9>.
- GIANNATTASIO-FERRAZ, S. *et al.* A common vaginal microbiota composition among breeds of *Bos taurus indicus* (Gyr and Nellore). **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 1115–1124, out. 2019.
- GIUFFRIDA, R. Infecções pelo gênero *Campylobacter*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C (EDS). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. São Paulo: Roca, 2016.
- DANIEL GIVENS, M.; MARLEY, M. S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 3, p. 270–285, 2008a.
- GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S.D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 3, p. 504–507, ago. 2008b.
- HAZELTON, M. S. *et al.* *Mycoplasma* species in vaginas of dairy cows before and after exposure to bulls and their association with conception. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 103, n. 12, p. 11795–11805, jul. 2020.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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