

USO DA BIONFORMÁTICA PARA PROPOSIÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA *Campylobacter fetus*

Michael Anderson Prado¹, Alessandro Afornali².

¹ Acadêmico do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR);

² Laboratório de Genômica do Instituto Carlos Chagas (ICC) – PR – Brasil, Prof. Adjunto Mestre da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR); Pesquisador IV do O BOTICÁRIO

Endereço para correspondência: Alessandro Afornali, alessandro@tecpar.br

RESUMO: As bactérias da espécie *Campylobacter fetus* são responsáveis pelo aborto e infertilidade em bovinos, podendo levar o animal a óbito. A utilização de ferramentas que permitam a identificação dessas bactérias é de extrema importância no âmbito científico. Como existe um grande interesse dos criadores de gado de corte, e por ser um problema que está presente em todas as regiões do Brasil, neste trabalho será utilizado o suporte de ferramentas de bioinformática, objetivando-se a diferenciar *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. A análise foi realizada a partir do banco de dados do *National Center of Biotechnology Information*; pela pesquisa de seqüências de DNA, para o diagnóstico molecular. De acordo com a similaridade dos DNAs genômicos foi selecionado o gene da girase A, foram desenhados seus iniciadores (*primers*), tendo como produto amplificado um fragmento de 683 para *C.fetus* subsp.*fetus*, e um fragmento de 348 pb para *C.fetus* subsp.*venerealis*. Através do programa NEBcutter V2.0 foram analisadas e selecionadas as enzimas de restrição *BpmI* e *FokI* como diferenciais em uma futura análise de PCR.

Palavras-chave: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, bioinformática.

ABSTRACT: The bacteria of the genus *Campylobacter fetus* are responsible for abortion and infertility in cattle, and may cause the animal to death. The use of tools enabling the identification of these bacteria is of utmost importance in the scientific realm. As there is a great interest from cattle breeders, to be a problem that is present in all regions of Brazil, this work will be supported by bioinformatics tools, aiming to differentiate *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* and *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. The analysis was performed from the database of *National Center of Biotechnology Information*, by the research of DNA sequences, for molecular diagnostics. Was selected by the similarity of the gyrase A gene,

were designed its initiators (*primers*), with the amplified product of 683 to *C.fetus* subsp. *fetus*, and 348 bp for *C.fetus* subsp. *venerealis*. Through the program NEBcutter V2.0 were reviewed and selected the restriction enzymes *FokI* and *BpmI* as differentiators in a future PCR analysis.

Keywords: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, bioinformatics.

INTRODUÇÃO

O gênero *Campylobacter* engloba atualmente 30 espécies, 13 subespécies, segundo o pesquisador J.P. Euzéby na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*”, abrangendo bactérias gram-negativas, cujas dimensões variam entre 0,2 e 0,9 µm de largura e por 0,5 a 5 µm de comprimento. Tem forma de bastão curvo, vírgula, "S", asa de gaivota ou espiral. Têm como característica motilidade do tipo espiralada, observada claramente em microscópio de contraste de fase ou de campo escuro, produzida por um flagelo polar único em uma ou em ambas as extremidades da célula. *Campylobacter spp.* é um microrganismo não hemolítico que não forma esporos, no qual suas células em culturas com mais de 48 horas tendem a assumir formas esféricas ou cocóides. É uma bactéria microaerófila, com metabolismo respiratório que requer oxigênio para seu crescimento em concentrações de 3% a 15% e dióxido de carbono em concentrações de 3% a 5%, contudo, em alguns casos, o crescimento ocorre em condições aeróbicas com 20% de oxigênio (GOMES, 2007). Esse microrganismo não utiliza carboidratos como fonte de carbono, estando amplamente distribuídas e ocorrem principalmente em animais homeotermos domésticos, selvagens e de produção. São prevalentes em alimentos de origem animal como aves de corte, bovinos, suínos, ovinos, ostras e mariscos. Sendo responsáveis por uma gama de doenças nos animais e nos seres humanos, e nestes a enterite é o sinal predominante, tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos.

No Brasil, Fernandes e Gomes (1992) citam os índices de prevalência para campilobacteriose encontrados por Mies Filho (1960) no Rio Grande do Sul, de 27%, por Castro *et al.* (1971) nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais, 14,4% e por Ramos e Guida (1978) no Rio de Janeiro de 12,95%. Genovez *et al.* (1986) indicou 23,9% de animais portadores do *Campylobacter fetus* em São Paulo (PELLEGRIN *et al.*, 1996).

O *C. fetus* subespécie *fetus* tem como habitat o tubo gastrintestinal, podendo causar abortamentos esporádicos, em bovinos. Entretanto, uma cepa intermediária, desta subespécie, pode causar infertilidade e persistência, no trato genital de novilhas. No homem, o *C. fetus*

subsp. *fetus* pode causar infecções intestinais e sistêmicas. Ocorrências de infecções, no homem, pelo *C. fetus* subsp. *fetus* são raras e não há registros. A subespécie *venerealis* e seu biovar *intermedius* são responsáveis pela campilobacteriose genital bovina (CGB), caracterizada por infertilidade e abortamentos. Estas duas subespécies desenvolveram uma relação parasitária com o trato reprodutor bovino, o biovar *intermedius* pode ocorrer no trato intestinal. Análises das sequências da região hipervariável da subunidade do 16S RNA ribossômico (rRNA) das duas subespécies, indicaram uma homologia de 99,9%, indicando uma única base diferente entre 1400 bases seqüenciadas (GOMES, 2007). Há relatos ocasionais em que o *C. fetus* subsp. *fetus* foi isolado e associado com infertilidade bovina, colocando em questão, a confiança dos testes atuais, especialmente os testes de tolerância a glicina e apresentação doença (GOMES, 2007).

Os machos são mais suscetíveis que as fêmeas, parecendo que alguns casos, possuem um grau diferenciado de suscetibilidade. A infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*, geralmente é venérea. Já o *C. fetus* subsp. *fetus* causa aborto esporádico em bovinos e aborto em ovinos fêmeas, além de infecções.

O diagnóstico da campilobacteriose genital bovina pode ser realizado pelas técnicas de imunofluorescência direta, de isolamento e identificação do agente, de aglutinação com muco cérvicovaginal, por testes imunoenzimáticos e por PCR. Até as décadas de 1960 e 1970 dois métodos para detecção do agente em touros e de anticorpos específicos em fêmeas, respectivamente, eram bastante utilizados, a imunofluorescência direta e a muco-aglutinação (STYNEN *et al.*, 2003).

Existe grande interesse dos criadores de gado de corte e de reprodução em desenvolver métodos de identificação mais rápidos e precisos para *Campylobacter fetus*, por ser um problema que está presente em todas as regiões do Brasil. Os primeiros estudos sobre as campilobacterioses animais foram realizados, no início deste século, na Inglaterra, por McFadyean & Stockman (1909, 1913); nos Estados Unidos, com Smith & Taylor, 1919; Smith, 1923, e avançaram, especialmente com os trabalhos de Plastridge (1941), na Austrália, e, prosseguindo nas décadas subseqüentes, entre os anos 40 e 70 (GOMES, 2007). Campilobacteriose bovina é o termo genérico utilizado para designar doenças causadas por espécies do gênero *Campylobacter spp*, incluindo o *C. fetus* subsp. *fetus* e o *C. fetus* subsp. *venerealis*.

O presente estudo tem como objetivo diferenciar *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* da *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*, por intermédio de ferramentas de bioinformática. Definindo regiões específicas de DNA genômico passíveis de serem

amplificadas através da PCR, oferecendo mais uma opção de análise destas bactérias utilizando métodos mais específicos e sensíveis de diagnóstico molecular. *****

MATERIAL E MÉTODOS

As ferramentas da bioinformática mais utilizadas são os bancos de dados e programas computacionais disponíveis na *internet*, ponto de partida na análise de seqüências de DNA (BAYAT, 2002). Este instrumento é capaz de proporcionar análises mais velozes na análise de DNAs diferentes e no processo comparativo de variabilidades e na previsão de resultados de análises (GASPARINO, 2008).

O trabalho foi constituído por análise computacional (*in silico*) compreendendo buscas em bancos de dados de seqüências gênicas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA - NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por genes que estivessem presentes na espécie em estudo (*C. fetus*), porém escolhendo seqüências que pudessem diferir entre suas duas subespécies do gênero, *fetus* e *venerealis*.

Escolha do gene de interesse

A escolha será baseada na similaridade entre as seqüências das duas espécies de genes que codificam girases utilizando a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para a escolha das seqüências foram estabelecidos alguns critérios. Não serão utilizadas seqüências de DNA muito semelhantes ao DNA bovino e seqüências comumente utilizadas para genotipagem, sempre obedecendo aos parâmetros estatísticos.

Análise comparativa entre duas seqüências foi realizada através do programa BLAST 2 SEQUENCE - bl2seq (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi).

Desenho dos oligos

Iniciadores (*primers*) específicos para *Campylobacter fetus* serão projetados através de um programa na tentativa de se obter o melhor desempenho na reação desencadeada pela polimerase para os produtos estabelecidos. O programa utilizado para esta análise será o Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Análise de restrição

As seqüências dos produtos de PCR da *C.fetus* serão analisadas pelo programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Será elaborado um mapa de restrição com base nas enzimas que reconhecem e digerem as seqüências de DNA.

Os mapas de restrição serão comparados entre si para que se possam identificar possíveis enzimas a serem utilizadas no diagnóstico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após vários testes iniciais com outros genes de função conhecida, foi selecionado a girase A, por ser praticamente o único gene que não apresentou 100% similaridade entre as duas subespécies, a *C. fetus* subsp. *venerealis*, do banco de dados do NCBI, com um tamanho de 1158 pb. Da *C. fetus* subsp. *fetus* do mesmo banco e com um tamanho de 3163 pb. As seqüências obtidas do NCBI por intermédio de seu código de acesso NZ_ACLG01001124.1 para o gene de *C. fetus* subsp. *venerealis* e do GenBank U25640.1 para *C. fetus* subsp. *fetus* foram utilizadas para todas as análises realizadas.

O alinhamento entre as duas seqüências escolhidas de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* demonstra que as bases se apresentam muito idênticas entre si (*Figura 1*). Com o processo de alinhamento foi possível verificar que a identidade entre as duas é de 99% e a taxa de similaridade de 99%. Tendo assim somente quatro pontos de diferença entre as duas seqüências, há dois *mismatches* (mutação por substituição de bases) e dois *gaps* (mutação por deleção de bases).

As seqüências selecionadas foram submetidas ao programa Primer BLAST que resultou em 10 seqüências de iniciadores, mas como as seqüências possuem um grau de similaridade muito elevado, foi selecionado para a detecção de um *primer* para a *C. fetus* subsp. *fetus* uma região cuja seqüência não é homóloga a seqüências da *C. fetus* subsp. *venerealis*, após 1464 pb até 3163 pb, assim retornando iniciadores específicos para *C. fetus* subsp. *fetus*. Já para a *C. fetus* subsp. *venerealis* foi escolhido a seqüência onde se encontra as diferenças de identidade e similaridade, tendo assim um par de iniciadores específicos (*Figura 1*).

TABELA 1 – Lista dos oligos iniciadores (*primers*)

	Seqüência do <i>primer</i> 5'→3'	Temperatura de anelamento em °C	Tamanho do produto (pb)
<i>fetus</i>	F - GTTAGCCCGTGCGTAACCGC	58,71	683
	R - AGGAATTCCTCGCCGACTGCT	59,98	
<i>venerealis</i>	F - CCGGCGGTATAATTTTGGGA	50,44	348
	R - ACCGCAATATTACGAACGAT	49,68	

Os iniciadores mostrados na TABELA 1 foram selecionados para análise para se obter a seqüência do produto a ser utilizado em uma análise por restrição. Estes iniciadores resultam em produtos de tamanho de 683 pb para *C.fetus* subsp. *fetus* e um outro fragmento

de 348 pb para *C.fetus* subsp. *venerealis*. A escolha destes iniciadores foi baseada no seu tamanho para haver a diferenciação após análise de restrição e a posição dos iniciadores para que não houvesse nenhuma similaridade com as duas espécies. Assim para a *C.fetus* subsp. *fetus* foi selecionado um iniciador no final de sua seqüência, e para a *C.fetus* subsp. *venerealis* foi escolhido duas áreas de diferença nucleotídica entre as duas espécies.

Após selecionados os *primers*, foi verificado a existência de um par de *primers*, que se mostravam exclusivos para as duas subespécies (GROOF, 2005). Mas a sua utilização não foi possível, pois a se utilizar a ferramenta BLAST do site NCBI, esses *primers* retornavam resultados para as duas subespécies em questão. Tornando assim não específicos (*Figura 3*).

Foram comparadas as enzimas de restrição que cortam esses produtos gerados pela amplificação, sendo excluídas as que possuem restrições quanto ao sítio de CpG, ou seja, de metilação do DNA, que podem alterar o resultado. Para a *C.fetus* subsp. *fetus* foi proposto a enzima de restrição *BpmI* que reconhece apenas um sítio no produto amplificado do genoma da *C.fetus* subsp. *fetus* gerando dois fragmentos, um de 157 pb e outro de 526 pb e a enzima *FokI* que reconhece apenas um sítio no produto amplificado do genoma da *C.fetus* subsp. *venerealis* gerando dois fragmentos de 117 pb e outro de 231 pb. A escolha destas enzimas foi baseada na possível diferenciação durante a visualização em gel de agarose dos fragmentos gerados entre as espécies (*Figura 2*).

CONCLUSÃO

As ferramentas de bioinformática possibilitam análises sugerindo possíveis métodos diferenciais entre duas subespécies. Os tamanhos dos produtos estão adequados a serem utilizados de forma prática na amplificação por PCR, pois seqüências muito extensas são mais difíceis de serem amplificadas.

Análises das enzimas de restrição selecionaram as enzimas *BpmI* e *FokI* como sendo enzimas de restrição utilizáveis gerando fragmentos diferentes entre as espécies e sendo enzimas que não reconhecem sítios CpG, diminuindo alterações no resultado devido as metilações.

O trabalho proposto tem como princípio uma análise *in silico*, necessitando testes *in vitro* para comprovar a sua eficiência, garantindo melhores resultados. Assim, uma análise mais completa poderá ser feita quando o genoma da *C.fetus* subsp. *venerealis* estiver finalizado, abrangendo de forma completa os diversos genes entre as espécies trabalhadas.

ANEXO

Score = 2109 bits (1142), Expect = 0.0
 Identities = 1151/1155 (99%), Gaps = 2/1155 (0%)
 Strand=Plus/Plus

<i>venerealis</i> 1	ATGGAAGAAAATAATTTTCAGTTCAAATCAAGATATCGACGCTATAGACGTTGAAGACTCT	60
<i>fetus</i> 311	ATGGAAGAAAATAATTTTCAGTTCAAATCAAGATATCGACGCTATAGACGTTGAAGACTCT	370
<i>venerealis</i> 61	ATAAAGCAAGCTACCTAGATTACTCTATGAGCGTTATAATAGGTCGTGCTTTGCCAGAT	120
<i>fetus</i> 371	ATAAAGCAAGCTACCTAGATTACTCTATGAGCGTTATAATAGGTCGTGCTTTGCCAGAT	430
<i>venerealis</i> 121	GCAAGAGACGGTTTAAACCGGTTCAICGICGCATACTTTATGCTATGAACGATCTTGGC	180
<i>fetus</i> 431	GCAAGAGACGGTTTAAACCGGTTCAICGICGCATACTTTATGCTATGAACGATCTTGGC	490
<i>venerealis</i> 181	GTAGGTAGTCGCAGCCCATATAAAAAGTCTGCTCGTATAGTAGGTGATGTTATCGGTAAAG	240
<i>fetus</i> 491	GTAGGTAGTCGCAGCCCATATAAAAAGTCTGCTCGTATAGTAGGTGATGTTATCGGTAAAG	550
<i>venerealis</i> 241	TATCACC CGCACGCGATACTGCGGTATATGACGCTTTAGTTAGAATGGCTCAGAACTTT	300
<i>fetus</i> 551	TATCACC CGCACGCGATACTGCGGTATATGACGCTTTAGTTAGAATGGCTCAGAACTTT	610
<i>venerealis</i> 301	TCTATGAGAGTTCCTGCAGTAGATGGTCAAGGAACTTTGGCTCAGTCGATGGCGATGGC	360
<i>fetus</i> 611	TCTATGAGAGTTCCTGCAGTAGATGGTCAAGGAACTTTGGCTCAGTCGATGGCGATGGC	670
<i>venerealis</i> 361	GCAGCCGCTATGCGTTTACTGAAGCTAGAATGACGGTTTTGGCAGAGGAACTTTTAAGA	420
<i>fetus</i> 671	GCAGCCGCTATGCGTTTACTGAAGCTAGAATGACGGTTTTGGCAGAGGAACTTTTAAGA	730
<i>venerealis</i> 421	GATTTAGATAAAGATACGGTTGATTTTATACCAAATTATGATGATAGTTTAAAGCGAACCA	480
<i>fetus</i> 731	GATTTAGATAAAGATACGGTTGATTTTATACCAAATTATGATGATAGTTTAAAGCGAACCA	790
<i>venerealis</i> 481	GATGTTTTACCCGCGCGTACCGAAITTTGTTGTTAAATGGATCGAGCGGTATCGCTGTT	540
<i>fetus</i> 791	GATGTTTTACCCGCGCGTACCGAAITTTGTTGTTAAATGGATCGAGCGGTATCGCTGTT	850
<i>venerealis</i> 541	GGTATGGCGACAAATATCCCTCCACATAGTTTAGATGAGCTAGTAAATGGATTACTCACT	600
<i>fetus</i> 851	GGTATGGCGACAAATATCCCTCCACATAGTTTAGATGAGCTAGTAAATGGATTACTCACT	910
<i>venerealis</i> 601	CTTTTAGACGATAAAGAAGTTGGTTTAGAGGATATTATGACTCATATAAAGGGTCCTGAT	660
<i>fetus</i> 911	CTTTTAGACGATAAAGAAGTTGGTTTAGAGGATATTATGACTCATATAAAGGGTCCTGAT	970
<i>venerealis</i> 661	TTTCCAACCGCGGTATAAATTTTGG-AAAAAGGGTATTATCGAAGCTTATAAAACAGG	719
<i>fetus</i> 971	TTTCCAACCGCGGTATAAATTTTGGAAAAAGG-TATTATCGAAGCTTATAAAACAGG	1029
<i>venerealis</i> 720	TCGAGGACGTATCAAACCTAAGAGCTAAAACCTCATATTTGAAAAAAAAA CCAAATAAAGATGT	779
<i>fetus</i> 1030	TCGAGGACGTATCAAACCTAAGAGCTAAAACCTCATATTTGAAAAAAAAA CCAAATAAAGATGT	1089
<i>venerealis</i> 780	TATAGTAGTCGATGAACCTCCATATCAAGTAAATAAAGCCAAGC C C ATGCAGATATAGC	839
<i>fetus</i> 1090	TATAGTAGTCGATGAACCTCCATATCAAGTAAATAAAGCCAAGC C C ATGCAGATATAGC	1149
<i>venerealis</i> 840	CGATCTTGTAAAAGAGAAGCTCATCGATGGTATAAGCGAAGTAAGGGATGAGAGCGATAG	899
<i>fetus</i> 1150	CGATCTTGTAAAAGAGAAGCTCATCGATGGTATAAGCGAAGTAAGGGATGAGAGCGATAG	1209
<i>venerealis</i> 900	AGACGGAATTCGTCCTTGTATAGAGCTAAAACCGCATGCTATGAGTGAGATCGTGTAAA	959
<i>fetus</i> 1210	AGACGGAATTCGTCCTTGTATAGAGCTAAAACCGCATGCTATGAGTGAGATCGTGTAAA	1269
<i>venerealis</i> 960	TAATTTATTTAAATCTACTCAAATGGAAGTTACTTTTGGCGTTATAATGCTTGTCTATAAA	1019
<i>fetus</i> 1270	TAATTTATTTAAATCTACTCAAATGGAAGTTACTTTTGGCGTTATAATGCTTGTCTATAAA	1329
<i>venerealis</i> 1020	TAATAAAGAGCCAAAAGTATTTTCTCTTTTGGAGCTTTTAAAGCTGTTTTTAAATCATAG	1079
<i>fetus</i> 1330	TAATAAAGAGCCAAAAGTATTTTCTCTTTTGGAGCTTTTAAAGCTGTTTTTAAATCATAG	1389
<i>venerealis</i> 1080	AAAAACAGTTATCATCAGGCGTACTATTTTTGAACTTCAAAAAGCAAGAGCAAGAGCTCA	1139
<i>fetus</i> 1390	AAAAACAGTTATCATCAGGCGTACTATTTTTGAACTTCAAAAAGCAAGAGCAAGAGCTCA	1449
<i>venerealis</i> 1140	TATTTTAGAAGGTTT 1154	
<i>fetus</i> 1450	TATTTTAGAAGGTTT 1464	

Figura 1 – Alinhamento entre *C.fetus* subsp.*venerealis* e *C.fetus* subsp.*fetus*.Círculos mostram as diferenças encontradas entre o alinhamento das duas sequências.

FONTE: BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

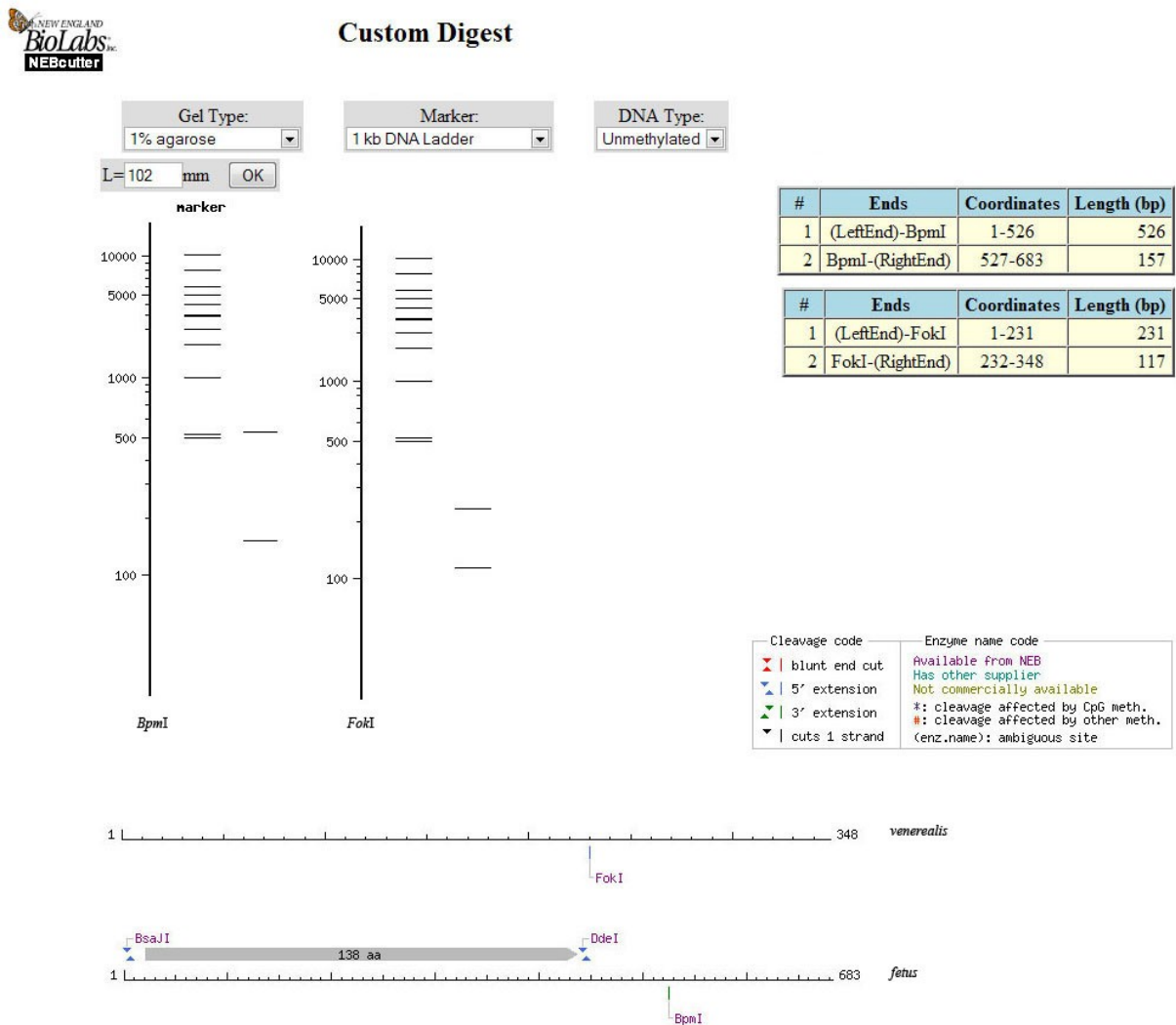



Figura 2 – Enzima de restrição escolhida para clivagem do produto de *C.fetus* subsp.*venerealis* foi a *FokI*. Suposta posição de produtos de *C.fetus* subsp.*venerealis* após clivagem e sua corrida em gel de agarose 1 % com marcador de DNA de 1 kb. Enzima de restrição escolhida para clivagem do produto de *C.fetus* subsp.*fetus* foi a *BpmI*. Suposta posição de produtos de *C.fetus* subsp.*fetus* após clivagem e sua corrida em gel de agarose 1 % com marcador de DNA de 1 kb.

FONTE: Adaptado do programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

primer forward

>[gb|CP000487.1](#)  Campylobacter fetus subsp. fetus 82-40, complete genome
Length=1773615

Features in this part of subject sequence:
[carbon starvation protein A](#)

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.021
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus


```
Query 1      GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT  21
             |||
Sbjct 59346  GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT  59326
```

>[gb|AY158814.1](#) Campylobacter fetus subsp. venerealis carbon starvation protein
gene, partial cds
Length=764

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.021
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT  21
             |||
Sbjct 1      GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT  21
```

primer reverse

>[gb|CP000487.1](#)  Campylobacter fetus subsp. fetus 82-40, complete genome
Length=1773615

Features in this part of subject sequence:
[carbon starvation protein A](#)

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.056
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      TAGCTACAATAACGACAACT  20
             |||
Sbjct 58583  TAGCTACAATAACGACAACT  58602
```

Features in this part of subject sequence:
[aconitate hydratase 2](#)

Score = 26.3 bits (13), Expect = 845
Identities = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 8      AATAACGACAACT  20
             |||
Sbjct 1003107 AATAACGACAACT  1003095
```

>[gb|AY158814.1](#) Campylobacter fetus subsp. venerealis carbon starvation protein
gene, partial cds
Length=764

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.056
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      TAGCTACAATAACGACAACT  20
             |||
Sbjct 764    TAGCTACAATAACGACAACT  745
```

Figura 3 – Iniciadores encontrados na literatura e testados no programa BLAST.

FONTE: BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAYAT, A. **Bioinformatics: science, medicine and the future clinical review**. BMJ, London, v. 324, n. 7344, p. 1018-1022, 2002.

GASPARINO, E.; OSÓRIO, P.S.; SOARES, M.A.M.; SOMMER, D.; BLANCK, D.V; LUIZETTI, F.; **Uso da bioinformática na diferenciação molecular da Entamoeba histolytica e Entamoeba dispar**. Acta Sci. Health Sci. Maringá, v. 30, n. 2, p. 101-106, 2008.

GOMES, Marcos JP, Microbiologia Clínica - *Campylobacter spp* LABACVET 2007-II PEREIRA, José Carlos, **Boletim do Criadouro Campo das Caviúnas, As Infecções pelo Campylobacter**, Nº5 Agosto de 2003

BETTERO, Leandro Babosa; TON, Nielton Cezar; BARIONI, Graziela; BELTRAME, Marcus Alexandre Vaillant; **Pesquisa De Campylobacter fetus Em Prepúcio De Touros, Em Uma Propriedade Rural Do Espírito Santo, Brasil**; Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1, 2009 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, p.486-491

CEFAR DIAGNÓSTICA LTDA. **Informativo Cefar De Microbiologia, Campylobacter**, Ano III - Ed. 16 - Jul/Ago/2006 - Circulação Bimestral

GOMES, Marcos JP, **Gênero Campylobacter sp, Campilobacteriose Genital Bovina (cgb), Aborto Enzoótico Ovino**, 4º Semestre 2009-2, FAVET-UFRGS

EUZÉBY, J.P., “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” <<http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>> acesso em 11/04/2010 às 19:43

CORTEZ, Ana Lígia Lordello, **Disseminação De Bactérias Dos Gêneros Campylobacter E Salmonella Em Linhas De Abate De Aves**, JABOTICABAL, SÃO PAULO 2006

ROCHA, Flávio Soares da, JESUS, Vera Lúcia Teixeira de, TORRES, Helenita Marques, GOMES, Marcos José Pereira, FIGUEIREDO, Márcio José de, NASCIMENTO, Elmiro Rosendo do, FERREIRA, Teresinha, AQUINO, Maria Helena Cosendey de, **Campylobacter fetus and Tritrichomonas foetus investigation in prepucial mucous of bulls from Médio Paraíba/RJ region, Brazil**, Ciência Rural, v.39, n.5, ago, 2009. Ciência Rural, Santa Maria, v.39, n.5, p.1586-1589, ago, 2009

MOOLHUIJZEN Paula M, LEW-TABOR Ala E, WLODEK Bartosz M, AGÜERO Fernán G, COMERCI Diego J, UGALDE Rodolfo A, SANCHEZ Daniel O, APPELS Rudi; BELLGARD Matthew; **Genomic analysis of Campylobacter fetus subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets**; disponível em < <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/86>>

JOSEPH, Watine; JEAN, Martorell; THIERRY, Bruna; JEAN-LOUIS, Gineston; JEAN-LUC, Poirier; GÉRALDINE, Lamblin; ***In vivo* pefloxacin-resistant *Campylobacter fetus* Responsible For Gastro-Intestinal Infection And Bacteremia** Associated With Arthritis Of The Hip; Yonsel Medical Journal, Vol.36, Nº 2, 1995, p.202-205

GROFF, Ana Cláudia Mello; **PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA** DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Santa Maria, RS, Brasil 2005

BERGEN M.A.P. van; LINNANE S.; PUTTEN J.P.M. van; WAGENAAR J.A.; **Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis***; Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2005, Nº 24, p.1017-1026

PELLEGRIN, Aiesca Oliveira; SERENO, José Robson Bezerra; LEITE, Rômulo Cerqueira; COSTA, Geraldo Márcio da; **CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA EM REBANHOS DE CORTE DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL: RESULTADOS PRELIMINARES**; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Nº17, Ago./96. 0.1-7

STYNEN, A.P.R.; PELLEGRIN, A.O.; FÓSCOLO, C.B.; FIGUEIREDO, J.F.; CANELLA FILHO, C.; LEITE, R.C.; LAGE, A.P.; **Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha – Minas Gerais**; *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.6, p.766-769, 2003.