

**JÚNIOR MÁRIO BALTAZAR DE OLIVEIRA**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES POR *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis* E *Tritrichomonas foetus* EM BOVINOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

**GARANHUNS**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E  
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**JÚNIOR MÁRIO BALTAZAR DE OLIVEIRA**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES POR *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis* E *Tritrichomonas foetus* EM BOVINOS NO  
ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro  
Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Friguglietti  
Brandespim

**GARANHUNS**

**2014**

Ficha Catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

O48e Oliveira, Júnior Mário Baltazar de  
Estudo epidemiológico das infecções por *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis* E *Tritrichomonas foetus* em bovinos no estado de Pernambuco/Júnior Mário Baltazar de Oliveira.-  
Garanhuns, 2014.

107f.

Orientador: José Wilton Pinheiro Júnior  
Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes) – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhus, 2014.

Inclui anexos e bibliografias

CDD: 636.1089

1. Epidemiologia
  2. *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis*
  3. *Tritrichomonas foetus*
  4. Infecções – Bovinos
- I. Pinheiro Júnior, José Wilton
  - II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E**  
**REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES POR *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis* E *Tritrichomonas foetus* EM BOVINOS NO**  
**ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação elaborada por  
**JÚNIOR MÁRIO BALTAZAR DE OLIVEIRA**

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior  
Presidente da banca – Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa  
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro  
Unidade Acadêmica de Garanhuns /UFRPE

Prof. Dr. Daniel Friguglietti Brandespim  
Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

## DEDICATÓRIA

*A minha família, motivo pelo qual cheguei até aqui, por ser meu porto seguro e sempre apoiar minhas escolhas.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, todo poderoso, por estar sempre ao meu lado e me ajudar a conquistar mais essa vitória.

Aos meus queridos pai (José Alves) e mãe (Maria Baltazar), por terem me concedido à dádiva da vida, pela educação, paciência, apoio e amor incondicional dado durante toda minha vida.

A minha família, em especial, aos meus irmãos, por serem minha base familiar e suporte durante todas as etapas da minha vida.

A minha namorada, Andreza Raquel Barbosa de Farias, pelo carinho, confiança e apoio dado nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, José Wilton Pinheiro Júnior, pela paciência, dedicação, aprendizado, apoio e amizade. Gostaria de dizer que foi um prazer inenarrável ser seu orientado durante todos esses anos.

Ao professor Daniel Brandespim, pela amizade e contribuição durante toda minha vida acadêmica e formação profissional.

A toda equipe do LARICA, Adalberto Leite, Anne Caroline, Breno Santana, Bruna Soares, Érica Chaves, Joab Carvalho, Juliana Pimentel, Luã Brito, Márcia Torres, Milena Brandão, Paulo Jedyson, Pollyanne Raysa, Roberta Patriota, Saruanna Milena. Pelo auxílio e apoio dado durante a realização do experimento.

Aos meus amigos e companheiros de coleta, Fernando Barbosa, Gesika Silva e Jonas Borges, pela disposição em ajudar em todos os momentos que precisei. Sem vocês os fatos não seriam os mesmos, muito obrigado.

A todos que fazem parte do Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da UFRPE. Em especial, ao professor Rinaldo Aparecido Mota, pelo auxílio durante a execução do experimento.

A todo corpo docente do programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes (PGSRR), pela excelência das aulas e apoio prestado.

Aos meus amigos de mestrado, em especial, a Guilherme Marcolino, pelas gargalhadas dadas e auxílio nas disciplinas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante o período de realização do mestrado.

A todos que fizeram parte dos desafios e conquistas alcançadas durante esta caminhada.

Muito Obrigado!

*“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele.  
Por isso o universo de cada um se resume no tamanho de seu saber”*  
(Albert Einstein)



## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho realizar uma análise epidemiológica da infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* em bovinos do estado de Pernambuco, Brasil. Para isso, foram colhidas 383 amostras de muco cérvico-vaginal de vacas procedentes de 21 propriedades distribuídas nos 19 municípios que compõem a microrregião de Garanhuns e 105 amostras de esmegma prepucial de machos em idade reprodutiva, procedentes de 32 propriedades e quatro matadouros do estado de Pernambuco. As amostras tiveram seu material genômico extraído e submetido à reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico. Para análise de fatores de risco aplicou-se um questionário investigativo com perguntas referentes ao manejo higiênico-sanitário e reprodutivo. Nas fêmeas, observou-se uma prevalência de 1,8% (0,8% - 3,9%; I.C. 95%) e 33,4% (28,7% - 38,4%; I.C. 95%;) para *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus*, respectivamente. Em relação ao número de focos observou-se que 28,6% das propriedades apresentaram pelo menos um animal positivo para *C. fetus* subsp. *venerealis* e 90,5% para *T. foetus*. Os fatores de risco identificados neste estudo para campilobacteriose genital bovina em fêmeas foi rebanhos acima de 100 animais (OR=7,2; I.C. 1,3 - 38,4%; p=0,020) e para tricomonose bovina foi a utilização da monta natural (OR=2,4; I.C. 1,1 - 5,9%; p=0,041). Nos machos, observou-se uma frequência de 6,6% (2,7% - 13,2%; I.C. 95%) para *T. foetus* e nenhuma amostra foi positiva para *C. fetus* subsp. *venerealis*. Em relação ao número de focos, 21,8% das propriedades apresentaram animais positivos para *T. foetus*. Nenhuma das variáveis analisadas apresentou associação com a infecção. Quanto às amostras dos matadouros, nenhuma foi positiva. Conclui-se que as infecções por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* estão presentes nos rebanhos bovinos do estado de Pernambuco e sugere-se que medidas de controle e profilaxia como o diagnóstico, separação e repouso sexual das fêmeas infectadas, utilização de um programa de inseminação artificial com cuidados sanitários rigorosos, descarte dos touros infectados e reposição por animais jovens devem ser implementadas a fim de evitar a disseminação do agente nos rebanhos.

**Palavras-chave:** Bovinocultura; diagnóstico; fatores de risco; campilobacteriose; tricomonose.

## ABSTRACT

The objective of this study was to perform an epidemiological analysis of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Trichomonas foetus* infection in cattle from state of Pernambuco, Brazil. For this, 383 samples of cervical-vaginal mucus of cows from 21 properties distributed in the 19 counties that make up the microregion of Garanhuns and 105 samples of preputial smegma of males in the reproductive age, coming from 32 properties and four slaughterhouses were collected from state Pernambuco. The samples had their genomic materials extracted and subjected to polymerase chain reaction for diagnosis. To analyze the risk factors applied an investigative questionnaire on the hygienic, sanitary and reproductive management. The risk factors identified in this study was to bovine genital campylobacteriosis in female herds above 100 animals (OR=7.2, C.I. 1.3 to 38.4%, p=0.020) and bovine trichomoniasis was the use of natural mating (OR=2.4, C.I. 1.1 to 5.9%, p=0.041). In males, there was a frequency of 6.6% (2.7%-13.2%, 95% C.I.) for *T. fetus* and no sample was positive for *C. fetus* subsp. *venerealis*. Regarding the number of outbreaks, 21.8% of farms had animals positive for *T. foetus*. None analyzed variables was associated with infection. Regarding the samples from slaughterhouses, none was positive. It is concluded that infection by *C. fetus* subsp. *venerealis* and *T. foetus* are present in cattle in the state of Pernambuco and suggest that control measures such as diagnosis and prophylaxis, and sexual segregation and rest of infected females, using a program of artificial insemination with strict health care, elimination of infected bulls and replacement for young animals are implemented to prevent the spread of agents in herds.

**Keywords:** Cattle, diagnostics, risk factors, campylobacteriosis, trichomoniasis.

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de Literatura

Tabela 1	Estudos da Campilobacteriose Genital Bovina realizados no Brasil	16
Tabela 2	Estudos da Tricomomose Bovina realizados no Brasil	24

### Artigo 1

Tabela 1	Análise dos fatores de risco associados à infecção por <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> em vacas procedentes da microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco, Brasil, 2013	61
Tabela 2	Análise dos fatores de risco associados à infecção por <i>Tritrichomonas foetus</i> em vacas procedentes da microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco, Brasil, 2013	62

### Artigo 2

Tabela 1	Análise dos fatores associados à infecção por <i>Tritrichomonas foetus</i> em touros no estado de Pernambuco, Brasil, 2013	76
----------	--	----

## **LISTA DE FIGURAS**

### **Artigo 2**

Figura 1	Distribuição geográfica dos municípios estudados	77
Figura 2	Distribuição geográfica dos matadouros estudados	77

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
	2.1 Geral	14
	2.2 Específicos	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>15</b>
	<b>3.1 Campilobacteriose Genital Bovina (CGB)</b>	<b>15</b>
	3.1.1 Etiologia	15
	3.1.2 Epidemiologia	15
	3.1.3 Patogenia	18
	3.1.4 Sinais clínicos e achados anatomo-patológicos	19
	3.1.5 Diagnóstico	20
	3.1.6 Controle e prevenção	21
	<b>3.2 Tricomonose Bovina (CG)</b>	<b>23</b>
	3.2.1 Etiologia	23
	3.2.2 Epidemiologia	23
	3.2.3 Patogenia	25
	3.2.4 Sinais clínicos e achados anatomo-patológicos	27
	3.2.5 Diagnóstico	27
	3.2.6 Controle e prevenção	29
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	<b>45</b>
	5.1 Artigo 1	45
	5.2 Artigo 2	63
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>APÊNDICE A. Questionário Investigativo</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICE B. Termo de Autorização</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>ANEXO A. Normas para publicação de periódico <i>Tropical Animal Health and Production</i></b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>ANEXO B. Normas para publicação de periódico <i>Research in Veterinary Science</i></b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>ANEXO C. Licença para uso de animais em pesquisa</b>	<b>107</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém o segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. O valor bruto relacionado à bovinocultura é estimado em R\$ 67 bilhões, aliado à presença dessa atividade em todos os estados brasileiros, evidencia-se a importância econômica e social da bovinocultura para o país (BRASIL, 2013). O estado de Pernambuco possui um rebanho de aproximadamente 2,3 milhões de bovinos e uma produção leiteira de 877 mil litros/ano, dados esses, responsáveis por colocar o estado como quarto maior rebanho efetivo e segundo maior produtor de leite da região nordeste (IBGE, 2013).

Diversas são as causas que interferem na produtividade da bovinocultura. Os distúrbios reprodutivos são considerados uma das principais causas de perdas econômicas nesse segmento (FERNANDEZ et al., 2007). Os principais problemas reprodutivos de ordem plurietiológica relatados são anestro, falha de concepção, infertilidade e mortalidades embrionária e/ou fetal (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006). Tais condições afetam negativamente os principais parâmetros de eficiência na cadeia produtiva da bovinocultura, como o intervalo entre partos, porcentagem de vacas em lactação no rebanho e número de bezerros produzidos por ano (LAGE et al., 1997; PELLEGRIN et al., 2002).

Os distúrbios reprodutivos podem ser divididos em: não-infecciosos e infecciosos (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006). Dentre as causas não-infecciosas, destacam-se as falhas nutricionais, plantas tóxicas, falhas de manejo e distúrbios endócrinos de origem materna (GIVENS, 2006; FERNANDEZ et al., 2007). Já os infecciosos podem ser de origem viral, fúngica, protozoária ou bacteriana (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006). Dentre às infecciosas, a Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) e a Tricomonose Bovina (TB) constituem umas das principais causas de distúrbios reprodutivos em rebanhos leiteiros (BONDURANT, 2005; GIVENS, 2006; ALVES et al., 2011).

A CGB e a TB são enfermidades de caráter venéreo, que possuem como agentes etiológicos o *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus*, respectivamente. No Brasil, diversos estudos foram conduzidos em diferentes regiões (STYNEN et al., 2003; JESUS et al., 2004; ROCHA et al., 2009; SILVA et al., 2009;

LEAL et al., 2012), entretanto, há uma escassez de dados atuais relacionados a essas infecções no nordeste brasileiro, sobretudo no estado de Pernambuco.

Apesar de o *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* serem micro-organismos filogeneticamente diferentes, a ecologia, epidemiologia e patologia de ambos são semelhantes; o que possibilita que sejam estudados conjuntamente como causas de problemas reprodutivos de ordem infecciosa em rebanhos de *status* sanitário desconhecido (BONDURANT, 2005).

Tendo em vista a escassez de dados na região e as perdas econômicas decorrentes dessas enfermidades, objetivou-se com este estudo, diagnosticar e analisar os aspectos epidemiológicos relacionados à infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* em rebanhos de bovinos leiteiros procedentes do estado de Pernambuco.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Realizar um estudo epidemiológico da Campilobacteriose Genital Bovina e da Tricomonose Bovina no estado de Pernambuco.

### 2.2 Específicos

- Determinar a prevalência da campilobacteriose genital bovina e da tricomonose bovina em fêmeas da microrregião de Garanhuns, Pernambuco;
- Pesquisar a ocorrência das infecções por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* em machos no estado de Pernambuco;
- Identificar os fatores de risco associados às infecções em bovinos no estado de Pernambuco.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Campilobacteriose Genital Bovina (CGB)

##### 3.1.1 Etiologia

A CGB é uma doença infecto-contagiosa, sexualmente transmissível, causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (OIE, 2008). As bactérias do gênero *Campylobacter* são microaerófilas estritas, necessitando de uma atmosfera ideal de 5-10% de oxigênio e de 1-10% de dióxido de carbono para o seu desenvolvimento. O agente é um bastonete Gram negativo, espiralado, sigmóide ou em forma de vírgula, formam pequenas colônias arredondadas, lisas e translúcidas, semelhantes a uma “gota de orvalho” (QUINN et al., 2005).

Em relação aos testes fenotípicos, o agente é capaz de produzir as enzimas catalase e oxidase, não possui a capacidade de produzir H<sub>2</sub>S em meio *Triple Sugar Iron* (TSI), não apresenta crescimento em meios contendo 1% glicina, não reduz o selenito e é resistente ao metronidazol e cefoperazone (ON, 1996; SCHULZE et al., 2006).

O *C. fetus* subsp. *venerealis* apresenta sensibilidade à desidratação e à luz ultravioleta; conseqüentemente, é provável que o tempo de sobrevivência do agente no meio ambiente seja curto (BONDURANT, 2005).

##### 3.1.2 Epidemiologia

A CGB apresenta distribuição cosmopolita e já foi diagnosticada em diversos países, como Alemanha, Austrália, Estados Unidos, Espanha, França e Reino Unido (VAN BERGEN, 2005). Entretanto, há uma escassez de dados sobre esta enfermidade em algumas regiões do mundo como na Ásia e África (MSHELIA et al., 2010). Apesar da escassez de diagnóstico e notificações, acredita-se que essa enfermidade seja responsável

por sérios distúrbios reprodutivos em países africanos, como na África do Sul (MADOROBÁ et al., 2011). Na Argentina, a CGB é considerada uma das maiores causas de aborto nos rebanhos bovinos (CAMPERO et al., 2005).

Estudos recentes em algumas regiões do mundo relatam prevalências que variam entre 1,5% e 2,2% (MADOBORA et al., 2011; MSHELIA et al., 2012; MOLINA et al., 2013). No Brasil, o primeiro diagnóstico da CGB foi realizado no estado de São Paulo em um feto bovino abortado (D'ÁPICE, 1956). Desde então, foram conduzidos diversos estudos epidemiológicos nas diferentes regiões do país, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Estudos da Campilobacteriose Genital Bovina realizados no Brasil

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Estado</b>	<b>Amostra</b>	<b>Método de diagnóstico</b>	<b>Prevalência (%)</b>
D'Ápice	1956	SP	F	I	1º relato
Mies Filho et al.	1960	RS	M	MA	27,0
Castro et al.	1967	SP	M, LP e F	I/MA	10,5/8,0
Fernandes et al.	1975	RS	E	I	33,3
Genovez et al.	1993	SP	F	I	4,6
Pellegrin et al.	1996	MS	E	IFD	56,0
Lage et al.	1997	MG/MS/SP/RS/DF/ BA/RJ/GO/PE	M, E e F	IFD	27,9
Pellegrin et al.	2002	MS	E	IFD	52,3
Stynen et al.	2003	MG	M	IFD	25,5
Giuffrida	2007	SP	E	PCR/I	5,8/7,8
Rocha et al.	2009	RJ	E	I/IFD	10,3/35,9
Leal et al.	2012	DF	M e E	IFD	11,1

E - Esmegma; F - Feto; LP - Lavado prepucial; M - Muco; I - Isolamento; IFD - Imunofluorescência direta; MA - Muco-aglutinação; PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

O modo de transmissão de maior importância epidemiológica do agente é pela monta natural, onde um animal infectado transmite o *C. fetus* subsp. *venerealis* para um não infectado no momento da cópula (MIES FILHO, 1960; CARROLL; HOERLEIN, 1972; ALVES et al., 2011). Entretanto, a transmissão também pode acontecer pela inseminação artificial com sêmen contaminado (GARCIA et al., 1983; EAGLESOME; GARCIA, 1997; OIE, 2008) e por fômites, principalmente devido a falta da higienização dos materiais utilizados na inseminação dos animais (GENOVEZ et al., 1997; MAI et al., 2013).

Os touros são considerados como portadores sadios (CASTRO et al., 1967; CLARK; DAFTY, 1978; PELLEGRIN, 2002), por não apresentarem sinais clínicos e pelas características particulares do aparelho reprodutivo, como a presença das criptas prepuciais, que proporcionam características adequadas para o desenvolvimento do agente (BONDURANT, 2005).

Os fatores de risco associados a esta enfermidade estão principalmente relacionados à idade dos reprodutores, ao tipo de manejo reprodutivo utilizado nos rebanhos e ao manejo higiênico-sanitário adotado nas propriedades (ALVES et al., 2011). Novilhas são mais susceptíveis à infecção, provavelmente devido à falta de mecanismo de defesa e anticorpos de memória que facilitem o processo de eliminação do patógeno (PELLEGRIN et al., 1999) e touros mais velhos, provavelmente devido ao maior tamanho das criptas prepuciais que conseqüentemente, aumenta a capacidade de manutenção do agente (CARROLL; HOERLEIN, 1972; DUFTY; CLARK; MONSBOURGH, 1975).

A utilização da monta natural no manejo reprodutivo dos animais é considerada como a principal de transmissão do agente dentro de um rebanho (CASTRO et al., 1967; PELLEGRIN et al., 2002; BONDURANT, 2005). Além disso, a utilização de reprodutores mais velhos aumentam a probabilidade de disseminação desse agente, devido a características particulares de dominância desses animais perante os outros machos do rebanho (BONDURANT, 2005).

A prática de empréstimo de touros para a cobertura de vacas em diferentes rebanhos (MARDONES et al., 2008), a falta de monitoramento das propriedades através do diagnóstico da enfermidade (MSHELIA et al., 2010), o acesso de touros procedentes de outras propriedades ao rebanho (JIMENEZ et al., 2011), a frequência de contato entre os animais (MADOROBA et al., 2011) e a aquisição de animais de rebanhos onde não se tenha o conhecimento do *status* sanitário podem contribuir com a introdução e disseminação do agente dentro dos rebanhos (MAI et al., 2013).

Outros fatores que podem contribuir para a disseminação do agente são: a utilização do chamado “touro de repasse”, que é empregado na cobertura de vacas que não conceberam após a inseminação artificial (PELLEGRIN, 2002; STYNEN et al., 2003; ROCHA et al., 2009) e a falta de conhecimento por parte dos produtores, o que inviabiliza a implementação de quaisquer medidas de controle e/ou profilaxia (GIUFFRIDA, 2007; VIANA; ZANINI, 2009).

### 3.1.3 Patogenia

Nos machos, o *C. fetus* subsp. *venerealis* está restrito ao pênis e mucosa prepucial (GARCIA et al., 1983; COBO; CORBEIL; BONDURANT, 2011) colonizando as invaginações e criptas do epitélio estratificado da mucosa peniana e prepucial, onde há condições favoráveis para o seu desenvolvimento como temperatura e baixa concentração de O<sub>2</sub> (SAMUELSON; WINTER, 1966; GENOVEZ et al., 1997). Essa infecção não resulta em nenhuma manifestação inflamatória e/ou clínica para o reprodutor, porém, o animal torna-se portador do agente durante toda sua vida (COBO et al., 2011), provavelmente, devido a capacidade do agente em realizar pequenas variações antigênicas nas proteínas de superfície da parede celular, resultando em uma diminuição da atuação do sistema imunológico do hospedeiro (TU et al., 2003).

Nas fêmeas, o micro-organismo coloniza as células da mucosa vaginal, cérvix, útero e ovidutos (GARCIA et al., 1983; CHIAPPARRONE et al., 2011). A colonização ocorre principalmente durante a fase ovulatória, como nessa fase há um grande aporte de neutrófilos para a vagina e útero, somente os micro-organismos que conseguirem escapar da fagocitose e se multiplicarem irão invadir o útero durante a fase progesterônica, quando o aporte de neutrófilos é menor (LAGE; LEITE, 2000).

Uma vez depositado na vagina, o agente se multiplica e atinge a cérvix em aproximadamente cinco dias, os cornos uterinos em cerca de 12 dias e posteriormente o ovidutos em 20 dias. Ao final de 40-60 dias, inicia-se, então, o processo de síntese de anticorpos na vagina e útero, debelando a infecção no sentido inverso. Quando está presente no útero acarreta em modificações do endométrio nas camadas mais profundas, principalmente, causando infiltração por células de defesa, podendo resultar em falhas no processo de nidação e/ou morte embrionária, aborto, retorno ao cio com intervalos irregulares e infertilidade (GENOVEZ et al., 1997; LAGE; LEITE, 2000).

O principal tipo de resposta imunológica nos machos é a produção local de IgA, entretanto, essa produção não é suficiente para debelar a infecção (COBO et al., 2011). Enquanto que nas fêmeas, logo após o processo de infecção, há uma pequena produção de IgM, porém, o principal mecanismo de resposta imunológica seria a produção da IgA responsável por impedir a colonização e por último, a síntese de IgG, que está

principalmente relacionada com o processo de opsonização (CORBEIL et al., 1974; CORBEIL, 1999; COBO et al., 2003; CORBEIL et al., 2003).

Após três a cinco cios, dependendo da concentração do agente, ocorre a cura espontânea das fêmeas devido à atuação do sistema imunológico (STYNEN et al., 2003) e eliminação do agente através da produção de muco (LAGE; LEITE, 2000; CORBEIL et al., 2003).

#### **3.1.4 Sinais clínicos e achados anatomo-patológicos**

Nos machos, a infecção não resulta em nenhuma manifestação clínica e/ou redução na qualidade seminal dos animais (GARCIA et al., 1983; GENOVEZ et al., 1997). Os principais sinais clínicos observados nas fêmeas acometidas são: repetição de cio com intervalos aumentados e irregulares; aumento do intervalo entre partos (CARROLL; HOERLEIN, 1972; HOFFER, 1981; BONDURANT, 2005); redução nas taxas de prenhez (JIMENEZ et al., 2011); prolongamento da estação de monta (PELLEGRIN et al., 2002); infertilidade temporária, endometrite, morte embrionária, aborto e retenção de placenta (CASTRO et al., 1967; HOFFER, 1981; ANDERSON, 2007); vaginite não purulenta (MIES FILHO, 1960); e redução da produção de leite (AKHTAR et al., 1993).

Normalmente, o aborto ocorre até a metade da gestação (GIVENS; MARLEY, 2008; JIMENEZ et al., 2011) e é seguido de uma endometrite com focos de infiltrados linfocíticos no estroma uterino (HOFFER, 1981).

Nos fetos abortados, pode-se observar broncopneumonia neutrofílica, abomasite não supurativa, serosite fibrino-supurativa no peritônio, pleura e pericárdio (CAMPERO et al., 2005), enterite intersticial não supurativa, hepatite multifocal não supurativa e meningite fibrino-supurativa (MORRELL et al., 2011). Na placenta, pode-se ainda observar um quadro de placentite neutrofílica e necrosante (CAMPERO et al., 2005).

### 3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo para a enfermidade pode ser realizado a partir de observação dos sinais clínicos, análise do histórico do rebanho e dos parâmetros zootécnicos de produção (ALVES et al., 2011). Entretanto, o diagnóstico laboratorial é fundamental para a confirmação da doença e pode ser realizado a partir do isolamento do agente em amostras de esmegma prepucial (BONDURANT, 2005), muco cérvico-vaginal (STYNEN et al., 2003) ou amostras de aborto ou placenta (KODAKARAM-TAFTI; IKEDE, 2005).

A colheita do material biológico dos machos pode ser realizada mediante a lavagem prepucial ou por aspiração e raspagem do esmegma. Porém, o último procedimento apresenta os resultados mais satisfatórios devido à menor contaminação das amostras (TEDESCO; ERRICO; DEL BAGLIVI, 1977; OIE, 2008). Além disso, a realização de um repouso sexual acima de 15 dias é recomendável para que os micro-organismos se desenvolvam, resultando em um aumento da probabilidade de isolamento do agente (LAGE et al., 1997). Outra alternativa seria a realização de três colheitas consecutivas com um repouso sexual superior a 15 dias entre elas (SAMUELSON; WINTER, 1966; PELLEGRIN et al., 1999)

O isolamento do agente é considerado como um dos melhores testes de diagnóstico para a CGB. Porém, são necessários cuidados especiais com o procedimento de colheita e transporte das amostras. Após a colheita, deve-se transportar rapidamente o material para o laboratório, uma vez que o agente apresenta baixa taxa de sobrevivência fora do hospedeiro, sendo necessária a utilização de meios de transporte específicos com o objetivo de manter as bactérias viáveis (ROCHA et al., 2009).

Os meios de transporte e enriquecimento empregados no diagnóstico da CGB são o Clark, Lander, Foley e Clark, Cary-Blair (OIE, 2008). Porém, o meio Lander é o mais indicado por apresentar menor contaminação (LANDER, 1990 a,b). Em relação ao exame microbiológico, o meio de cultura que apresenta os melhores resultados é o Skirrow devido a sua constituição com antibióticos como o sulfato de polimixina B, trimetoprim, vancomicina e cycloheximidina (OIE, 2008).

Apesar de o isolamento e dos métodos fenotípicos como o crescimento em meio contendo 1% de glicina, prova da catalase e oxidase, produção de H<sub>2</sub>S, redução do selenito

e resistência ao metronidazol e cefoperazone serem importantes para a diferenciação das espécies de *Campylobacter* spp. (ON, 1996), a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) deve ser utilizada para a confirmação dos resultados, devido a sua maior sensibilidade e especificidade (SCHULZE et al., 2006; GROFF et al., 2010). Além disso, a PCR (HUM et al., 1997; VARGAS et al., 2003) e suas derivações, como a PCR multiplex (WILLOUGHBY et al., 2005) e PCR *Real Time* apresentam uma maior rapidez e precisão em relação aos métodos tradicionais de diagnóstico (SPENCE et al., 2013).

Além do isolamento e/ou detecção do material genômico do agente, outras técnicas laboratoriais podem ser utilizadas no diagnóstico, tais como: imunofluorescência direta (IFD) (DUFTY, 1967; FIGUEIREDO et al., 2002; PELLEGRIN et al., 2002); ensaio imunoenzimático (ELISA) (HUM; STEPHENS; QUINN, 1991; PELLEGRIN et al., 2011); teste de aglutinação (CASTRO et al., 1967; ERGANIS et al., 2002) e exames anatomo-patológicos (CAMPERO et al., 2005; MORELL et al., 2011). Entretanto, é aconselhável a confirmação desses métodos de diagnóstico mediante a cultura e métodos moleculares (MORRELL et al., 2011).

O diagnóstico diferencial para a CGB deve ser realizado para as enfermidades que ocasionam distúrbios reprodutivos, tais como: tricomonose bovina, leptospirose, neosporose, brucelose, ureaplasmosse, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina (GIVENS; MARLEY, 2008).

### **3.1.6 Prevenção e controle**

O controle da CGB deve ser fundamentado principalmente em dois aspectos: a identificação dos portadores e o manejo reprodutivo das fêmeas (PELLEGRIN et al., 2002). Dessa forma, as principais medidas de controle que devem ser adotadas são: a identificação e descarte dos reprodutores infectados (JIMENEZ et al., 2011); e a implementação de um programa de inseminação artificial com rigorosos cuidados sanitários (CARROLL; HOERLEIN, 1972; HOFFER, 1981; LAGE; LEITE, 2000).

Em relação às medidas prevenção, deve-se realizar o descarte dos touros velhos e reposição por animais jovens comprovadamente negativos (PELLEGRIN et al., 2002; ROJO-MONTEJO et al., 2008), evitar o acesso de touros procedentes de rebanhos vizinhos

ao rebanho (JIMENEZ et al., 2011), evitar a prática de pastagens compartilhadas, pois pode haver a transmissão do agente pela monta com animais infectados, principalmente de rebanhos onde o *status* sanitário não é conhecido (ROJO-MONTEJO et al., 2008) e realizar um monitoramento do rebanho mediante o diagnóstico periódico da infecção (MOLINA et al., 2013).

A utilização de vacinas pode ser realizada, mas de acordo com Cobo et al. (2003) as vacinas disponíveis no mercado não conferem uma boa imunidade nos rebanhos vacinados. Cobo et al. (2004b) relatam que vacinas elaboradas com antígenos purificados de *C. fetus* subsp. *venerealis* induzem nas fêmeas uma resposta imunológica capaz de reduzir os casos da infecção e aumentar as taxas de prenhez dentro dos rebanhos. Entretanto, o mesmo não ocorre nos machos, provavelmente, devido ao tipo de resposta imunológica frente ao agente (COBO; CORBEIL; BONDURANT, 2011).



## 3.2 Tricomonose Bovina (TB)

### 3.2.1 Etiologia

A tricomonose bovina é uma enfermidade venérea causada por um protozoário denominado *Tritrichomonas foetus* (PELLEGRIN; LEITE, 2003). O *T. foetus* é um protozoário de morfologia piriforme cujo tamanho oscila entre 10 a 20  $\mu\text{m}$ . Possui um núcleo bem definido e quatro flagelos, três na porção anterior e um na posterior, acompanhando a membrana ondulante, que é perfeitamente visível à microscopia (FELLEISEN, 1999; RAE; CREWS, 2006). Além disso, esse patógeno apresenta uma grande sensibilidade ao calor, à luz ultravioleta e aos sabões e desinfetantes comuns (SOUSA et al., 1991).

### 3.2.2 Epidemiologia

Essa enfermidade possui distribuição cosmopolita (OIE, 2008; SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009). Estudos realizados em diversas localidades relataram diferentes prevalências: 6,0% (119/1984) em touros da Flórida (RAE et al., 2004); 8,5% (14/164) em vacas leiteiras na Turquia (SERIN et al., 2010); 4,1% (142/3458) na África do Sul (MADOBORA et al., 2011); 32,0% (33/103) e 4,0% (13/327) em touros procedentes de rebanhos de corte oriundos do norte da Espanha (MENDOZA-IBARRA et al., 2012; 2013); 3,7% (1154/31202) em touros de corte nos Estados Unidos (SZONYI et al., 2012); 5,0% (4/80) em fetos abortados na China (YANG et al., 2012) e 1,1% (309/29.178) na região dos pampas da Argentina (MOLINA et al., 2013).

No Brasil, o primeiro diagnóstico da TB foi realizado por Roehe (1948) em rebanhos bovinos do estado do Rio Grande do Sul. Desde então, foram conduzidos diversos estudos em diferentes regiões do país (Tabela 2). No estado de Pernambuco, Paz Junior et al. (2010) analisaram amostras procedentes de 150 vacas e sete touros, procedentes do Município de Sanharó e não identificaram o agente em nenhuma amostra.

O principal modo de transmissão do agente é pela monta natural (CORBEIL et al., 1989; FELLEISEN, 1999; BONDURANT, 2005; CARVALHO; RODRIGUES, 2006; RAE; CREWS, 2006). Outra forma de transmissão é por inseminação artificial, caso o sêmen esteja contaminado (EAGLESOME; GARCIA, 1997; FELLEISEN, 1999; BONDURANT, 2005).

Tabela 2 - Estudos da Tricomonose Bovina realizados no Brasil

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Estado</b>	<b>Amostra</b>	<b>Método de diagnóstico</b>	<b>Prevalência (%)</b>
Roehe	1948	RS	FS/M	I	1º relato
Mello	1954	CE/PB/PE/ BA/RJ/MG	LP/M	I	0,0 - 14,8
Amaral et al.	1970	SP	LP/M	I	8,1
Medeiros e Figueiredo	1971	MG	LP	I	14,3
Bacalhau	1981	PB	LP	I	27,0
Leite et al.	1997	MG	LP/F/M	I	7,3
Jesus et al.	2004	RJ	M/LP	I	1,6
Silva et al.	2009	RS	LP	I	2,6

FS - Fluido seminal; LP - Lavado prepucial; M - Muco; I - Isolamento.

Os machos são considerados os principais responsáveis pela manutenção e disseminação do agente nos rebanhos, principalmente devido à ausência de manifestações clínicas da infecção e características particulares do aparelho reprodutivo, que possibilitam a proliferação do *T. foetus* sem que ocorra a eliminação do patógeno pelo sistema imunológico (JESUS et al., 2004).

Além disso, outros fatores estão relacionados com a capacidade de transmissão do agente pelos reprodutores, como por exemplo, a concentração de organismos na superfície do pênis e prepúcio, sua libido e classificação hierárquica de dominância perante os outros machos do rebanho (BONDURANT, 2005). Estima-se que a taxa de transmissão do touro para a vaca, dependendo da concentração do agente e atuação dos mecanismos de defesa do aparelho reprodutor das fêmeas, possa variar entre 30% e 70% (ROJO-MONTEJO et al., 2008).

A utilização da monta natural no manejo reprodutivo do rebanho é sem dúvida um dos principais fatores de risco para transmissão do agente (CORBEIL et al., 1989; FELLEISEN, 1999; BONDURANT, 2005; CARVALHO; RODRIGUES, 2006; RAE; CREWS, 2006). Além disso, o risco de transmissão no rebanho aumenta à medida que

umenta a idade dos reprodutores (RAE; CREWS, 2006; MENDONZA-IBARRA et al., 2012). Isso ocorre devido ao aumento das invaginações das criptas prepuciais, oferecendo condições ideais para o desenvolvimento do agente (GENOVEZ et al., 1997).

Outros fatores que podem contribuir para a disseminação do agente nos rebanhos são: utilização do touro de repasse no programa de inseminação artificial (PELLEGRIN et al., 2002; STYNEN et al., 2003; CARVALHO; RODRIGUES, 2006; ROCHA et al., 2009; VIANA; ZANINI, 2009); a utilização da inseminação artificial sem um controle higiênico-sanitário rigoroso (CARVALHO; RODRIGUES, 2006); aumento do número de vacas que apresentam repetição de cio no rebanho (MENDONZA-IBARRA et al., 2012); utilização de pastagens compartilhadas e empréstimo de touros (MARDONES et al., 2008; ROJO-MONTEJO et al., 2008).

Além dos fatores supracitados, acredita-se que em rebanhos maiores, o risco de transmissão também seja maior devido o contato sexual mais frequente entre os animais (RAE; CREWS, 2006) e o desconhecimento das medidas preventivas da TB por parte dos produtores favorece a introdução do agente nos rebanhos (RAE et al., 2004; GIUFFRIDA, 2007; VIANA; ZANINI, 2009).

### 3.2.3 Patogenia

Nos machos, o agente coloniza os espaços entre as criptas epiteliais da mucosa prepucial sem causar nenhuma manifestação inflamatória e/ou clínica. Os touros acometidos tornam-se portadores assintomáticos devido à incapacidade de eliminação do *T. foetus* pelo sistema imunológico (CORBEIL, 1999; FELLEISEN, 1999; RAE; CREWS, 2006; SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009; COBO et al., 2011).

Nas fêmeas, o agente pode ser encontrado na vagina, cérvix, útero e oviduto (ROEHE, 1948; PERSONSON et al., 1976; COBO et al., 2004a). Primeiramente, o agente coloniza a vagina, onde causa vaginite, e posteriormente, útero e oviduto, resultando em infertilidade devido à reação inflamatória local, que dificulta e/ou impossibilita o processo de nidação embrionária (EAGLESOME; GARCIA, 1997; BENCHIMOL; DIAS; FONTES, 2006; MEDLEJ et al., 2009).

Acredita-se que a colonização total do aparelho genital das vacas ocorra em aproximadamente duas semanas (PELLEGRIN; LEITE, 2003) e que os seguintes processos estejam relacionados à infecção pelo agente: mimetismo antigênico devido à capacidade de variação de epítomos (CORBEIL et al., 1994); penetração mecânica do epitélio (RHYAN et al., 1995; ROJO-MONTEJO et al., 2008); secreção de enzimas que degradem e/ou inibam a aderência dos anticorpos (CORBEIL et al., 1989; CORBEIL et al., 1994; FELLEISEN, 1999; KENNETT; HOOK JR, 2002) e a indução do processo de apoptose celular, resultando em um aumento na taxa de sobrevivência do protozoário devido a baixa resposta imunológica do organismo frente à infecção (SINGH et al., 2004; RUTKOWSKI; HARMSEN, 2007).

Além desses fatores, é provável que as células epiteliais forneçam alguns nutrientes e proporcionem um ambiente de anaerobiose propício para a sobrevivência do *T. foetus* (SINGH et al., 1999). Ainda, segundo os mesmos autores, os níveis de adesão e multiplicação do *T. foetus* às células epiteliais do aparelho reprodutivo das fêmeas são maiores quando a concentração de progesterona está elevada no organismo.

A colonização do útero resulta em um quadro de endometrite, tornando o ambiente intra-uterino impróprio para o desenvolvimento embrionário (COBO et al., 2004a; ROJO-MONTEJO et al., 2008). Este protozoário pode causar a morte embrionária precoce ou aborto desde a fecundação até o sétimo mês de gestação, porém o aborto ocorre com maior frequência entre o 50º e 70º dia da gestação (BONDURANT, 2005). Em alguns casos, não há a expulsão do feto e ocorre o processo de maceração fetal intra-uterino e piometra (FELLEISEN, 1999).

Nos machos, o principal tipo de resposta imunológica contra o agente ocorre mediante a síntese e secreção de IgA pelo epitélio do aparelho reprodutivo (CORBEIL et al., 2003; COBO; CORBEIL; BONDURANT, 2011). Enquanto que nas fêmeas, há produção tanto da IgA, responsável pela neutralização dos patógenos, quanto da IgG, que favorece a reação de opsonização. A eliminação do agente ocorre principalmente pela produção e liberação do muco vaginal (IKEDA; BONDURANT; CORBEIL, 1995; CORBEIL et al., 2003; BONDURANT, 2005).

A maioria das fêmeas infectadas podem assim permanecer por um período que varia entre 95 a 300 dias pós-infecção (PELLEGRIN; LEITE, 2003; GIVENS, 2006). Nas fêmeas, a infecção é auto-limitante provavelmente devido à atuação direta do sistema imunológico do animal e síntese de anticorpos locais no útero e vagina (CORBEIL, 1999).

### 3.2.4 Sinais clínicos e achados anatomo-patológicos

Nos machos, a infecção por *T. foetus* não resulta em nenhuma manifestação clínica (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009). Porém nas fêmeas, pode-se observar a ocorrência deaios irregulares com intervalos aumentados (RAE, 1989), redução na taxa de prenhez (MARDONES et al., 2008), vaginite, cervicite, endometrite, piometra, morte embrionária, maceração fetal, piometra, aborto e infertilidade (RAE, 1989; CORBEIL et al., 2003; ANDERSON, 2007; GIVENS; MARLEY, 2008; SERIN et al., 2010).

Não há presença de lesões microscópicas no aparelho reprodutivo masculino. Nas fêmeas, mediante cortes histológicos, pode-se visualizar a presença de infiltração de linfócitos, macrófagos e neutrófilos por todo o aparelho reprodutivo (PELLEGRIN; LEITE, 2003). Na vagina acometida observa-se a presença de aglomerados linfóides multifocais subepiteliais e infiltrado difuso superficial de células mononucleares. No útero, observa-se um quadro de endometrite com agregação de células mononucleares, focos linfóides na submucosa e região periglandular, fibrose e salpingite (PERSONSON et al., 1976; COBO et al., 2004a).

Nos fetos, observa-se uma pneumonia piogranulomatosa com presença de macrófagos e neutrófilos nos espaços alveolares (RHYAN; STACKHOUSE; QUINN, 1988) e enterite necrosante (RHYAN et al., 1995). Em relação à placenta, é comum o quadro de placentite (RHYAN; STACKHOUSE; QUINN, 1988) e hipotrofia placentária (FELLEISEN, 1999).

### 3.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da TB baseia-se no histórico reprodutivo do rebanho e no isolamento e identificação do agente (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009). O material biológico utilizado para o diagnóstico é o esmegma prepucial dos machos, muco vaginal das fêmeas (PELLEGRIN; LEITE, 2003), fluidos placentários, conteúdo estomacal (GIVENS, 2006) e fragmentos de pulmões de fetos abortados (RHYAN; STACKHOUSE; QUINN, 1988).

As amostras de esmegma podem ser colhidas mediante a lavagem prepucial, aspiração do esmegma com pipeta e raspagem da mucosa prepucial (SHONMANN et al., 1994). Porém, na raspagem, a quantidade do material é superior e os níveis de contaminação são menores (IRONS; HENTON; BERTSCHINGER, 2002). Para a realização desse tipo de colheita é recomendável a realização de um descanso sexual dos reprodutores para aumentar a sensibilidade do diagnóstico (PELLEGRIN; LEITE, 2003).

Após a colheita, as amostras devem ser encaminhadas ao laboratório sob temperatura ambiente em no máximo 24 horas ou incubadas a 37°C em meios de cultura (MUKHUFHI et al., 2003; MUTTO; GIAMBIAGGI; ANGEL, 2006; CLAVIJO et al., 2011). Quando o diagnóstico é realizado mediante a cultura e observação do agente, os meios que podem ser utilizados para esse procedimento são: Lactopep (LOPES et al., 1995); Tioglicolato; InPouch™ e Diamond, ambos devem ser inoculados com as amostras e incubadas a 37°C, realizando-se leituras diárias durante sete dias em microscópio de contraste de fase (MENDONZA-IBARRA et al., 2012; OIE, 2012).

Apesar de ser considerado como teste padrão para o diagnóstico da TB (OIE, 2012), o isolamento pode ter sua sensibilidade reduzida devido à contaminação do meio de cultura por bactérias, leveduras e fungos (FELLEISEN et al., 1998; BONDURANT et al., 2003; MUTTO; GIAMBIAGGI; ANGEL, 2006; OYHENART et al., 2012) ou presença de espécies de *Tritrichomonas* fecais como o *Tetratrichomonas* spp. e *Pentatrichomonas hominis*, que apesar de serem morfológicamente semelhantes ao *T. foetus*, aparentemente não são patogênicos para os bovinos (AGNEW et al., 2008; CORBEIL et al., 2008; RODNING et al., 2008).

Devido à contaminação dos meios, buscou-se o desenvolvimento e padronização de métodos de diagnósticos mais precisos como a PCR. Esse ensaio é considerado mais rápido e prático, quando comparado aos métodos de cultura convencional (NICKEL; OLSON; SCHULTZ, 2002; BONDURANT et al., 2003; MUTTO; GIAMBIAGGI; ANGEL, 2006; OYHENART et al., 2012). Além disso, é considerada uma técnica mais sensível, pois consegue detectar o DNA genômico do agente a partir de baixas concentrações de DNA (FELLEISEN, 1997; FELLEISEN et al., 1998; MUKHUFHI et al., 2003; MUTTO; GIAMBIAGGI; ANGEL, 2006).

Apesar da maior sensibilidade da PCR, a qualidade da amostra pode influenciar negativamente o resultado (MUKHUFHI et al., 2003). Uma alternativa para a resolução desse problema seria a utilização simultânea da cultura e PCR no diagnóstico (COBO et

al., 2007; MENDONZA-IBARRA et al., 2012). Recomenda-se a realização de três repetições do diagnóstico, com iguais intervalos e repouso sexual entre coletas, a fim de evitar a presença de falsos negativos (COBO et al., 2007).

Além dos métodos supracitados, métodos anatomo-patológicos podem ser utilizados como auxílio no diagnóstico da infecção por *T. foetus*. Entretanto, a confirmação dos resultados é necessária mediante a identificação do agente ou do seu material genômico (COBO et al., 2004b).

O diagnóstico diferencial para a TB deve ser realizado para as enfermidades que acarretem em distúrbios reprodutivos, como: campilobacteriose genital bovina, leptospirose, neosporose, brucelose, micoplasmose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006) e condições metabólicas e nutricionais (RAE; CREWS, 2006).

### **3.2.6 Prevenção e controle**

O controle da infecção por *T. foetus* deve ser baseado em medidas que possibilitem a identificação dos animais infectados, mudanças no manejo reprodutivo dos rebanhos e repouso sexual para as fêmeas (PELLEGRIN et al., 2002; SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009).

A principal medida de controle que deve ser adotada em rebanhos com histórico de distúrbios reprodutivos é a identificação e descarte dos machos infectados, tendo em vista que estes são os principais responsáveis pela disseminação do agente nos rebanhos (MADOROBA et al., 2011; OYHENART et al., 2012). Além disso, a separação dos animais que apresentam distúrbios (MADOROBA et al., 2011), o monitoramento dos rebanhos mediante a realização rotineira do diagnóstico da enfermidade também podem contribuir com o controle da TB (SILVA et al., 2009; MOLINA et al., 2013).

Em relação à prevenção, as principais medidas que devem ser adotadas são: a separação dos animais que apresentam distúrbios (MADOROBA et al., 2011); implementação de um programa de inseminação artificial com cuidados sanitários adequados (FELLEISEN, 1999; BONDURANT, 2005); evitar a prática do empréstimo de touros; abolir a utilização do touro de repasse nos programas de inseminação; descartar as

fêmeas que frequentemente apresentam distúrbios reprodutivos (PELLEGRIN et al., 2002); evitar a utilização de pastagens compartilhadas (PELLEGRIN; LEITE, 2003; RAE; CREWS, 2006; ROJO-MONTEJO et al., 2008); e o descarte periódico dos touros mais velhos e substituição por touros jovens, preferencialmente virgens (FELLEISEN, 1999; PELLEGRIN et al., 2002).



## 4 REFERÊNCIAS

- AGNEW, D.W. et al. Comparative histopathology and antibody responses of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad and *Tritrichomonas foetus* genital infections in virgin heifers. **Veterinary Parasitology**, v.151, p.170-180, 2008.
- AKHTAR, S. et al. The Association between antibody titres against *Campylobacter fetus* and milk production efficiency in dairy cattle. **Veterinary Research Communications**, v.17, p.183-191, 1993.
- ALVES, T.M. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.4, p.336-344, 2011.
- AMARAL, V.; SANTOS, S.M.; FENERICH, F.L. Levantamentos de incidência do *Tritrichomonas foetus* no estado de São Paulo. **Biológico**, v.36, p.201-204, 1970.
- ANDERSON, M.L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. **Theriogenology**, v.68, p.474-486, 2007.
- BACALHAU, A.S. Ocorrência da tricomonose em bovinos da bacia leiteira de Campina Grande no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.5, p.21-24, 1981.
- BENCHIMOL, M.; DIAS, A.B.; FONTES, R. Interaction of *Tritrichomonas foetus* and the bovine oviduct in an organ culture model. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.244-250, 2006.
- BONDURANT, R.H. et al. Detection of *Tritrichomonas foetus* by polymerase chain reaction in cultured isolates, cervicovaginal mucus, and formalin-fixed tissues from infected heifers and fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.579-584, 2003.

BONDURANT, R.H. Venereal Diseases of Cattle: Natural History, Diagnosis, and the Role of Vaccines in their Control. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.21, p.383-408, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 21 dez. 2013.

CAMPERO, C.M. et al. Immunohistochemical Identification of *Campylobacter fetus* in Natural Cases of Bovine and Ovine Abortions. **Journal of Veterinary Medicine**, v.52, p.138-141, 2005.

CARROL, E.J.; HOERLEIN, A.B. Diagnosis and control of bovine genital vibriosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.161, p.1359-1364, 1972.

CARVALHO, D.V.; RODRIGUES, A.F.S.F. *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller,1928) (Protista, Trichomonadidae) e a implicação na pecuária do Brasil. **CES Revista**, v.6, p.113-132, 2006.

CASTRO, A.F.P. et al. Vibriose bovina no estado de São Paulo. Isolamento de novas amostras de *Vibrio fetus* e pesquisa de aglutininas anti-*Vibrio fetus* no muco-vaginal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.34, n.1, p.29-43, 1967.

CHIAPPARRONE, M.L. et al. Quantitative analysis of *Campylobacter fetus venerealis* adhesion to bovine reproductive tract cell cultures. **Brazilian of Journal Veterinary Research Animal Science**, v.48, n.1, p.73-78, 2011.

CLARK, B.L.; DUFTY, J.H. The species of flies reared from struck sheep in western Australia. **Australian veterinary journal**. v.54, p.263-263, 1978.

CLAVIJO, A. et al. The influence of temperature and simulated transport conditions of diagnostic samples on real-time polymerase chain reaction for the detection of *Tritrichomonas foetus* DNA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.5, p.982-985, 2011.

COBO, E.R. et al. Effect of Two Commercial Vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on Heifers Naturally Challenged. **Journal of Veterinary Medicine**, v.50, p.75-80, 2003.

COBO, E.R. et al. Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes.

**Theriogenology**, v.62, p.1367-1382, 2004a.

COBO, E.R. et al. Lectin Binding Patterns and Immunohistochemical antigen detection in the genitalia of *Tritrichomonas foetus*-infected Heifers. **Journal of Comparative Pathology**, v.131, p.127-134, 2004b.

COBO, E.R. et al. Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. **Theriogenology**, v.68, p.853-860, 2007.

COBO, E.R.; CORBEIL, L.B.; BONDURANT, R.H. Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. **Journal of Reproductive Immunology**, v.89, p.55-61, 2011.

CORBEIL, L.B. et al. Bovine venereal vibriosis: Variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. **Infection and Immunity**, v.10, n.5, p.1084-1090, 1974.

CORBEIL, L.B. et al. Adherence of *Tritrichomonas foetus* to Bovine Vaginal Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v.57, n.7, p.2158-2165, 1989.

CORBEIL, L.B. Vaccination Strategies Against *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Today**, v.10, n.3, p.103-106, 1994.

CORBEIL, L.B. Immunization and diagnosis in bovine reproductive tract infections. **Advances in Veterinary Medicine**, v.41, p. 217-239, 1999.

CORBEIL, L.B. et al. Vaccines against sexually transmitted diseases. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-6, 2003.

CORBEIL, L.B. et al. Detection of trichomonad species in the reproductive tracts of breeding and virgin bulls. **Veterinary Parasitology**, v.154, p.226-232, 2008.

DUFTY, J.H. Diagnosis of vibriosis in the bull. **Australian veterinary journal**, v.43, p.433-437, 1967.

DUFTY, J.H.; CLARK, B.L.; MONSBOURGH, M.J. The influence of age on the susceptibility of bull to *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. **Australian Veterinary Journal**, v.51, p.294-297, 1975.

D'APICE, M. Ocorrência do aborto bovino no estado de São Paulo devido ao *Vibrius fetus*. **Biológico**, v.22, p.15-18, 1956.

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen **Revue Scientifique Technique**, v.16, n.1, p.215-225, 1997.

ERGANIS, O. et al. Rapid diagnosis of ovine *Brucella*, *Campylobacter* and *Salmonella* infections from fetal stomach contents by coagglutination test. **Small Ruminant Research**, v.45, p. 123-127, 2002.

FERNANDES, J.C.T.; MOOJEN, V.; PALACIO, P.T. Isolamento do *Campylobacter fetus* sub-espécie *venerealis* sorotipo A de touros, no Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.3, n.1, p.7-12, 1975.

FERNANDEZ, M.E. et al. Pérdidas reproductivas em bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.88, n.6, p.246-254, 2007.

FELLEISEN, R.S.J. Comparative sequence analysis of 5±8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. **Parasitology**, v.115, p.111-119, 1997.

FELLEISEN, R.S.J et al. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA Enzyme Immunoassay Based on rRNA Gene Unit Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.513-519, 1998.

FELLEISEN, R.S.J. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. **Microbes and Infection**, v.1, p.807-816, 1999.

FIGUEIREDO, J.F. et al. Evaluation of direct fluorescent antibody test for the diagnosis of Bovine Genital Campylobacteriosis. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.44, n.3-4, p.118-123, 2002.

GARCIA, M.M. et al. Detection of *Campylobacter fetus* in Artificial Insemination Bulls with a Transport Enrichment Medium. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v.47, p.336-340,1983.

GENOVEZ, M.E. et al. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no instituto biológico de São Paulo no período de 1985 a 1992. **Brazilian of Journal Veterinary Research Animal Science**, v.30, n.2, p.107-112, 1993.

GENOVEZ, M. E. Campilobacteriose genital bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.21, n.3, p.48-52, 1997.

GIUFFRIDA, R. **Fatores de risco e comparação de técnicas de diagnóstico para campilobacteriose genital bovina em touros do município de Presidente Prudente – SP**. 2007, 107p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2007.

GIVENS, M.D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, v.66, p.648-654, 2006.

GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v.70, p.270-285, 2008.

GROFF, A.C.M. et al. Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.12, p.1031-1035, 2010.

HOFFER, M.A. Bovine Campylobacteriosis: A Review. **Canadian Veterinary Journal**, v.22, n.11, p.327-330, 1981

HUM, S., STEPHENS, L.R., QUINN, C. Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. **Australian Veterinary Journal**, v.68, n.8, p.272-275, 1991.

HUM, S. et al. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. **Australian Veterinary Journal**, v.75, n.11, p.827-831, 1997.

IKEDA, J.S.; BONDURANT, R.H.; CORBEIL, L.B. Bovine Vaginal Antibody Responses to Immunoaffinity-Purified Surface Antigen of *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.5, p.1158-1163, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE 2011.

Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 21 dez. 2013.

IRONS, P.C.; HENTON, M.M.; BERTSCINGER, H.J. Collection of preputial material by scraping and aspiration for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in bulls. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.73, n.2, p.66-69, 2002.

JESUS, V.L.T. et al. Fatores intrínsecos do hospedeiro associados à prevalência de tricomonose genital bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.4, p.159-163, 2004.

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**, v.101, p.157-162, 2011.

JUNQUEIRA, J.R.C.; ALFIERI, A.A. Reproductive failures in beef cattle breeding herds with emphasis for infectious causes. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.2, p.289-298, 2006.

KENNETT, M.J.; HOOK JR, R.R. *Tritrichomonas foetus*: characterization of isolates and partial purification of a secreted cytotoxin. **Experimental Parasitology**. v.102, p.1-8, 2002.

KODAKARAM-TAFTI, A.; IKEDE, B.O. A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, from 1990 to 2001. **The Canadian Veterinary Journal**, v.46, p.635-637, 2005.

LAGE, A.P.; LEITE, R.C. Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). **Pecuária de Corte**, v.10, 50-54, 2000.

LAGE, A.P. et al. Campilobacteriose genital bovina: diagnóstico na Escola de Veterinária da UFMG de 1976 a 1996. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.2, p.164-166, 1997.

LANDER, K.P. The application of a transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. **British Veterinary Journal**, v.146, n.4, p.334 - 340, 1990a.

LANDER, K.P. The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. **British Veterinary Journal**, v.146, n.4, p.327-333, 1990b.

LEAL, D R. et al. Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal e em seu entorno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.4, p.256-259, 2012.

LEITE, R.C. et al. Tricomonose bovina: diagnósticos realizados na Escola de Veterinária da UFMG no período de 1979 a 1995. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.2, p.166-168, 1997.

LOPES, L.M.S. et al. Um novo meio de transporte e cultivo para *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). I: Dias de viabilidade dos parasitos. **Semina: ciências biológicas/saúde**, v.2, n.16, p.260-263, 1995.

MADOROBA, E. et al. Prevalence of *Campylobacter foetus* and *Trichomonas foetus* among cattle from Southern Africa. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.50, p.10311-10314, 2011.

MAI, H.M. et al. Herd-level risk factors for *Campylobacter fetus* infection, *Brucella* seropositivity and within-herd seroprevalence of brucellosis in cattle in northern Nigeria. **Preventive Veterinary Medicine**, v.111, p.256-267, 2013.

MARDONES, F.O. et al. Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.231-237, 2008.

MEDEIROS, P.M.; FIGUEIREDO, J.B. Trichomonose bovina em Minas Gerais. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.23, p.143-147, 1971.

MEDLEJ, V. et al. Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.216-230, 2009.

MELLO, M.H. Dados sobre a incidência de tricomonose bovina em alguns estados do Brasil. **Boletim de Inseminação Artificial**, v.6, p.16-23, 1954.

MENDOZA-IBARRA, J.A. et al. High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. **The Veterinary Journal**, v.193, p.146-151, 2012.

MENDOZA-IBARRA, J.A. et al. Differences in the prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef cattle farmed under extensive conditions in northern Spain. **The Veterinary Journal**. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.10.026>>. Acesso em: 21 dez. 2013.



MIES FILHO, A. Incidência da vibriose bovina em alguns rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária da UFRGS**, v.3, p.195-199, 1960.

MOLINA, L. et al. Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). **Preventive Veterinary Medicine**, v.110, p.388-394, 2013.

MORRELL, E.L. et al. Histopathological, Immunohistochemical, Lectin histochemical and Molecular Findings in spontaneous bovine abortions by *Campylobacter fetus*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.309-315, 2011.

MSHELIA, G.D. et al. Epidemiology of Bovine Venereal Campylobacteriosis: Geographic Distribution and Recent Advances in Molecular Diagnostic Techniques. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.221-230, 2010.

MSHELIA, G.D. et al. The prevalence of bovine venereal campylobacteriosis in cattle herds in the Lake Chad basin of Nigeria. **Tropical Animal Health Production**, v.44, n.7, p.1487-1489, 2012.

MUKHUFHI, N. et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. **Theriogenology**, v.60, p.1269-1278, 2003.

MUTTO, A.A.; GIAMBIAGGI, S.; ANGEL, S.O. PCR detection of *Tritrichomonas foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.357-361, 2006.

NICKEL, D.D.; OLSON, M.E.; SCHULTZ, G.A. An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v.43, p.213-216, 2002.

ON, S.L. Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and related organisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.3, p.405-422, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL - OIE 2008. Bovine genital campylobacteriosis and Trichomonosis. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em 29 dez. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL - OIE 2012. Terrestrial Manual: Trichomonosis. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em 29 dez. 2013.

OYHENART, J. et al. Loop mediated isothermal amplification of 5.8S rDNA for specific detection of *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Parasitology**, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.034>>. Acesso em 23 dez. 2013.

PAZ JÚNIOR, C.J. et al. Frequência de infecção por *Tritrichomonas foetus* (RIEDMULLER, 1928) em bovinos leiteiros do município de Sanharó - PE. **Medicina Veterinária**, v.4, n.1, p.6-11, 2010.

PELLEGRIN, A.O. et al. Comunicado técnico: Campilobacteriose genital bovina em rebanhos de corte do estado de Mato Grosso do Sul: Resultados preliminares. **Corumbá: Embrapa Pantanal**, n.17, p.2-7, 1996.

PELLEGRIN, A.O. et al. Comunicado técnico: Prevalência da campilobacteriose genital bovina em touros nelore do Pantanal mato-grossense. **Corumbá: Embrapa Pantanal**, n.23, p.1-8, 1999.

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**, v.55, n.3, p.169-173, 2002.

PELLEGRIN, A.O; LEITE, R.C. **Atualização Sobre Tricomonose Genital Bovina**. Mato Grosso do Sul: Embrapa. 2003. 22p.

PELLEGRIN, A.O. et al. The use of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting for the detection of *Campylobacter fetus* immunoglobulins in the cervico-vaginal mucus of female cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.3, p.247-254, 2011.

PERSONSON, I.M.; CLARK, B.L.; DUFTY, J.H. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. **Journal of Comparative Pathology** v.86, p.59-66, 1976.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed. 2005. 415p.

RAE, D.O. Impact of trichomoniasis on the cow-calf producer's profitability. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.194, p.771-775, 1989.

RAE, D. O. et al. Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. **Theriogenology**, v.61, p.605-618, 2004.

RAE, D.O.; CREWS, J.E. *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.22, p.595-611, 2006.

RHYAN, J.C.; STACKHOUSE, L.L.; QUINN, W.J. Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Pathology**, v.25, p.350-355, 1988.

RHYAN, J. C. et al. Tissue-invasive *Tritrichomonas foetus* in four aborted bovine fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.409-412, 1995.

ROCHA, F.S. et al. Investigação de *Campylobacter fetus* e *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da região do Médio Paraíba, RJ. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1586-1589, 2009.

RODNING, S.P. et al. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in several subpopulations of Alabama beef bulls. **Theriogenology**, v.69, p.212-217, 2008.

ROEHE, R. Tricomoniase bovina. **Boletim da Diretoria de Produção Animal**, v.3, n.6, p.21-26, 1948.

ROJO-MONTEJO, S. et al. La tricomonosis y la campilobacteriosis genital bovina: dos enfermedades importantes en el diagnóstico del fallo reproductivo en explotaciones con monta natural. In: CONGRESO INTERNACIONAL ANEMBE DE MEDICINA BOVINA. 15, 2010. **Anais...** Granada, Espanha. 2010.

RUTKOWSKI, M R.; HARMSSEN, A.G. *Tritrichomonas foetus*: Pathogenesis of acute infection in normal, estradiol-treated, and stressed mice. **Experimental Parasitology**, v.115, p.143-159, 2007.

SAMUELSON, J.D.; WINTER, A.J. Bovine vibriosis: the nature of the carrier state in the bull. **Journal of Infectious Diseases**, v.116, n.5, p. 581-592, 1966.

SCHULZE, F. et al. Identification of *Campylobacter fetus* Subspecies by Phenotypic Differentiation and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.6, p.2019-2024, 2006.

SERIN, I. et al. Prevalence of Trichomoniasis in dairy cows with some reproductive disorders in Aydin province of Turkey. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.7, p.1175-1178, 2010.

SILVA, A.S. et al. Leptospirose e Tricomonose : Isolamento em propriedade com problemas reprodutivos no sul do Brasil. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia**, v.12, n.1, p.87-90, 2009.

SINGH, B.N. et al. Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.67, n.8, p.3847-3854, 1999.

SINGH, B.N. et al. *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.72, n.7, p.4151-4158, 2004.

SHONMANN, M.J. et al. Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bull. **The Veterinary Record**, v.134, p.620-622, 1994.

SOUSA, S.T.B. et al. Métodos para a colheita de *Tritrichomonas foetus* em fêmeas e machos bovinos. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, n.19, p.125-132, 1991.

SPENCE, R.P. et al. Cross-reaction of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time PCR. **The Veterinary Record**, 2013. Disponível em: <<http://www.veterinaryrecord.bmj.com>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA; S.M. Tricomonose bovina. **Biológico**, v.71, n.1, p.9-11, 2009.

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 Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p.766-769, 2003.

SZONYI, B. et al. Spatio-temporal epidemiology of *Tritrichomonas foetus* infection in Texas bulls based on state-wide diagnostic laboratory data. **Veterinary Parasitology**, v.186, p.450-455, 2012.

TEDESCO, L.F.; ERRICO, F.; DEL BAGLIVE, L.P. Comparison on three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. **Australian Veterinary Journal**, v.53, p.470-472, 1977.

TU, Z.C.; WASSENAAR, T.M.; THOMPSON, S.A.; BLASER, M.J. Structure and genotypic plasticity of the *Campylobacter fetus* sap locus. **Molecular Microbiology**, v.48, n.3, p.685-698, 2003.

VAN BERGEN, M.A.P et al. Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. **Revue Scientifique Technique International Office of Epizootics**, v.24, n.3, p.1017-1026, 2005.

VARGAS, A.C. et al. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.93, p.121-132, 2003.

VIANA, K.F.; ZANINI, M.S. Perfil de produtores frente à vacinação contra doenças infecciosas abortivas em rebanhos bovinos do município de Alegre/ES. **Archives of Veterinary Science**, v.14, n.2, p.103-108, 2009.

WILLOUGHBY, K. et al. A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies fetus and *Campylobacter fetus* -species *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.758-766, 2005.

YANG, N. et al. Survey of nine abortifacient infectious agents in aborted bovine fetuses from dairy farms in Beijing, China, by PCR. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.60, n.1, p.83-92, 2012.

## **5 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

### **5.1 Artigo 1**

**FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À CAMPILOBACTERIOSE GENITAL  
BOVINA E À TRICOMONOSE BOVINA NA MICRORREGIÃO DE  
GARANHUNS, PERNAMBUCO, BRASIL**

**(Artigo a ser encaminhado ao periódico *Tropical Animal Health and Production*)**

1     **FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À CAMPILOBACTERIOSE GENITAL**  
2             **BOVINA E À TRICOMONOSE BOVINA NA MICRORREGIÃO DE**  
3                     **GARANHUNS, PERNAMBUCO, BRASIL**

4  
5     **Resumo:** Objetivou-se com este trabalho realizar uma análise epidemiológica da  
6     infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* em vacas  
7     procedentes de rebanhos leiteiros da microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco,  
8     Brasil. Foram colhidas 383 amostras de muco cérvico-vaginal de vacas procedentes de  
9     21 propriedades distribuídas em 19 municípios. As amostras tiveram seu DNA  
10    genômico extraído e submetido à reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico.  
11    Para análise de fatores de risco aplicou-se um questionário investigativo com perguntas  
12    referentes ao manejo higiênico-sanitário e reprodutivo. Observou-se uma prevalência de  
13    1,8% (0,8% - 3,9%; I.C. 95%) e 33,4% (28,7% - 38,4%; I.C. 95%;) para *Campylobacter*  
14    *fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus*, respectivamente. Em relação ao número  
15    de focos observou-se que 28,6% das propriedades apresentaram pelo menos um animal  
16    positivo para *C. fetus* subsp. *venerealis* e 90,5% para *T. foetus*. O fator de risco  
17    identificado neste estudo para campilobacteriose genital bovina foi rebanhos acima de  
18    100 animais (OR=7,2; I.C. 1,3 - 38,4%; p=0,020) e para tricomonose bovina a utilização  
19    da monta natural (OR=2,4; I.C. 1,1 - 5,9%; p=0,041). Conclui-se que as infecções por  
20    *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* ocorrem na região do estudo e encontram-se com  
21    elevado número de focos. Dessa forma, sugere-se que medidas de profilaxia e controle  
22    como o diagnóstico, separação e repouso sexual das fêmeas infectadas e utilização de  
23    um programa de inseminação artificial com cuidados sanitários rigorosos devem ser  
24    implementados.



25 **Palavras-chave:** diagnóstico, fatores de risco, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*,  
26 *Tritrichomonas foetus*.

27

## 28 **Introdução**

29 Os problemas da esfera reprodutiva são uma das principais causas de perdas  
30 econômicas da bovinocultura leiteira. Diversas são as causas que acometem esse  
31 segmento produtivo e causam sérias perdas de ordem econômica para a cadeia produtiva  
32 (Junqueira e Alfieri 2006). Entretanto, as doenças infecciosas como a  
33 Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) e a Tricomonose Bovina (TB) constituem  
34 umas das principais causas de distúrbios reprodutivos em rebanhos leiteiros (Alves *et al.*  
35 2011).

36 A CGB possui como agente etiológico o *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*  
37 e a TB o *Tritrichomonas foetus* (OIE, 2009). Esses agentes estão localizados no pênis e  
38 na mucosa prepucial dos touros e na mucosa vaginal, cérvix, útero e ovidutos das  
39 fêmeas infectadas (Garcia *et al.* 1983; Spósito Filha e Oliveira 2009). Os machos são  
40 assintomáticos, entretanto, nas fêmeas infectadas, pode-se observar: repetição de cio,  
41 vaginite, cervicite, endometrite, morte embrionária e aborto (Rae, 1989; BonDurant,  
42 2005).

43 Apesar de o *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* serem micro-organismos  
44 filogeneticamente diferentes, a ecologia, epidemiologia e patologia de ambos são  
45 semelhantes; isso possibilita que sejam estudados conjuntamente como causas de  
46 problemas reprodutivos de ordem infecciosa em rebanhos de *status* sanitário  
47 desconhecido (BonDurant, 2005).Essas duas enfermidades apresentam distribuição  
48 cosmopolita (OIE, 2009). No Brasil, são poucos os relatos dessas infecções (Pellegrin *et*  
49 *al.* 2002; Stynen *et al.* 2003; Jesus *et al.* 2004; Silva *et al.* 2009; Leal *et al.* 2012).

50 Tendo em vista a escassez de dados sobre essas enfermidades, objetivou-se com  
51 este trabalho, realizar uma análise epidemiológica da infecção por *C. fetus* subsp.  
52 *venerealis* e *T. foetus* em vacas procedentes de rebanhos leiteiros no estado de  
53 Pernambuco, Brasil.

54

## 55 **Material e Métodos**

56 Foi realizado um estudo transversal em 21 propriedades distribuídas nos 19  
57 municípios que compõem a microrregião de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Para  
58 compor a amostra do estudo da prevalência foi considerado um total de 336.221 cabeças  
59 (IBGE, 2011), com intervalo de confiança de 95%, erro estatístico de 5% e uma  
60 prevalência esperada de 25,5% para a CGB (Stynen *et al.* 2003) e 1,6% para a TB  
61 (Jesus *et al.* 2004). Esses parâmetros forneceram um tamanho da amostra de 292 fêmeas  
62 para a CGB e 25 para TB (Thrusfield, 2004). Foram colhidas 383 amostras de muco  
63 cérvico-vaginal de vacas em idade reprodutiva, de aptidão leiteira, apresentando ou não  
64 sinais clínicos característicos da infecção. Os animais amostrados eram mestiços de  
65 zebuínos e taurinos em diferentes graus de sangue, criados de forma semi-intensiva e  
66 extensiva.

67 A escolha das propriedades foi feita por conveniência e antes do procedimento  
68 da colheita de material biológico foi aplicado um questionário investigativo constituído  
69 por perguntas objetivas, referentes às características do manejo produtivo, reprodutivo e  
70 sanitário a fim de identificar os possíveis fatores de risco.

71 Após a contenção do animal foi realizada uma limpeza da região vulvar com  
72 água e álcool a 70% e secagem com papel toalha. Para a colheita do material, os lábios  
73 vulvares foram afastados com uma das mãos; posteriormente, um espécuro vaginal foi  
74 introduzido a fim de se localizar a cérvix. Feito isso, introduziu-se uma escova

75 ginecológica acoplada a uma pipeta de inseminação e, então, foi realizada uma  
76 raspagem do muco cérvico-vaginal.

77 Realizada a colheita, as amostras foram acondicionadas em solução salina  
78 tamponada (PBS, pH 7,2) e, posteriormente, em caixas isotérmicas contendo gelo  
79 reciclável e encaminhadas em até três horas ao laboratório para seu devido  
80 processamento.

81 As amostras foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial “Qiagen  
82 DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen<sup>®</sup>), utilizando-se o protocolo do fabricante.  
83 O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel de agarose a 0,8%, com marcador  
84 de peso molecular 1Kb, corado com *Blue Green* (LGCbio), visualizado em luz  
85 ultravioleta e fotodocumentado para verificação de sua qualidade.

86 Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação do material genômico  
87 para *C. fetus* subsp. *venerealis* foram realizada com os oligonucleotídeos VenSF  
88 (<sup>5</sup>CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT<sup>3</sup>) e VenSR (<sup>5</sup>GCTTTTGAGATAACAAT-  
89 AAGAGCTT<sup>3</sup>) de acordo com o protocolo estabelecido por Hum et al. (1997). Para *T.*  
90 *foetus*, utilizou-se os oligonucleotídeos TFR3 (<sup>5</sup>CGGGTCTTCCTATATGAGACA  
91 GAACC<sup>3</sup>) e TFR4 (<sup>5</sup>CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTAA<sup>3</sup>) de acordo com o  
92 protocolo estabelecido por Felleisen (1997). Além disso, foram utilizados controles  
93 positivos e negativos para ambas as reações. O produto amplificado foi detectado por  
94 eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com *Blue Green* (LGCbio), visualizados  
95 através de luz ultravioleta e fotodocumentado.

96 Para análise estatística descritiva utilizou-se dispersão das frequências absoluta e  
97 relativa. Para o estudo dos fatores de risco associados à infecção por *C. fetus* subsp.  
98 *venerealis* e *T. foetus* foi realizado uma análise univariada das variáveis de interesse  
99 através do teste de Qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher, quando necessário, e

100 posteriormente uma análise de regressão logística considerando como variável  
101 dependente a PCR (positiva ou negativa). As variáveis independentes ou explanatórias  
102 consideradas no modelo foram aquelas que apresentaram significância estatística  $<0,20$ .  
103 Essa probabilidade foi estipulada para que possíveis fatores de risco do evento não  
104 fossem excluídos da análise (Hosmer e Lemeshow 1989). O programa EPIINFO<sup>TM</sup> 7 foi  
105 utilizado para a execução dos cálculos estatísticos.

106

## 107 **Resultados**

### 108 *Campilobacteriose Genital Bovina*

109 Observou-se uma prevalência de 1,8% (7/383) de amostras positivas para *C.*  
110 *fetus subsp. venerealis*. Em relação ao número de focos, 28,6% (6/21) das propriedades  
111 apresentaram pelo menos um animal positivo. Estas estavam distribuídas em 31,5%  
112 (6/19) nos municípios que compõem essa microrregião.

113 Quanto à análise dos fatores de risco, o tamanho do rebanho apresentou  
114 associação significativa na análise univariada; no modelo de regressão logística,  
115 observou-se que rebanhos com o número de animais acima de 100 foi identificado como  
116 fatores de risco para à infecção (OR=7,2; I.C. =1,3 - 38,4%;  $p=0,020$ ) (Tabela 1).

117 Ao analisar a associação entre os índices reprodutivos e a PCR, não se observou  
118 associação entre as variáveis analisadas: casos de aborto ( $p=0,236$ ); repetição de cio  
119 ( $p=1,000$ ); corrimento vaginal ( $p=0,678$ ) e retenção de placenta ( $p=0,599$ ).

120

### 121 *Tricomonose Bovina*

122 Foi observada uma prevalência de 33,4% (128/383) de amostras positivas na  
123 PCR. Quanto ao número de focos, 90,5% (19/21) das propriedades apresentaram pelo

124 menos um animal positivo com as prevalências variando entre 9,5% e 52,9% dentro dos  
125 rebanhos e, estas, estavam distribuídas em 89,5% (17/19) dos municípios estudados.

126 Os resultados da análise univariada dos fatores associados à infecção por *T.*  
127 *foetus* estão dispostos na tabela 2. Nessa análise, a importação de animais de outros  
128 rebanhos apresentou associação (p=0,047). Na análise multivariada, o fator de risco  
129 identificado foi a utilização da monta natural (OR=2,4; IC=1,1 - 5,9; p=0,041) (tabela  
130 2).

131 Ao analisar a associação entre os índices reprodutivos e a PCR, não foi  
132 observada associação entre as variáveis analisadas: casos de aborto (p=0,739); repetição  
133 de cio (p=0,132); corrimento vaginal (p=0,303) e retenção de placenta (p=0,303).

134

## 135 **Discussão**

### 136 *Campilobacteriose Genital Bovina*

137 Este é o primeiro registro da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* na  
138 microrregião estudada. A prevalência observada neste trabalho é inferior aos relatados  
139 em outras regiões do país, como: no Distrito Federal, onde foi observada uma  
140 prevalência de 10,4% (27/258) frente à imunofluorescência direta (IFD) em amostras de  
141 muco uterino e vaginal provenientes de animais abatidos em frigoríficos (Leal *et al.*  
142 2012) e em Minas Gerais, onde 25,5% (40/157) das amostras de muco cérvico-vaginal,  
143 procedentes de animais com problemas reprodutivos, foram positivas na IFD (Stynen *et*  
144 *al.* 2003). Em outras regiões do mundo, como por exemplo, na Nigéria, pôde-se  
145 observar uma positividade de 3,0% (3/100) no exame microbiológico em amostras de  
146 muco cérvico-vaginal de vacas em idade reprodutiva (Mshelia *et al.* 2012).

147 A diferença entre o resultado obtido no presente estudo, em relação aos demais,  
148 pode estar relacionada com os diferentes tipos de delineamentos experimentais, meios

149 de transporte e métodos de diagnósticos utilizados. Segundo Leal *et al.* (2012), a  
150 sensibilidade e a especificidade dos testes utilizados no diagnóstico dessa infecção é  
151 uma das principais causas de variação na prevalência. Uma alternativa para minimizar  
152 essas variações seria a utilização de técnicas mais sensíveis como a PCR para a  
153 confirmação dos resultados e/ou identificação direta do agente (Schulze *et al.* 2006;  
154 Groff *et al.* 2010). Além disso, outros fatores, como por exemplo, a idade dos animais  
155 (Pellegrin *et al.* 1999), tipo de manejo reprodutivo (BonDurant, 2005; Madoroba *et al.*  
156 2011) e manejo sanitário dos rebanhos também podem estar relacionados a essa  
157 diferença (Mardones *et al.* 2008; Rocha *et al.* 2009; Mai *et al.* 2013).

158         Em relação ao número de focos, constata-se que apesar da baixa prevalência  
159 observada, o agente apresenta-se distribuído nos rebanhos dessa microrregião. Acredita-  
160 se que a introdução de animais infectados e a falta de conhecimento da enfermidade  
161 pelos produtores podem ter sido responsáveis pela introdução e manutenção do agente  
162 nos rebanhos.

163         Provavelmente, o maior risco de infecção por *C. fetus*. subsp. *venerealis* em  
164 rebanhos que possuem acima de 100 animais está relacionado com aumento do contato  
165 entre os animais e falhas no manejo sanitário das propriedades, principalmente devido à  
166 aquisição e à importação de animais infectados no rebanho. Segundo Alves *et al.*  
167 (2011), a falta de diagnóstico desta enfermidade contribui para a introdução e utilização  
168 de animais infectados no manejo reprodutivo. Além disso, a utilização da monta natural  
169 (BonDurant, 2005) bem como, o touro de repasse, no programa de inseminação  
170 artificial, podem ser responsáveis pela manutenção do agente nos rebanhos (Stynen *et*  
171 *al.* 2003).

172         A prática de empréstimo de touros entre diferentes propriedades pode contribuir  
173 para disseminação desse patógeno, principalmente porque o touro não apresenta sinais

174 clínicos, mas elimina o agente (Mardones *et al.* 2008). Apesar de não ter sido  
175 encontrada associação significativa neste estudo entre esta prática e positividade para  
176 CGB, observou-se uma maior prevalência nas propriedades que emprestavam os touros  
177 para outras propriedades.

178 Vale ressaltar que em todos os rebanhos onde foi detectado o agente, os animais  
179 apresentavam histórico de distúrbios reprodutivos, principalmente, aborto, repetição de  
180 cio e retenção de placenta, entretanto, não se observou associação ( $p < 0,05$ ) entre essas  
181 manifestações clínicas com a positividade para a CGB. Provavelmente, isso deve ter  
182 acontecido devido à baixa prevalência observada no rebanho.

183

#### 184 *Tricomonose Bovina*

185 Este é o primeiro registro da infecção por *T. foetus* na microrregião estudada. No  
186 Brasil, estudos recentes sobre essa infecção em fêmeas são escassos. Porém, há relatos  
187 da ocorrência dessa infecção no estado do Rio de Janeiro, em um levantamento dos  
188 resultados das amostras analisadas entre 1958 e 2001 pelo Laboratório de Patologia da  
189 Reprodução da UFRRJ, onde os autores relataram uma prevalência de 0,07%  
190 (107/15108) de amostras de muco vaginal positivas na cultura (Jesus *et al.* 2004).

191 Em outras regiões do mundo, como por exemplo, na Turquia, pode-se observar  
192 uma prevalência de 8,5% (14/164) mediante o exame direto de amostras de muco  
193 vaginal de vacas leiteiras naquele país (Serin *et al.* 2010).

194 Apesar de ser difícil realizar uma comparação entre os estudos supracitados  
195 devido aos diferentes tipos de delineamentos experimentais empregados, a divergência  
196 entre os resultados pode ter ocorrido devido às diferentes metodologias empregadas na  
197 colheita do material e diagnóstico. Sabe-se que apesar de ser uma técnica bastante  
198 empregada no diagnóstico da TB, o isolamento pode ter sua sensibilidade reduzida

199 devido à contaminação dos meios de cultura (Mutto *et al.* 2006; Oyhenart *et al.* 2012),  
200 sendo necessária a confirmação dos resultados mediante a técnicas mais sensíveis como  
201 a PCR, que é capaz de detectar o agente a partir de baixas concentrações de DNA  
202 (Mukhufhi *et al.* 2003; Mutto *et al.* 2006).

203 Outra hipótese estaria relacionada aos diferentes tipos de manejo higiênico-  
204 sanitário empregados nos rebanhos, tendo em vista que práticas como: a utilização de  
205 pastagens compartilhadas; empréstimo de touros (Mardones *et al.* 2008; Rojo-Montejo  
206 *et al.* 2008); utilização de touros velhos no manejo reprodutivo dos animais (Mendonza-  
207 Ibarra *et al.* 2012) e o touro de repasse no programa de inseminação artificial poderiam  
208 influenciar na prevalência da TB (Rocha *et al.* 2009; Viana e Zanini 2009).

209 Quanto ao número de focos, 90,5% (19/21) das propriedades apresentaram  
210 animais positivos com as prevalências variando entre 9,5% e 52,9% dentro dos  
211 rebanhos e, essas, estavam distribuídas em 89,5% (17/19) dos municípios estudados.  
212 Acredita-se que nestas propriedades existam touros infectados e estes, por sua vez, são  
213 os responsáveis pela manutenção do parasito nos rebanhos. Outra hipótese para a  
214 elevada prevalência de fêmeas positivas neste estudo está relacionada com uma falha no  
215 sistema imunológico ao aparelho reprodutivo dos animais, que pode ser responsável  
216 pela manutenção do parasito por longos períodos no trato reprodutivo dos animais,  
217 inclusive, durante a gestação e pós-parto (Pellegrin e Leite 2003; Givens, 2006).

218 Observou-se neste estudo que a monta natural é um fator de risco (OR=2,4). A  
219 utilização da monta natural como manejo reprodutivo é considerada como a principal  
220 via de transmissão do *T. foetus* entre os animais, onde, touros ou vacas infectadas,  
221 transmitem o agente para os animais sadios durante a cópula (Rae e Crews 2006).  
222 Entretanto, o manejo de inseminação artificial inadequado, sem um rigoroso controle



223 sanitário (Eaglesome e Garcia 1997), bem como a utilização do touro de repasse  
224 também podem ser responsáveis pela transmissão (Carvalho e Rodrigues 2006).

225 Uma maior prevalência (36,3%) foi observada nas propriedades que adquiriram  
226 animais de outros rebanhos. Esse tipo de manejo, associado à falta de diagnóstico,  
227 podem ter sido os responsáveis pelo maior número de animais positivos nestas  
228 propriedades.

229 Nos rebanhos que apresentaram animais positivos, a separação dos animais que  
230 apresentam distúrbios e o descarte dos animais portadores do agente (Madoroba *et al.*  
231 2011; Pellegrin *et al.* 2002), bem como, a implementação de um programa de  
232 inseminação artificial com cuidados sanitários adequados, são medidas de controle e  
233 profilaxia que devem ser adotadas a fim de reduzir os riscos da infecção e as perdas  
234 econômicas decorrentes dessas enfermidades (BonDurant, 2005).

235

## 236 **Conclusão**

237 Este é o primeiro registro da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus*  
238 na microrregião Garanhuns, Pernambuco e a partir dos resultados obtidos pôde-se  
239 constatar que as infecções supracitadas apresentam-se distribuídas nos rebanhos  
240 leiteiros da região estudada. Além disso, sugere-se que medidas de profilaxia e controle  
241 como o diagnóstico, separação e repouso sexual das fêmeas infectadas e utilização de  
242 um programa de inseminação artificial com cuidados sanitários rigorosos devem ser  
243 implementados nas propriedades, a fim de evitar a propagação dos agentes nos  
244 rebanhos.

245 **Agradecimentos**

246 A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado. A Dra Agueda Castagna de  
247 Vargas e Dr. Luis Miguel Ortega Mora pelo fornecimento das cepas controles de *C.*  
248 *fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus*, respectivamente.

249

250 **Aspéctos Éticos**

251 O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade  
252 Federal Rural de Pernambuco com a licença nº 022/2013.

253

254 **Referências**

255 Alves, T.M., Stynen, A.P.R., Miranda, K.L. and Lage, A.P., 2011. Campilobacteriose  
256 genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle.  
257 Pesquisa Veterinária Brasileira, 31(4), 336--344.

258 Bondurant, R.H., 2005. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the  
259 role of vaccines in their control. Veterinary Clinics of North America: Food Animal  
260 Practice, 21(2), 383--408.

261 Carvalho, D.V. and Rodrigues, A.F.S.F., 2006. *Tritrichomonas foetus*  
262 (Riedmuller,1928) (Protista ,Trichomonadidae) e a implicação na pecuária do Brasil.  
263 CES Revista, 6, 113--132.

264 Eaglesome, M.D. and Garcia, M.M., 1997 Disease risks to animal health from artificial  
265 insemination with bovine semen. Revue Scientifique Technique, 16, 215--225.

266 Felleisen, R.S.J., 1997. Comparative sequence analysis of 5±8S rRNA genes and  
267 internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. Parasitology, 115,  
268 111--119.

- 269 Garcia, M.M., Ruckerbauer, G.M., Eaglesome, M.D. and Boisclair, W.E., 1983.  
270 Detection of *Campylobacter fetus* in artificial insemination bulls with a transport  
271 enrichment medium. Canadian Journal of Comparative Medicine, 47, 336--340.
- 272 Givens, M.D., 2006. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of  
273 infertility in beef cattle. Theriogenology, 66, 648--654.
- 274 Groff, A.C.M., Kirinus, J.K., Silva, M.S., Machado, G., Costa, M.M. and Vargas,  
275 A.P.C., 2010. Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital  
276 campylobacteriosis. Pesquisa Veterinária Brasileira, 30(12), 1031--1035.
- 277 Hosmer, D.W. and Lemeshow, S., 1989. Applied logistic regression. (New York: John  
278 Wiley & Sons).
- 279 Hum, S., Quinn, K., Brunner, B. and On, S.L.W., 1997. Evaluation of a PCR assay for  
280 identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. Australian  
281 Veterinary Journal, 17(11), 827--831.
- 282 IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. <<http://www.ibge.gov.br>>.  
283 Acesso em: 21 dez. 2013.
- 284 Jesus, V.L.T., Pereira, M.J.S., Alves, P.A.M. and Fonseca, A.H., 2004. Fatores  
285 intrínsecos do hospedeiro associados à prevalência de tricomonose genital bovina.  
286 Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 13(4), 159--163.
- 287 Junqueira, J.R.C. and Alfieri, A.A., 2006. Falhas da reprodução na pecuária bovina de  
288 corte com ênfase para causas infecciosas. Semina: Ciências Agrárias, 27(2), 289--298.
- 289 Leal, D.R., Fernandes, G.O., Gouveia, F.F., Miranda, K.L. and Neves, J.P., 2012.  
290 Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal  
291 e em seu entorno. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 36(4), 256--259.

- 292 Madoroba, E., Awoke, G., Tiny, H. and Mkhevu, M., 2011. Prevalence of  
293 *Campylobacter foetus* and *Trichomonas foetus* among cattle from Southern Africa.  
294 African Journal of Biotechnology, 10(50), 10311--10314.
- 295 Mai, H.M., Iron, P.C., Kabirb, J. and Thompson, P.N., 2013. Herd-level risk factors for  
296 *Campylobacter fetus* infection, *Brucella* seropositivity and within-herd seroprevalence  
297 of brucellosis in cattle in northern Nigeria. Preventive Veterinary Medicine, 111, 256--  
298 267.
- 299 Mardones, F.O., Perez, A.M., Martinez, A. and Carpenter, T.E., 2008. Risk factors  
300 associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the province of Buenos  
301 Aires, Argentina. Veterinary Parasitology, 153, 231--237.
- 302 Mendoza-Ibarra, J.A., Pedraza-Díaz, S., García-Peña, F.J., Rojo-Montejo, S., Ruiz-  
303 Santa-Quiteria, J.A., Miguel-Ibáñez, E.S., Navarro-Lozano, V., Ortega-Mora, L.M.,  
304 Osoro, K. and Collantes-Fernandez, E., 2012. High prevalence of *Tritrichomonas foetus*  
305 infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern  
306 Spain. The Veterinary Journal, 193, 146--151.
- 307 Mshelia, G.D., Amin, J.D., Egwu, G.O., Woldehiwet, Z. and Murray, R.D., 2012. The  
308 prevalence of bovine venereal campylobacteriosis in cattle herds in the Lake Chad basin  
309 of Nigeria. Tropical Animal Health Production, 44(7), 1487--1489.
- 310 Mukhufhia, N., Irons, P.C., Michela, A. and Peta, F., 2003. Evaluation of a PCR test for  
311 the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection  
312 method, storage and transport medium on the test. Theriogenology, 60, 1269--1278.
- 313 Mutto, A.A., Giambiaggi, S. and Angel, S.O., 2006. PCR detection of *Tritrichomonas*  
314 *foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation, Veterinary Parasitology, 136,  
315 357--361.

- 316 OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, 2009. Bovine genital campylobacteriosis  
317 and Trichomonosis. <<http://www.oie.int>> Acesso em: 29 fev. 2013.
- 318 Oyhenart, J., Martínez, F., Ramírez, R., Fort, R. and Breccia, J.D., 2012. Loop mediated  
319 isothermal amplification of 5.8S rDNA for specific detection of *Tritrichomonas foetus*.  
320 Veterinary Parasitology. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.034>> Acesso em  
321 23 dez. 2013.
- 322 Pellegrin, A.O., Leite, R.C., Sereno, J.R.B., Reinato, A.P.R. and Lage, A.P., 1999.  
323 Comunicado técnico: Prevalência da campilobacteriose genital bovina em touros nelore  
324 do Pantanal mato-grossense. Corumbá: Embrapa Pantanal, 23,1--8.
- 325 Pellegrin, A.O., Lage, A.P., Sereno, J.R.B., Ravaglia, E., Costa, M.S. and Leite, R.C.,  
326 2002. Bovine Genital Campylobacteriosis in Pantanal, State of Mato Grosso do Sul,  
327 Brazil. Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 55(3), 169--  
328 173.
- 329 Pellegrin, A.O. and Leite, R.C., 2003. Atualização sobre Tricomonose genital bovina.  
330 (Corumbá: Embrapa Pantanal).
- 331 Rae, D. O., 1989. Impact of trichomoniasis on the cow- calf producer's profitability.  
332 Journal of the American Veterinary Medical Association, 194, 771--775.
- 333 Rae, D.O. and Crews, J.E., 2006. *Tritrichomonas foetus*. Veterinary Clinics Food  
334 Animal Practice, 22, 595--611.
- 335 Rocha, F.S, Jesus, V.L.T., Torres, H.M., Gomes, M.J.P., Figueiredo, M.J., Nascimento,  
336 E.R., Ferreira, T. and Aquino, M.H.C., 2009. Investigação de *Campylobacter fetus* e  
337 *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da região do Médio Paraíba, RJ.  
338 Ciência Rural, 39(5), 1586--1589.
- 339 Rojo-Montejo, S., Pedraza-Díaz, S., García-Peña, F.J., Mendoza-Ibarra, J.A., Osoro, K.,  
340 Ortega-Mora, L.M., Collantes-Fernández, E., 2010. La tricomonosis y la

- 341 campilobacteriosis genital bovina: dos enfermedades importantes en el diagnóstico del  
342 fallo reproductivo en explotaciones con monta natural. In: 15<sup>th</sup> Congreso Internacional  
343 Anembe de Medicina Bovina.
- 344 Schulze, F., Bagon, A., Müller, W. and Hotzel, H., 2006. Identification of  
345 *Campylobacter fetus* Subspecies by Phenotypic Differentiation and PCR. *Journal of*  
346 *Clinical Microbiology*, 44(6), 2019--2024.
- 347 Serin, I., Aldemir, O.S., Ceylan, A. and Serin, G., 2010. Prevalence of Trichomoniasis  
348 in dairy cows with some reproductive disorders in Aydin Province of Turkey. *Journal of*  
349 *Animal and Veterinary Advances*, 9(7), 1175--1178.
- 350 Silva, A.S., Zanette, R.A, Oliveira, C.B, Gallio, M., Pereira, P.L., Fernandes, M.B.,  
351 Tonin, A.A., Badke, M.R.T. and Monteiro, S.G., 2009. Leptospirose e tritricomonose:  
352 isolamento em propriedade com problemas reprodutivos no sul do Brasil. *Arquivos de*  
353 *Ciências Veterinárias e Zoologia*, 12(1), 87--90.
- 354 Spósito Filha E. and Oliveira, S.M., 2009. Divulgação técnica: Tricomonose bovina. *O*  
355 *Biológico*, 71(1), 9--11.
- 356 Stynen, A.P.R., Pellegrin, A.O., Fóscolo, C.B., Figueiredo, J.F., Canella Filho, C.,  
357 Leite, R.C. and Lage, A.P., 2003. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos  
358 leiteiros com problemas reprodutivos de Varginha – Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro*  
359 *de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(6), 766--769.
- 360 Thrusfield, M. V., 2004. *Epidemiologia Veterinária*. (São Paulo: Roca).
- 361 Viana, K. F. and Zanini, M. S., 2009. Perfil de produtores frente à vacinação contra  
362 doenças infecciosas abortivas em rebanhos bovinos do município de Alegre/ES.  
363 *Archives of Veterinary Science*, 14(2), 103--108.

Tabela 1 – Análise dos fatores de risco associados à infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em vacas procedentes da microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco, Brasil, 2013

VARIÁVEL	N	PCR	ANÁLISE UNIVARIADA	Valor de P	REGRESSÃO LOGÍSTICA	Valor de P
		Positivo	OR (I.C. 95%)		OR (I.C. 95%)	
<b>Sistema de criação</b>						
Extensivo	73	3 (4,11%)	3,2 (0,7 - 14,9)	0,130	1,5 (0,3 - 8,2)	0,626
Semi-intensivo	310	4 (1,29%)				
<b>Tamanho do rebanho</b>						
< 100 animais	328	3 (0,91%)	0,1 (0,0 - 0,5)	0,009*	7,2 (1,3 - 38,4)	0,020*
> 100 animais	55	4 (7,27%)				
<b>Suplementação mineral</b>						
Sim	364	6 (1,65%)	0,3 (0,0 - 2,6)	0,301		
Não	19	1 (5,26%)				
<b>Importa animais</b>						
Sim	281	4 (1,42%)	0,4 (0,1 - 2,1)	0,389		
Não	102	3 (2,94%)				
<b>Manejo reprodutivo</b>						
Monta natural	268	5 (1,87%)	-	0,891		
Inseminação artificial	39	1 (2,56%)	1,4 (0,1 - 12,1)			
Ambos	76	1 (1,32%)	0,7 (0,1 - 6,1)			
<b>Empréstimo de touros<sup>2</sup></b>						
Sim	40	1 (2,50%)	1,3 (0,1 - 11,1)	0,575		
Não	310	6 (1,94%)				
<b>Utiliza touro de repasse</b>						
Sim	76	1 (1,32%)	0,6 (0,1 - 5,6)	1,000		
Não	307	6 (1,95%)				

Convenções: N – Total de amostras, OR – (razão de chance), IC – Intervalo de Confiança, \*Associação significativa ( $p < 0,05$ ), <sup>1</sup>Base utilizada (364), <sup>2</sup>Base utilizada (350)

Tabela 2 – Análise dos fatores de risco associados à infecção por *Tritrichomonas foetus* em vacas procedentes da microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco, Brasil, 2013

VARIÁVEL	N	PCR	ANÁLISE UNIVARIADA	Valor de P	REGRESSÃO LOGÍSTICA	Valor de P
		Positivo	OR (I.C. 95%)		OR (I.C. 95%)	
<b>Sistema de criação</b>						
Extensivo	73	27 (36,99%)	1,2 (0,7 - 2,0)	0,472		
Semi-intensivo	310	101 (32,58%)				
<b>Tamanho do rebanho</b>						
< 100 animais	328	113 (34,45%)	1,4 (0,7 - 2,6)	0,297		
> 100 animais	55	15 (27,27%)				
<b>Suplementação mineral</b>						
Sim	364	120 (32,97%)	0,6 (0,2 - 1,7)	0,411		
Não	19	8 (42,11%)				
<b>Importa animais</b>						
Sim	281	102 (36,30%)	1,6 (1,0 - 2,7)	0,047*	1,6 (0,9 - 2,7)	0,079
Não	102	26 (25,49%)				
<b>Manejo reprodutivo</b>						
Monta natural	268	99 (36,94%)	-	0,083	2,4 (1,1 - 5,9)	0,041*
Inseminação artificial	39	10 (25,64%)	0,6 (0,3 - 1,2)		-	-
Ambos	76	19 (25,00%)	0,6 (0,3 - 1,0)		1,6 (0,9 - 2,9)	0,091
<b>Empréstimo de touros<sup>2</sup></b>						
Sim	40	10 (25,00%)	0,6 (0,3 - 1,3)	0,202		
Não	310	109 (35,16%)				
<b>Utiliza touro de repasse</b>						
Sim	76	19 (25,00%)	0,6 (0,3 - 1,0)	0,082		
Não	307	109 (35,50%)				

Convenções: N – Total de amostras, OR – (razão de chance), IC – Intervalo de Confiança, \*Associação significativa ( $p < 0,05$ ), <sup>1</sup>Base utilizada (364), <sup>2</sup>Base utilizada (350)



## 5.2 Artigo 2

**PESQUISA DE *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* EM  
TOUROS DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**(Artigo a ser encaminhado ao periódico *Research in Veterinary Science*)**

1 **PESQUISA DE *Campylobacter fetus* SUBSP. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* EM**  
2 **TOUROS DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

3  
4 **Resumo:** Objetivou-se com esse trabalho pesquisar a ocorrência de *Campylobacter*.  
5 *fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* em touros do estado de Pernambuco,  
6 Brasil. Foram colhidas 105 amostras de esmegma prepucial de animais em idade  
7 reprodutiva, procedentes de propriedades (63) e matadouros (42) do estado de  
8 Pernambuco. Para a identificação do agente realizou-se a extração do DNA genômico  
9 das amostras e as mesmas foram submetidas à reação em cadeia da polimerase.  
10 Observou-se uma frequência de 6,6% (2,7% - 13,2%; I.C. 95%) para *T. foetus*. Em  
11 relação ao número de focos, 21,8% (7/32) das propriedades apresentaram animais  
12 positivos para *T. foetus*. Quanto às amostras dos matadouros, nenhuma foi positiva. Para  
13 pesquisa de *C. fetus* subsp. *venerealis* nenhuma amostra foi positiva. Conclui-se que a  
14 infecção por *T. foetus* ocorre em touros no estado de Pernambuco, Brasil. Dessa forma,  
15 sugere-se que medidas de profilaxia e controle como o descarte dos touros infectados e  
16 reposição por animais jovens devem ser implementadas a fim de evitar a disseminação  
17 do agente nos rebanhos.

18 **Palavras-chave:** bovinos, campilobacteriose, tricomonose.

19  
20 **Introdução**

21 A Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) e a Tricomonose Bovina (TB) são  
22 enfermidades de caráter venéreo responsáveis por sérias perdas econômicas para  
23 bovinocultura. O *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e o *Tritrichomonas foetus* são,  
24 respectivamente, os agentes etiológicos dessas infecções. Apesar de serem micro-

25 organismos diferentes, a epidemiologia, patogenia e patologia de ambos são muito  
26 semelhantes (Alves et al., 2011).

27 Estas enfermidades apresentam distribuição cosmopolita, com prevalências  
28 variando entre 1,5% a 2,2% para a CGB (Madobora et al., 2011; Mshelia et al., 2012;  
29 Molina et al., 2013) e 0,3% a 32% para a TB (Rodning et al., 2008; Madobora et al.,  
30 2011; Mendoza-Ibarra et al., 2012; Molina et al., 2013). No Brasil, estudos realizados  
31 em diferentes regiões do país relataram prevalências que variam entre 10,3% a 35,9%  
32 para a CGB (Stynen et al., 2003; Rocha et al., 2009; Leal et al., 2012) e 1,6% a 2,6%  
33 para TB (Jesus et al., 2004; Silva et al., 2009).

34 Nos machos, os agentes estão restritos a mucosa prepucial e peniana (Cobo et  
35 al., 2011) e nas fêmeas, na vagina, cérvix, útero e oviduto (Cobo et al., 2004;  
36 Chiapparrone et al., 2011). Entretanto, machos acometidos não apresentam nenhuma  
37 manifestação e tornam-se portadores durante toda vida. Por esses motivos, são  
38 considerados como principais responsáveis pela manutenção dos agentes nos rebanhos  
39 (Alves et al., 2011).

40 O modo de transmissão de maior importância epidemiológica dos micro-  
41 organismos é pela monta natural, onde um animal infectado transmite o agente para um  
42 não infectado no momento da cópula (BonDurant, 2005). Porém, a transmissão também  
43 pode acontecer por inseminação artificial com sêmen contaminado (Eaglesome e Garcia  
44 1997) e por fômites, principalmente devido à falta da higienização dos materiais  
45 utilizados na inseminação dos animais (Mai et al., 2013).

46 Tendo em vista a importância dos machos na cadeia epidemiológica e a escassez  
47 de dados sobre essas enfermidades no estado de Pernambuco, objetivou-se com este  
48 trabalho, pesquisar a ocorrência da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* em  
49 touros no estado de Pernambuco, Brasil.

## 50 **Material e Métodos**

51 O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade  
52 Federal Rural de Pernambuco com a licença nº022/2013.

53 Foram colhidas 105 amostras de esmegma prepucial de animais em idade  
54 reprodutiva, de aptidão leiteira e carne, procedentes de propriedades e matadouros do  
55 estado de Pernambuco. Os animais amostrados eram mestiços de zebuínos e taurinos em  
56 diferentes graus de sangue, criados de forma semi-intensiva e extensiva.

57 A escolha das propriedades foi feita por conveniência. Foram analisados 63  
58 touros (Agreste=28; Sertão=20; Zona da mata=15) procedentes de 32 propriedades  
59 distribuídas em 18 municípios do estado de Pernambuco (Figura 1). Em relação aos  
60 matadouros, foram colhidas 42 amostras de esmegma prepucial em quatro matadouros  
61 situados na região do agreste do estado (Figura 2).

62 Em cada propriedade foi aplicado um questionário investigativo constituído por  
63 perguntas objetivas, referentes às características do manejo produtivo, reprodutivo e  
64 sanitário a fim de identificar possíveis fatores de risco.

65 Antes da colheita do material dos reprodutores nas propriedades, foi solicitado  
66 um descanso sexual dos animais por um período mínimo de 15 dias aos produtores. No  
67 procedimento de colheita, após prévia contenção, foi realizado o corte dos pelos do  
68 óstio prepucial e, posteriormente, realizada uma limpeza da região com água e álcool a  
69 70% e secagem do óstio com papel toalha. Em seguida, introduziu-se um raspador de  
70 plástico previamente esterilizado no prepúcio dos animais e realizou-se uma raspagem  
71 do esmegma da mucosa peniana e prepucial.

72 Em relação às amostras de matadouro, foram colhidas amostras apenas de  
73 animais não virgens. Após o abate dos animais, foi colhido todo o prepúcio dos machos,

74 em seguida, realizou-se a exposição do pênis e mucosa prepucial e uma raspagem da  
75 mucosa a fim de se obter o esmegma.

76 Realizada a colheita, as amostras foram acondicionadas em solução salina  
77 tamponada (PBS, pH 7,2) e, posteriormente, encaminhadas em caixas isotérmicas  
78 contendo gelo reciclável, em até três horas, ao laboratório para seu devido  
79 processamento.

80 As amostras foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial “Qiagen  
81 DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen<sup>®</sup>), utilizando-se o protocolo do fabricante.  
82 O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel de agarose a 0,8%, com marcador  
83 de peso molecular 1Kb, corado com *Blue Green* (LGCbio), visualizado em luz  
84 ultravioleta e fotodocumentado para verificação de sua qualidade.

85 Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação do material genômico  
86 para *C. fetus* subsp. *venerealis* foi realizada com os oligonucleotídeos VenSF  
87 (5'CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT<sup>3'</sup>) e VenSR (5'GCTTTTGAGATAACAAT-  
88 AAGAGCTT<sup>3'</sup>) de acordo com o protocolo estabelecidos por Hum et al. (1997). Para *T.*  
89 *foetus*, utilizou-se os oligonucleotídeos TFR3 (5'CGGGTCTTCCTATATGAGACA  
90 GAACC<sup>3'</sup>) e TFR4 (5'CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTAA<sup>3'</sup>) de acordo com o  
91 protocolo estabelecido por Felleisen (1997). Além disso, foram utilizados controles  
92 positivos e negativos para ambas as reações. O produto amplificado foi detectado por  
93 eletroforese em gel de agarose a 2%, corados *Blue Green* (LGCbio), visualizados  
94 através de luz ultravioleta e fotodocumentado.

95 Para análise estatística descritiva utilizou-se a dispersão das frequências absoluta  
96 e relativa. Para o estudo dos fatores associados à infecção por *T. foetus* foi realizada  
97 uma análise univariada das variáveis de interesse através do teste de Exato de Fisher. O

98 programa EPIINFO™ 7 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos. Em  
99 relação à confecção das figuras utilizou-se o programa TabWin32 versão 3.6b.

100

## 101 **Resultados**

102 Observou-se uma frequência de 6,6% (7/105) de amostras positivas para *T.*  
103 *foetus* e nenhuma amostra foi positiva para *C. fetus subsp. venerealis*.

104 Em relação à infecção por *T. fetus*, observou-se que todas as amostras eram  
105 procedentes de reprodutores dos rebanhos situados no Agreste. Todas as amostras de  
106 matadouro foram negativas. Quanto ao número de focos, 21,8% (7/32) das propriedades  
107 apresentaram ao menos um animal positivo, sendo distribuídas em 38,8% (7/18) dos  
108 municípios estudados.

109 Nenhuma variável do manejo higiênico-sanitário analisada apresentou  
110 associação com a infecção por *T. fetus* (Tabela 1). Entretanto, ao analisar a associação  
111 entre os índices reprodutivos e a positividade na PCR, observou-se uma associação com  
112 a retenção de placenta ( $p=0,035$ ).

113

## 114 **Discussão**

115 No Brasil, estudos sobre a ocorrência da tricomonose bovina são escassos. Jesus  
116 et al. (2004) relataram uma prevalência de 9,9% (173/1736) em amostras de esmegma  
117 prepucial submetidas a cultura no estado do Rio de Janeiro. No Rio Grande do Sul,  
118 observou-se uma frequência de 2,6% (1/38) em amostras de lavado prepucial de touros  
119 procedentes de rebanhos que apresentavam altas taxas de repetição de cio (Silva et al.,  
120 2009). No estado de Pernambuco, Paz Junior et al. (2010) analisaram amostras  
121 procedentes de sete touros oriundos de rebanhos do Município de Sanharó e não  
122 identificaram o agente em nenhuma amostra.

123 Em outras regiões do mundo, diferentes prevalências da infecção por *T. foetus*  
124 são relatadas, como por exemplo, na África do Sul, onde foi observada uma prevalência  
125 de 4,1% (142/3458) em amostras de esmegma prepucial na PCR (Madobora et al.,  
126 2011). Mendoza-Ibarra et al. (2012) relataram uma prevalência de 32,0% (33/103) em  
127 amostras de touros procedentes de rebanhos de corte do norte da Espanha pela técnica  
128 de PCR. Na Argentina, Molina et al. (2013) observaram uma prevalência de 1,1%  
129 (309/29.178) em amostras de esmegma na IFD.

130 A diferença entre o resultado do presente estudo, em relação aos demais, pode  
131 estar relacionada aos diferentes tipos de delineamentos experimentais empregados,  
132 meios de transporte e métodos de diagnóstico utilizados. Rae e Crews (2006) reportam  
133 que a variação da sensibilidade dos testes de diagnóstico pode estar relacionada com o  
134 tempo transcorrido da colheita das amostras até o processamento, com a temperatura e  
135 meios de cultura e transporte utilizados.

136 Em relação ao número de focos, observou-se que apesar da baixa frequência, a  
137 infecção pelo *T. foetus* apresenta-se distribuída nos municípios do estado de  
138 Pernambuco, sobretudo na região do Agreste. Vale ressaltar que os machos são  
139 considerados os principais responsáveis pela manutenção e disseminação do agente nos  
140 rebanhos, principalmente devido à ausência de manifestações clínicas da infecção e  
141 características particulares do aparelho reprodutivo, que possibilitam a proliferação do  
142 *T. foetus* sem que ocorra a eliminação do patógeno pelo sistema imunológico (Jesus et  
143 al., 2004). Dessa forma, aconselha-se o descarte dos machos infectados (Madoroba et  
144 al., 2011), reposição por animais jovens e implementação de um programa de  
145 inseminação artificial com cuidados sanitários adequados (BonDurant, 2005).

146 Nenhuma das amostras de matadouro foi positiva na PCR, isso pode ter ocorrido  
147 devido à ausência do repouso sexual. Segundo Lage et al. (1997), a realização do

148 repouso sexual dos animais por um período superior a 15 dias, aumenta as chances de  
149 diagnóstico da enfermidade devido o maior desenvolvimento dos micro-organismos no  
150 prepúcio dos animais.

151 Observou-se neste estudo uma maior positividade nos rebanhos que utilizavam a  
152 monta natural como manejo reprodutivo. Vale ressaltar que esse tipo de manejo é  
153 considerado como a principal forma de transmissão do agente (Rae e Crews, 2006).  
154 Além disso, a adoção de práticas como o empréstimo de touros para outros rebanhos  
155 (Mardones et al., 2008) e a utilização de touros velhos no manejo reprodutivo, também  
156 podem influenciar na prevalência da TB. (Alves et al., 2011). Apesar de não ter sido  
157 observada associação ( $p>0,05$ ), a aquisição de animais de outros rebanhos, sem o  
158 conhecimento do *status* sanitário, pode favorecer a introdução e disseminação do  
159 patógeno (Mendoza-Ibarra et al., 2012).

160 Em relação aos índices reprodutivos observou-se que em 100,0% dos rebanhos  
161 que apresentaram animais positivos, havia também relatos de distúrbios reprodutivos, e  
162 constatou-se associação significativa para variável retenção de placenta. Provavelmente,  
163 existam fêmeas infectadas nos rebanhos e estas, podem servir de fonte de infecção para  
164 os touros não infectados. Segundo Mendonza-Ibarra et al. (2012) a presença de vacas  
165 que apresentam repetição de cio no rebanho aumentam em 5,2 vezes as chances de  
166 infecção.

167 Apesar de não ter sido possível identificar *C. fetus* subsp. *venerealis* neste  
168 estudo, registros dessa infecção vem sendo relatados em diferentes regiões do país,  
169 como por exemplo, no estado do Mato Grosso do Sul, onde foi observada uma  
170 prevalência de 52,3% (171/327) em amostras de esmegma prepucial submetidas à  
171 reação de imunofluorescência direta (IFD) (Pellegrin et al., 2002). No Rio de Janeiro,  
172 em um estudo realizado em touros oriundos de rebanhos que apresentavam histórico de



173 distúrbios reprodutivos, observou-se uma positividade de 35,9% (14/39) na IFD (Rocha  
174 et al., 2009). Leal et al. (2012) relataram uma prevalência de 12,1% (17/140) frente à  
175 IFD em amostras de esmegma prepucial provenientes de animais abatidos em  
176 frigoríficos no Distrito Federal.

177 Em outras regiões do mundo, como na África do Sul, observou-se uma  
178 prevalência de 1,9% (60/3161) em amostras de esmegma prepucial submetidas à PCR  
179 (Madobora et al., 2011). Na Argentina, Molina et al. (2013) relataram uma prevalência  
180 1,5% (437/29.178) de amostras esmegma positivas na IFD.

181 Apesar de ser difícil realizar uma comparação entre o resultado do presente  
182 estudo com os supracitados, devido aos diferentes tipos de delineamentos experimentais  
183 e métodos de diagnósticos, a divergência entre os resultados pode estar relacionada ao  
184 procedimento de colheita das amostras. Samuelson e Winter (1966) relataram que a  
185 realização de três colheitas consecutivas, com o período de repouso sexual igual ou  
186 superior a 15 dias, aumenta a sensibilidade do diagnóstico. Além disso, pode ter  
187 ocorrido uma diminuição da sensibilidade da PCR devido à presença de substâncias  
188 inibitórias, principalmente pela contaminação das amostras por urina (McMillen et al.,  
189 2006).

190

## 191 **Conclusão**

192 O resultado obtido no presente estudo confirma a presença da infecção por *T.*  
193 *foetus* nos rebanhos bovinos do estado de Pernambuco, Brasil. Além disso, sugere-se  
194 que medidas de controle e profilaxia como o descarte dos touros infectados e reposição  
195 por animais jovens devam ser implementadas, a fim de evitar a disseminação do agente  
196 nos rebanhos.

197 **Agradecimentos**

198 A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado. A Dra Agueda Castagna de  
199 Vargas e Dr. Luis Miguel Ortega Mora pelo fornecimento das cepas controles de *C.*  
200 *fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus*, respectivamente.

201

202 **Referências**

203 Alves, T.M., Stynen, A.P.R., Miranda, K.L., Lage, A.P., 2011. Campilobacteriose  
204 genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle.  
205 Pesquisa Veterinária Brasileira, 31(4), 336-344.

206 Bondurant, R.H., 2005. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the  
207 role of vaccines in their control. Veterinary Clinics of North America: Food Animal  
208 Practice, 21(2), 383-408.

209 Chiapparrone, M.L., Moran, P.E., Pasucci, J.A., Echevarria, H.M., Monteavaro, C.,  
210 Soto, P., Rodriguez, E., Catena, M.D.C., 2011. Quantitative analysis of *Campylobacter*  
211 *fetus venerealis* adhesion to bovine reproductive tract cell cultures. Braz. J. Brazilian of  
212 Journal Veterinary Research Animal Science, 48(1), 73-78.

213 Cobo, E.R., Campero, C.M., Gimeno, E.J., Barbeito, C.G., 2004. Lectin Binding  
214 Patterns and Immunohistochemical Antigen Detection in the Genitalia of  
215 *Tritrichomonas foetus*-infected Heifers. Journal of Comparative Pathology, 131, 127-  
216 134.

217 Cobo, E.R., Corbeil, L.B., Bondurant, R.H., 2011. Immunity to infections in the lower  
218 genital tract of bulls. Journal of Reproductive Immunology, 89,55-61.

219 Eaglesome, M.D., Garcia, M.M., 1997. Disease risks to animal health from artificial  
220 insemination with bovine semen. Revue Scientifique Technique, 16, 215-225.

- 221 Felleisen, R.S.J., 1997. Comparative sequence analysis of 5±8S rRNA genes and  
222 internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology*, 115,  
223 111-119.
- 224 Hum, S., Quinn, K., Brunner, B., On, S.L.W., 1997. Evaluation of a PCR assay for  
225 identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies Australian  
226 *Veterinary Journal*, 75(11), 827-831.
- 227 Jesus, V.L.T., Pereira, M.J.S., Alves, P.A.M., Fonseca, A.H., 2004. Fatores intrínsecos  
228 do hospedeiro associados à prevalência de tricomonose genital bovina. *Revista*  
229 *Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13(4), 159-163.
- 230 Lage, A.P., Pellegrin, A.O., Costa, G.M., Silva, N., Reinato, A.P.R., Gomes, L.I.,  
231 Guimarães, P.H.S., Leite, R.C., 1997. Campilobacteriose genital bovina: diagnóstico na  
232 Escola de Veterinária da UFMG de 1976 a 1996. *Revista Brasileira de Reprodução*  
233 *Animal*, 21(2), 164-166.
- 234 Leal, D.R., Fernandes, G.O., Gouveia, F.F., Miranda, K.L., Neves, J.P., 2012.  
235 Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal  
236 e em seu entorno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36(4), 256-259.
- 237 Madoroba, E., Awoke, G., Tiny, H., Mkhevu, M., 2011. Prevalence of *Campylobacter*  
238 *foetus* and *Trichomonas foetus* among cattle from Southern Africa. *African Journal of*  
239 *Biotechnology*, 10(50), 10311-10314.
- 240 Mai, H.M., Iron, P.C., Kabirb, J., Thompson, P.N., 2013. Herd-level risk factors for  
241 *Campylobacter fetus* infection, *Brucella* seropositivity and within-herd seroprevalence  
242 of brucellosis in cattle in northern Nigeria. *Preventive Veterinary Medicine*, 111, 256-  
243 267.

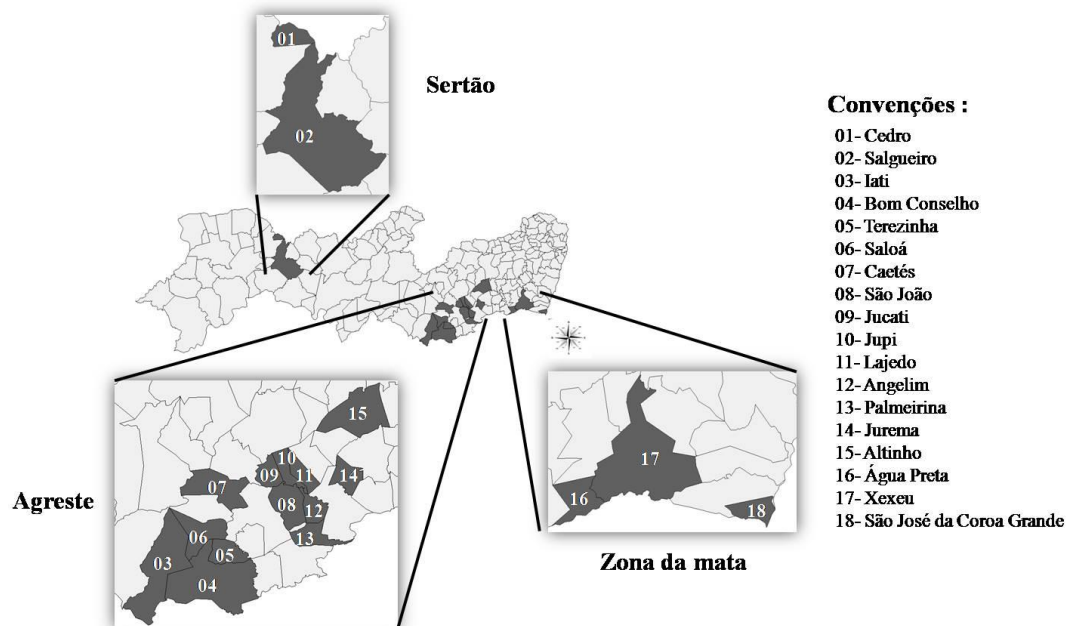
- 244 Mardones, F.O., Perez, A.M., Martinez, A., Carpenter, T.E., 2008. Risk factors  
245 associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the province of Buenos  
246 Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 153, 231-237.
- 247 McMillen, L., Fordyce, G., Doogan, V.J., Lew, A.E., 2006. Comparison of Culture and  
248 a Novel 5 Taq Nuclease Assay for Direct Detection of *Campylobacter fetus* subsp.  
249 *venerealis* in Clinical Specimens from Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3),  
250 938-945.
- 251 Mendoza-Ibarra, J.A., Pedraza-Díaz, S., García-Peña, F.J., Rojo-Montejo, S., Ruiz-  
252 Santa-Quiteria, J.A., Miguel-Ibáñez, E.S., Navarro-Lozano, V., Ortega-Mora, L.M.,  
253 Osoro, K., Collantes-Fernandez, E., 2012. High prevalence of *Tritrichomonas foetus*  
254 infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern  
255 Spain. *The Veterinary Journal*, 193, 146-151.
- 256 Molina, L., Perea, J., Meglia, G., Angón, E., García, A., 2013. Spatial and temporal  
257 epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La  
258 Pampa province (Argentina). *Preventive Veterinary Medicine*, 110, 388-394.
- 259 Mshelia, G.D., Amin, J.D., Egwu, G.O., Woldehiwet, Z., Murray, R.D., 2012. The  
260 prevalence of bovine venereal campylobacteriosis in cattle herds in the Lake Chad basin  
261 of Nigeria. *Tropical Animal Health Production*, 44(7), 1487-1489.
- 262 Paz Júnior, C.J., Almeida, H.J.O., Júnior, H.A.F., D'Alencar, A.S., Galindo, M.K.F.,  
263 Jesus, V.L.T., Alves, L.C., Faustino, M.A.G., 2010. Frequência de infecção por  
264 *Tritrichomonas foetus* (RIEDMULLER, 1928) em bovinos leiteiros do município de  
265 Sanharó-PE. *Medicina Veterinária*, 4(1), 6-11.
- 266 Pellegrin, A.O., Lage, A.P., Sereno, J.R.B., Ravaglia, E., Costa, M.S., Leite, R.C., 2002.  
267 Bovine Genital Campylobacteriosis in Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil.  
268 *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 55(3), 169-173.

- 269 Rae, D.O., Crews, J.E., 2006. *Tritrichomonas foetus*. Veterinary Clinics Food Animal  
270 Practice, 22, 595-611.
- 271 Rodning, S.P., Wolfe, DF., Carson, R. L., Wright, J.C., Stockdale, H.D., Pacoli, M.E.,  
272 Busby, H.C., Rowe, S.E., 2008. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in several  
273 subpopulations of Alabama beef bulls. Theriogenology, 69, 212-217.
- 274 Rocha, F.S, Jesus, V.L.T., Torres, H.M., Gomes, M.J.P., Figueiredo, M.J., Nascimento,  
275 E.R., Ferreira, T., Aquino, M.H.C., 2009. Investigação de *Campylobacter fetus* e  
276 *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da região do Médio Paraíba, RJ.  
277 Ciência Rural, 39(5), 1586-1589.
- 278 Samuelson, J.D., Winter, A.J., 1966. Bovine vibriosis: the nature of the carrier state in  
279 the bull. Journal of Infectious Diseases, 116(5), 581-592.
- 280 Silva, A.S., Zanette, R.A, Oliveira, C.B, Gallio, M., Pereira, P.L., Fernandes, M.B.,  
281 Tonin, A.A., Badke, M.R.T., Monteiro, S.G., 2009. Leptospirose e tritricomonose:  
282 isolamento em propriedade com problemas reprodutivos no sul do Brasil. Arquivos de  
283 Ciências Veterinárias e Zoologia, 12(1), 87-90.
- 284 Stynen, A.P.R., Pellegrin, A.O., Fóscolo, C.B., Figueiredo, J.F., Canella Filho, C.,  
285 Leite, R.C., Lage, A.P., 2003. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros  
286 com problemas reprodutivos de Varginha – Minas Gerais. Arquivo Brasileiro de  
287 Medicina Veterinária e Zootecnia, 55(6), 766-769.

288 Tabela 1 – Análise dos fatores associados à infecção por *Tritrichomonas foetus* em  
 289 touros no estado de Pernambuco, Brasil, 2013

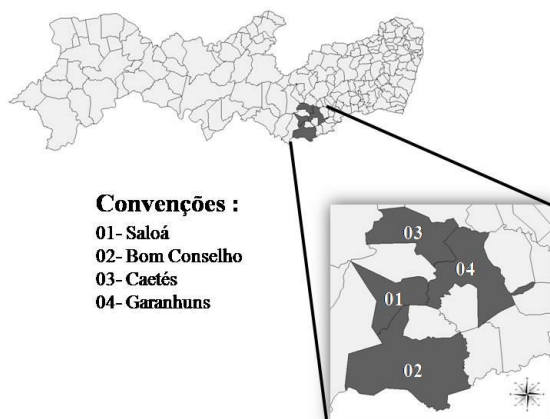
VARIÁVEL	N	PCR	ANÁLISE UNIVARIADA	Valor de P
		Positivo	OR (I.C. 95%)	
<b>Sistema de criação</b>				
Extensivo	30	3 (10,00%)	-	
Intensivo	10	0 (0,00%)	**	0,333
Semi-intensivo	23	4 (17,39%)	1,9 (0,4 - 9,45)	
<b>Tamanho do rebanho</b>				
< 100 animais	35	5 (14,29%)		
> 100 animais	28	2 (7,14%)	2,1 (0,4 - 12,1)	0,447
<b>Adquire animais de outros rebanhos</b>				
Sim	50	5 (10,00%)		
Não	13	2 (15,38%)	0,6 (0,1 - 3,5)	0,626
<b>Manejo reprodutivo</b>				
Monta natural	37	5 (13,51%)	1,7 (0,3 - 9,6)	
Inseminação artificial	2	0 (0,00%)	**	0,721
Ambos	24	2 (8,33%)	-	
<b>Empréstimo de touros</b>				
Sim	24	1 (4,17%)		
Não	39	6 (15,38%)	0,3 (0,1 - 2,1)	0,236

290 Convenções: N – Total de amostras; OR – (razão de chance); IC – Intervalo de Confiança; \*Associação  
 291 significativa ( $p < 0,05$ ); \*\* Indefinido; <sup>1</sup>Base utilizada (61).



292

293 Figura 1 – Distribuição geográfica dos municípios estudados



294

295 Figura 2 – Distribuição geográfica dos matadouros estudados

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos pôde-se observar que as infecções por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* estão presentes nos rebanhos bovinos do estado de Pernambuco;

O número de focos identificados na microrregião de Garanhuns sugere que os agentes apresentam-se distribuídos nos rebanhos;

Medidas de controle e profilaxia como o diagnóstico, separação e repouso sexual das fêmeas infectadas, utilização de um programa de inseminação artificial com cuidados sanitários rigorosos, descarte dos touros infectados e reposição por animais jovens devem ser implementadas a fim de evitar a disseminação do agente nos rebanhos.



## 7 APÊNDICE A. Questionário Investigativo



### QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À CAMPILOBACTERIOSE E TRICOMONOSE GENITAL BOVINA

Nome da Propriedade: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_  
 Proprietário: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Email: \_\_\_\_\_  
 Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 Questionário nº \_\_\_\_\_  
 Investigador: \_\_\_\_\_

#### DADOS DA PROPRIEDADE

---

##### 1) Propriedade Informatizada:

- 1- Sim ( )  
 2- Não ( )

- 3-Entre 101 e 200 animais ( )  
 4-Acima de 200 animais ( )

##### 2) Constituição racial:

- 1- Européia ( )  
 2- Zebuína ( )  
 3- Mestiça ( )

##### 6) Qual a fonte de volumoso oferecida aos animais?

- 1- Pasto ( )  
 2- Silagem ( )  
 3- Capim ( )  
 4- Outras: \_\_\_\_\_

##### 3) Sistema de Criação:

- 1- Intensivo ( )  
 2- Extensivo ( )  
 3- Semi-Intensivo ( )

##### 7) Suplementa a alimentação?

- 1- Sim ( )  
 2- Não ( )

##### 4) Assistência Veterinária:

- 1- Não ( )  
 2- Permanente ( )  
 3- Temporária/Esporádica ( )

##### 8) Suplementação mineral?

- 1- Sim ( )  
 2- Não ( )

##### 5) Qual o tamanho do rebanho?

- 1- Abaixo de 50 animais ( )  
 2-Entre 51 e 100 animais ( )

##### 9) Fonte de água

- 1- Parada ( )  
 2- Corrente ( )  
 3- Mista ( )

**10) Vacina os animais?**

1- Sim ( )

Quais: \_\_\_\_\_

2-Não ( )

**11) Os animais para reposição são provenientes da propriedade?**

1- Sim ( )

2- Não ( )

**12) Qual a taxa anual de reposições dentro do rebanho?**

1- Abaixo de 50 animais ( )

2- Entre 51 e 100 animais ( )

3- Entre 101 e 200 animais ( )

4- Acima de 200 animais ( )

**13) Quando importa animais realiza quarentena?**

1- Sim ( )

2- Não ( )

**14) Qual o tipo de manejo reprodutivo utilizado na propriedade?**

1- Monta Natural ( )

2- Inseminação artificial ( )

3- Transferência de embriões ( )

**15) Se realiza monta natural, há empréstimos de touros para outras propriedades?**

1- Sim ( )

2- Não ( )

**16) É dado um descanso aos touros entre as montas?**

1- Sim ( )

2-Não( )

**17) Se realiza Inseminação artificial, o sêmen é acompanhado de atestados sanitários?**

1- Sim ( )

2- Não ( )

**18) Já houve casos de aborto na propriedade?**

1- Sim ( )

2- Não ( )

**19) Em que terço da gestação ele ocorreu?**

1- 1/3 ( )

2- 2/3 ( )

3- 3/3 ( )

**20) Qual o destino do produto do aborto?**

1- Enterrou ( )

2- Queimou ( )

3- Deixou no pasto ( )

4- Outro: \_\_\_\_\_

**21) Houve casos de repetição de cio na propriedades?**

1- Sim ( )

2-Não ( )

**22) Foi observado corrimento vaginal purulento nas vacas?**

1- Sim ( )

2-Não ( )

**23) Foi observado retenção de placenta nas vacas?**

1- Sim ( )

2-Não ( )

**24) Os touros que utilizados na reprodução cobrem fêmeas que apresentam distúrbios reprodutivos?**

1- Sim ( )

2-Não ( )

**25) Utiliza touro de repasse?**

1- Sim ( )

2-Não ( )

## 8 APÊNDICE B. Termo de Autorização



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**

Av. Bom Pastor, s/n – Boa Vista – CEP 55292-270 – Garanhuns, PE  
Telefones: (087) 3761.0882 e 3761.0969

### **TERMO DE AUTORIZAÇÃO**

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, portador do CPF de número \_\_\_\_\_ e RG  
\_\_\_\_\_ autorizo a coleta do material biológico necessário para a  
execução do projeto intitulado Estudo epidemiológico da Campilobacteriose e da  
Tricomonose Genital Bovina na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco e também  
a publicação dos resultados obtidos para a comunidade científica.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do proprietário**

## 9 ANEXO A. Normas para publicação de periódico *Tropical Animal Health and Production*

### INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

#### TYPES OF ARTICLES

Manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double spaced, using A4 paper size. Line numbers will be inserted when the pdf is generated.

**Regular Articles:** Articles should be as concise as possible and should not normally exceed approximately 4000 words or about 8 pages of the Journal including illustrations and tables. Articles should be structured into the following sections;

- (a) Abstract of approximately 150-250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached
- (b) Introduction stating purpose of the work
- (c) Materials and Methods
- (d) Results
- (e) Discussion
- (f) Acknowledgements
- (g) References

**Short Communications:** Short communications should not normally exceed approximately 2000 words or about 4 pages of the Journal, including illustrations, tables and references. An abstract of 150-250 words should be included and a minimum number of sub-headings may be included if it adds clarity to the article.

**Reviews:** Review articles will be welcomed. However, authors considering the submission of review articles are advised to consult the editor in advance.

**Correspondence:** Letters on topics relevant to the aims of the Journal will be considered for publication by the Editor who may modify them.

It is the authors responsibility to ensure that submitted manuscripts comply with journal format as indicated in the current instructions to authors and example articles.

## **ETHICAL STANDARDS**

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

## **MANUSCRIPT SUBMISSION**

### **Manuscript Submission**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

**Permissions**

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

**Online Submission**

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

**TITLE PAGE****Title Page**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address (es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

**Abstract**

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

**Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

**Please note:**

The Abstract should be presented as a single continuous paragraph.

**TEXT****Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

**Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

**Abbreviations**

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

**Footnotes**

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### **Acknowledgments**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

### **REFERENCES**

1. All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list.

2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages. Examples: 'Peters (1985) has shown that . . . . 'This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 12--16)'

3. If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation et al. should be used. All names should be given in the list of references.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with co-authors. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc.

5. Use the following system for arranging each reference in the list:

- For journal articles:



Ahl, A.S., 1986. The role of vibrissae in behaviour: a status review, *Veterinary Research Communications*, 10, 245--268

- For books:

Fox, J.G., Cohen, B.J. and Lowe, F.M., 1984. *Laboratory Animal Medicine*, (Academic Press, London)

- For a paper in published symposia proceedings or a chapter in multi-author books:

Lowe, K.F. and Hamilton, B.A., 1986. Dairy pastures in the Australian tropics and subtropics. In: G.T. Murtagh and R.M. Jones (eds), *Proceedings of the 3rd Australian conference on tropical pastures*, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 68--79

- For unpublished theses, memoranda etc:

Crowther, J., 1980. *Karst water studies and environment in West Malaysia*, (unpublished PhD thesis, University of Hull)

- For Online documents:

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999

6. Do not abbreviate the titles of journals mentioned in the list of references.

7. Titles of references should be given in the original language, except for the titles of publications in non-Latin alphabets, which should be transliterated, and a notation such as '(in Russian)' or '(in Greek, with English abstract)' added.

8. Citations of personal communications should be avoided unless absolutely necessary. When used, they should appear only in the text, using the format: 'E. Redpath, personal communication, 1986' and should not appear in the Reference List. Citations to the unpublished data of any of the authors should not be included unless the work has already been accepted for publication, in which case a reference should be given in the usual way with "in press" in place of the volume and page numbers.

## **CONFLICT OF INTEREST**

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

## **TABLES**

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## **ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES**

### **Electronic supplementary material**

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

### **Submission**

- Supply all supplementary material in standard file formats.

- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### **Audio, Video, and Animations**

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

### **Text and Presentations**

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### **Spreadsheets**

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

### **Specialized Formats**

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### **Collecting Multiple Files**

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### **Numbering**

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

**Captions**

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

**Processing of supplementary files**

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

**Accessibility**

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

**DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?**

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

### **For Authors from China**

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

- 理文编辑

### **For Authors from Japan**

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- エダンズグループ ジャパン

### **For Authors from Korea**

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- Edanz Editing Global

### **AFTER ACCEPTANCE**

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

### **Open Choice**

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

### **Copyright transfer**

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

### **Offprints**

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### **Color illustrations**

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### **Proof reading**

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

**Online First**

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

## 10 ANEXO B. Normas para publicação de periódico *Research in Veterinary Science*

### GUIDE FOR AUTHORS

*Research in Veterinary Science* publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.

#### Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Short Communications
3. Review articles

**Original research papers** should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

**Short Communications** should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

**Review articles** Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

#### Submission of manuscripts

Submission to *Research in Veterinary Science* now proceeds online via Elsevier Editorial System -<http://ees.elsevier.com/rvsc>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research



Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Acknowledgements**

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

### **Conflict of interest**

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

### **Role of the funding source**

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

### **Open Access**

This journal offers authors two choices to publish their research;

#### *1. Open Access*

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

#### *2. Subscription*

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

*Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA)*: for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

*Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivs (CC-BY-NC-ND)*: for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

*Creative Commons Attribution (CC-BY)*: available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/funding-body-agreements>.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The Open Access publication fee for this journal is \$USD 2,500, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy [www.elsevier.com/openaccesspricing](http://www.elsevier.com/openaccesspricing).

**Language Editing:** [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com).

## **Ethics**

Before papers describing animal studies are accepted for publication in *Research in Veterinary Science*, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final.

The authors should provide written assurances that: (i) The project underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and post-operative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

### **Title**

Papers should be headed with the full title, the initials and surnames of the authors, and the name and address of the institution where the work was carried out. The full telephone number, Fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided.

### **Form of Papers**

- a) Abstract (not more than 150 words), self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.
- b) Keywords. Please supply a list of up to six keywords that describe the paper.
- c) Introduction.
- d) Materials and methods employed.
- e) Results, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data will rarely be permitted.
- f) Discussion and conclusions.
- g) Acknowledgements.
- h) References.

i) Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing**, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

**Abbreviation and symbols:** Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

## References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al." This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more

than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Minamoto, T., Honjo, M.N., Yamanaka, H., Tanaka, N., Itayama, T., Kawabata, Z., 2011. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Research in Veterinary Science* 90, 530-532.

Castillo, V.A., Gomez, N.V., Lalia, J.C., Cabrera Blatter, M.F., Garcia, J.D., 2008a. Cushing's disease in dogs: Cabergoline treatment. *Research in Veterinary Science* 85, 26-34.

b. For books

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

c. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215-2246.

6. Please do not abbreviate the journal title names e.g. *Research in Veterinary Science* and not *Res Vet Sci*.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

## **Illustrations**

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

### **Preparation of supplementary data**

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file.

### **Tables**

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.



3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

### **Copyright**

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com). Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

### **Authors Rights**

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on [elsevier.com](http://elsevier.com))
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

**Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

**Proofs**

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

**Author Enquiries**

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/rvsc>. This also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

***Research in Veterinary Science has no page charges***

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

## 11 ANEXO C. Licença para uso de animais em pesquisa

I- FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DE LICENÇA Nº. 0221/2013  
 PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO  
 PROTOCOLO Nº 23082.014840/2012  
 RECEBIDO EM: 15/04/2013

DOI

No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

Lista das DCBs disponível em:

[http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista\\_dcb\\_2007.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf).

### 1. FINALIDADE

Ensino	<input type="checkbox"/>
Pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/>
Treinamento	<input type="checkbox"/>

Início: 01/12/2012

Término: 30/11/2014

### 2. TÍTULO DO PROJETO/AULA PRÁTICA/TREINAMENTO

**Estudo epidemiológico da Campilobacteriose e da Tricomonose Genital Bovina na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco.**


Área do conhecimento: Medicina Veterinária

Lista das áreas do conhecimento disponível em:

<http://www.cnpq.br/areasconhecimento/index.htm>.

### 3. RESPONSÁVEL

Nome completo	Daniel Friguglietti Brandespim
Instituição	Universidade Federal Rural de Pernambuco
Unidade	Acadêmica de Garanhuns

 CEUA - UFRPE  
 Aprovado em 25/03/2013  
 Validade 25/03/2015