

JONAS DE MELO BORGES

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA INFECCÃO POR *Campylobacter fetus* subsp.
venerealis e *Tritrichomonas foetus* EM BÚFALOS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

**Garanhuns
2016**

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

JONAS DE MELO BORGES

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Campylobacter fetus* subsp.
venerealis e *Tritrichomonas foetus* EM BÚFALOS 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 Junior

**GARANHUNS
2016**

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

B732e Borges, Jonas de Melo

Estudo epidemiológico da infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* em Búfalos no Estado de Pernambuco / Jonas de Melo Borges.
- Garanhuns, 2016.

56 f.

CDD: 636.293

1. Búfalo - Doenças
 2. *Campylobacter*
 3. Infecção
- I. Pinheiro Junior, 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 DA INFEÇÃO POR *Campylobacter fetus* subsp.
venerealis e *Tritrichomonas foetus* EM BÚFALOS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

Dissertação elaborada por:
JONAS DE MELO BORGES

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Presidente da Banca – Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Prof. Dr. Daniel Friguglietti Brandespim
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

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

Dedico

*A Deus que é meu guia, a minha família presente
maior é fonte de toda minha força e alegria,
todos que me ajudaram ao chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Neste momento o agradecimento maior vai a Deus, meu Pai do Céu, Ele que é o guia de minha vida, e me fortalece todos os momentos, sempre presente em minha vida. Todas as conquistas que tive e terei sempre são sinal de sua benevolência para comigo. Obrigado meu Senhor por me fazer tão feliz e realizado. Meu Deus obrigado por me abençoar, me proteger e se fazer tão presente em minha vida.

Sou muito abençoado e devo agradecer de modo especial à minha família. A Minha Mãe (Ivete) uma guerreira que se mostra forte e capaz de organizar essa família, a todo amor dedicado a mim, todo seu compromisso de me ajudar em minhas iniciativas e sonhos, devo lembra que seu exemplo de força e confiança, sem dúvidas é meu orgulho, obrigado mainha.

Quero agradecer de maneira igual a meu Pai (Josué) que é exemplo de trabalho e luta de um homem que desde muito cedo lutou e luta no trabalho do dia-a-dia, vai atrás do que acredita e sempre esteve pronto para nos mostrar e falar que é preciso ter valores, nos mostrando que a pessoa humana deve ser respeitada, painho muito obrigado.

A minha Irmã (Jéssica) você é muito especial, agradeço por todos os momentos vividos juntos, por me abrigar aqui no Recife. Você é fera, sou seu fã, mesmo sendo mais nova é um exemplo de força e superação e coragem, Jéh muito obrigado por tudo!

Agradeço também a todos os meus familiares, minhas avós (vovó Alice e vovó Zefinha), a meus tios e tias a meus primos e primas, vocês são muito especiais pra mim, obrigado minha família.

Quero agradecer de modo especial ao meu orientador José Wilton Pinheiro Junior, exemplo de professor pra mim, preocupado com suas atividades, com a formação e com alunos, por dividir com os seus orientados todo seu conhecimento sem estar preso a questões sociais e de “*status*”, obrigado por toda a ajuda (toda mesmo laboratório, coleta e escrita) e desculpe por minhas falhas, mas acho que faz parte, porém de verdade sou muito grato. Muito Obrigado!

Agradeço aos meus mestres que passaram por minha vida e foram fundamentais para minha formação, todos os professores da graduação e da pós-graduação, meus orientadores na extensão e na monitoria. Agradecendo de modo especial ao Professor Daniel Brandespim e Gustavo Ferrer, que foram meus professores na graduação, participaram de minha banca de ESO e me acompanham até hoje, meu muito obrigado, por tudo e por aceitarem o convite para estar em minha banca de mestrado.

Quero agradecer aos meus amigos mais próximos, eu não posso deixar de agradecer a esse que me conhecem, sabem de minhas dificuldades e me ajudam a melhorar. Thiago, Djalma e Rodrigo companheiros de conversa. Quero agradecer também à um amigo, presente de Deus, nesses últimos anos que ganhei, Francisco Gabriel (Pe. Francisco) muito obrigado por tudo. Minhas amigas: Paula, Marcinha, Rafinha, Tamarinha, Natália. Olhe são muito os amigos, graças a Deus, não vou continuar citando nomes, vou esquecer de colocar o nome de uns ou outros(as), pois de verdade são muitos, obrigado aos amigos(as) da rua, da faculdade e da igreja. Tenho um carinho especial por todos vocês!

Eu não posso deixar de agradecer aos meus amigos e companheiros de trabalho Júnior Mario, Fernando, Polly, André, Bruna, Bruno, Marlos, Renata, Allisson e Érica. Vocês me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor e mais inteligente, apoiaram-me nas atividades do dia-a-dia, me ajudaram no projeto. Não há o que fazer para agradecê-los vocês são especiais na minha trajetória. Muito obrigado meus amigos!

Quero agradecer a Unidade Acadêmica de Garanhuns, a Universidade Federal Rural de Pernambuco casa do conhecimento, fundamental para minha formação. Agradeço a toda galera do LARICA no CENLAG, e agradecer os companheiros do laboratório de Bacterioses e Virozes do Departamento de Medicina Veterinária na cidade do Recife.

Agradecendo também a FACEPE pelo apoio com uma bolsa de estudos concedida durante a execução da pesquisa.

Enfim, agradecer a todos que fazem parte da minha vida, essa minha jornada fez a pessoa que sou hoje e certeza todos contribuíram ou contribuem na minha vida.

“A luz da fé ilumina a todas as nossas relações e ajuda-nos a vivê-las em união com o Amor de Cristo para vivê-las como Ele.”

(Papa Francisco)

RESUMO

Objetivou-se com este estudo determinar a ocorrência da infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* em búfalos no Estado de Pernambuco, Brasil e identificar os possíveis fatores de risco associados às infecções. Foram coletadas amostras biológicas (muco cérvico-vaginal e raspado prepucial) de 113 animais, procedentes de 8 propriedades, de diferentes regiões do Estado. O material biológico coletado foi transferido para solução salina tamponada (PBS) e posteriormente inoculado nos meios de transporte específicos, Lander para diagnóstico de *C. fetus* subsp. *venerealis* e Diamond para *T. foetus*. Para o diagnóstico das infecções por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* as amostras foram cultivadas em meio ágar columbia acrescido de antibiótico e Diamond, respectivamente. Posteriormente as amostras de PBS foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para pesquisa de *C. fetus* subsp. *venerealis*, observou-se uma ocorrência de 1,8% (2/113; I.C. 0,2 – 6,2%) de animais positivos no exame microbiológico com confirmação pela PCR. Em relação à procedência, observou-se que 100% das amostras positivas pertenciam a dois machos do mesmo rebanho. Na pesquisa de *T. foetus* nenhum animal foi positivo. Não foi possível identificar os fatores de risco associados às infecções. Este é o primeiro registro da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em búfalos no Brasil. Apesar da baixa ocorrência recomenda-se que medidas de controle sejam adotadas, com o intuito de evitar a disseminação do agente para outros rebanhos.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*; Campilobacteriose Genital Bovina; Tricomonose Genital Bovina.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the occurrence of infection with *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Tritrichomonas foetus* in buffaloes in the State of Pernambuco, Brazil and identify possible risk factors associated with infection. Biological samples were collected (cervico vaginal mucus and shaved prepuce) of 113 animals, coming from 8 properties in different regions of the state. The biological material collected was transferred into phosphate buffered saline (PBS) and inoculated in the specific transport, Lander for diagnosis of *C. fetus* subsp. *venerealis* and Diamond for *T. fetus* subsequently. For the diagnosis of infection by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Tritrichomonas foetus* the samples were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) grown in Columbia agar plus antibiotics and Diamond, respectively. There was an occurrence of 1.8% (2/113 ; I.C. 0.2 to 6.2 %) of positive animals in the microbiological examination with confirmation by PCR, for *C. fetus* subsp. *venerealis*. It was observed that 100% of positive samples were from two (2) males from the same herd. No animals were positive for *T. foetus*. It was not possible to identify risk factors associated with infection. This is the first report of infection with *C. fetus* subsp. *venerealis* in buffaloes in Brazil. Despite the low occurrence it is recommended that control measures are adopted, in order to prevent the spread of the agent to other herds.

Keywords: *Bubalus bubalis*; Bovine Genital Campylobacteriosis; Bovine Genital Trichomoniasis.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1** – Cadeia de transmissão do *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* 17
- Figura 2** – Área do estudo, propriedades localizadas no Agreste e Zona da Mata de Pernambuco. 44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 – Objetivo Geral	14
2.2 – Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO de LITERATURA	15
3.1 – <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	15
3.1.1 – Etiologia	15
3.1.2 – Epidemiologia	16
3.1.3 – Patogenia e sinais clínicos	18
3.1.5 – Diagnóstico	19
3.1.6 – Controle e Prevenção	21
3.2 – <i>Tritrichomonas foetus</i>	22
3.2.1 – Etiologia	22
3.2.2 – Epidemiologia	22
3.2.3 – Patogenia e sinais clínicos	23
3.2.5 – Diagnóstico	25
3.2.6 – Controle e Prevenção	27
4. REFERÊNCIAS	28
5. ARTIGO CIENTÍFICO	40
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7. APÊNDICE E ANEXO	54

INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é uma espécie animal originária do continente Asiático adaptada à zona tropical e temperada do continente. Os búfalos são animais que se adaptam a diversas condições climáticas, topográficas e geológicas. Essas condições permitem uma criação em muitas regiões com condições distintas de seu local de origem (CAMPANILE; BALESTRINE, 2002).

A população de búfalos no mundo totaliza 168 milhões de animais, que estão distribuídos geograficamente na seguinte proporção; 161 milhões na Ásia (95,4%), 3,717 milhões na África (2,2%), 3,3 milhões na América do Sul (1,9%), 40.000 na Austrália (0,2 %) e 500.000 na Europa (0,3%) (BORGHESE, 2005).

O Brasil possui um rebanho bubalino de 1.319.478 cabeças segundo o IBGE, com aumento nos últimos anos. Mais da metade desta criação está na região Norte do país com aproximadamente 877 mil, sendo o estado do Pará com a maior criação, com maior concentração desses animais na ilha de Marajó (IBGE, 2014).

O nordeste tem a segunda maior criação de búfalos do país, com mais de 120 mil cabeças, sendo o estado do Maranhão o maior criador da região, com mais de 80 mil cabeças, seguido da Bahia com 25 mil e Pernambuco com uma população superior a 9 mil animais (IBGE, 2014).

A bubalinocultura no Brasil apresenta índices de produtividade superiores para as atividades de produção de leite, carne e trabalho, quando comparados os resultados com a bovinocultura tradicional (SILVA et al., 2003). A criação de búfalos vem cada dia em substituição a criação de bovinos, transferindo as práticas de manejo utilizadas na bovinocultura para a bubalinocultura, isso se deve a semelhança que existe entre as atividades (BASTIANETTO, 2009).

A criação de búfalos no país tem alguns entraves, pois é uma criação extensiva e não há acompanhamento zootécnico, o que impede a melhoria da produtividade, bem como a baixa preocupação com as questões sanitárias. Devido a esses fatores, problemas de origem reprodutiva podem estar presentes nos rebanhos, porém os proprietários não conseguem identificar. Distúrbios reprodutivos como aborto, repetição de cio, vaginite, endometrite, dentre outros, ocasionam perdas econômicas (OHASHI et al., 2012).

As causas infecciosas podem ser de origem viral, fúngica, protozoária ou bacteriana (MODI et al., 2011). Dentre os agentes infecciosos destaca-se *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* (LEITE; BASTIANETTO, 2009).

Apesar do *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* serem agentes infecciosos de classes diferentes, a ecologia, epidemiologia e patologia são semelhantes, o que permite a realização de um estudo conjunto dessas doenças (BONDURANT, 2005).

Na região Nordeste não há nenhum estudo que relata a ocorrência de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* em búfalos. Desta forma se faz necessário a realização de um estudo epidemiológico para determinar a ocorrência da infecção e identificar os possíveis fatores de risco associados a essas infecções.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo epidemiológico da infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* em búfalos no Estado de Pernambuco.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* em búfalos;
- Identificar os possíveis fatores de risco associados às infecções por esses agentes.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

1.1.1 Etiologia

As primeiras espécies do gênero *Campylobacter* foram identificadas a mais de 90 anos em animais. Inicialmente essas bactérias eram incluídas no gênero *Vibrio*, porém mais tarde com o surgimento da diferenciação da constituição do DNA e por testes bioquímicos, a incapacidade de fermentar hidratos de carbono, foram agrupados em um novo gênero denominado *Campylobacter*, *campylo* que significa curvo e *bacter* - bactéria (BROOKS et al., 2002).

Em 1991 foi proposta uma revisão da taxonomia e nomenclatura do gênero *Campylobacter*. Atualmente pertence ao Domínio Bactéria, Filo Proteobacteria, Classe Epsilonproteobacteria, Ordem Campylobacteriales, Família *Campylobacteraceae*, Gênero *Campylobacter* com 34 espécies e 14 subespécies (LPSN, 2015).

A espécie *Campylobacter fetus* é dividida em duas subespécies *C. fetus* subsp. *fetus*, que pode ser do sorotipo A ou B, estando relacionado a composição da membrana externa da bactéria. O *C. fetus* subsp. *venerealis* apresenta somente o sorotipo A (THOMPSON; BLASER, 2000). *C. fetus* subsp. *venerealis* é o agente etiológico da campilobacteriose genital bovina (THOMPSON; BLASER, 2000).

A bactéria é bastonete Gram negativa, curva em forma de asa de gaivota, não forma esporo, possuindo 0,3-0,4µm de largura e 0,5-8,0µm de comprimento (GOMES; FERNANDES, 2006). É microaerófila, necessitando de atmosfera rica em CO₂ (10%) e reduzida concentração de O₂ (5%) para seu crescimento, termófila estável em temperatura de 37°C (BROOKS et al., 2004), é móvel, devido à presença de flagelo com comprimento de duas a três vezes maior que a célula, localizado em uma ou nas duas extremidades, promovendo um movimento característico de saca-rolhas (SMIBERT, 1978; PENNER, 1988).

A morfologia dessa bactéria é outro fator importante para sua identificação, frequentemente assume a forma de um bacilo delgado, curvado, formas curtas (forma de vírgula), formas médias (forma de S) e formas longas (helicoidal com vários espirais) culturas antigas podem conter bactérias cocóide (ON, 2013). Esse microrganismo cresce

na faixa de pH entre 5,5 e 8,0, com valor ótimo próximo a neutralidade (VANDAMME, 2000).

1.1.2 Epidemiologia

A Campilobacteriose Genital Bovina possui distribuição mundial. Em búfalos a enfermidade já foi relatada em países da América do Sul como Venezuela (SERRANO et al., 1984) e Argentina (JACOBO et al., 2007). Porém não há notificações dessa infecção em búfalos no Brasil (OIE, 2015).

No Brasil, DÁpice (1956) foi o primeiro pesquisador a isolar o então denominado *Vibrio fetus* de um feto abortado, relatando a presença da “Vibriose” no rebanho bovino. A presença de *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis*, tem sido relatada em rebanhos bovinos de diferentes regiões do Brasil (JESUS et al., 1999; PELLEGRIN et al., 1999; FREITAS; SAQUY; DINIZ, 2006; ROCHA et al., 2009; LEAL et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2015). Na literatura compulsada não existe registro da infecção em búfalos no Brasil, considerando como base de dados o SCOPUS.

O *habitat* do *C. fetus* subsp *venerealis* no macho é o prepúcio, principalmente nas criptas do epitélio, mas também pode ser encontrado no pênis e na uretra distal (GOMES; FERNANDES, 2006). Já nas fêmeas, o microrganismo se encontra na região cérvico-vaginal, principalmente no fundo de saco na vagina e pode colonizar todo o útero da fêmea. Esses lugares oferecem condições ótimas de pH e baixa tensão de oxigênio facilitando o crescimento desta bactéria (GOMES; FERNANDES, 2006).

Alguns fatores relacionados à epidemiologia da doença são diferenciados de acordo com o sexo, visto que os machos são considerados como portadores assintomáticos, não apresentam sinais clínicos. Observa-se uma maior frequência da infecção por este patógeno nos touros mais velhos em função do aumento do tamanho e do número das criptas no epitélio do prepúcio (DEKEYSER, 1986; PELLEGRIN, 2002).

Nas fêmeas, a bactéria penetra na mucosa genital durante a monta ou inseminação artificial (DEKEYSER, 1986). Diferentemente do que ocorre nos machos, novilhas ou fêmeas jovens 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).

A forma de transmissão do agente é direta, onde o macho infectado transmite o agente pela monta natural para as fêmeas susceptíveis. As fêmeas infectadas podem transmitir o agente para outro macho susceptível completando assim a cadeia de transmissão do *C. fetus* subsp. *venerealis* (GARCIA et al., 1983). A transmissão pode ocorrer também pela inseminação artificial com sêmen contaminado (GARCIA et al., 1983; EAGLESOME; GARCIA, 1997; OIE, 2008) e por fômites contaminados (GENOVEZ et al., 1997; MAI et al., 2013) (Figura 1).

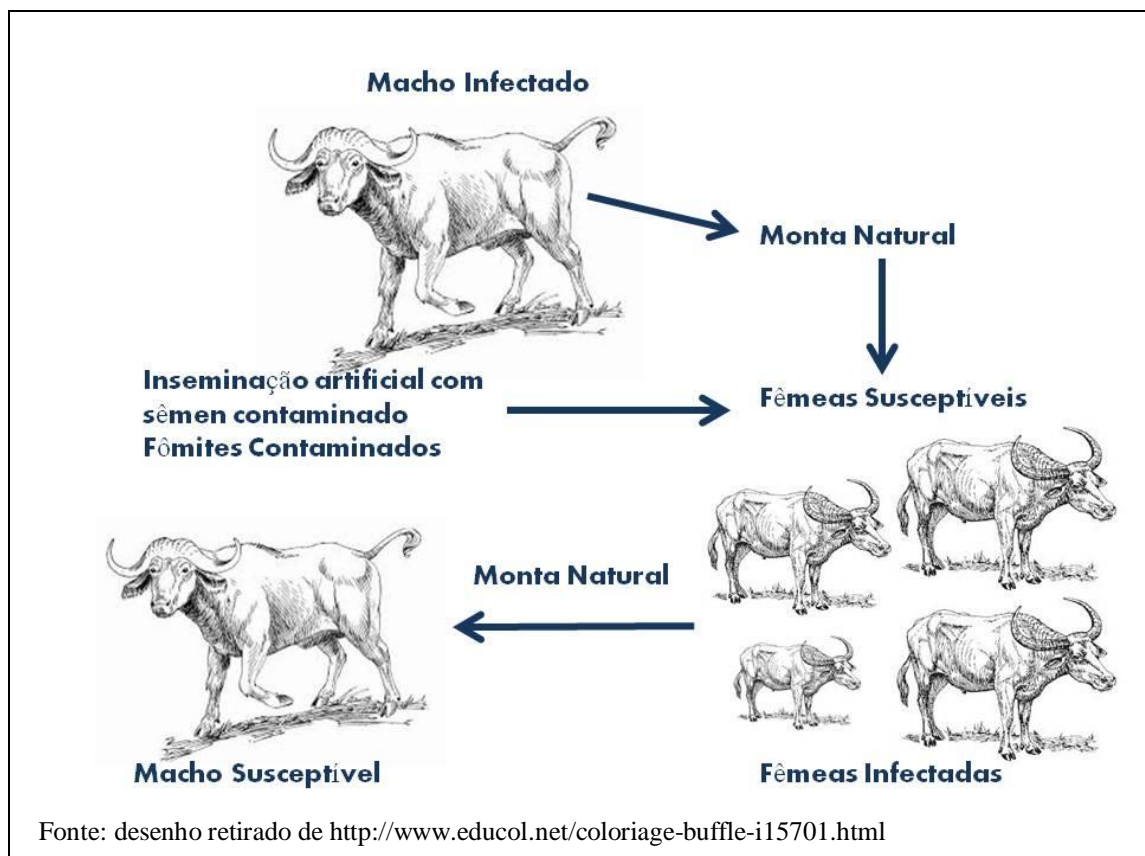


Figura 1 – Cadeia de transmissão do *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

Os fatores de risco associados à infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* estão relacionados com a idade dos machos com idade superior a 4-5 anos no rebanho e ao manejo reprodutivo utilizado na propriedade, pois a utilização da monta natural é considerada como a principal forma de transmissão do agente dentro de um rebanho (CASTRO et al., 1967; PELLEGRIN et al., 2002; BONDURANT, 2005).

Outros fatores podem ser destacados, tais como: prática de empréstimo de reprodutores para a cobertura de vacas em diferentes rebanhos (MARDONES et al., 2008); acesso de reprodutores procedentes de outras propriedades ao rebanho e o uso de pastagens compartilhadas (ROJO-MONTEJO et al., 2008; JIMENEZ et al., 2011);

aquisição de animais de rebanhos onde não se tenha o conhecimento do *status* sanitário (MAI et al., 2013), e rebanhos acima de 100 animais (OLIVEIRA et al., 2015).

1.1.3 Patogenia e sinais clínicos

Nos machos, o *C. fetus* subsp. *venerealis* localiza-se no prepúcio, multiplicando-se nas glândulas penianas, e não provoca lesões. A recuperação espontânea da infecção nos machos raramente ocorre, provavelmente, devido a pequenas variações antigênicas que a bactéria sofre no curso de infecção e por esta não ter um caráter invasivo nos machos, sem induzir produção de anticorpos (LAGE; LEITE, 2000; GOMES; FERNANDES, 2006).

Nas fêmeas, o agente permanece na região cérvico-vaginal até o final do estro, provavelmente como consequência do maior aporte sanguíneo e ativação de leucócitos polimorfonucleados (HIRSH, 1999). O microrganismo localiza-se na parte anterior da vagina, multiplica-se e posteriormente invade o útero resultando em endometrite e interrupção da gestação (LAGE; LEITE, 2000, COBO et al., 2011).

Em decorrência deste fenômeno inflamatório, o embrião não recebe o suprimento de oxigênio necessário a sua sobrevivência. Eventualmente, ocorre uma salpingite bilateral, o comprometimento da fertilidade nesse caso é total (DEKEISER, 1986).

A presença do *C. fetus* subsp. *venerealis* no útero provoca uma endometrite com grande produção de imunoglobulinas, sendo as mais importantes as classes G (predominante no útero) e A (predominantes na vagina) (GROFF; VARGAS, 2000). A IgM aparece no muco cérvico-vaginal uma a duas semanas após a infecção e persiste por oito a dezoito semanas (COBO et al., 2011). IgA específica contra *C. fetus* subsp. *venerealis* está presente no muco cérvico-vaginal entre três e cinco semanas após a infecção, podendo persistir por mais quarenta semanas. Imunoglobulinas de classe G estão presentes em torno da 8ª semana após a infecção e persistem por vinte e quatro e trinta e seis semanas (LAGE; LEITE, 2000, COBO et al., 2011).

As IgG's facilitam a fagocitose do agente por macrófagos e neutrófilos, mas a ativação da via clássica do complemento não é eficiente contra *C. fetus* subsp. *venerealis*. Isto pode ser explicado pela presença de uma camada "S", como componente mais externo do envelope celular (CORBEIL et al., 2003).

A presença desta camada “S” impede a fixação do componente C3b do complemento, não permitindo assim a ação deste. As IgA's, como não são boas opsoninas, atuam imobilizando estes microrganismos no muco cérvico-vaginal e limitam a entrada das bactérias no útero e na camada de muco, facilitando assim a expulsão do *C. fetus* subsp. *venerealis*, principalmente durante o estro (LAGE; LEITE, 2000).

Apesar de as fêmeas que não foram cobertas conseguirem debelar a infecção em 4 a 5 meses, ou seja, em torno de três cios após a infecção, em alguns animais a bactéria pode permanecer por meses na cérvix e, principalmente, na vagina, mesmo durante a gestação (LAGE; LEITE, 2000; GOMES; FERNANDES, 2006).

A infecção pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* também pode causar aborto entre o quarto e sexto mês de idade (DEKEYSER, 1986), sendo comprovado que este pode passar da vagina para o útero em qualquer momento da gestação (STOESSEL, 1982).

1.1.4 Diagnóstico

A Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) tem seu diagnóstico bastante dificultado pela baixa taxa de sobrevivência do agente fora do hospedeiro, sendo preciso um rápido espaço de tempo entre coleta e encaminhamento ao laboratório em meios específicos (CLARK; DUFTY, 1972; LANDER, 1990).

A coleta do material biológico dos machos pode ser realizada mediante a lavagem, aspiração ou raspado prepucial. Porém, o último procedimento apresenta os resultados mais satisfatórios devido à menor contaminação das amostras (OIE, 2008). Além disso, a realização de um repouso sexual de sete a quinze dias é recomendável para aumentar a quantidade do agente, resultando em um ganho na sensibilidade da cultura microbiológica (LAGE et al., 1997).

Outra alternativa, é a realização de três coletas consecutivas com um repouso sexual superior a 15 dias entre elas (PELLEGRIN et al., 1999). Nas fêmeas a coleta de muco cérvico-vaginal pode ser realizada por lavagem ou aspiração e raspagem (OIE, 2008).

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 coleta e transporte das amostras. Após a coleta, deve-se transportar rapidamente o material para o laboratório, sendo necessária a utilização de meios de transporte específicos com o

objetivo de manter a bactéria viável (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).

Em relação ao exame microbiológico, o meio de cultura que apresenta os melhores resultados é o ágar columbia acrescido de Skirrow®, um suplemento que devido a sua constituição com antibióticos como o sulfato de polimixina B, trimetoprim, vancomicina e cycloheximidina, permite uma menor contaminação por outras bactérias competitivas (OIE, 2008).

Na ausência de isolamento bacteriano, outros testes por meio de reações imunológicas, especialmente muco-aglutinação ou pelo teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) são utilizados para o diagnóstico da CGB, utilizando anticorpo monoclonal (COBO, 2004)

A utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) é outro método de diagnóstico utilizado e ao longo dos anos vem sendo aperfeiçoado. Atualmente este método é utilizado para 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 em tempo real apresentam uma maior rapidez e precisão em relação aos métodos tradicionais de diagnóstico. As técnicas moleculares permitem uma melhor padronização das reações, minimizando antigos erros de diagnóstico (SPENCE et al., 2013)

1.1.5 Prevenção e controle

Em relação às medidas prevenção, deve-se fazer a reposição de reprodutores velhos por animais jovens comprovadamente negativos (PELLEGRIN et al., 2002; ROJO-MONTEJO et al., 2008), evitar o acesso de touros procedentes de rebanhos vizinhos (JIMENEZ et al., 2011), evitar a prática de pastagens compartilhadas, 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 (MOLINA et al., 2013).

O controle da Campilobacteriose Genital Bovina em um rebanho pode ser realizado empregando-se algumas medidas básicas como: utilização da inseminação artificial; descarte dos touros infectados e realização de exames nos animais adquiridos (LEITE, 1997).

A utilização da inseminação artificial com sêmen atestado de animais negativos ou sêmen tratado com antibióticos deve ser utilizada como controle dessa enfermidade, sendo comprovadamente eficaz. Quando o uso da inseminação artificial não for possível, é indicado separar as novilhas das vacas e utilizar um touro virgem ou livre do agente com estas novilhas (LEITE, 1997).

Quando se trata de rebanho com manejo extensivo, com densidade populacional alta, a utilização da inseminação artificial e/ou repouso sexual são medidas de difícil implementação, trazendo problemas no controle. Nestes casos, a melhor estratégia a ser utilizada para o controle da doença é a vacinação (BONDURANT, 2005).

As vacinas com adjuvantes oleosos para campilobacteriose são utilizadas, pois produzem uma imunidade mais duradoura e é uma medida preventiva eficiente. A vacinação deve ser realizada em todos os animais com idade reprodutiva, a imunização deve ser realizada preferencialmente de 30 a 60 dias antes da estação de monta ou do período de cobertura dos animais (COBO et al., 2003). No mercado brasileiro a vacina comercial existente é Fertiguard Selenium Max®.

1.2 *Tritrichomonas foetus*

1.2.1 Etiologia

A classificação filogenética do *Tritrichomonas foetus* é baseada na organização microtubular do citoesqueleto que classifica como pertencente à classe Parabasalia, filo Metamonada e reino Protista (DACKS et al., 2008).

T. foetus é um protozoário móvel e vive em ambientes pobres de oxigênio, de aspecto piriforme ou ovóide, cujo tamanho varia entre 10 a 25µM de comprimento e 3 a 13µM de largura. Possui três flagelos anteriores e uma membrana ondulante que se estende pelo comprimento do corpo, terminando em um único flagelo posterior (SILVA, 2011).

O protozoário multiplica-se por divisão binária longitudinal, sendo sensível ao calor, raios ultravioletas e desinfetantes comuns, mas sobrevive ao congelamento. No meio ambiente o parasito sobrevive por poucos dias (CORDERO DEL CAMPILLO et al., 2007). Geralmente, *T. foetus* apresenta forma de trofozoíto, embora possa apresentar também forma de pseudocisto, que não tem motilidade em virtude da internalização dos flagelos. A transformação do parasito na forma trofozoíto para pseudocisto pode ocorrer quando se encontra em situações de estresse ou em decorrência da oscilação da temperatura (MARIANTE et al., 2004).

1.2.2 Epidemiologia

A Tricomonose genital bovina ocorre em todo o mundo, especialmente na Ásia (YANG et al., 2012), Austrália (MCCOOL et al., 1988), América do Sul (MANCEBO et al., 1995), Europa (MENDOZA-IBARRA et al., 2012,).

Em búfalos há um estudo realizado em 1992 de tricomonose na Índia e Egito (EAGLESOME, GARCIA, 1997). Na Argentina foi realizada uma pesquisa para determinar a prevalência da infecção por *T. foetus* em rebanho bubalinos, mas não foi diagnosticado nenhum animal positivo (JACOBO et al., 2007).

No Brasil, o primeiro estudo sobre a tricomonose em bovinos foi realizado em São Paulo, com prevalência de 8% (AMARAL et al., 1970). Em búfalos houve notificação

de tricomonose no estado de Minas Gerais no ano de 2009, com 9 áreas de focos, com 18 animais positivos (OIE, 2015).

A forma de transmissão do parasito é direta, seus hospedeiros definitivos são os bovinos e bubalinos, onde um macho ou fêmea infectada transmite o agente para um animal susceptível (CAMPERO; COBO, 2006). O parasito é transmitido durante a monta natural, os machos são os principais reservatórios do agente. O agente pode ser transmitido pela inseminação artificial com sêmen fresco ou congelado contaminado, isso ocorre devido a uma contaminação no sêmen no momento da coleta visto que, o agente se localiza na região prepucial (CAMPERO; COBO, 2006). A cadeia de transmissão é semelhante ao do *C. fetus* subesp. *venerealis*, conforme ilustra a figura 1.

A maior prevalência da infecção é observada em machos com idade superior a 5 anos, essa afirmação está associada ao fato de os animais mais velhos apresentarem maior profundidade das criptas da mucosa prepucial, o que favorece a instalação e permanência do *T. fetus*, devido às condições ideais de microaerofilia para o seu desenvolvimento. A presença de animais velhos constitui um dos principais fatores que favorecem a permanência do agente no rebanho (MARDONES et al., 2008).

Os principais fatores de risco relacionados à infecção por *Tritrichomonas foetus* são: utilização de monta natural no manejo reprodutivo (BONDURANT, 2005; CARVALHO; RAE; CREWS, 2006; RODRIGUES, 2006), cobertura com touros de idade superior a 5 anos (RAE; CREWS, 2006; MENDONZA-IBARRA et al., 2012), utilização do touro de repasse (CARVALHO; RODRIGUES, 2006; ROCHA et al., 2009; VIANA; ZANINI, 2009), compartilhamento de pastagens e empréstimo de reprodutores (MARDONES et al., 2008; ROJO-MONTEJO et al., 2008).

1.2.3 Patogenia e sinais clínicos

Os machos são considerados portadores assintomáticos do parasito e transmitem o agente por longos períodos (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009). Situa-se na cavidade prepucial e depois coloniza as criptas prepuciais, onde se estabiliza como uma infecção crônica assintomática (EAGLESOME; GARCIA, 1997).

Geralmente nas fêmeas o parasito está localizado no trato genital de forma ascendente, coloniza a vagina, colo do útero, útero e as tubas uterinas. Nas fêmeas o parasito multiplica-se na vagina e, posteriormente, localiza-se principalmente nas pregas

da cérvix. A infecção frequentemente induz a uma vaginite moderada com descarga mucopurulenta, uma endometrite discreta e infertilidade transitória, mas que pode progredir para salpingite e cervicite (IKEDA; BONDURANT; CORBEIL, 1995; BONDURANT, 2005).

Os protozoários são mais numerosos no início da infecção. A resposta inflamatória do útero ocorre entre 6 a 8 semanas após a infecção e, provavelmente, é responsável pela morte do embrião. A interrupção da gestação, geralmente se concentra nas primeiras semanas, podendo estender-se até o quinto mês. Algumas fêmeas não têm o útero invadido, apresentando gestação e partos normais (SKIRROW; BONDURANT, 1988).

Nas fêmeas a uma resposta inflamatória inicial, mediada principalmente pela atuação de neutrófilos, formando o que se chama de infecção precoce. A resposta imunológica ocorre principalmente após a 5ª semana com a produção de IgA e IgG. Neste período pode ocorrer morte e reabsorção embrionária. Já entre a 8ª e 11ª semana existe a elevação da taxa de IgA e IgG, podendo apresentar um aumento de IgA no muco vaginal por volta da 24ª e 25ª semanas (GAULT et al., 1995).

No entanto, quadro de endometrite grave e perda fetal pode ocorrer em 63-70 dias após a infecção (ANDERSON, 2007). Várias enzimas imunológicas estão associadas à infecção por *T. foetus*, incluindo neuraminidases, proteases, adesinas e citotocinas (SKIRROW; BONDURANT, 1988; SHINGH et al., 2004). Essas proteinases extracelulares exercem ação proteolítica sobre proteínas presentes em secreções do hospedeiro e que participam nos processos de absorção de ferro, aderência celular ou na imunidade adquirida (albumina, fibrinogênio, lactoferrina e imunoglobulinas G1, e G2) (SINGH et al., 2004; DA ROCHA et al., 2005).

As fêmeas podem desenvolver vaginite, cervicite e endometrite, que podem estar acompanhada por uma descarga mucopurulenta. Ocasionalmente observa-se piometra, que é detectada durante o exame de gestação. O evento mais frequente é a morte embrionária que ocorre com 50 ou mais dias após a concepção (QUIROZ, 1994).

Os casos de abortos passam despercebidos e a piometra ocorre em 10% das vacas infectadas. Em rebanhos com introdução recente do agente, observa-se repetição de cio, aumento do número de vacas vazias, diminuição dos índices de fertilidade e abortos que ocorrem geralmente nos primeiros meses de gestação (ROSSANIGO, 1998). Problemas relacionado a maceração fetal também podem ocorrer em caso de aborto onde não há expulsão do feto (FELLEISEN, 1999)

Em rebanhos nos quais a doença é enzoótica, as fêmeas infectadas com *T. foetus* manifestam cios após 60 dias dentro da estação de monta. Além disso, ocorre uma redução de 20 a 40% na taxa de prenhez (QUIROZ, 1994; REBHUN, 1999). Algumas vacas permanecem infectadas durante toda a gestação, e por até 9 semanas pós-parto, esses animais podem transmitir o agente a touros sadios (SKIRROW, 1987).

1.2.4 Diagnóstico

Para o sucesso no diagnóstico da tricomonose genital bovina é fundamental o cuidado com as condições de coleta, da agilidade no envio para o laboratório e com os meios e métodos de cultura utilizados com a finalidade de garantir a sobrevivência do *T. foetus* no transporte do campo para o laboratório (PELLEGRIN; LEITE, 2003; SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009).

As amostras de esmegma podem ser coletadas 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).

Nas fêmeas o lavado e a aspiração com pipeta são as técnicas mais utilizadas, obtendo uma boa quantidade de material com menores níveis de contaminação na aspiração. Para os machos é recomendado o repouso sexual de 15 dias para aumentar a sensibilidade do diagnóstico (PELLEGRIN; LEITE, 2003). Nas fêmeas o período recomendado para a coleta de material é uma semana antes até uma semana depois do estro, devido a maior quantidade de muco (PELLEGRIN; LEITE, 2003).

O exame direto tem uma sensibilidade de 30%, inferior ao cultivo que apresenta uma sensibilidade entre 87 a 97% com o emprego do meio de Diamond (MUKHUFHI et al., 2003). Um único teste pode ser adequado para o diagnóstico de rebanho quando um ou mais touros estão infectados, mas para exame individual de um touro, três exames negativos são necessários para assegurar que o animal não esteja infectado com *T. foetus* (ORTEGA-MORA; PEREIRA BUENO; ROJO-VASQUEZ, 1996).

No laboratório, é realizado o cultivo em meios seletivos e incubado a 37°C em tubos em posição vertical para que ocorra a deposição dos *T. foetus* no fundo, em meios como: Lactopep (LOPES et al., 1995); Tioglicolato e Diamond (MENDONZA-IBARRA et al., 2012; OIE, 2012).

As culturas são examinadas microscopicamente em intervalos de 24, 48 e 72 horas de incubação e os parasitos podem ser visualizados em microscópio óptico (400x), sendo reconhecidos pelas suas características morfológicas, ou seja, presença de três flagelos anteriores, membrana ondulante e movimentos no sentido anti-horário (MUKHUFHI et al., 2003; MUTTO; GIAMBIAGGI; ANGEL, 2006; CLAVIJO et al., 2011).

Apesar de ser considerado como teste padrão para o diagnóstico da Tricomose genital bovina (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). Devido à contaminação dos meios, buscou-se o desenvolvimento e padronização de métodos de diagnósticos mais precisos como a PCR (MUTTO, 2006).

Essa técnica de diagnóstico é considerada mais rápida e prática, quando comparada 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 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).

1.2.5 Prevenção e controle e prevenção

O desenvolvimento de vacinas na área reprodutiva é complexo, ainda que estrategicamente importante para melhorar o controle das enfermidades venéreas. A falta de identificação dos antígenos específicos nas vacinas existentes e o alto custo dos testes de eficácia são entres para o desenvolvimento (COBO et al., 2004). Trichguard®, Trichguard Plus®, Trichguard V5L® (Fort Dodge Animal Health) são exemplos de vacinas contra *T. foetus* existentes no mercado, embora ainda não disponíveis no Brasil (ALVES et al., 2011).

As medidas adotadas no controle da tricomonose genital bovina devem levar em consideração o fato de ser uma doença de transmissão venérea, os touros serem portadores permanentes do parasito e as fêmeas infectadas podem obter imunidade a partir da 5ª semana após a infecção (GAULT et al., 1995). Em rebanhos infectados é recomendado o descarte de reprodutores e substituição por reprodutores jovens, se possível virgens (MARDONES et al., 2008).

Em função desses aspectos, a eliminação dos touros infectados, a introdução de inseminação artificial (IA), adoção de uma estação de monta e o repouso sexual das fêmeas por 90 dias são as principais medidas de controle da tricomonose bovina. Medidas mais restritivas devem avaliar a possibilidade de adoção da IA com a eliminação de todos os touros da propriedade. Caso haja interesse em manter os reprodutores, eles devem ser examinados periodicamente e sempre que possível, fazer a reposição destes animais por touros virgens (ORTEGA-MORA; PEREIRA BUENO; ROJO-VASQUEZ, 1996).

2. REFERÊNCIAS

ALVES, T.M.; STYNEN, A.P.R.; MIRANDA, K.L.; LAGE, A.P. 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.

BASTIANETTO, E., Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva, **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n.6, p.98-103, 2009. Disponível em <www.cbra.org.br> acesso em outubro de 2015.

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 of North America: Food Animal Practice**, v.21, n.2, p.383-408, 2005.

BORGHESE A., Buffalo Production and Research. FAO Ed. REU, **Technical Series**, v.67, p.43-48, 2005.

BROOKS B.W., ROBERTSON R.H., LUTZE-WALLACE C.L.; PFAHLER W. Monoclonal antibodies specific for *Campylobacter fetus* lipopolysaccharides. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.37-49, 2002.

BROOKS, B.W.; DEVENISH, J.; LUTZEWALLACE, C.L. et al. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of

Campylobacter fetus in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. **Veterinary Microbiology**, v.103, n.1-2, p.77-84, 2004.

CAMPANILE, G.; BALESTRIERI, M.L. Interactions of environmental factors for better production in buffaloes. In: **Simpósio de Búfalo das Américas**, 1, 2002, Belém, PA. SBA, 2002.

CAMPERO C, COBO E. *Tritrichomonas foetus*: patogénesis de la mortalidad embrionaria/fetal, caracterización de antígenos vacúnales y respuesta inmune inducida. **Revue Médecine Veterinaire**, v.87, p.47-56, 2006.

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

CLARK, B. L. & DUFTY, B.V. A method for maintaining the viability of *Vibrio fetus* var. *venerealis* in samples of prepuccial secretion collected from carrier bulls. **Aust. Veterinary Journal.**, v.48, p.462-464, 1972.

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., MORSELLA, C., CANO D., CIPOLLA, A., CAMPERO, C. M. Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes, **Theriogenology**, v.62, p.1367–1382, 2004

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. 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. Vaccines against sexually transmitted diseases. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-6, 2003.

CORDERO DEL CAMPILLO. M.; ROJO VÁSQUEZ. F.; MARTÍNEZ FERNÁNDEZ. A.; **Parasitología general**. McGraw-Hill. p. 363-365, 2007

DA ROCHA. B.; DE MELO-BRAGA. M.; SILVA. F. Intra-strain clonal phenotypic variation of *Tritrichomonas foetus* is related to the cytotoxicity exerted by the parasite to cultured cells, **Parasitology Research**, v.9, p.106–112, 2005

DACKS, J.B.; WALKER, G.; FIELD, M.C. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. **Parasitology International**, v.57, n.2, p.97-104, 2008.

DÁPICE, M. Ocorrência de aborto bovino no Estado de São Paulo. **Biológico.**, v.22, p.15-18, 1956.

DEKEYSER, P.J. Bovine genital campylobacteriosis. In: MORROW, D.A, (Ed.) Current therapy, **Theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p.263-266, 1986.

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.

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.

FÓSCOLO, C. B.; PELLEGRIN, A. O.; STYNEN, A. P. R.; CARNEIRO, R. L. R.; LAGE, A. P. Uso Terapêutico da Vacinação Contra a Campilobacteriose Genital Bovina em Touros do Pantanal, **Documento Embrapa Corumbá**, Dezembro de 2007, Disponível em <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT75.pdf>> . Acesso em Janeiro de 2016.

FREITAS, P. F. A.; SAQUY, A C. S.; DINIZ, E. G., Pesquisa de campilobacteriose genital bovina em touros do triângulo mineiro, **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.12, n.2, p.123, set. 2006

GARCIA, M.M.; RUCKERBAUER, G.M.; EAGLESOME, M.D.; BOISCLAIR, W.E. Detection of *Campylobacter fetus* in artificial insemination bulls with a transport enrichment medium. **Canadian Journal of Comparative Medicine.**, v.47, p.336-340, 1983.

GAULT, R.A., KVASNICKA, W.G., HANKS, D., HANKS, M., HALL, M.R. Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculated with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. **American Journal of Veterinary Research.**, v.56, p.454-459, 1995.

GENOVEZ, M.E. **Campilobacteriose Genital Bovina**. In: Simpósio Pfizer sobre doenças infecciosas e vacinas para bovinos, 2. Caxambu, Anais, Belo Horizonte, MG, p.49-53, 1997

GOMES, M. J. P.; FERNANDES, J. C. T.; **Campilobacteriose Genital Bovina**. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Setor de Bacteriologia da Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre –RS, 2006; Disponível no site: <<http://www.ufrgs.br>>, acessado em setembro de 2015.

GROFF, A. C. M.; VAGAS, A. C.; **Padronização da técnica da PCR para o diagnóstico da campilobacteriose genital bovina, 2005**. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2005

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.

HIRSH, D.C. Campylobacter-Arcobacter (Reproductive tract). In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary microbiology**. Malden: Blackwell Science, p.192-195, 1999.

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.

IBGE, **Instituto Brasileiro de geografia e estatística**, Disponível em: http://www.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2014/ppm2014.pdf. Acesso em: 10 de junho 2015

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.

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

JACOBO, R.A.; STORANI, C.A.; CIPOLINI, M.F.; MARTÍNEZ, D.E.; MARTÍNEZ, E.I.; CARDOZO, R.O, Resultados preliminares del diagnóstico de campylobacteriosis y

trichomonosis en búfalos del nordeste Argentino, Enfermedades venéreas en búfalos. **Revista. Veterinária**, v.18, n.2, p.130–132, 2007

JESUS, V.L. et al. Campilobacteriose Genital Bovina: ocorrência nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.6, n.3, p.133-136, 1999.

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.

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

LAGE, A.P.; GODFROID, E.; FAUCONNIER, A. et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2752-2756, 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. & BATIANETTO E. **Doenças infecciosas em búfalos**. 2009. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7665/5438>. Acessado em: 11 agos 2015.

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

LPSN, List of prokaryotic names with standing in nomenclature, 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>>. Acesso em: janeiro 2016

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.

MANCERO, O. A.; RUSSO, A. M.; CARABAJAL, L. L.; MONZON, C. M. Persistence of *Tritrichomonas foetus* in naturally infected cows and heifers in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.59, p.7–11, 1995.

MARDONES, F.O.; PEREZ, A.M., MARTÍNEZ A.; CARPENTER, T.E. 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.

MARIANTE, R.M.; LOPES, L.C.; BENCHIMOL, M. *Tritrichomonas foetus* pseudocysts adhere to vaginal epithelial cells in a contact-dependent manner. **Parasitology Research**, v.92, p.303–312, 2004.

MCCOOL, C. J.; TOWNSEND, M. P.; WOLFE, S. G.; SIMPSON, M. A.; OLM, T. C.; JAYAWARDHANA, G. A.; CARNEY, J. V. Prevalence of bovine venereal disease in the Victoria River District of the Northern Territory: likely economic effects and practicable control measures. **Australian Veterinary Journal**. v.65, p.153–156, 1988.

MENDOZA-IBARRA, J. A.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; GARCÍA-PEÑA, F. J.; ROJO-MONTEJO, S.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; SAN MIGUEL-IBÁÑEZ, E.;

NAVARRO-LOZANO, V.; ORTEGA-MORA, L. M.; OSORO, K.; COLLANTES-FERNANDEZ, E. 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.

MODI, L.C.; PATEL, P.A.; PATEL, S.P.; JOSHI, A.H.; SUTHAR, D.N. **Prevalência de problemas reprodutivos em búfalos em Mehsana Milk-Shed área de Gujarat. I** JAVMS, v. 5, p. 424-428, 2011.

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.

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.

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.

OHASHI, O.; MIRANDA, M. S.; SANTOS, S. D.; CORDEIRO, M. S.; COSTA, N. N.; SILVA, T. V. Distúrbios reprodutivos do rebanho bubalino nacional, **Ciência Animal**, v.22, n1, p.171-187, 2012.

OLIVEIRA, J. M. B.; et al. Prevalence and risk factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil, **Tropical Animal Health and Production**. v. 47, n. 2, fevereiro de 2015.

ON, S. L. W. Isolation, identification and subtyping of Campylobacter: where to from here? **Journal of Microbiological Methods**, v.95, n.1, p.3-7, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL – OIE, **Bovine Genital Campylobacteriosis**, Terrestrial Manual, p 661 – 670, 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso outubro 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL - OIE. Terrestrial Manual: Trichomonosis, 2012. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso dezembro 2015.

ORTEGA-MORA, L.M.; PEREIRA BUENO, J.; ROJO-VASQUEZ, F. A. Tricomonosis bovina genital bovina (I). **Medicina. Veterinária.**, v.13, p.7-13, 1996.

OYHENART, J. et al. Loop mediated isothermal amplification of 5.8S rDNA for specific detection of *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Parasitology**, 2012.

PELLEGRIN, A.O. A Campilobacteriose e Tricomonose são doenças reemergentes? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.4, p.479-566, 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**. Embrapa Mato Grosso do Sul. 22p, 2003.

PENNER, J. L. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, n.2, p.157-72, 1988.

QUIROZ. H. **Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos.** Noriega editores. p. 96-102, 1994

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

REBHUN.W. **Enfermedades del Ganado vacuno lechero.** Editorial Acribia. p.440-441, 1999.

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.

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.

ROSSANIGO. C. **Las enfermedades venéreas en los rodeos de cría; prevalencia, diagnóstico y control Oeste Ganadero**, v.1, n.2, p.22-24, 1998

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.

SERRANO,G.; VARGAS DIAZ,M.; CLAVIJO,A.. Campylobacteriosis (Vibriosis) en rodeos bubalinos de Venezuela. **Veterinária Tropical**, v.8, p.95-111, 1984.

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.

SILVA, M.S.T.; JUNIOR, J.B.L.; MIRANDA, H.A. **Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF.** Pará, agosto de 2003.

SILVA, N. S.; MACHADO, S. M; SILVA FILHO, F. C.; PACHECO-SOARES, C. Basic biological aspects of *Tritrichomonas foetus* of relevance to the treatment of bovines suffering of trichomoniasis, **Open Journal of Animal Sciences**, v.1, p.112-120, 2011. Disponível em: <http://www.scirp.org/journal/OJAS/>. Acesso em: 11 agosto 2015

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.

SKIRROW S.Z.; BONDURANT R.H. Bovine trichomoniasis. **Veterinary Bulletin**, v.58, n.8, p.591-603, 1988.

SKIRROW, S. Identification of trichomonad-carrier cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, p.553-554, 1987.

SMIBERT, R. M. The genus *Campylobacter*. **Annual Review of Microbiology**, v.32, n.1, p.673-709, 1978.

SPENCE, R.P. et al. Cross-reaction of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time PCR. **The Veterinary Record**, v.23, p.10-18, 2013.

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

STOESSEL, F. **Las enfermedades venereas de los bovinos: Trichomoniasis y vibriosis genital**. Zaragoza Acribia, 163 p. 1982.

THOMPSON, S.A; CLAVIJO BLASER, M.J. **Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infectivos**. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. *Campylobacter*. 2. ed. Washington: ASM,. p.321-347, 2000.

VANDAMME P., “**Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*,**” in ***Campylobacter***, eds Namchamkin I., Blaser M. J., editors. Washington, p. 3–27, 2000.

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.; CUI, X.; QIAN, W.; YU, S.; LIU, Q. Survey of nine abortifacient infectious agents in aborted bovine fetuses from dairy farms in Beijing, China, by PCR. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.60, p.83-92, 2012.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

**OCORRÊNCIA DA INFECCÃO POR *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e
Tritrichomonas foetus EM BÚFALOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO,
BRASIL**

(Artigo a ser encaminhado ao periódico *The Veterinary Journal*)

1 **Ocorrência da infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas***
2 ***foetus* em búfalos no estado de Pernambuco, Brasil**

3
4 **RESUMO**

5 Objetivou-se com este estudo determinar a ocorrência da infecção por *Campylobacter*
6 *foetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* em búfalos no Estado de Pernambuco,
7 Brasil. Foram coletadas 133 amostras biológicas (muco cérvico-vaginal e raspado
8 prepucial) de animais, procedentes de 8 propriedades, de diferentes regiões do estado. O
9 material biológico coletado foi transferido para solução salina tamponada (PBS), e
10 posteriormente inoculado em meios de transporte específicos, Lander para diagnóstico
11 de *C. fetus* subsp. *venerealis* e Diamond para *T. foetus*. Para o diagnóstico das infecções
12 por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* as amostras foram
13 submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e cultivadas em meio ágar
14 Columbia acrescido de antibiótico e Diamond, respectivamente. Para pesquisa de *C.*
15 *foetus* subsp. *venerealis*, observou-se uma ocorrência de 1,8% (2/113; I.C. 0,2 – 6,2%) de
16 animais positivos no exame microbiológico com confirmação pela PCR. Em relação à
17 procedência, observou-se que 100% das amostras positivas pertenciam a dois machos
18 do mesmo rebanho. Nenhum animal foi positivo na pesquisa de *T. foetus*. Este é o
19 primeiro registro da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em búfalos no Brasil.
20 Apesar da baixa ocorrência recomenda-se que medidas de controle sejam adotadas, com
21 o intuito de evitar a disseminação do agente para outros rebanhos.

22
23 *Palavras-chaves:* *Bubalus bubalis*, Campilobacteriose Genital Bovina, Tricomonose
24 Genital Bovina.

25

26 **Introdução**

27

28 *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* são agentes
29 causadores da campilobacteriose genital bovina (CGB) e tricomonose genital bovina
30 (TGB), respectivamente (Givens, 2006). Esses patógenos podem ocasionar perdas
31 reprodutivas e conseqüentemente prejuízos para o setor pecuário (Junqueira e Alfieri,
32 2006).

33 Estudos epidemiológicos indicam a ocorrência de CGB em rebanhos bubalinos
34 (Serrano et al., 1984; Jacobo et al., 2007; Cipolini et al., 2009). Em relação à TGB
35 existem poucos relatos na literatura, na Argentina foi realizado um estudo com 151
36 búfalos, mas não foi detectada a presença de *T foetus* no rebanho bubalino (Jacobo et
37 al., 2007).

38 A forma de transmissão do *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e
39 *Tritrichomonas foetus* é direta, onde o macho infectado transmite o agente pela monta
40 natural para as fêmeas susceptíveis (Bondurant, 2005; Carvalho e Rodrigues, 2006;
41 Alves et al., 2011). As fêmeas infectadas podem transmitir o agente para outro macho
42 susceptível completando assim a cadeia de transmissão (Garcia et al., 1983; Pellegrin,
43 2002; Campero e Cobo, 2006). É importante destacar que a inseminação artificial com
44 sêmen contaminado e fômites contaminados utilizados durante a inseminação artificial,
45 podem infectar as fêmeas (Eaglesome e Garcia, 1997; Campero e Cobo, 2006).

46 Os machos são considerados como reservatórios, não apresentam sinais clínicos e
47 transmitem o agente por longos períodos (Gomes e Fernandes, 2006; Spósito Filha e
48 Oliveira, 2009). Os agentes situam-se na cavidade prepucial e depois colonizam as

49 criptas prepuciais, onde se estabilizam determinando uma infecção crônica
50 assintomática (Eaglesome e Garcia, 1997; Lage e Leite, 2000).

51 Nas fêmeas, os agentes colonizam a mucosa genital, principalmente vagina e útero e
52 provocam lesões como a vaginite moderada com descarga mucopurulenta, uma
53 endometrite discreta e infertilidade transitória, mas que pode progredir para salpingite e
54 cervicite podendo levar a interrupção da gestação e aborto (Pellegrin et al., 1999,
55 Mardones et al., 2008; Cobo et al., 2011). Na TGB pode ocorrer em alguns casos
56 maceração fetal e piometra (Felleisen, 1999).

57 Considerando que estes agentes podem ocasionar perdas reprodutivas na espécie
58 bubalina e que poucas pesquisas foram realizadas com essa espécie, objetiva-se com
59 este estudo determinar a ocorrência da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus*
60 em búfalos no estado de Pernambuco, Brasil.

61

62 **Materiais e métodos**

63

64 A realização da pesquisa foi aprovada na Comissão de Ética em Uso de Animais
65 (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco com a licença número
66 043/2015.

67

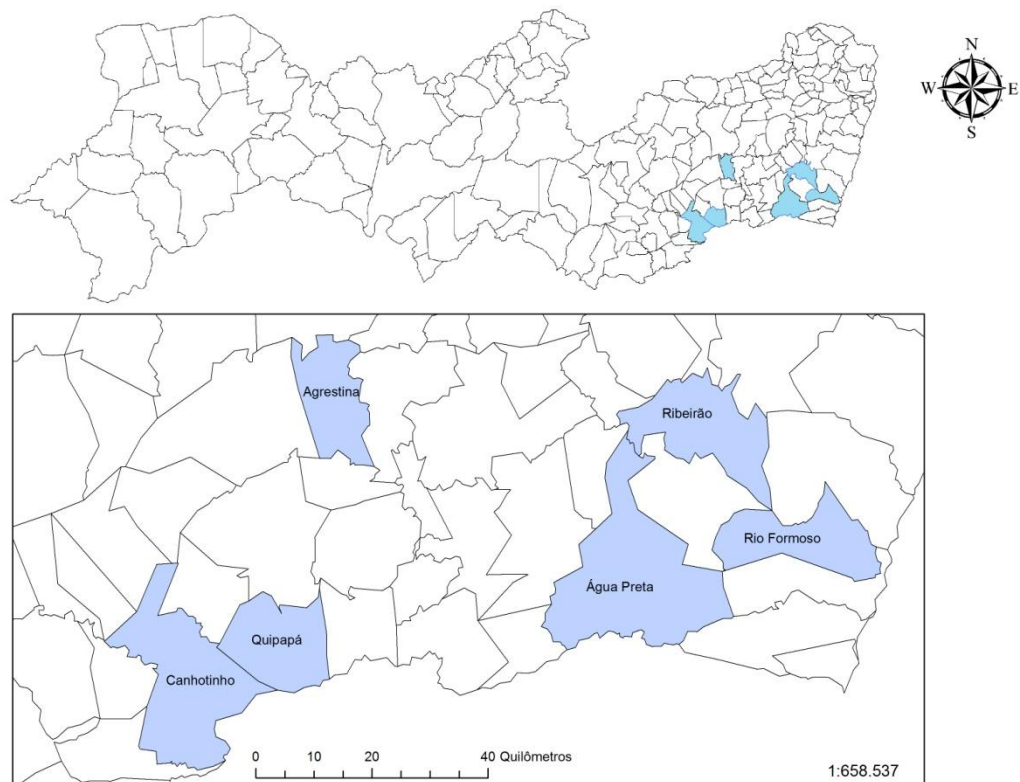
68 *Amostragem e área de estudo*

69 Para determinar a amostragem para o estudo de ocorrência foi considerada uma
70 população de 9.200 búfalos no estado de Pernambuco (IBGE, 2014) e uma prevalência
71 esperada de 1,8% para *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e 6,6% para
72 *Tritrichomonas foetus* em bovinos no estado de Pernambuco (Oliveira et al., 2015), com

73 intervalo de confiança de 95% e erro estatístico de 5%. Com este parâmetro foi
74 determinada uma amostragem mínima de 33 bubalinos para pesquisa de *C. fetus* subsp.
75 *venerealis* e 100 bubalinos para *T. foetus*.

76 A escolha das propriedades foi realizada por conveniência não probabilística. Nas
77 propriedades foram coletadas amostras de machos e fêmeas em idade reprodutiva, com
78 repouso sexual de no mínimo 7 dias.

79 Para a pesquisa foram coletadas amostras biológicas de 113 animais, sendo 106
80 fêmeas e 7 machos, procedentes de 8 propriedades localizadas em 6 municípios de
81 diferentes regiões do Estado de Pernambuco, sendo Zona da Mata Sul (5) e no Agreste
82 (3) (Figura 2).



83
84 Figura 2 – Área do estudo, propriedades localizadas no Agreste e Zona da Mata de
85 Pernambuco.
86

87 *Coleta das amostras*

88 Para coleta do material biológico nos machos foi realizada a contenção, em seguida
89 o corte dos pelos do óstio prepucial e limpeza com álcool 70° e secagem com papel
90 toalha. A coleta foi realizada pela técnica de raspagem do prepúcio utilizando
91 raspadores específicos.

92 Nas fêmeas foi realizada a limpeza da região vulvar com álcool 70° e secagem com
93 papel toalha, para a coleta do muco cérvico-vaginal, utilizou-se pipetas de infusão
94 acopladas a seringas de 20 mL esterilizadas.

95 Após a coleta, o esmegma e muco cérvico-vaginal foram colocados em tubos tipo
96 falcon esterilizado com 5mL de solução salina tamponada (PBS), pH 7,0.
97 Posteriormente, as amostras foram transferidas em um volume de 1mL do PBS, para os
98 meios de transporte específicos, sendo Lander para diagnóstico de *C. fetus* subsp.
99 *venerealis* e Diamond para *T. foetus*.

100

101 *Cultivo de Campylobacter fetus subsp. venerealis*

102 Para o cultivo de *C. fetus* subsp. as amostras no meio Lander foram incubadas em
103 jarras de microaerofilia a 37°C em estufa microbiológica por 72h.

104 Após esse período as amostras do meio Lander foram semeadas em ágar columbia
105 (Difco®), adicionado de 7% de sangue equino desfibrinado e suplemento seletivo
106 Skirrow (Merck®), sendo incubadas novamente em jarras de microaerofilia por até 72
107 horas. Neste período foram realizadas leituras das placas com 24, 48 e 72 horas, para
108 observação do crescimento bacteriano, identificação e análise das características
109 fenotípicas das colônias. Para análise das características morfo-tintoriais foi realizada a
110 coloração de Gram (Quinn et al., 2005). As colônias suspeitas foram submetidas à
111 Reação em Cadeia da Polimerase.

112

113 *Cultivo de Tritrichomonas foetus*

114 Para o cultivo de *Tritrichomonas foetus*, as amostras no meio Diamond foram
115 incubadas em estufa microbiológica a 37° C, realizando-se leituras nos intervalos de 24,
116 48, 72 horas.

117 Para a leitura, as lâminas foram preparadas retirando-se alíquotas de 40µL, após
118 homogeneização das amostras, para identificação do agente em microscópio de
119 contraste de fase com aumento de 400X (Jacobo et al., 2007).

120

121 *Extração de DNA e PCR para Campylobacter fetus subsp. venerealis e Tritrichomonas*
122 *foetus*

123 A extração de DNA foi realizada a partir do PBS coletado utilizando o kit comercial
124 “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega®), de acordo com o protocolo do
125 fabricante. Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação do material
126 genômico para *C. fetus subsp. venerealis* foi realizada com os oligonucleotídeos VenSF
127 (5“CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT3”) e VenSR
128 (5“GCTTTTGAGATAACAAT- 88 AAGAGCTT3”) de acordo com o protocolo
129 estabelecido por Hum et al. (1997).

130 Para *T. foetus*, utilizou-se os oligonucleotídeos TFR3
131 (5“CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC3”) e TFR4
132 (5“CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA3”) de acordo com o protocolo
133 estabelecido por Felleisen (1997). Para toda reação foram utilizados controles positivos
134 e negativos. O produto amplificado foi detectado por eletroforese em gel de agarose a
135 2%, corado com Blue Green (LGCbio), visualizados com a utilização de luz ultravioleta
136 e fotodocumentado.

137

138 **Resultados**

139

140 Para pesquisa de *C. fetus* subsp. *venerealis*, observou-se uma ocorrência de 1,8%
141 (2/113; I.C. 0,2 – 6,2%) de animais positivos no exame microbiológico com
142 confirmação pela PCR. Em relação à procedência, observou-se que 100% das amostras
143 positivas pertenciam a 2 (dois) machos do mesmo rebanho. Nenhum animal foi positivo
144 para *T. foetus*.

145

146 **Discussão**

147

148 Este é o primeiro registro da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em búfalos no
149 Brasil. Em bubalinos a prevalência relatada em outros estudos varia de 0,6% a 17%
150 (Serrano et al., 1984; Modulo et al., 1997; Jacobo et al., 2007; Cipolini et al. 2009).
151 Essa variação pode ser decorrente do delineamento amostral, dos meios de cultivo
152 utilizados para o transporte do material biológico, das técnicas utilizadas para o
153 diagnóstico e dos diferentes tipos de manejo higiênico-sanitário e reprodutivo adotados
154 nas propriedades.

155 A ocorrência observada neste estudo é baixa, quando comparada a estudos
156 realizados com a espécie bovina no Brasil, visto que a média de prevalência encontrada
157 é 31,2% (Pellegrin et al., 2002; Stynen et al, 2003; Rocha et al., 2009; Leal et al., 2012).
158 Entretanto, Oliveira et al. (2015) determinaram uma prevalência de 1,8% (7/333) para
159 infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em fêmeas bovinas no estado de Pernambuco.
160 Desta forma, acredita-se que a prevalência para esta infecção nos rebanhos bovinos e
161 bubalinos do estado de Pernambuco, seja realmente baixa.

162 Apesar da ocorrência ser considerada baixa, destaca-se que os animais podem servir
163 como disseminadores do agente dentro do rebanho e também para outros rebanhos,
164 visto que é comum na região o empréstimo de animais e a compra e venda de animais
165 sem o devido controle sanitário. Neste estudo não foi detectada a ocorrência da infecção
166 por *C. fetus* subsp. *venerealis* em fêmeas. É importante ressaltar que na única
167 propriedade que foram diagnosticados os machos positivo para ocorrência deste agente
168 não foi possível realizar a coleta de muco cérvico-vaginal, visto que as fêmeas deste
169 rebanho estavam na fase final de gestação.

170 Destaca-se que a forma de transmissão do agente é direta, onde o macho infectado
171 transmite o agente pela monta natural para as fêmeas susceptíveis (Alves et al., 2011).
172 Alguns fatores relacionados à epidemiologia da doença são diferenciados de acordo
173 com o sexo, visto que os machos são considerados como reservatórios por não
174 apresentarem sinais clínicos. Observa-se uma maior frequência da infecção por este
175 patógeno nos touros mais velhos em função do aumento do tamanho e do número das
176 criptas no epitélio do prepúcio (Dekeyser, 1986; Pellegrin, 2002).

177 Apesar de não ter sido diagnosticada fêmeas positivas neste estudo, deve-se
178 levar em consideração que as fêmeas infectadas podem transmitir o agente para outro
179 macho susceptível completando assim a cadeia de transmissão do *C. fetus* subsp.
180 *venerealis* (Alves et al., 2011). Desta forma, se faz necessário um acompanhamento nos
181 índices reprodutivos dos rebanhos bubalinos, uma vez que este agente pode ocasionar
182 perdas reprodutivas, tais como: infertilidade temporária, retorno ao cio, salpingite e
183 aborto (Lage e Leite, 2000, Cobo et al., 2011).

184 Durante as coletas observou-se algumas particularidades no manejo higiênico-
185 sanitário e reprodutivo dos rebanhos que favorecem a disseminação do *C. fetus* subsp.
186 *venerealis*, tais como: compra de animais de outras propriedades sem atestado sanitário,

187 utilização de monta natural, ausência de estação de monta. Os fatores de risco
188 associados à CGB são prática de empréstimo de reprodutores para a cobertura de vacas
189 em diferentes rebanhos (Mardones et al., 2008); acesso de reprodutores procedentes de
190 outras propriedades ao rebanho e o uso de pastagens compartilhadas (Rojo-Montejo et
191 al., 2008; Jimenez et al., 2011); aquisição de animais de rebanhos onde não se tenha o
192 conhecimento do *status* sanitário (Mai et al., 2013), e rebanhos acima de 100 animais
193 (Oliveira et al., 2015).

194 Neste estudo não foi possível identificar a ocorrência da infecção por *T. foetus*.
195 Resultado semelhante ao estudo conduzido por Jacobo et al. (2007) em búfalos na
196 Argentina. Estudos com um maior número de rebanhos devem ser realizados, visto que
197 a TGB em búfalos já foi notificada a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) no
198 estado de Minas Gerais, Brasil, em 2009 (OIE, 2015).

199 A CGB e TGB são enfermidades pouco conhecidas pelos médicos veterinários que
200 atuam a campo e este fato associado à ausência de uma rede de laboratórios veterinários
201 aptos a realizarem o diagnóstico de forma padronizada, dificulta determinar a real
202 prevalência dessas infecções.

203 O controle das enfermidades deve ser realizado mediante a identificação dos fatores
204 de risco. Desta forma, recomenda-se a eliminação dos touros infectados, a introdução de
205 inseminação artificial (IA), adoção de uma estação de monta e o repouso sexual das
206 fêmeas por 90 dias e o monitoramento dos rebanhos mediante a realização rotineira do
207 diagnóstico das enfermidades também podem contribuir com o controle; (Pellegrin et
208 al., 2002; Spósito Filha; Oliveira, 2009; Molina et al., 2013).

209

210 **Conclusão**

211 Este é o primeiro registro da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em búfalos no
212 Brasil. Apesar da baixa ocorrência recomenda-se que medidas de controle sejam
213 adotadas, com o intuito de evitar a disseminação do agente para outros rebanhos.

214 **Referências**

215

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

219

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

223

224 Campero C, Cobo E., 2006 *Tritrichomonas foetus*: patogénesis de la mortalidad
225 embrionaria/fetal, caracterización de antígenos vacunales y respuesta inmune
226 inducida. Revue Médecine Veterinaire, Bs As Argentina; 87: 47-56.

227

228 Carvalho, D.V.; Rodrigues, A.F.S.F., 2006. *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller,1928)
229 (Protista, Trichomonadidae) e a implicação na pecuária do Brasil. CES Revista,
230 6, 113-132.

231

232 Cipolini, M.F.; Jácomo, R.A.; Storani, C.A.; Martínez, D.E.; Martínez, E.I., 2009.
233 Campylobacteriosis en hembras bubalinas, Campylobacteriosis en búfalas.
234 Revisit Veterinary. 20(2), 130–131.

235

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

238

239 Dekeyser, P.J., 1986. Bovine genital campilobacteriosis. In: MORROW, D.A, (Ed.)
240 Current therapy, Theriogenology. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company,
241 p. 263-266.

242

243 Eaglesome, M.D.; Garcia, M.M., 1997. Disease risks to animal health from artificial
244 insemination with bovine semen. Revue Scientifique Technique, 16(1), 215-225.

245

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

249

250 Felleisen, R.S.J.,1999. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas*
251 *foetus*. Microbes and Infection, 1, 807-816.

252

253 Garcia, M.M.; Ruckerbauer, G.M.; Eaglesome, M.D.; Boisclair, W.E., 1983. Detection
254 of *Campylobacter fetus* in artificial insemination bulls with a transport
255 enrichment medium. Canadian Journal of Comparative Medicine., 47, 336-340.

256

257 Givens, M.D., 2006. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of
258 infertility in beef cattle. Theriogenology, 66, 648-654.

259

- 260 Gomes, M. J. P.; Fernandes, J. C. T., 2006. Campilobacteriose Genital Bovina.
261 Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Setor de Bacteriologia da
262 Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre –RS.
263
- 264 Hum S1, Quinn K, Brunner J, On SL., 1997. Evaluation of a PCR assay for
265 identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. Australian
266 Veterinary Journal, 75(11), 827-831.
267
- 268 IBGE, Instituto Brasileiro de geografia e estatística, 2014. Produção Pecuária.
269 Disponível em:
270 [http://www.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/20](http://www.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2014/ppm2014.pdf)
271 [14/ppm2014.pdf](http://www.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2014/ppm2014.pdf).
272
- 273 Jacobo, R.A.; Storani, C.A.; Cipolini, M.F.; Martínez, D.E.; Martínez, E.I.; Cardozo,
274 R.O., 2007. Resultados preliminares del diagnóstico de campylobacteriosis y
275 trichomonosis en búfalos del nordeste Argentino, Enfermedades venéreas en
276 búfalos. Revista. Veterinária, 18(2), 130–132.
277
- 278 Jimenez D.F.; Perez A.M.; Carpenter T.E.; Martinez A., 2011. Factors associated with
279 infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires,
280 Argentina. Preventive Veterinary Medicine, 101, 157-162.
281
- 282 Junqueira, J.R.C.; Alfieri, A.A., 2006. Reproductive failures in beef cattle breeding
283 herds with emphasis for infectious causes. Ciências Agrárias, 27(2), 289-298.
284
- 285 Lage, A.P.; Leite, R.C., 2000. Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). Pecuária de
286 Corte, 10, 50-54.
287
- 288 Leal, D.R., Fernandes, G.O., Gouveia, F.F., Miranda, K.L. and Neves, J.P., 2012.
289 Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito
290 Federal e em seu entorno. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 36(4), 256-
291 -259.
292
- 293 Mai, H.M.; Irons, P.C.; Kabir, J.; Thompson, P.N., 2013. Herd-level risk factors for
294 *Campylobacter fetus* infection, *Brucella* seropositivity and within-herd
295 seroprevalence of brucellosis in cattle in northern Nigeria. Preventive Veterinary
296 Medicine, 111, 256-267.
297
- 298 Mardones, F.O., Perez, A.M., Martínez A., Carpenter, T.E., 2008. Risk factors
299 associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of
300 Buenos Aires, Argentina, Veterinary Parasitology, 153, 231–237.
301
- 302 Modulo, J.R., W. Bisping, C.A.M. Lopes, A.F. Gottschalk and C.D. Fava. 1997.
303 Characterization of *Campylobacter* in genitals of buffalo bulls. Indian J. Anim.
304 Sci., 67: 682-683
305
- 306 Molina, L.; Perea, J.; Meglia, G.; Angón, E.; García, A., 2013. Spatial and temporal
307 epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in
308 La Pampa province (Argentina). Preventive Veterinary Medicine, 110, 388-394.
309

- 310 OIE – Organização Mundial de Saúde Animal, 2014. Bovine Genital.
311 Campylobacteriosis Terrestrial Manual. 201, 661 – 670.
312
- 313 OIE – Organização Mundial de Saúde Animal, 2015. Disponível em <
314 http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/diseasehome>
315 acesso junho de 2016
316
- 317 Oliveira, J.M.; Da Silva, G. M.; Batista Filho, A.F.; Borges, J.M.; Oliveira, P.R.;
318 Brandespim, D.F.; Mota, R.A.; Pinheiro Jr, J.W., 2015. Prevalence and risk
319 factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine
320 trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil. Tropical Animal Health and
321 Production. 47(2), 549-555.
322
- 323 Pellegrin, A.O., 1999. A Campilobacteriose e Tricomonose são doenças reemergentes?
324 Revista Brasileira de Reprodução Animal, 23(4), 479-566.
325
- 326 Pellegrin, A.O.; Lage, A.P.; Sereno, J.B.; Ravaglia, E.; Costa, M.S.; Leite, R.C., 2002.
327 Bovine Genital Campylobacteriosis in Pantanal, State of Mato Grosso do Sul,
328 Brazil. Revue d`Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 55(3),
329 169-173.
330
- 331 Quinn, P.J. et al., 2005. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre:
332 Artmed. p. 415.
333
- 334 Rocha, F.S.; Jesus, V.L.T.; Torres, H.M.; Gomes, M.J. P.; Figueiredo, M.J.;
335 Nascimento, E.R.; Ferreira, T.; Aquino, M.H.C., 2009. Investigação de
336 *Campylobacter fetus* e *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da
337 região do Médio Paraíba, RJ. Ciência Rural, 39(5), 1586-1589.
338
- 339 Serrano, G.; Vargas Diaz, M.; Clavijo, A., 1984. Campylobacteriosis (Vibriosis) en
340 rodeos bubalinos de Venezuela. Veterinária Tropical. 8, 95-111.
341
- 342 Spósito Filha, E.; Oliveira; S.M., 2009. Tricomonose bovina. Biológico. 71(1), 9-11.
343
- 344 Stynen, A.P.R.; Pellegrin, A.O.; Fóscolo, C.B.; Figueiredo; J.F.; Canella Filho, C.;
345 LeiteI, R.C.; Lage, A.P., 2003. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos
346 leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha – Minas
347 Gerais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 55(6), 766-769.
348

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é o primeiro a relatar a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* no Brasil em búfalos. Apesar da baixa ocorrência e pelo fato dos animais positivos serem procedentes de um mesmo rebanho, medidas de controle são recomendadas, tais como: separação dos animais positivos; realização de tratamento ou descarte dos animais do rebanho; evitar que esses animais entrem em contato com fêmeas e utilização de um programa de inseminação artificial com cuidados sanitários rigorosos. Realizando tais medidas é possível evitar a disseminação do agente no rebanho.

O estudo é pioneiro no que se refere à infecção por *T. foetus*, apesar de não ter sido diagnosticado animais positivos, o cuidado na importação de animais de outra região e realização de exames prévios antes da compra de animais é fundamental para evitar a introdução do agente nos rebanhos bubalinos, visto que há notificação da enfermidade no país.

5. APÊNDICE

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

Questionário nº _____

Nome da Propriedade: _____ Município: _____

Proprietário: _____ Estado: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Email: _____ Data: ___ / ___ / _____

Coordenadas Geográficas: S: _____ W: _____

Investigador: _____

DADOS DA PROPRIEDADE

1) Sistema de Criação:

1- Intensivo ()

2- Extensivo ()

3- Semi-Intensivo ()

5) O tipo de rebanho é aberto ou
fechado?

1- Aberto ()

2- Fechado ()

2) Qual tipo de manejo reprodutivo

1- Monta Natural ()

2- Inseminação Artificial ()

3- Ambos as técnicas ()

6) Quando importa animais realiza
quarentena?

1- Sim ()

2- Não ()

3) Assistência Veterinária:

1- Não ()

2- Permanente ()

3- Temporária/Esporádica ()

7) Há empréstimos dos reprodutores
para outras propriedades

1- Sim ()

2- Não ()

4) Qual o tamanho do rebanho?

1- Abaixo de 50 animais ()

2- Entre 51 e 100 animais ()

3- Entre 101 e 200 animais ()

4- Acima de 200 animais ()

8) É dado um descanso aos reprodutores
entre as montas

1- Sim ()

2- Não ()

9) Já houve casos de aborto na propriedade?

1- Sim ()

2- Não ()

10) Em que terço da gestação ocorreu?

1- 1/3 ()

2- 2/3 ()

3- 3/3 ()

11) Houve casos de repetição de cio na propriedades?

1- Sim ()

2-Não()

12) Foi observado corrimento vaginal purulento nas búfalas?

1- Sim ()

2-Não()

13) As búfalas ao parir é observado retenção de placenta?

1- Sim ()

2- Não ()

14) Os reprodutores também copulam com os animais que apresentaram os sinais? (aborto, repetição de cio e retenção de placenta)

1- Sim ()

2-Não

15) Realiza tratamento nos animais que apresentam alguns dos problemas reprodutivos descritos?

1- Sim ()

2- Não ()

16) Onde geralmente adquire animais?

()Criadores conhecidos

()Indicação de conhecidos

()Feiras

()Outros_____

Última aquisição(meses):_____

ANEXO I – Parecer do Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



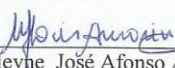
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	043/2015
Número do processo	23082.007354/2015
Data de emissão da licença	04 de Maio de 2015
Título do Projeto	Estudo epidemiológico da infecção por <i>Campylobacter fetus</i> <i>venerealis</i> e <i>Tritrichomonas foetus</i> em búfalos no estado de Pernambuco.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	José Wilton Pinheiro Júnior
Colaboradores	Jonas de Melo Borges; Júnior Mário Baltazar de Oliveira; Antônio Fernando Barbosa Batista Filho; Daniel Friguglietti Brandespim; Mateus Matiuzzi da Costa; Bruno Pajeú e Silva; Rinaldo Aparecido Mota; Larice Bruna Ferreira Soares.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Bubalino; total de 400 animais.


Prof.ª. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof.ª. Dra. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA