



UFRPE

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL – PGCAT

SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS INFECÇÕES POR *Tritrichomonas foetus* E
***Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* EM BOVINOS NA MICRORREGIÃO**
GEOGRÁFICA DO BREJO PARAIBANO

RUY BRAYNER DE OLIVEIRA FILHO

RECIFE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL – PGCAT

**SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS INFECÇÕES POR *Tritrichomonas foetus* E
Campylobacter fetus subsp. *venerealis* EM BOVINOS NA MICRORREGIÃO
GEOGRÁFICA DO BREJO PARAIBANO**

RUY BRAYNER DE OLIVEIRA FILHO

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador:

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

O48s Oliveira Filho, Ruy Brayner de
 Situação epidemiológica das infecções por *Tritrichomonas foetus*
 e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em bovinos na microrregião
 geográfica do Brejo Paraibano / Ruy Brayner de Oliveira Filho. –
 2017.
 85 f. : il.

 Orientador: José Wilton Pinheiro Junior.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife,
 BR-PE, 2017.
 Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

 1. Bovinocultura 2. Campilobacteriose 3. Fatores de risco
 4. Tricomonose 5. Paraíba 6. PCR I. Pinheiro Junior, José Wilton,
 orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS INFECÇÕES POR *Tritrichomonas foetus* E
***Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* EM BOVINOS NA MICRORREGIÃO**
GEOGRÁFICA DO BREJO PARAIBANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Tese elaborada por

RUY BRAYNER DE OLIVEIRA FILHO

Aprovada em 16/10/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Aderaldo Alexandrino de Freitas

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

Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

DEDICATÓRIA

A minha filha Laura que está por vir.

À minha esposa, Karla Campos Malta, pelo amor, carinho, compreensão e pela grande
companheira que tem sido.

Aos meus pais, Ruy Brayner de Oliveira e Amélia Maria Madruga de Oliveira, pelo
amor, incentivo e constante apoio que têm me dado todos esses anos.

Ao meu irmão, Antonio Coutinho Madruga Neto.

E a minha quase vó, Luzia de Jesus Madruga.

AGRADECIMENTOS

A Karla Campos Malta, que me ajudou nas coletas das amostras, na cultura de *T. foetus*, e na extração de DNA, e sempre me deu sugestões que auxiliaram o trabalho.

Ao meu orientador, José Wilton Pinheiro Júnior, por estar sempre disponível para tirar dúvidas e ajudar em todas as fases desse trabalho.

Ao professor Rinaldo Aparecido Mota, por ter cedido o seu laboratório para treinamento referente a cultura de *T. foetus*.

Ao professor Ricardo Guerra, por ter cedido seu laboratório para realização das culturas para *T. foetus*.

Ao professor Leonardo Félix, por ter cedido seu laboratório para realização das extrações de DNA.

A Érica Chaves Lúcio, Jonas de Melo Borges, Pollyanne Raysa Fernandes de Oliveira e Glaucia Grazielle Nascimento, pela colaboração na PCR.

A Lucas da Costa Dutra, Givanildo Jacinto dos Santos Filho e Ricardo Pereira Lima (*in memoriam*), pela colaboração nas coletas de material biológico.

A Rafael Lima de Oliveira e Manuela Monteiro, pelo transporte de amostras e materiais.

E a todos que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

FONTE FINANCIADORA

CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, bolsa de produtividade em pesquisa (Processo nº305072/2015-3).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA	14
2.1.1	Etiologia	14
2.1.2	Epidemiologia	14
2.1.3	Patogenia	17
2.1.4	Sinais clínicos	18
2.1.5	Diagnóstico	18
2.1.6	Prevenção e Controle	19
2.2	TRICOMONOSE GENITAL BOVINA	19
2.2.1	Etiologia	19
2.2.2	Epidemiologia	20
2.2.3	Patogenia	22
2.2.4	Sinais clínicos	23
2.2.5	Diagnóstico	24
2.2.6	Prevenção e Controle	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Geral	26
3.2	Específicos	26
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	27
4.1	ARTIGO 1 - PREVALENCE OF <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> IN DAIRY COWS FROM BREJO PARAIBANO, BRAZIL	27
4.2	ARTIGO 2 – PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR <i>Tritrichomonas foetus</i> EM BOVINOS NO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL	41
5	CONCLUSÃO	63
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	APÊNDICE	72
	ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Fig. 1 - Distribution and prevalence of *C. fetus* subsp. *venerealis* infection in Brejo Paraibano microregion, Paraíba, Brazil. Upper map: Paraíba state; Bottom map: surveyed counties. 34

Artigo 2

Figura 1 Microrregião do Brejo Paraibano (azul) do estado da Paraíba (verde) no nordeste do Brasil. 61

Figura 2 Distribuição e prevalência da infecção por *T. foetus* na microrregião do Brejo Paraibano, estado da Paraíba, Brasil. 62

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 – Registros da infecção por <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> em bovinos no mundo	15
Tabela 2 – Registros da infecção por <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> em bovinos no Brasil	16
Tabela 3 - Fatores de risco associados à infecção por <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> em bovinos	17
Tabela 4 - Registros da infecção por <i>Tritrichomonas foetus</i> em bovinos no mundo	20
Tabela 5 – Registros da infecção por <i>Tritrichomonas foetus</i> em bovinos no Brasil	21
Tabela 6 - Fatores de risco associados à infecção por <i>Tritrichomonas foetus</i> em bovinos	22

Artigos Científicos

Artigo 1

Table 1 - Prevalence of dairy cows positive for <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> in Brejo Paraibano microregion, Brazil	33
---	----

Artigo 2

Tabela I Prevalência da infecção por <i>T. foetus</i> em rebanhos bovinos, por sexo, na microrregião do Brejo Paraibano, Brasil.	58
Tabela II Análise univariada e regressão logística dos fatores de risco associados à infecção por <i>Tritrichomonas foetus</i> em bovinos no Brejo Paraibano	59

Resumo - Objetivou-se com este estudo determinar a situação epidemiológica das infecções por *Tritrichomonas foetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em bovinos na microrregião do Brejo Paraibano, região Nordeste do Brasil, identificando os possíveis fatores de risco associados à infecção por *T. foetus*. Para pesquisa de *T. foetus* foram coletadas 349 amostras de muco cérvico vaginal e esmegma em bovinos de corte e leite (290 fêmeas e 59 machos) em 31 propriedades e para pesquisa de *C. fetus* subsp. *venerealis* foram coletadas 273 amostras de muco cérvico vaginal de vacas leiteiras procedentes de 19 propriedades. Para a pesquisa do DNA dos agentes utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase e cultivo com meio Diamond Modificado para isolamento de *T. foetus*. Para análise dos fatores de risco associados à infecção por *Tritrichomonas foetus* na espécie bovina, foi realizada uma análise univariada das variáveis de interesse pelo teste qui-quadrado de Pearson, ou Exato de Fisher, quando necessário. Posteriormente foi realizada uma regressão logística considerando como variável dependente para Tricomonose a PCR (positivo ou negativo). Foram elaborados mapas temáticos com as distribuições das prevalências na área estudada. A prevalência da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em vacas foi 7,7% (21/273) (I.C. 95%; 4,8 - 11,5%) e 31,6% (6/19) das propriedades apresentaram ao menos um animal positivo. A prevalência da infecção por *T. foetus* foi 3,7% (13/349) (I.C. 95%; 2,1 - 6,4%). Em relação ao sexo, observou-se uma prevalência da infecção por *T. foetus* de 4,5% (fêmeas) e 0,0% (machos). A porcentagem de propriedades que apresentaram ao menos um animal positivo para *T. foetus* foi de 19,3% (6/31). No cultivo, nenhuma amostra foi positiva para *T. foetus*. O fator de risco associado à infecção por *T. foetus* identificado neste estudo foi contato de fêmeas com touros de outras propriedades (OR 5,9; I.C. 1,5 - 22,4). Este é o primeiro relato da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em vacas leiteiras nesta região do Brasil e o primeiro na microrregião do Brejo Paraibano a analisar a infecção por *T. foetus* em bovinos. Para diminuir os riscos de infecção, recomenda-se a adoção de um programa de inseminação artificial nas propriedades com sêmen de touros negativos, bem como um programa de vacinação contra a Campilobacteriose Genital Bovina para estimular a imunidade, com o intuito de reduzir a ocorrência da infecção e possíveis problemas reprodutivos. O contato das fêmeas com machos de outras propriedades deve ser evitado, principalmente quando não se conhece o *status* sanitário desses touros em relação a estas duas infecções.

Palavras-chave: bovinocultura, campilobacteriose, fatores de risco, tricomonose, Paraíba, PCR.

Abstract - The objective of this study was to determine the epidemiological situation of infection by *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in cattle at Brejo Paraibano microregion, Northeastern Brazil, identifying the possible risk factors associated with *T. foetus* infection. For the study of *T. foetus*, 349 samples of cervico-vaginal mucus and smegma were collected in beef and dairy cattle (290 females and 59 males) in 31 farms and for *C. fetus* subsp. *venerealis*, 273 samples of cervico-vaginal mucus from dairy cows from 19 farms were collected. Polymerase Chain Reaction was used to identify the DNA of the agents and culture with Modified Diamond medium for isolation of *T. foetus*. For analysis of risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in bovine species, univariate analysis of the variables of interest was performed by the Pearson chi-squared test, or Fisher's exact test, when necessary. Subsequently, logistic regression was performed considering PCR (positive or negative) as the dependent variable for trichomoniasis. Thematic maps were prepared with prevalence distributions in the studied area. The prevalence of *C. fetus* subsp. *venerealis* infection in cows was 7.7% (21/273) (CI 95% 4.8% – 11.5%), and 31.6% (6/19) of the farms showed at least one positive animal. The prevalence of *T. foetus* infection was 3.7% (13/349) (CI 95%, 2.1 - 6.4%). Regarding the gender, a prevalence of *T. foetus* infection of 4.5% (females) and 0.0% (males) was observed. The percentage of farms that had at least one positive animal for *T. foetus* was 19.3% (6/31). In culture, no samples were positive for *T. foetus*. The risk factor associated with *T. foetus* infection identified in this study was contact of females with bulls of other farms (OR 5.9; CI 1.5 - 22.4). This is the first report of *C. fetus* subsp. *venerealis* infection in dairy cows in this region of Brazil and the first in Brejo Paraibano microregion that analyzed *T. foetus* infection in cattle. To reduce risk of infection, it is recommended to adopt an artificial insemination program on the farms with negative bull semen, as well as a vaccination program against Bovine Genital Campylobacteriosis to stimulate immunity to reduce the occurrence of infection and possible reproductive problems. Contact of females with males of other farms should be avoided, especially when the health status of these bulls is not known regarding these two infections.

Keywords: bovine farming, campylobacteriosis, risk factors, trichomonosis, Paraíba, PCR.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil possui o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. Além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas para mais de 180 países. O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos: as cadeias produtivas da carne e leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões, aliado à presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país (BRASIL, 2017).

A microrregião do Brejo Paraibano possui uma produção anual de 7.458.000 litros de leite (IBGE, 2015) e 18.792 cabeças de bovinos nos rebanhos com pecuária de corte (IBGE, 2006).

O desenvolvimento de uma pecuária bovina rentável é baseado na obtenção de resultados adequados nos parâmetros reprodutivos (FERNÁNDEZ et al., 2007; LEAL et al., 2012). Os problemas reprodutivos são responsáveis por diversos sinais clínicos como: ausência ou repetição de cio, intervalo irregular entre partos, abortos, natimortalidade, mortalidades perinatal e/ou neonatal (MARQUES et al., 2005). O nascimento de animal debilitado e a retenção de placenta são duas outras formas comuns de sinais clínicos associados a problemas reprodutivos. Muitas vezes, falhas na eficiência reprodutiva não são devidamente estudadas. Esses sinais clínicos causam prejuízos aos rebanhos bovinos, diminuindo o número de nascimentos, a idade das primíparas ao primeiro parto, e, por consequência, diminuem direta e significativamente os índices de produtividade dos rebanhos, com prejuízos na receita financeira da propriedade e aumento dos custos da atividade pecuária (PEGORARO et al., 2009).

Apesar do fato de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* estarem afastados um do outro na árvore genealógica e filogenética, a sua ecologia, epidemiologia e patologia são quase idênticas (BONDURANT, 2005). *C. fetus* possui duas subespécies, *C. fetus* subsp. *fetus*, que causa aborto esporádico em bovinos e infertilidade enzoótica em ovinos, e *C. fetus* subsp. *venerealis*, responsável pela Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) (ALVES et al., 2011). A tricomonose bovina (TB) é uma enfermidade venérea causada por um protozoário flagelado denominado *Tritrichomonas foetus* (PELLEGRIN; LEITE, 2003).

A campilobacteriose genital bovina tem maior prevalência nos países em desenvolvimento, onde a monta natural em bovinos é amplamente praticada (MSHELIA et al., 2010b). A CGB é uma doença que causa elevados prejuízos às cadeias produtivas do leite e da carne no país. A transmissão de *C. fetus* subsp. *venerealis* ocorre por via sexual e as fêmeas se

infectam após a monta natural com touro infectado ou vice-versa, quando ocorre infecção em quase 100% dos casos (ALVES et al., 2011). A presença de *C. fetus* subsp. *venerealis* no sêmen de touros ocasiona risco de disseminação do agente pela inseminação artificial (OIE, 2008).

A Tricomonose Bovina possui distribuição cosmopolita e pode ocorrer em qualquer região onde existam bovinos, seja de aptidão leiteira ou de carne (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009). A transmissão do agente ocorre por meio da monta natural ou pelo uso de sêmen contaminado (BONDURANT, 2005). Pode-se observar uma maior frequência de diagnósticos positivos para a tricomonose nos machos, confirmando a sua importância na manutenção e disseminação do agente no rebanho, principalmente pela ausência de sinais clínicos nestes animais. Entretanto, isto não implica necessariamente em uma maior suscetibilidade dos machos (JESUS et al., 2004).

O conhecimento dos fatores de risco para as doenças é essencial para o desenvolvimento de programas de controle eficazes e econômicos (MAI et al., 2013a). A análise espacial é útil para a visualização de áreas em risco de infecção e serve para alertar rapidamente sobre problemas iminentes que precisam de ação imediata (OLIVEIRA FILHO et al., 2014). Consequentemente, a detecção precoce e o rastreamento do rebanho para estas infecções são um pré-requisito para uma criação de bovino bem-sucedida e economicamente viável (NJIRO et al., 2011).

A Tricomonose Bovina e a Campilobacteriose Genital Bovina são enfermidades de grande importância, pois podem causar sérios problemas reprodutivos aos bovinos e, consequentemente, prejuízos econômicos aos produtores e um impacto negativo na produção. Por isso, e em função da liderança do Brasil no comércio internacional de carne, e devido à limitação no conhecimento atual sobre essas infecções em bovinos no Brejo Paraibano, é importante conhecer a situação epidemiológica dessas infecções, para que se possam adotar as devidas medidas de controle e prevenção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA

2.1.1 Etiologia

Campylobacter fetus possui duas subespécies, *C. fetus* subsp. *fetus*, que causa aborto esporádico em bovinos e infertilidade enzoótica em ovinos, e *C. fetus* subsp. *venerealis*. *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (*C. f. venerealis*) causa a Campilobacteriose Genital Bovina (CGB). Esta bactéria é um bastonete Gram-negativo microaerofílico, móvel, espiralado, em forma de vírgula ou em “S” (melhor visto em microscópio de campo escuro), possui um ou dois flagelos polares e não forma esporos (CORBEIL et al., 2003; BONDURANT, 2005; ALVES et al., 2011).

Os micro-organismos do gênero *Campylobacter* são quimiorganotróficos, não fermentam açúcares, obtendo energia a partir de aminoácidos ou de componentes intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. A maioria das espécies é positiva para a enzima citocromo-oxidase e redutoras de nitrato. Esses microrganismos são sensíveis ao sal, sendo esta sensibilidade variável em função da temperatura. Assim, não se multiplicam em meios contendo 2% de NaCl quando mantidos a 30°C ou a 35°C. À temperatura de 4°C são sensíveis em meios contendo 1% de NaCl. São também bastante sensíveis ao pH ácido, crescendo na faixa de pH entre 5,5 - 8,0, com valor ótimo próximo do neutro (6,5-7,5) e à desidratação (BRASIL, 2011).

Para caracterização das espécies, colônias que apresentarem características compatíveis ao gênero *Campylobacter* deverão ser submetidas ao teste de sensibilidade aos antibióticos cefalotina (30mg) e ácido nalidíxico (30mg), assim como às seguintes provas para a caracterização final: catalase, oxidase, fermentação da glicose, redução de nitrato, produção de H₂S, hidrólise do hipurato e tolerância a glicina a 1% (LADEIRA; SCHILD, 2007).

2.1.2 Epidemiologia

A CGB é uma doença de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2017) e permanece enzoótica, principalmente em bovinos de corte causando perdas reprodutivas (MICHI et al., 2016). Estudos realizados no mundo estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Registros da infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em bovinos no mundo

Autor	Ano	Localidade	Prevalência (%)	Método de diagnóstico
Griffiths et al.	1984	Colômbia	15,0	Isolamento
Finlay et al.	1985	Canadá	0,3	Isolamento
Otte et al.	1995	Colômbia	0,0	Isolamento
Kodakaram-Tafti; Ikede	2005	Canadá	0,4	Isolamento
Mshelia et al.	2010a	Nigéria	11,0	ELISA
Madoroba et al.	2011	Sul da África	1,9	PCR
Njiro et al.	2011	África do Sul	1,4	Isolamento e PCR
Mendoza-Ibarra et al.	2012	Espanha	-	Isolamento e PCR
Hosseinzadeh et al.	2013	Irã	12,6	Isolamento e PCR
Mai et al.	2013b	Nigéria	13,3	Isolamento
Molina et al.	2013	Argentina	1,5	IFD
Hancock et al.	2015	Austrália	4,9	Isolamento

Convenções: IFD - Imunofluorescência Direta; PCR – Reação em Cadeia da Polimerase; ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

No Brasil a prevalência de CGB foi estimada nos 12 estados com a maior produção de bovinos do país em 50,8% (IC 95%: 41,6%; 60,1%) de propriedades positivas (MIRANDA, 2005). Os registros da infecção por *C. f. venerealis* em bovinos no Brasil a partir do ano 2000 encontram-se dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Registros da infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em bovinos no Brasil

Autor	Ano	Estado	Prevalência (%)	Método de diagnóstico
Pellegrin et al.	2002	MS	52,3	IFD
Stynen et al.	2003	MG	25,5	IFD
Miranda	2005	BA, GO, MA, MT, MS, MG, PA, PR, RS, RO, SP, TO	19,7	IFD
Giuffrida*	2007	SP	7,8/5,8/1,9	Isolamento/PCR/IFD
Rocha et al.	2009	RJ	35,9	IFD
Leal et al.	2012	DF, GO	11,1	IFD
Oliveira et al.	2015	PE	1,8	PCR

Convenções: IFD - Imunofluorescência Direta; MA – Muco-aglutinação; PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

* Prevalência de propriedades

C. f. venerealis é transmitido de forma venérea por touros infectados durante a monta natural (BURNS et al., 2010; MSHELIA et al., 2010b). Existe o risco de o agente ser encontrado em sêmen de doadores infectados (CARVALHO et al., 2007). Touros mais velhos têm maior risco de serem portadores, pois com a idade aumenta a profundidade e o número das criptas; podem ser mais ativos e tendem a exercer dominância sobre jovens, aumentando os riscos (ROCHA et al., 2009; BURNS et al., 2010). O estado de portador em fêmeas dura de dois a seis meses e é regra em touros infectados com mais de três anos (BONDURANT, 2005). As chances de infecção tendem a ser maiores em *Bos taurus* que *Bos indicus* (JESUS et al., 2004; MAI et al., 2013b). Os fatores de risco associados à infecção por *C. f. venerealis* em bovinos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Fatores de risco associados à infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em bovinos

Fator de risco	OR	Valor de p	Autor	Ano
Abortos	3,08	0,020	Jimenez et al.	2011
Contato com touros de outros rebanhos	2,03	0,060		
Compra de >3 animais ou ausência de quarentena nos últimos 12 meses	10,9	0,002	Mai et al.	2013a
Exame ginecológico	5,26	0,001		
Aquisição inicial de animais em feiras de gado	14,8	0,009		
Sistema de manejo pastoral	7,3	<0,010	Mai et al.	2013b
Touros > 7 anos de idade	3,4	0,010		
Presença de brucelose (touros)	8,3	<0,0001		
Presença de brucelose (rebanhos)	16,0	<0,0001		
Rebanhos maiores que 100 animais	7,2	0,020	Oliveira et al.	2015

2.1.3 Patogenia

C. f. venerealis é adaptado ao trato genital, especialmente do macho (MSHELIA et al., 2010b). Não parece haver imunidade eficaz no touro, pois o agente não causa lesão e habita o trato genital por intervalos longos (BONDURANT, 2005; GIVENS, 2006; MICHI et al., 2016).

Nas fêmeas, enquanto os anticorpos IgG são capazes de opsonização (e, portanto, aumento da fagocitose por macrófagos ou neutrófilos) e lise do agente patogênico mediada pelo complemento, os anticorpos IgA geralmente imobilizam ou aglutinam, mas não destroem o micro-organismo (BONDURANT, 2005). A moderada inflamação da mucosa uterina que caracteriza a infecção com este agente pode permitir que IgG e complemento obtenham acesso ao lúmen do útero eliminando o patógeno. Uma relativa falta de resposta espontânea de IgG na vagina, ou o bloqueio dos efeitos de IgG pela ligação de IgA vaginal ao micro-organismo, pode explicar o estado de portador vaginal por um período maior para *C. f. venerealis* (BONDURANT, 2005). *C. f. venerealis* é um agente não invasivo extracelular, logo a produção de anticorpos é crucial para proteção (CORBEIL et al., 2003).

2.1.4 Sinais clínicos

A apresentação clínica habitual é diminuição de fertilidade resultante de morte fetal precoce (OIE, 2008). A CGB pode ocasionar endometrite, cervicite, vaginite, salpingite e intervalos entre estros prolongados. Podem-se notar irregularidades nos ciclos estrais e abortos esporádicos (OIE, 2008; BURNS et al., 2010; BOREL et al., 2014). Segundo Burns et al. (2010), *C. f. venerealis* é a maior causa de mortalidade embrionária (tardia) e fetal - 6º ao 8º mês de gestação - e infertilidade. Os machos são assintomáticos (BONDURANT, 2005; BURNS et al., 2010; HANCOCK et al., 2015).

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo deve ser realizado com base nos achados epidemiológicos, clínicos (quando a história do rebanho indica infertilidade) e laboratoriais, com a coleta de esmegma prepucial, sêmen, placenta, secreção vaginal e líquido fetal (GIVENS, 2006). O material biológico deve ser submetido ao laboratório em meios de transporte-enriquecimento (Weybridge, Cary-Blair, Amies, Clark, etc.). Os materiais biológicos de eleição para diagnóstico da CGB são esmegma obtido por raspagem e muco vaginal por aspiração (BONDURANT, 2005).

Para o cultivo do agente pode-se utilizar meio Skirrow, ágar sangue e outros, em atmosfera microaerofílica. Testes fenotípicos para caracterização de subespécies de *C. fetus* são indispensáveis (SCHULZE et al., 2006). Foram desenvolvidos ensaios de PCR multiplex (HUM et al., 1997) e PCR em tempo real (McMILLEN et al., 2006) para diferenciar as subespécies. Também podem ser utilizadas a Imunofluorescência Direta (IFD) (PELLEGRIN et al., 2003; ROCHA et al., 2009) e Muco-aglutinação (LEITE, 1977; JESUS et al., 1999).

Alguns fatores podem dificultar o diagnóstico, tais como: método de coleta do material biológico; meio utilizado para o transporte das amostras; tempo decorrido entre a coleta e o processamento e métodos de diagnóstico utilizados (MSHELIA et al., 2010b). A sobrevivência de *C. f. venerealis* durante o transporte do campo para o laboratório é considerado um entrave no diagnóstico de CGB por isolamento (GARCIA et al., 1983).

Amostras de esmegma são muitas vezes contaminadas com fezes, sangue, urina ou sêmen, o que pode limitar a eficácia dos testes (MENDOZA-IBARRA et al., 2012). Para identificar o agente é necessária uma combinação de culturas em série e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MICHI et al., 2016).

2.1.6 Prevenção e Controle

Um programa de inseminação artificial com cuidados sanitários rigorosos deve ser implementado nas propriedades para evitar a propagação do agente nos rebanhos (BONDURANT, 2005; OLIVEIRA et al., 2015). Vacinas têm sido associadas à prevenção e cura de infecções (MICHI et al., 2016). O sucesso da imunização de touros infectados parece ser alto e a maioria dos protocolos de vacinação de touro para *C. f. venerealis* requer a inoculação de uma dose dupla de vacina administrada em duas ocasiões, com um intervalo de um mês. Para machos pode ser feita a associação de antibióticos e vacinação, sendo requerida cultura/pesquisa de sensibilidade aos antibióticos. Essa associação também pode ser utilizada para fêmeas (BONDURANT, 2005). No entanto, os tratamentos com antibióticos têm eficácia limitada (MICHI et al., 2016).

O controle é feito pela remoção de touros infectados, e substituição por touros virgens (BONDURANT, 2005; MADOROBA et al., 2011). Provavelmente, a estratégia mais factível a ser adotada para o controle da Campilobacteriose Genital Bovina seja a combinação de práticas sanitárias, envolvendo descarte de touros velhos e reposição com touros jovens, comprovadamente negativos e estabelecimento de uma estação de monta (PELLEGRIN, 2002).

Oliveira et al. (2015) sugerem medidas de controle, como diagnóstico, separação e descanso sexual para fêmeas infectadas. Deve-se realizar o manejo reprodutivo utilizando fêmeas virgens com touros não infectados (BURNS et al., 2010).

2.2 TRICOMONOSE GENITAL BOVINA

2.2.1 Etiologia

Tricomonose Genital Bovina (TGB) é causada pelo protozoário flagelado *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*) (CARVALHO et al., 2007; SILVA et al., 2008; SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009). *T. foetus* tem morfologia piriforme, e seu tamanho oscila entre 8-18 µm de comprimento e 4-9 µm de largura. Possui quatro flagelos, três deles são anteriores e livres e o 4º acompanha a membrana ondulante, que é perfeitamente visível à microscopia, localizando-se na parte posterior (PELLEGRIN; LEITE, 2003). *T. foetus* é ativamente móvel e anaeróbio facultativo e se multiplica por divisão binária. É sensível ao calor, à luz ultravioleta, aos sabões e aos desinfetantes comuns. Sobrevive por poucos dias no ambiente e pode sobreviver ao congelamento (SOUSA et al., 1991; SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009; ALVES et al., 2011).

2.2.2 Epidemiologia

A Tricomonose Genital Bovina é uma doença de notificação obrigatória à OIE (OIE, 2017). A infecção é enzoótica, principalmente em bovinos de corte, quando o controle é deficiente, o sistema é extensivo, com monta natural, onde há touros de repasse ou inseminação artificial de má qualidade (BONDURANT, 2005; CARVALHO; RODRIGUES, 2006). Estudos realizados no mundo estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Registros da infecção por *Tritrichomonas foetus* em bovinos no mundo

Autor	Ano	Localidade	Prevalência (%)	Método de diagnóstico
Griffiths et al.	1984	Colômbia	13,7	Isolamento
Kvasnicka et al.	1989	EUA	4,7	Isolamento
Perez et al.	1992	Costa Rica	7,2	Isolamento
Grotelueschen et al.	1994	EUA	0,2	Isolamento
Otte et al.	1995	Colômbia	-	Isolamento
Peter et al.	1995	EUA	20,9	Isolamento
Martín-Gómez et al.	1998	Espanha	2,9	Isolamento
Rae et al.	2004	EUA	6,0	Isolamento
Fernández et al.	2007	Argentina e Uruguai	0,8	Isolamento
Rodning et al.				
Prospectivo	2008	EUA	-	Isolamento e PCR
Retrospectivo	2008	EUA	0,3	Isolamento e PCR
Serin et al.	2010	Turquia	8,5	Isolamento
Madoroba et al.	2011	Sul da África	4,1	PCR
Njiro et al.	2011	África do Sul	2,1	Isolamento e PCR
González-Carmona et al.	2012	Colômbia	61,9	Isolamento
Mendoza-Ibarra et al.	2012	Espanha	32,0	Isolamento e PCR
Mendoza-Ibarra et al.	2013	Espanha	4,0	Isolamento e PCR
Mai et al.	2013b	Nigéria	-	Isolamento
Molina et al.	2013	Argentina	1,1	Isolamento
Hancock et al.	2015	Austrália	-	PCR

Convenções: PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Estudos realizados no Brasil estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Registros da infecção por *Tritrichomonas foetus* em bovinos no Brasil

Autor	Ano	Estado	Prevalência (%)	Método de diagnóstico
Roehe	1948	RS	1º relato	-
Mello	1954	CE, PB, PE, BA, MG, ES, RJ, RS	9,09	Isolamento
Rabello	1955	SP	9,09	Isolamento
Megale	1963	MG	1º relato em MG	Isolamento
Amaral et al.	1970	SP	6,64	Isolamento
Medeiros; Figueiredo	1971	MG	14,29	Isolamento
Guida et al.	1972	RJ, SP, MG	14,6	Isolamento
Gomes et al.	1991	RS	1,88	Isolamento
Oliveira et al.	2000	PA	4,64	Isolamento
Jesus et al.	2003	RJ	14,05	Isolamento
Jesus et al.	2004	RJ	1,6	Isolamento
Rocha et al.	2009	RJ	-	Isolamento
Silva et al.	2009	RS	2,63	Isolamento
Paz Júnior et al.	2010	PE	-	Isolamento
Leal et al.	2012	DF, GO	-	Isolamento
Oliveira et al.	2015	PE	33,4	PCR

Convenções: PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

A transmissão de *T. foetus* é venérea (RAE; CREWS, 2006). O agente pode ser veiculado por fômites e inseminação artificial (PEGORARO et al., 2009; SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009). Os touros mais velhos infectados são portadores assintomáticos (WALKER et al., 2003; RAE et al., 2004). Em touros com menos de 3-4 anos a infecção pode ser transitória (OIE, 2012). Os fatores de risco associados à infecção por *T. foetus* em bovinos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Fatores de risco associados à infecção por *Tritrichomonas foetus* em bovinos

Fator de risco	OR	Valor de p	Autor	Ano
Touros <i>Bos taurus</i>	6,94	0,020	Perez et al.	1992
Touros em repouso sexual	11,88	0,020		
Touros >3 anos de idade	17,15	0,020		
Touros >5 anos de idade	2,2	0,022	Rae et al.	2004
Touros Simental	13,4	0,000		
Touros Charolês	13,6	0,000		
Touros Angus	12,7	0,001		
Rebanhos maiores com manejo mais extensivo	12,8	0,004		
Maior relação touro-vaca (rebanhos)	12,8	0,039		
Maior relação touro-vaca (touros)	2,2	0,030		
Mais de 10 touros por grupo de reprodução	3,9	0,002		
Aumento de repetidoras de cio	5,20	0,007	Mendoza-Ibarra et al.	2012
Touros >3 anos de idade	3,45	0,040		
	27,29	< 0,001	Mendoza-Ibarra et al.	2013
Monta natural	2,4	0,041	Oliveira et al.	2015

2.2.3 Patogenia

T. foetus é encontrado nas criptas prepuciais, onde a tensão de oxigênio é menor (BONDURANT, 2005). No touro, a imunidade em nível local é incipiente (PELLEGRIN; LEITE, 2003). A infecção em touros não afeta o sêmen e o comportamento sexual (MARTÍN-GÓMEZ et al., 1998). Com evasão das respostas imunes, *T. foetus* pode persistir no trato genital de touros (COBO et al., 2011). A localização superficial de *T. foetus* sugere que as células apresentadoras de antígenos podem capturar antígenos de *T. foetus* de superfícies genitais, seja usando suas projeções dendríticas ou por contato direto com células epiteliais e subepiteliais genitais. Portanto, parece que *T. foetus* é restrito às superfícies da mucosa e é incapaz de invadir os tecidos (MICHII et al., 2016).

Após a infecção das vacas o agente penetra nas células do epitélio vaginal e do útero e placenta e colonizam o oviduto. A inflamação ocasiona um ambiente intrauterino desfavorável (GIVENS, 2006; LUCAS et al., 2008; SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009). Há acúmulo de

polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos e células plasmáticas (PELLEGRIN; LEITE, 2003). É provável que a morte de células do oviduto por *T. foetus* seja importante na infertilidade (BENCHIMOL et al., 2006; MIDDLEJ et al., 2009). Endometrite e salpingite podem estar relacionadas com falha reprodutiva (FELLEISEN, 1999), impedindo que o embrião se fixe na mucosa uterina (PELLEGRIN; LEITE, 2003).

Parsonson et al. (1976) demonstraram em infecção experimental com fêmeas virgens a presença de *T. foetus* em secreções superficiais, lúmen de glândulas endometriais ou entre componentes maternos e fetais dos placentomas. Sua localização em secreções do trato genital e absorção de material antigênico parece ser o estimulador da inflamação. Antes de oito semanas da infecção não havia nenhuma perda fetal e pouca inflamação do trato reprodutivo ou placenta das fêmeas prenhes. Isso pode explicar o intervalo entre estros prolongado. Rhyan et al. (1995) evidenciaram que *T. foetus* penetra a mucosa fetal, tecido conjuntivo e vasos linfáticos. Hipotrofia placentária e invasão do tecido fetal podem resultar em aborto (FELLEISEN, 1999).

A vaca normalmente elimina o agente com repouso sexual (FELLEISEN, 1999; SILVA et al., 2008). Fêmea portadora é a que por motivo não conhecido (provavelmente falha na imunidade) mantém o agente por um período prolongado (PELLEGRIN; LEITE, 2003).

Para a tricomoníase, a classe predominante de anticorpos protetores no útero é IgG1, e na vagina IgA ou IgG1 (CORBEIL et al., 2003). A degradação de IgG pode ser um mecanismo de evasão. Em animais adultos, *T. foetus* pode ser considerado um parasito que habita principalmente no lúmen dos órgãos reprodutivos e na superfície das mucosas; portanto pode-se assumir que o sistema imunológico de mucosa desempenha papel-chave no controle da infecção por *T. foetus*. Mecanismos imunes humorais e mediados por células podem estar envolvidos. Os neutrófilos podem representar uma primeira linha de defesa. O papel exato destes e outros leucócitos como efetores imunes na tricomonose bovina *in vivo* deve ser esclarecido (FELLEISEN, 1999).

2.2.4 Sinais clínicos

A TGB pode ocasionar endometrite, cervicite, vaginite, salpingite e intervalos entre estros prolongados. Podem-se observar irregularidades nos ciclos estrais e abortos esporádicos (1º ao 5º mês de gestação) (MICKELSEN et al., 1986; BURNS et al., 2010; BOREL et al., 2014). Os sinais clínicos podem ser mais comuns em vacas mais velhas (BURNS et al., 2010). Segundo Bondurant (2005) a maior parte da perda da prenhez é tecnicamente fetal (> 42 dias de

gestação) e não embrionária, e esta morte do concepto não é detectável como um aborto expulso a não ser que ele morra após o terceiro mês.

Em cerca de 5% dos bovinos infectados, pode ocorrer piometra, provavelmente como resultado da contaminação bacteriana que ocorre no momento da perda fetal, quando a cérvix está provavelmente relaxada o suficiente para ocorrer infecção por outros patógenos presentes no ambiente exterior. Em touros não ocorre nenhum sinal clínico (BONDURANT, 2005; BURNS et al., 2010; OIE, 2012).

2.2.5 Diagnóstico

A observação dos sinais clínicos, do histórico dos animais e da avaliação dos dados zootécnicos da propriedade podem auxiliar no diagnóstico da infecção por *T. foetus*. No entanto, o diagnóstico laboratorial é fundamental, pois só ele pode confirmar o agente responsável pelo problema reprodutivo observado no rebanho (ALVES et al., 2011).

Os materiais biológicos de eleição para diagnóstico da TGB são esmegma obtido por raspagem e muco vaginal por aspiração (BONDURANT, 2005). Recomenda-se repouso sexual de pelo menos uma semana depois do último serviço antes de se coletar uma amostra do prepúcio (OIE, 2012). Cultura e PCR em combinação produzem maior sensibilidade e especificidade, sendo aconselhável para testar amostras sob condições de campo (MENDOZA-IBARRA et al., 2012; MICHI et al., 2016). As desvantagens da cultura são: tempo; presença de células viáveis; baixa sensibilidade (YAO, 2013).

Na cultura de *T. foetus*, a visualização do parasito com morfologia e movimentos característicos confere positividade preliminar. Quando um touro é positivo, todo o rebanho deve ser considerado positivo para controle, mas um animal só pode ser considerado negativo após três testes negativos com intervalo entre sete e 15 dias (PELLEGRIN; LEITE, 2003; BONDURANT, 2005).

A PCR apresenta maior sensibilidade para o diagnóstico de *T. foetus*, mas é limitada pelo custo (KENNEDY et al., 2008). Esta técnica pode detectar o agente com baixas concentrações de DNA (MUKHUFHI et al. 2003; MUTTO et al. 2006), além de não depender de organismos viáveis, e é capaz de detectar o organismo quando o transporte ou técnica de coleta resultou na perda de viabilidade (KENNEDY et al., 2008).

2.2.6 Prevenção e Controle

Devem-se adquirir apenas novilhas virgens e evitar pastos comuns, assim como se deve evitar levar touros para esses locais e introduzir inseminação artificial sem touro de repasse

(PELLEGRIN; LEITE, 2003). Recomenda-se estação de monta permitindo repouso de fêmeas, devendo os reprodutores serem testados 60 dias antes da atividade reprodutiva (PELLEGRIN, 2002). Animais novos devem vir de rebanhos livres com atestado sanitário (PELLEGRIN; LEITE, 2003).

O correto diagnóstico é o primeiro passo para a implantação de medidas de controle eficazes contra a TGB (ALVES et al., 2011). O controle da tricomoníase é baseado na detecção e remoção de touros infectados e substituição com touros virgens e segregação de vacas expostas (BONDURANT, 2007). Conhecer o *status* sanitário de touros antes da estação de monta é uma medida importante para o controle (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2014).

No caso de rebanhos diagnosticados com *T. foetus* recomenda-se abater todos os touros (BONDURANT, 2005). Programa com abate de touros infectados diminuiu o intervalo entre partos e aumenta o percentual de partos (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2014). Touros velhos devem ser substituídos por touros jovens testados (PELLEGRIN; LEITE, 2003; YAO, 2013). Devem-se evitar touros “arrendados” ou em parceria (PELLEGRIN, 2002; PELLEGRIN; LEITE, 2003). Fêmeas positivas devem passar por repouso sexual ou devem ser descartadas quando apresentarem falhas na concepção, abortarem ou apresentarem piometra (PELLEGRIN; LEITE, 2003; BONDURANT, 2005; MADOROBA et al., 2011; YAO, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Estudar a situação epidemiológica das infecções por *Tritrichomonas foetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em bovinos na microrregião do Brejo Paraibano.

3.2 Específicos

- Determinar a prevalência das infecções por *Tritrichomonas foetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* em bovinos de corte e leite na microrregião do Brejo Paraibano;
- Identificar os possíveis fatores de risco associados à infecção por *Tritrichomonas foetus*;
- Determinar a distribuição espacial das infecções por *Tritrichomonas foetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1

PREVALENCE OF *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* IN DAIRY COWS FROM BREJO PARAIBANO, BRAZIL

(Artigo enviado para o periódico Brazilian Journal of Microbiology)

Prevalence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in dairy cows from Brejo Paraibano, Brazil

Campylobacter fetus venerealis IN BRAZIL

**Ruy Brayner de Oliveira Filho^{a,*}, Karla Campos Malta^b, Érica Chaves Lúcio^a,
Gláucia Grazielle Nascimento^a, Lucas da Costa Dutra^b, Rinaldo Aparecido Mota^c,
José Wilton Pinheiro Júnior^d**

^a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus Dois Irmãos, Recife, PE, Brazil

^b Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias, Areia, PB, Brazil

^c PhD., UFRPE, Department of Veterinary Medicine, Recife, PE, Brazil

^d PhD., CNPq Productivity Scholarship Holder, UFRPE, Department of Veterinary Medicine, Recife, PE, Brazil

ABSTRACT

Studies on *C. fetus* are essential. The objective of this study was to determine prevalence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* infection in dairy cows from the Brejo Paraibano region, northeastern Brazil. Samples of cervico-vaginal mucus were collected from 273 dairy cows from 19 farms. Polymerase chain reaction was used for laboratory diagnosis using the oligonucleotides VENSF1 (5'-CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT³) and VENS2 (5'-GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT³) for detection of a 142 base-pairs product. The prevalence of *C. fetus* subsp. *venerealis* infection in cows was 7.7% (confidence interval [CI] 95%, 4.8%–11.5%), and 31.6% (6/19) of the farms showed at least one positive animal. This is the first report of *C. fetus* subsp. *venerealis* infection in dairy cows in this region of Brazil. It is recommended to adopt an artificial insemination program on the farms, as well as a vaccination program to stimulate immunity in order to reduce the occurrence of infection and possible reproductive problems.

Keywords: bovine, Brazil, campylobacteriosis, PCR

* *Corresponding author.*

E-mail: ruybrayner@gmail.com (R.B. Oliveira Filho)

Introduction

Bovine genital campylobacteriosis (BGC) is a contagious disease caused by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*.¹ Transmission of *C. fetus* subsp. *venerealis* occurs sexually and females become infected after copulation with infected bulls or vice versa.² Infection usually goes unnoticed in most breeding establishments.³

Development of profitable livestock is based on obtaining adequate results in reproductive parameters.⁴ Reproductive problems such as BGC result in an increase in the calving interval by frequent repetition of estrus, increase in age at first calving as the heifer category is the most affected, increase in the number of doses of semen or services by conception, and reduction in the number of animals born and weaned. These changes lead to reductions in herd fertility rates and additional expenses with discarding and replacement of bulls, causing significant economic losses to cattle breeding.^{5,6}

Bovine genital campylobacteriosis is more prevalent in developing countries, where natural mating in cattle is widely practiced.⁷ In Brazil, BGC is possibly present in all federal states due to the reproductive management practices used.² Some epidemiological studies were carried out in different regions, with different frequencies of infection being reported in cattle, ranging from 1.8%⁸ to 52.3%.⁹

Some factors may contribute to the introduction or dissemination of the agent, such as the high number of animals in the herd,⁸ acquisition of animals from markets,¹⁰ lack of herd prophylactic measures,¹⁰⁻¹² and herds in which the cattle graze communally during the rainy season but may cover large distances in search of pasture and water during critical period of dry season.¹²

Early detection and screening of the herd for this infection is a prerequisite for successful and economically viable cattle farming.¹³ Due to the importance of cattle breeding in Brazil, to the impact of BGC on bovine reproductive health, and since campylobacteriosis has never been studied in this region of Brazil, epidemiological studies on *C. fetus* infection in bovine herds are essential. Thus, this study aimed to determine the prevalence of *C. fetus* subsp. *venerealis* infection in cattle from the Brejo Paraibano microregion, Brazil.

Materials and Methods

Ethical approval

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Use in the Federal Rural University of Pernambuco under protocol number 048/2014.

Study area

A cross-sectional study was conducted to determine prevalence of animals infected by *C. fetus* subsp. *venerealis*. The Brejo Paraibano microregion is part of the Agreste mesoregion of the state of Paraíba, and consists of eight counties: Alagoa Grande, Alagoa Nova, Areia, Bananeiras, Borborema, Matinhas, Pilões, and Serraria.¹⁴

Sampling

In order to compose the sample of this study, the prevalence was estimated by means of a two-stage sampling design, primarily directed to detect farms with positive animals for *C. fetus* subsp. *venerealis* infection. In the first stage, the number of farms (primary sampling units) to be sampled was calculated using Win Episcopo version 2.0 software (The University of Edinburgh, UK).

The selection of the primary sampling units was based on the register of rural properties of cattle of the Secretariat of State for the Development of Agriculture and Fishery (SEDAP), being considered the farms with more than 50 bovines, since these properties are part of the cattle production chain. In order to compose the sample of the number of farms, a total of 30 farming establishments with milk cattle¹⁵ and expected prevalence of 1.8%,⁸ 95% confidence interval (CI) and statistical error of 5% were considered, which provided a minimum of 15 farms.

Farms were selected randomly. The selected farm that for some reason could not be visited was replaced by another nearby with the same production characteristics. The selected farm that at the time of the visit had less than the 50 cattle previously estimated was also sampled. In total, 19 properties were sampled.

In relation to the farms sampled by county, the numbers were as follows: Areia (7); Serraria (1); Alagoa Grande (3); Bananeiras (6); Pilões (1); and Alagoa Nova (1).

The number of cows in each farm (secondary unit) was calculated using Win Episcopo version 2.0 software, using the values of expected prevalence, statistical error, and CIs mentioned above. Thus, 273 samples of cervico-vaginal mucus were collected from adult dairy cows, non-pregnant, from July 2015 to May 2016.

Sampling of cows by county was as follows: Areia (n = 90), Serraria (n = 13), Alagoa Grande (n = 42), Bananeiras (n = 54), Pilões (n = 53), and Alagoa Nova (n = 21).

Collection of biological material

In order to collect the biological material, the cows were restrained and then a cleaning of the vulvar region was carried out with water and 70% alcohol, and later drying with paper towels. For collection of cervicovaginal mucus, the vulvar lips were separated and then a uterine lavage pipette coupled to a 20 ml syringe was introduced into the vagina to aspirate the mucus. Samples were transferred and stored in tubes containing 5 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) and transported immediately to the laboratory for due processing.

Laboratory processing of samples

In the laboratory, samples were transferred to polypropylene tubes and submitted for DNA extraction using the “Wizard® SV Genomic DNA Purification System” (Promega®) commercial kit, following the manufacturer’s instructions.

After DNA extraction, the amplification reactions of the genomic material to *C. fetus* subsp. *venerealis* were performed using the oligonucleotides VENSF1 (5'CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT3') and VENS2 (5'GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT3'), as described by Hum et al.¹⁶ In addition, positive and negative controls were used in all reactions. As a negative control, ultra-pure water was used. The thermal profile used was: initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 20 s; annealing at 50 °C for 20 s and extension at 72 °C for 2 min; and final extension at 72 °C for 10 min. The PCR product was analyzed by electrophoresis in agarose gel at 1.5%, stained with Blue Green (LGCbio), visualized in a transilluminator with ultraviolet light, and photodocumented to detect product with 142 base pairs (bp). Amplicon sizes were determined in comparison to a 100 bp marker.

Sequencing

In order to confirm the results, positive samples were purified after amplification and bidirectional sequenced using the BigDyeTerminator v3.1 CycleSequencing kit (AppliedBiosystems, USA), according to the manufacturer’s instructions. Sequencing was performed by capillary electrophoretic separation in an ABI 3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems). Data were collected using Data Collection Software (Applied Biosystems) and underwent quality inspection through SequencingAnalysis Software (AppliedBiosystems). After sequencing, the

contigs were submitted to BLAST in the NCBI GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) in order to investigate correspondence in species identification.

Georeferencing

A thematic map was prepared with prevalence distributions in the studied area. Each property was georeferenced to define and visualize its location in physical space, i.e., identifying the farm properties on the map of the Brejo Paraibano microregion. The location of the properties was obtained with the aid of satellite tracking equipment (GPS-Global Positioning System), configured to provide the positions in the coordinate latitude/longitude system in the SAD-69 (South American Datum, 1969) system, which is the coordinate system of the cartographic base in the Brejo Paraibano microregion. In order to map the occurrence, the georeferenced data were processed in TerraView 3.1.3 software.¹⁷

Results

The prevalence of positive cows was 7.7% (21/273) (CI 95%, 4.8%–11.5%). Of the cattle herds, 31.6% (6/19) had at least one positive animal. Prevalence in positive herds ranged from 3.2% to 40.0%. Of the six counties surveyed, all (100.0%) had positive animals, with a positive farm per county (Table 1 and Figure 1). Regarding age, it was observed that all positive animals were between two and 15 years old, with a mean age of 6.2 years.

In the genetic sequencing, the samples presented had between 100% and 99% similarity with *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Discussion

This is the first report of *C. fetus* subsp. *venerealis* infection in cattle in the state of Paraíba, northeastern region of Brazil. In this microregion, 7.7% (21) were positive in the PCR. Researches in several parts of the world have revealed prevalence's ranging from 0.0%^{18,19} to 15.0%.²⁰ Information regarding prevalence and outbreaks of the disease is not regularly reported by many countries,²¹ and this may be due to the lack or inefficiency of surveillance and monitoring programs on these sites. The difficulty of diagnosing BGC is well reported; this may be related to deficient infrastructure, lack of proper isolation media, and the sensitive nature of the bacteria. This difficulty has been the major limitation of the control of this disease in developing countries.⁷

Table 1 - Prevalence of dairy cows positive for *C. fetus* subsp. *venerealis* in Brejo Paraibano microregion, Brazil

County	N° samples	Positive samples	%	N° farms	Positive farms	%
Alagoa Grande	42	4	9.5	3	1	33.3
Farm A	4	0	0			
Farm B	28	0	0			
Farm C	10	4	40			
Alagoa Nova	21	3	14.3	1	1	100.0
Farm D	21	3	14.3			
Areia	90	2	2.2	7	1	14.3
Farm E	6	0	0			
Farm F	15	0	0			
Farm G	25	0	0			
Farm H	20	2	10.0			
Farm I	8	0	0			
Farm J	8	0	0			
Farm K	8	0	0			
Bananeiras	54	1	1.8	6	1	16.7
Farm L	2	0	0			
Farm M	3	0	0			
Farm N	5	0	0			
Farm O	8	0	0			
Farm P	31	1	3.2			
Farm Q	5	0	0			
Pilões	53	10	18.9	1	1	100.0
Farm R	53	10	18.9			
Serraria	13	1	7.7	1	1	100.0
Farm S	13	1	7.7			
Total	273	21	7.7	19	6	31.6

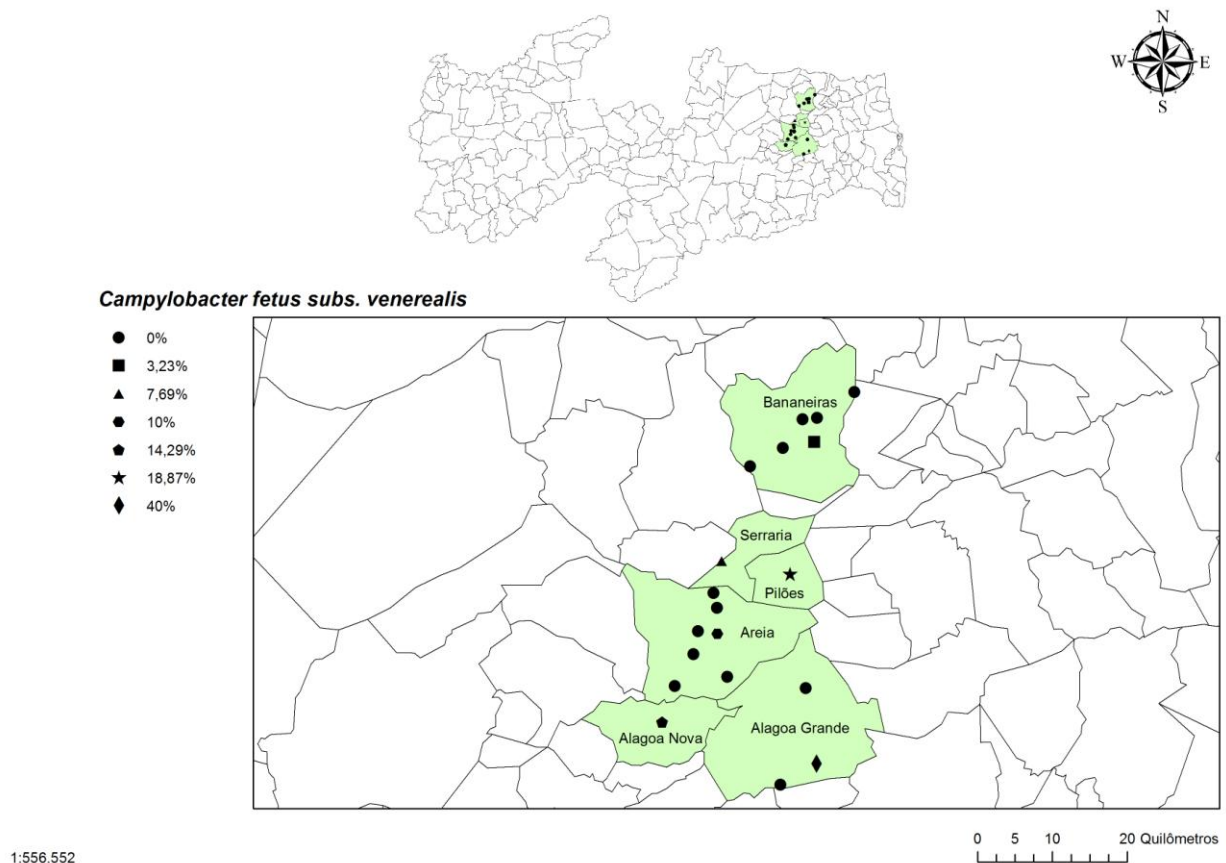


Fig. 1 - Distribution and prevalence of *C. fetus* subsp. *venerealis* infection in Brejo Paraibano microregion, Paraíba, Brazil. Upper map: Paraíba state; Bottom map: surveyed counties.

Considering only the samples of females, in Brazil a result close to that of the present study was obtained by Leal et al.²² which determined a prevalence of 10.5% (27/258) using direct immunofluorescence (DIF) in samples of uterine and vaginal swabs from animals slaughtered in slaughter houses in the Federal District and Goiás. However, the prevalence observed in the present study was lower than that generally reported, including other regions of the country. In Minas Gerais, a prevalence of 25.5% (40/157) was found using DIF in samples of cervicalvaginal mucus from cows from herds with reproductive problems.²³ Ziech et al.³ observed that 13.6% of samples from cows were PCR positive in the state of Rio Grande do Sul.

It is difficult to accurately compare the results of this research with previously published studies because the gender of the animals among the studies may vary. Also, since males generally remain chronically infected and females can clear the infection after a period of sexual rest, the prevalence directed to bulls and herds with a history of reproductive problems may be higher. The differences between the performed studies in prevalence may also be due to other factors such as type of farming (extensive, semi-intensive, and intensive), time the samples were

collected, use of artificial insemination, sample transport time to laboratory, differentiation between subspecies of *C. fetus*, and sexual rest before collection.²⁴

In some studies, the authors do not use an experimental design to estimate prevalence, only doing surveys specifically on problem farms and on animals with reproductive problems, as well as using different diagnostic techniques that vary in sensitivity and specificity.^{22,23} In this study, the farms and the animals sampled were randomly selected, regardless of whether or not they presented characteristic clinical signs of the disease. This provided the general prevalence in the studied region, which was not only taken from herds with reproductive problems, and may also explain the lower prevalence found compared to other studies, since animals with infertility problems are more likely to be *C. fetus* subsp. *venerealis* positive.

The methods of collection, pregnancy, and the phase of the estrous cycle can also influence the quality of the collected material. The cows in this study were not pregnant, but it was not possible to identify the stage of the estrous cycle due to the lack of record in zootechnical records by the owners. The number of microorganisms in the vaginal mucus and the amount of secretion obtained are higher during estrus, which may decrease the sensitivity of diagnostic tests for carrier females, since not all collected females are in this condition,^{3,23} which probably occurred in this study, and may have influenced the detection of the agent DNA, and consequently the prevalence may be higher than that found. Therefore, it is recommended to collect from females in the estrus period and to use estrus synchronization when the objective is to obtain representative sampling of the herd,³ since a larger number of cows will be in heat at the same time during a visit to the farm. However, the use of drugs for synchronization only for collection, when the rural producer does not yet use this tool as a reproductive strategy, increases costs for the owner in the case of routine diagnosis or for the researcher when performing epidemiological surveys like this one.

Therefore, the use of high sensitivity tests, such as PCR, which can detect a small number of microorganisms, is important in studies of this nature. In the work of Groff et al.,²⁵ the PCR technique was more sensitive and specific for the detection of *C. fetus* when compared with traditional isolation methods. The results of McMillen et al.²⁶ confirmed the sensitivity and specificity of the PCR assay by detecting an additional 40 bulls that were not detected by culture. The PCR is also faster and can be used as an effective alternative for genital campylobacteriosis diagnosis in cattle.²⁵

In general, epidemiological surveys should take into consideration the factors that may influence prevalence. These factors include herd size, management factors, age, geographical area, sampling design and sensitivity of diagnostic tests.²⁷

C. fetus subsp. *venerealis* was detected in six (31.6%) of the cattle herds sampled. The prevalence of farms with positive animals, associated with the detection of infection in cattle of all the counties surveyed, makes it possible to affirm that *C. fetus* subsp. *venerealis* infection is present in cattle in the Brejo Paraibano microregion.

Because of the damages that *C. fetus* subsp. *venerealis* infection can cause, the knowledge of distribution of this agent is important and the differences between regions should be considered. The prevalence rates found are, in general, randomly scattered in the study area. The spatial analysis of Molina et al.²⁴ showed that those herds in the center-south of La Pampa province (Argentina) were more likely to contain bulls infected with *C. fetus* than herds located in other areas of the province.

The vast spread of infectious agents constitutes a constant challenge for those involved with animal health, particularly in relation to control. Spatial epidemiology is useful for the visualization of areas at risk for infection and serves to rapidly alert of impending problems that need immediate action.²⁸

It is probable that the introduction of infected animals and lack of knowledge on the part of dairy farmers could have been responsible for the introduction and maintenance of the agent in the herds.⁸ Considering the number of positive herds, BGC should be considered in investigations of infertility problems in dairy cows from herds in this region.

Although the introduction of infected cows into breeding herds may contribute to the spread of BGC, non-virgin bulls involved in commercial exchanges are the major cause of spread.²⁴ Because of its epidemiological characteristics, mainly because it is a venereal transmission disease, BGC should be understood as a disease of the herd.⁵

This study demonstrates the presence of *C. fetus* subsp. *venerealis* DNA in dairy cows in the surveyed region. Considering the percentage of farms with positive animals, an artificial insemination program should be adopted on the properties, as well as a vaccination program to stimulate immunity with the aim of reducing the prevalence of positive animals.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the contribution made by Ricardo Pereira Lima (*in memoriam*) and Givanildo Jacinto dos Santos Filho in assisting with sample collection, and CNPq, National Council of Scientific and Technological Development for the research productivity grant (Process nº305072 / 2015-3).

REFERENCES

1. Monke HJ, Love BC, Wittum TE, Monke DR, Byrum BA. Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J Vet Diagn Invest*. 2002;14:35-39.
2. Alves TM, Stynen APR, Miranda KL, Lage AP. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. [Bovine genital campylobacteriosis and bovine genital trichomonosis: Epidemiology, diagnosis and control]. *Pesqui Vet Bras*. 2011;31:336-344 [in Portuguese].
3. Ziech RE, Machado G, Kirinus JK, et al. *Campylobacter fetus* em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. [*Campylobacter fetus* in cattle from Rio Grande do Sul state, Brazil]. *Ciência Rural*. 2014;44:141-146 [in Portuguese].
4. Fernández ME, Campero CM, Morrell E, et al. Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. [Bovine reproductive losses due to abortion, premature deliveries, stillbirth and neonatal losses: case report 2006-2007]. *Rev Med Vet (B Aires)*. 2007;88:246-254 [in Spanish].
5. Pellegrin AO, Leite RC, Sereno JRB, Reinato APR, Lage AP. Prevalência da campilobacteriose genital bovina em touros nelore do Pantanal Mato-Grossense. [Prevalence of bovine genital campylobacteriosis in nelore bulls of Pantanal Mato-grossense]. *Comun tec Embrapa*. 1999;23:1-8 [in Portuguese].
6. Junqueira JRC, Alfieri AA. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. [Reproductive failures in beef cattle breeding herds with emphasis for infectious causes]. *Semin, Ciênc Agrár*. 2006;27:289-298 [in Portuguese].

7. Mshelia GD, Amin JD, Woldehiwet Z, Murray RD, Egwu GO. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reprod Domest Anim.* 2010;45:e221-e230. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01546.
8. Oliveira JMB, Silva GM, Batista Filho AFB, et al. Prevalence and risk factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2015;47:549-555.
9. Pellegrin AO, Lage AP, Sereno JRB, Ravaglia E, Costa MS, Leite RC. Bovine genital campylobacteriosis in Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 2002;55:169-173.
10. Mai HM, Irons PC, Kabir J, Thompson PN. Herd-level risk factors for *Campylobacter fetus* infection, *Brucella* seropositivity and within-herd seroprevalence of brucellosis in cattle in northern Nigeria. *Prev Vet Med.* 2013;111:256-267.
11. Jimenez DF, Perez AM, Carpenter TE, Martinez A. Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Prev Vet Med.* 2011;101:157-162.
12. Mai HM, Irons PC, Kabir J, Thompson PN. Prevalence of bovine genital campylobacteriosis and trichomonosis of bulls in northern Nigeria. *Acta Vet Scand.* 2013;55:56.
13. Njiro SM, Kidanemariam AG, Tsotetsi AM, et al. A study of some infectious causes of reproductive disorders in cattle owned by resource-poor farmers in Gauteng Province, South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 2011;82:213-218.
14. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro; 2016. Available from: <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed 10.09.16.

15. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Pesquisa Censo Agropecuário 2006. Available from: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1267&z=t&o=24/>. Accessed 10.09.16.
16. Hum S, Quinn K, Brunner B, On SLW. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. Aust Vet J. 1997;17:827-831.
17. Brasil. Ministério de Ciência e Tecnologia. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. TerraView version 3.1.3; 2006. Available from: <http://www.dpi.inpe.br/terraview/index.php>.
18. Otte MJ, Ravenborg T, Hüttner K. A pilot study of elevated abortion and stillbirth ratios in cattle in the foothills of the Eastern plains of Colombia. Prev Vet Med. 1995;22:103-113.
19. Mendoza-Ibarra JA, Pedraza-Díaz S, García-Peña FJ, et al. High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. Vet J. 2012;193:146-151.
20. Griffiths IB, Gallego MI, de Leon LS. Levels of some Reproductive Diseases in the Dairy Cattle of Colombia. Trop Anim Health Prod. 1984;16:219-223.
21. OIE. World Organization for Animal Health. Bovine genital campylobacteriosis, disease timelines. In: WAHIS Interface; 2016. Available from: <http://www.oie.int/>. Accessed 26.09.16.
22. Leal DR, Fernandes GO, Gouveia FF, Miranda KL, Neves JP. Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal e em seu entorno. [Prevalence of bovine genital Campylobacteriosis and Trichomoniasis in the Federal District and its surroundings]. Rev Bras Reprod Anim. 2012;36:256-259 [in Portuguese].

23. Stynen APR, Pellegrin AO, Fóscolo CB, et al. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha - Minas Gerais. [Bovine genital campylobacteriosis in dairy herds with reproductive problems of the microregion of Varginha, MG, Brazil]. Arq Bras Med Vet Zootec. 2003;55:766-769 [in Portuguese].
24. Molina L, Perea J, Meglia G, Angón E, García A. Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). Prev Vet Med. 2013;110:388-394.
25. Groff ACM, Kirinus JK, Silva MS, Machado G, Costa MM, Vargas APC. Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. Pesqui Vet Bras. 2010;30:1031-1035.
26. McMillen L, Fordyce G, Doogan VJ, Lew AE. Comparison of culture and a novel 5' *Taq* nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. J Clin Microbiol. 2006;44:938-945.
27. Madoroba E, Gelaw A, Hlokwe T, Mnisi M. Prevalence of *Campylobacter foetus* and *Trichomonas foetus* among cattle from Southern Africa. Afr J Biotechnol. 2011;10:10311-10314.
28. Oliveira Filho RB, Malta KC, Santana VLA, et al. Spatial characterization of *Leptospira* spp. infection in equids from the Brejo Paraibano microregion in Brazil. Geospat Health. 2014;8:463-469.

4.2 ARTIGO 2

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR
Tritrichomonas foetus EM BOVINOS NO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL**

(Artigo a ser enviado para o periódico Acta Parasitologica)

Prevalência e fatores de risco associados à infecção por *Tritrichomonas foetus* em bovinos no estado da Paraíba, Brasil

ABSTRACT

Objetivou-se com este estudo determinar a prevalência da infecção por *Tritrichomonas foetus* e analisar os fatores de risco em bovinos no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Foram coletadas amostras de muco cérvico vaginal de 290 vacas leiteiras e de esmegma de 59 touros, de corte (31), aptidão mista (10) e leite (18), procedentes de 31 propriedades. Para o diagnóstico laboratorial utilizou-se o meio de cultivo Diamond modificado e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para análise dos fatores de risco, foi realizada análise univariada e regressão logística. Foi elaborado um mapa com a prevalência. A prevalência da infecção por *T. foetus* na PCR foi 3,7% (13/349) (I.C. 95%; 2,1 – 6,4%). No cultivo, nenhuma amostra foi positiva para a infecção por *T. foetus*. A porcentagem de propriedades que apresentaram ao menos um animal positivo para *T. foetus* foi 19,3% (6/31). Em relação ao sexo, observou-se uma prevalência da infecção por *T. foetus* de 4,5% (fêmeas) e 0,0% (machos). Na análise dos fatores de risco observou-se associação do contato de fêmeas com touros de outras propriedades (OR 5,9; I.C. 1,5 – 22,4; p = 0,009). Este estudo indica que a infecção por *T. foetus* ocorre em vacas leiteiras na região pesquisada. Tendo em vista a porcentagem de propriedades com animais positivos e com o intuito de reduzir a prevalência, o repouso sexual ou descarte das fêmeas positivas deve ser adotado nas propriedades. Para diminuir os riscos de infecção, recomenda-se evitar o contato das fêmeas com machos de outras propriedades, principalmente quando não se conhece a situação sanitária desses touros em relação a esta infecção.

Keywords: bovino, cultivo, fatores de risco, PCR, tricomonose

Introdução

A tricomonose genital bovina (TGB) é uma enfermidade venérea causada por um protozoário flagelado denominado *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*), cujo habitat é o trato genital de bovinos (PELLEGRIN; LEITE, 2003). Esta enfermidade possui distribuição cosmopolita com ocorrência em rebanhos de aptidão leiteira e de carne (SPÓSITO FILHA; OLIVEIRA, 2009). Dependendo da área estudada, a elevada prevalência dessa doença constitui um dos principais fatores sanitários que interferem nos índices reprodutivos do rebanho bovino (ROCHA et al., 2009).

T. foetus pode persistir em rebanhos enzoóticos sem detecção por muitos anos e ter um impacto econômico substancial em uma criação de gado devido a três fatores: (1) redução da produção de bezerros, devido à perda embrionária precoce ou aborto; (2) redução do peso ao desmame devido à concepção tardia; (3) eliminação e substituição de bovinos infectados (RODNING et al., 2008). A transmissão de *T. foetus* ocorre por meio da monta natural, utilização de touros de repasse ou inseminação artificial com utilização de sêmen sem certificação sanitária (CARVALHO; RODRIGUES, 2006).

Alguns fatores podem contribuir para a introdução ou disseminação do agente como touros mais velhos (PEREZ et al., 1992; RAE et al., 2004; MENDOZA-IBARRA et al., 2012; MENDOZA-IBARRA et al., 2013); proprietários ou fazendeiros que compartilham animais com outros rebanhos (MARDONES et al., 2008); rebanhos maiores em ambientes de manejo mais extensivos, maior proporção touro-vaca, muitos touros por grupo de reprodução e ausência de conhecimento sobre a doença (RAE et al., 2004).

Em função da importância da bovinocultura no Brasil e do impacto que a TGB ocasiona na saúde reprodutiva dos bovinos, é fundamental a realização de estudos epidemiológicos sobre a infecção por *T. foetus* nos rebanhos bovinos. Desta forma,

objetivou-se com este estudo determinar a prevalência da infecção por *T. foetus* e analisar os fatores de risco em bovinos no estado da Paraíba, Brasil.

Materiais e Métodos

Área de estudo

A microrregião do Brejo Paraibano está localizada na mesorregião do Agreste do estado da Paraíba, e é composta por oito municípios: Alagoa Grande, Alagoa Nova, Areia, Bananeiras, Borborema, Matinhas, Pilões e Serraria (IBGE, 2017) (Figura 1).

Amostragem

Foi realizado um estudo transversal para determinar a prevalência de animais infectados por *T. foetus*. Para compor a amostra deste estudo foi estimada a prevalência por meio de um delineamento amostral em dois estágios, dirigido, primordialmente, para detectar propriedades com animais positivos para a infecção por *T. foetus*. No primeiro estágio, o número de propriedades (unidades primárias de amostragem) a ser amostrado foi calculado com o auxílio do programa Win Episcopo 2.0.

A princípio a escolha das unidades primárias de amostragem foi baseada no cadastro de propriedades rurais de bovinos da Secretaria de Estado do Desenvolvimento da Agropecuária e da Pesca da Paraíba (SEDAP), sendo consideradas as criações com mais de 50 bovinos, visto que, são essas propriedades que fazem parte da cadeia produtiva da bovinocultura. O cadastro continha informações sobre a localização da fazenda, tamanho do rebanho e número de animais por faixa etária e sexo.

Para compor a amostra do número de propriedades foram considerados um total de 160 estabelecimentos agropecuários com fêmeas com mais de dois anos de idade (SEDAP) e prevalência esperada de propriedades com animais positivos de 90,5% (OLIVEIRA et al.,

2015), intervalo de confiança de 95% e erro estatístico de 10%, o que forneceu um número mínimo de 28 propriedades.

O número de vacas em cada propriedade (unidade secundária) foi calculado com o auxílio do programa Win Episcopo 2.0, utilizando os valores de prevalência esperada de 33,4% (OLIVEIRA et al., 2015), erro estatístico de 5% e intervalo de confiança de 95%. As amostras de fêmeas foram obtidas apenas em rebanhos leiteiros ou mistos. Em todas as propriedades visitadas, os proprietários de rebanhos foram encorajados a ter todos os touros em idade reprodutiva amostrados.

As propriedades foram selecionadas por sorteio. A propriedade selecionada que, por algum motivo, não pôde ser visitada foi substituída por outra, nas proximidades, com as mesmas características de produção.

No período de julho de 2015 a setembro de 2016 foram coletadas 290 amostras de muco cérvico-vaginal de vacas leiteiras, adultas, não prenhas e 59 amostras de esmegma de touros de corte e leite, adultos e que passaram por um período de repouso sexual de 7 a 15 dias, em 31 propriedades de seis municípios. Para classificar uma fêmea como prenha ou não, baseou-se nos registros da propriedade. Nas propriedades onde houve fêmeas positivas, foram realizadas três coletas nos machos.

Em relação às propriedades amostradas por município, os números foram os seguintes: Areia {(15 propriedades); (n=108 animais, 90 fêmeas e 18 machos)}; Serraria {(1 propriedade); (n=15; 13 fêmeas e 2 machos)}; Alagoa Grande {(4 propriedades); (n=67; 59 fêmeas e 8 machos)}; Bananeiras {(9 propriedades); (n=84; 54 fêmeas e 30 machos)}; Pilões {(1 propriedade); (n=53 fêmeas)}; e Alagoa Nova {(1 propriedade); (n=22; 21 fêmeas e 1 macho)}.

Aplicação de questionário investigativo

Durante as visitas às propriedades foi utilizado um questionário investigativo padronizado para coleta de dados relativos aos possíveis fatores de risco, com as seguintes variáveis: a) dados individuais: faixa etária (2-5 anos, 5,1-7,9 anos e >8 anos) (a idade foi estimada usando os registros da fazenda) e sexo (macho e fêmea), b) dados do rebanho: tipo de exploração (corte, leite e mista), pastos comuns com outras propriedades, qualidade das cercas (boa, ruim e regular), raça predominante (pura e mestiça), tempo de permanência dos reprodutores com as fêmeas (0-6 meses, 6-12 meses e 6-12 meses como repasse), aluguel de pastos, sistema de criação (extensivo, semi-intensivo e intensivo) e incorporações de novas fêmeas reprodutivamente ativas, c) dados reprodutivos: possibilidade de contato de fêmeas com touros de outras propriedades, consórcio de touros, controles reprodutivos regularmente e manejo reprodutivo (monta natural e inseminação artificial).

Coleta de material biológico

Para a obtenção do material biológico, as vacas foram contidas e em seguida foi realizada uma limpeza da região vulvar com água e álcool a 70°GL e, posteriormente, secagem com papel toalha. Após esse procedimento, os lábios vulvares foram afastados e então uma pipeta de lavagem uterina acoplada a seringa de 20mL foi introduzida na vagina para aspirar o muco cérvico vaginal. As amostras foram transferidas e armazenadas em tubos contendo 5mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2).

Os machos foram previamente contidos. Os pelos do óstio prepucial foram aparados. Posteriormente foi realizada uma limpeza da área prepucial externa com álcool a 70°GL e secagem com papel toalha. A coleta do esmegma prepucial foi realizada usando a técnica de raspagem da cavidade prepucial com auxílio de raspadores cilíndricos específicos

esterilizados. Após a coleta, imediatamente os raspadores foram imersos em tubos tipo Falcon estéreis com solução PBS (pH 7,2).

Realizada a coleta das amostras, a suspensão de PBS foi cuidadosamente misturada para assegurar uma amostra homogênea a partir da qual foi tomada uma alíquota de 1mL, destinada ao cultivo de *Tritrichomonas foetus*, que foi imediatamente transferida para tubos contendo Meio Diamond Modificado (DMM), que foram acondicionados à temperatura ambiente e transportados imediatamente ao laboratório para devido processamento.

Processamento laboratorial das amostras

As amostras no DMM foram incubadas em estufa a 37°C por 72 horas e examinadas microscopicamente 24, 48 e 72 horas após a incubação. Na leitura foi pesquisada a presença de *Tritrichomonas*. A confirmação de um cultivo positivo baseou-se na visualização de pelo menos um trofozoíto flagelado vivo com morfologia e movimentos abruptos e ondulantes característicos em cada lâmina.

Alíquotas da suspensão de PBS de todas as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno e submetidas à extração de DNA com o kit comercial “Wizard® SV Genomic DNA Purification System” (Promega®) utilizando-se o protocolo do fabricante.

Após a extração do DNA, as reações de amplificação do material genômico de *T. foetus* foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos TFR3 (5'CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC3') e TFR4 (5'CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA3'), de acordo com o protocolo estabelecido por Felleisen et al. (1998). Além disso, controles positivos e negativos foram usados em todas as reações. Como controle negativo foi utilizada água ultrapura. Como controle positivo, foi utilizada uma amostra isolada de bovino no estado de Pernambuco.

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com *Blue Green* (LGCbio), visualizado em transluminador com luz ultravioleta e fotodocumentado para detecção de produto com 347 pares de bases (pb). Os tamanhos dos *amplicons* foram determinados em comparação com um marcador de 100 pb.

Análise de fatores de risco para infecção por *T. foetus*

Foi realizada uma análise descritiva, determinando-se medidas de dispersão para as frequências absolutas e relativas. Para análise dos fatores de risco associados à infecção por *Tritrichomonas foetus* na espécie bovina, foi realizada uma análise univariada das variáveis de interesse pelo teste qui-quadrado de Pearson, ou Exato de Fisher, quando necessário. Posteriormente foi realizada uma regressão logística considerando como variável dependente para Tricomonose a PCR (positivo ou negativo). As variáveis independentes ou explanatórias consideradas no modelo foram aquelas que apresentaram significância estatística $<0,20$. Essa probabilidade foi estipulada para que possíveis fatores de risco do evento não sejam excluídos da análise (HOSMER; LEMESHOW, 1989). O programa EpiInfo 3.5.2 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos.

Georreferenciamento

Foi elaborado um mapa temático com as distribuições da prevalência na área estudada. Cada propriedade foi georreferenciada para definir e visualizar suas localizações no espaço físico, ou seja, identificar as propriedades no mapa da microrregião do Brejo Paraibano.

A localização das propriedades foi obtida com auxílio de um aparelho de localização por satélite (GPS - *Global Position System*), configurado para fornecer as posições no sistema de coordenadas de latitude / longitude, no Sistema SAD-69 (South American

Datum de 1969), que é o sistema de coordenadas da base cartográfica na microrregião do Brejo Paraibano. Para o mapeamento da prevalência, os dados georreferenciados foram lançados no software QGIS 2.14.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco com licença nº 048/2014.

Resultados

Este é o primeiro relato da infecção por *T. foetus* em bovinos na microrregião geográfica do Brejo Paraibano, região Nordeste do Brasil. Considerando a PCR, a prevalência de bovinos positivos foi 3,7% (13/349) (I.C. 95%; 2,1 – 6,4%). No cultivo, nenhuma amostra foi positiva para a infecção por *T. foetus*.

Dos rebanhos bovinos, 19,3% (6/31) tiveram pelo menos um animal positivo. A prevalência nos rebanhos positivos variou de 9,4% a 28,6%, com uma média de 16,7%. Dos seis municípios pesquisados, quatro (66,7%) possuíam propriedades com animais positivos. O número de propriedades positivas por município positivo variou de uma a três (Figura 2). Os dados referentes ao sexo estão descritos na Tabela I. Quanto à idade, observou-se que todos os animais positivos tinham entre dois e 10 anos de idade, com média de 5,5 anos.

Na análise dos fatores de risco observou-se associação do contato de fêmeas com touros de outras propriedades (OR 5,9; I.C. 1,5 – 22,4; $p = 0,009$) (Tabela II).

Discussão

A prevalência de propriedades positivas, associada à detecção da infecção em 66,7% dos municípios, possibilita afirmar que a infecção está presente no Brejo Paraibano. Na

Paraíba, Mello (1954) determinou prevalência de 8,0% com exame direto ou lâminas coradas pelo Giemsa ou fucsina, mas não cita a microrregião do estudo, quantas propriedades foram amostradas, e não informa se os rebanhos tinham suspeita de tricomose ou problemas reprodutivos.

A prevalência em outras partes do mundo variou de 0,0% (OTTE et al., 1995; MAI et al., 2013; BERNASCONI et al., 2014; HANCOCK et al., 2015) e 61,9% (GONZÁLEZ-CARMONA et al., 2012). No Brasil, de 0,0 (ROCHA et al., 2009; PAZ JÚNIOR et al., 2010; LEAL et al., 2012) a 33,4% (OLIVEIRA et al., 2015).

Neste estudo, as propriedades e os animais foram selecionados independentemente do histórico reprodutivo e se os animais apresentavam sinais clínicos sugestivos da enfermidade. Isso fornece a prevalência geral, e não apenas nos rebanhos com problemas reprodutivos, e pode explicar a menor prevalência encontrada se comparada a estudos pontuais.

Pode-se citar a exigência de células vivas e a baixa sensibilidade, dentre as desvantagens da cultura que podem ter influenciado o resultado deste teste neste estudo (YAO, 2013). Pereira-Neves et al. (2012) demonstraram que *T. foetus* pode se transformar em pseudocistos e pode não ser detectado pelo cultivo.

Neste estudo foram tomadas todas as precauções para obtenção de amostras em quantidade e de qualidade adequadas, minimizando a contaminação, evitando variações de temperatura e o transporte foi realizado o mais rápido possível para o laboratório, com uma média de tempo de aproximadamente três horas. A detecção do DNA do parasito na PCR e não detecção do agente no cultivo pode ser devido a maior sensibilidade da PCR, de acordo com Silva et al. (2009) e Mukhufhi et al. (2003).

A maior positividade em fêmeas que em touros pode ser devido à condição de fêmeas portadoras, que são fêmeas infectadas e, por provável falha da imunidade, mantêm

o parasito por longos períodos (PELLEGRIN; LEITE 2003). Essas vacas são fonte de infecção no rebanho e enfatizam que os programas de controle devem ser baseados em todo o rebanho e não apenas no touro (RAE; CREWS, 2006).

A não detecção de machos positivos pode ser atribuída principalmente a dois fatores: contato com reprodutores de outras propriedades e idade dos touros. A possibilidade de contato de fêmeas com touros de outras propriedades foi um fator de risco neste estudo (OR 5,9; I.C. 1,5 - 22,4; $p = 0,009$). Isso também evidencia o risco de propagação do agente entre os animais de diferentes propriedades, mostrando a importância da monta natural apenas entre animais do mesmo rebanho. Nos estudos de Jin et al. (2014) e Mardones et al. (2008), a infecção foi associada ao contato com animais de outras propriedades. Jesus et al. (2003) também encontraram rebanhos com fêmeas infectadas, mas os machos foram negativos, e sugerem como explicação a troca recente de machos.

Nas propriedades com fêmeas positivas, 63,6% dos touros tinham até cinco anos, e no geral 74,6% tinham até cinco anos, fazendo com que esses animais possam ter debelado a infecção. Em touros jovens, a infecção pode ser transitória (OIE, 2012). Touros mais velhos são mais prováveis de estarem infectados (PEREZ et al., 1992; RAE et al., 2004; MENDONZA-IBARRA et al. 2012, 2013).

Maior prevalência foi observada em animais de rebanhos onde se realizavam incorporações de novas fêmeas reprodutivamente ativas. Isso, associado à ausência de diagnóstico nos animais recém-adquiridos, pode ter sido responsável por essa maior prevalência. Vacas recém-adquiridas possivelmente infectadas poderiam ainda não ter tido contato sexual com os touros das propriedades onde estavam durante a coleta, e consequentemente não houve a possibilidade de transmissão do agente, fazendo com que os machos fossem negativos.

Ausência de programas sanitários que tenham como um dos critérios a entrada de animais novos após certificação sanitária influencia a epidemiologia da infecção (JESUS et al., 2003).

As três coletas nos machos das propriedades com fêmeas positivas minimizam o risco de resultados falso-negativos. No entanto, em cinco machos de três propriedades, isso não foi possível, visto que foram vendidos. Apesar de os touros fornecerem o material ideal para diagnóstico (PEGORARO et al., 2009), este estudo mostra a necessidade da coleta em fêmeas em rebanhos com *status* sanitário desconhecido para essa enfermidade. Recomenda-se a pesquisa dessa infecção na rotina de diagnóstico, para prevenção e controle de rebanhos com baixo índice reprodutivo nesta região.

A ocorrência de propriedades positivas foi maior no setor norte, não havendo distribuição proporcional, assim como em outros estudos que avaliaram a distribuição espacial. Szonyi et al. (2012) identificaram o sudeste do Texas com maior risco para TGB, o que só poderia ser parcialmente explicado pela densidade do rebanho. Molina et al. (2013) indicam que rebanhos no centro-sul da província de La Pampa (Argentina) eram mais propensos a possuir touros infectados do que os localizados em outras áreas da província. As medidas de controle devem ser adotadas principalmente no setor norte.

Este estudo indica que a infecção por *T. foetus* ocorre em vacas leiteiras na região pesquisada. Tendo em vista a porcentagem de propriedades com animais positivos, com o intuito de reduzir a prevalência, o repouso sexual ou descarte das fêmeas positivas deve ser adotado nas propriedades. O contato das fêmeas com machos de outras propriedades deve ser evitado, principalmente quando não se conhece a situação sanitária desses touros em relação a esta infecção. Sugere-se a criação de um programa de controle no Brasil por parte das autoridades sanitárias competentes, com a devida educação sanitária referente a essa enfermidade.

Referências

- Bernasconi Ch., Bodmer M., Doherr M.G., Janett F., Thomann A., Spycher C., *et al.* 2014. *Tritrichomonas foetus*: Prevalence study in naturally mating bulls in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, 200, 289–294. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.029>
- Carvalho D.V., Rodrigues A.F.S.F. 2006. *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller,1928) (Protista, Trichomonadidae) e a implicação na pecuária do Brasil. *CES Revista*, 6, 113-132. (In Portuguese)
- Felleisen R.S.J., Lambelet N., Bachmann P., Nicolet J., Müller N., Gottstein B. 1998. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA Enzyme Immunoassay Based on rRNA Gene Unit Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 513–519.
- González-Carmona L.C., Sánchez-Ladino M.J., Castañeda-Salazar R., Pulido-Villamarín A.D.P., Guáqueta-Munar H., Aranda-Silva M., *et al.* 2012. Determination of presence of *Tritrichomonas foetus* in uterine lavages from cows with reproductive problems. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21, 201-205.
- Hancock A.S., Younis P.J., Beggs D.S., Mansell P.D., Pyman M.F. 2015. Infectious reproductive disease pathogens in dairy herd bulls. *Australian Veterinary Journal*, 93, 349-353. DOI: 10.1111/avj.12369
- Hosmer D.W., Lemeshow S. 1989. Applied logistic regression. John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 241.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Pesquisa Censo Agropecuário 2006. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1267&z=t&o=24>>. Acesso em: 10 set. 2016. (In Portuguese)

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/territorio#/N6/IN%20N9%2025015>>. Acesso em: 18 mar. 2017. (In Portuguese)
- Jesus V.L.T., Pereira M.J.S., Folhadella D.S., Alves P.A.M., Goulart I.L. 2003. Características da infecção por *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) em rebanhos leiteiros de Rio das Flores, Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27, 26-32. (In Portuguese)
- Leal D.R., Fernandes G.O., Gouveia F.F., Miranda K.L., Neves J.P. 2012. Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal e em seu entorno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36, 256-259. (In Portuguese)
- Mai H.M., Irons P.C., Kabir J., Thompson P.N. 2013. Prevalence of bovine genital campylobacteriosis and trichomonosis of bulls in northern Nigeria. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 56. DOI: 10.1186/1751-0147-55-56
- Mardones F.O., Perez A.M., Martinez A. and Carpenter T.E. 2008. Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the province of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 153, 231-237. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.01.038
- Mello M.R. 1954. Dados sobre a incidência de Tricomonose Bovina em alguns Estados do Brasil. *Boletim de Inseminação Artificial*, 6, 16-23. (In Portuguese)
- Mendoza-Ibarra J.A., Ortega-Mora L.M., Pedraza-Díaz S., Rojo-Montejo S., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., García-Peña F.J., et al. 2013. Differences in the prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef cattle farmed under extensive conditions in northern Spain. *The Veterinary Journal*, 196, 547-549. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.10.026>
- Mendoza-Ibarra J.A., Pedraza-Díaz S., García-Peña F.J., Rojo-Montejo S., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., San Miguel-Ibáñez E., et al. 2012. High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection

- in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. *The Veterinary Journal*, 193, 146–151. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.09.020
- Molina L., Perea J., Meglia G., Angón E., García A. 2013. Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Preventive Veterinary Medicine*, 110, 388–394. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.019>
- Mukhufhi N., Irons P.C., Michel A., Peta F. 2003. 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*, 60, 1269–1278. DOI: 10.1016/S0093-691X(03)00138-9
- OIE. 2012. Trichomonosis. In: _____. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014. Office International des epizooties. Vol. 1, cap. 2.4.16. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.16_TRICHOMONOSIS.pdf. Acesso em: 11 abr. 2017.
- Oliveira J.M.B., Silva G.M., Batista Filho A.F.B., Borges J.M., Oliveira P.R.F., Brandespim D.F., *et al.* 2015. Prevalence and risk factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 47, 549–555. DOI: 10.1007/s11250-015-0761-3
- Otte M.J., Ravenborg T., Hüttner K. 1995. A pilot study of elevated abortion and stillbirth ratios in cattle in the foothills of the Eastern plains of Colombia. *Preventive Veterinary Medicine*, 22, 103-113.
- Paz Júnior C.J., Almeida H.J.O., Júnior H.A.F., D'alencar A.S., Galindo M.K.F., Jesus V.L.T., *et al.* 2010. Frequência de infecção por *Tritrichomonas foetus* (RIEDMULLER, 1928) em bovinos leiteiros do município de Sanharó – PE. *Medicina Veterinária*, 4, 6-11. (In Portuguese)

- Pegoraro L.M.C., Saalfeld M.H., Weissheimer C.F., Vieira A.D. 2009. Manejo Reprodutivo em Bovinos de Leite. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, BR, pp. 38. (In Portuguese)
- Pellegrin A.O, Leite R.C. 2003. Atualização Sobre Tricomonose Genital Bovina. Embrapa, Mato Grosso do Sul, BR, pp. 22. (In Portuguese)
- Pereira-Neves A., Nascimento L.F., Benchimol M. 2012. Cytotoxic effects exerted by *Tritrichomonas foetus* pseudocysts. *Protist*, 163, 529–543. DOI: 10.1016/j.protis.2011.11.005
- Perez E., Conrad P.A., Hird D., Ortuno A., Chacon J., Bondurant R., *et al.* 1992. Prevalence and risk factors for *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in northeastern Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine*, 14, 155-165.
- Rae D.O., Crews J.E., Greiner E.C., Donovan G.A. 2004. Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. *Theriogenology*, 61, 605–618. DOI: 10.1016/S0093-691X(03)00236-X
- Rae D.O., Crews J.E. 2006. *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 22, 595–611. DOI: 10.1016/j.cvfa.2006.07.001
- Rocha F.S., Jesus V.L.T., Torres H.M., Gomes M.J.P., Figueiredo M.J. Nascimento E.R. *et al.* 2009. Investigação de *Campylobacter fetus* e *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da região do Médio Paraíba, RJ. *Ciência Rural*, 39, 1586-1589. (In Portuguese)
- Rodning S.P., Wolfe D.F., Carson R.L., Wright J.C., Stockdale H.D., Pacoli M.E., *et al.* 2008. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in several subpopulations of Alabama beef bulls. *Theriogenology*, 69, 212–217. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.014
- Silva A.S., Zanette R.A., Oliveira C.B., Gallio M., Pereira P.L., Fernandes M.B., *et al.* 2009. Leptospirose e tritricomonose: isolamento em propriedade com problemas reprodutivos no sul do Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 12, 87-90. (In Portuguese)

- Spósito Filha E., Oliveira S.M. 2009. Divulgação técnica: Tricomonose bovina. *O Biológico*, São Paulo, 71, 9-11. (In Portuguese)
- Szonyi B., Srinath I., Schwartz A., Clavijo A., Ivanek R. 2012. Spatio-temporal epidemiology of *Tritrichomonas foetus* infection in Texas bulls based on state-wide diagnostic laboratory data. *Veterinary Parasitology*, 186, 450–455. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.11.075
- Yao C. 2013. Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle? *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1–9. DOI: 10.1099/jmm.0.047365-0

Tabelas

Tabela I




Prevalência da infecção por *T. foetus* em rebanhos bovinos, por sexo, na microrregião do Brejo Paraibano, Brasil.

Município	Nº Machos	Machos positivos	%	Nº Fêmeas	Fêmeas positivas	%
Alagoa Grande	8	-	0,0	59	2	3,4
Alagoa Nova	1	-	0,0	21	0	0,0
Areia	18	-	0,0	90	3	3,3
Bananeiras	30	-	0,0	54	6	11,1
Pilões	0	-	0,0	53	0	0,0
Serraria	2	-	0,0	13	2	15,4
Total	59	-	0,0	290	13	4,5

Tabela II

Análise univariada e regressão logística dos fatores de risco associados à infecção por *Tritrichomonas foetus* em bovinos no Brejo Paraibano

Variável	N	PCR Positivo (%)	Valor de p	Regressão Logística		
				OR	IC 95%	Valor de p
Sexo						
Fêmea	290	13 (4,5%)	0,085			
Macho	59	-				
Faixa etária (anos)						
Entre 2 a 5	152	6 (3,9%)	0,980			
Entre 5,1 a 7,9	111	4 (3,6%)				
> 8	86	3 (3,5%)				
Raça						
Pura	31	-	0,291			
Mestiça	318	13 (4,1%)				
Tipo de criação						
Extensivo	86	4 (4,7%)	0,775			
Semi-intensivo	256	9 (3,5%)				
Intensivo	7	-				
Tipo de exploração						
Corte	31	-	0,517			
Leite	270	11 (4,1%)				
Mista	48	2 (4,2%)				
Pasto comum						
Sim	10	-	0,680			
Não	339	13 (3,8%)				
Aluga pasto						
Sim	19	-	0,476			
Não	330	13 (13,9%)				
Qualidade da cerca						
Boa	205	7 (3,4%)	0,913			
Ruim	1	-				
Regular	143	6 (4,2%)				
Manejo reprodutivo						
Monta natural	189	8 (4,2%)	0,400			
Inseminação artificial	160	5 (3,1%)				

Contato das fêmeas com reprodutores de outras propriedades						
Sim	80	8 (10,0%)	0,002	5,86	1,53 – 22,39	0,009
Não	269	5 (1,9%)				
Incorporam-se fêmeas no rebanho em atividade reprodutiva						
Sim	238	8 (3,4%)	0,027	1,00	0,19 – 5,25	0,999
Não	90	2 (2,2%)				
Esporadicamente	21	3 (14,3%)				
Consórcio de touros*						
Sim	44	-	0,117			
Não	252	13 (5,2%)				
Controle reprodutivo						
Sim	239	9 (3,8%)	0,609			
Não	110	4 (3,6%)				
Tempo de permanência dos reprodutores com as fêmeas*						
0 – 6 meses	21	-	0,594			
6,1 – 12 meses	168	8 (4,8%)				
6,1 – 12 meses (repasse)	107	5 (4,7%)				

*Base = 296

Figuras



Figura 1

Microrregião do Brejo Paraibano (azul) do estado da Paraíba (verde) no nordeste do Brasil.

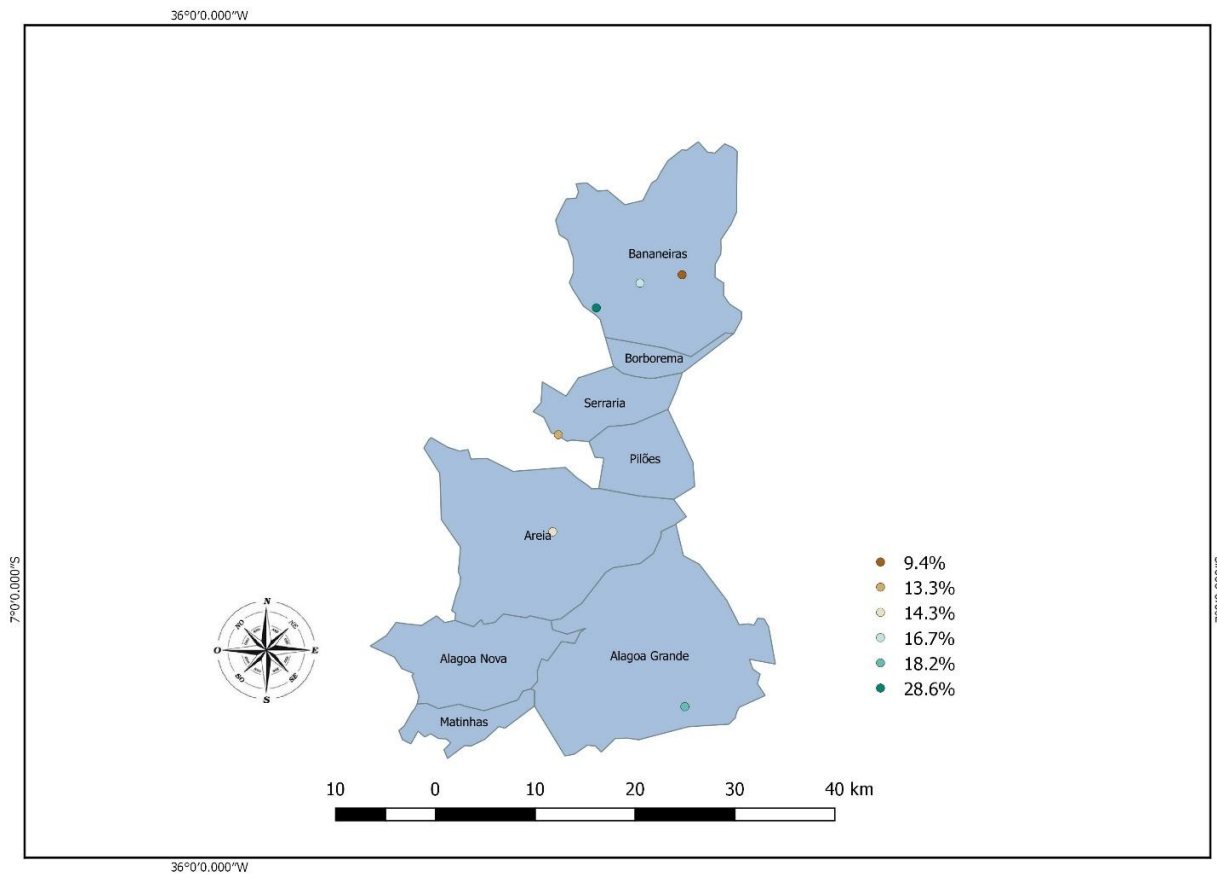


Figura 2

Distribuição e prevalência da infecção por *T. foetus* na microrregião do Brejo Paraibano, estado da Paraíba, Brasil.

5 CONCLUSÃO

- Apesar de nenhum touro ter sido positivo para *T. foetus*, a infecção foi observada em fêmeas de aptidão leiteira. Isso pode ser atribuído principalmente a três fatores: contato com reprodutores de outras propriedades; idade dos animais e introdução de fêmeas infectadas.
- A quantidade de rebanhos com animais positivos, associada à detecção da infecção em bovinos de todos os municípios pesquisados possibilita afirmar que a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* está presente em bovinos na microrregião do Brejo Paraibano.
- A ocorrência de rebanhos positivos para *T. foetus* foi maior no setor norte da microrregião do Brejo Paraibano, onde se encontra o município de Bananeiras, não havendo uma distribuição proporcional. Dessa forma, é necessária intervenção principalmente nesta área para o controle da infecção.
- Os proprietários devem evitar o contato das fêmeas com machos de outras propriedades, principalmente quando não se conhece a situação sanitária desses touros em relação a estas infecções, para diminuir os riscos de infecção por esses agentes, bem como o repouso sexual ou descarte das fêmeas positivas deve ser adotado nas propriedades.
- Neste estudo, o manejo reprodutivo não teve associação com as prevalências das infecções. No entanto, recomenda-se a adoção de um programa de inseminação artificial nas propriedades com sêmen de touros negativos, bem como um programa de vacinação contra a Campilobacteriose Genital Bovina para estimular a imunidade, com o intuito de reduzir a ocorrência de possíveis problemas reprodutivos. Essas práticas devem ser adotadas para evitar a introdução e disseminação de diversos patógenos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, T. M.; STYNEN, A. P. R.; MIRANDA, K. L.; LAGE, A. P. (2011) Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. *Pesq Vet Bras*, 31(4):336-344.
- AMARAL, V.; SANTOS, S. M.; FENERICH, F. L. (1970) Levantamento da incidência do *Tritrichomonas foetus*, no Estado de São Paulo. *Biológico*, 36:201-204.
- BENCHIMOL, M.; DIAS, A. B.; FONTES, R. (2006) Interaction of *Tritrichomonas foetus* and the bovine oviduct in an organ culture model. *Vet Parasitol*, 140:244–250.
- BONDURANT, R. H. (2007) Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology*, 68:461–473.
- BONDURANT, R. H. (2005) Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet Clin Food Anim*, 21(2):383-408.
- BOREL, N.; FREY, C. F.; GOTTSTEIN, B.; HILBE, M.; POSPISCHIL, A.; FRANZOSO, F. D.; WALDVOGEL, A. (2014) Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Vet J*, 200:218–229.
- BRASIL (2011) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde. 40 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em 01 jan. 2017.
- BURNS, B.M.; FORDYCE, G.; HOLROYD, R. G. (2010) A review of factors that impact on the capacity of beef cattle females to conceive, maintain a pregnancy and wean a calf—Implications for reproductive efficiency in northern Australia. *Anim Reprod Sci*, 122:1–22.
- CARVALHO, D. V.; RODRIGUES, A. F. S. F. (2006) *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) (Protista, Trichomonadidae) e a implicação na pecuária do Brasil. *CES Revista*, 113-132.
- CARVALHO, L. F. R.; MELO, C. B., DRUMMOND, V. O. (2007) Procedimentos para exportação e importação de material genético pelo Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, 31(3):415-422.
- CLARK, B. L. (1971) Review of bovine vibriosis. *Aust Vet J*, 47:103–107.
- COBO, E. R.; CORBEIL, L. B.; BONDURANT, R. H. (2011) Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. *J Reprod Immunol*, 89:55–61.
- COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; MENDOZA-IBARRA, J. A.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; ROJO-MONTEJO, S.; NAVARRO-LOZANO, V.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; ORTEGA-MORA, L. M.; OSORO, K. (2014) Efficacy of a control program

for bovine trichomonosis based on testing and culling infected bulls in beef cattle managed under mountain pastoral systems of Northern Spain. *Vet J*, 200:140–145.

CORBEIL, L. B.; CAMPERO, C. M.; RHYAN, J. C.; BONDURANT, R. H. (2003) Vaccines against sexually transmitted diseases. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:118.

FELLEISEN, R. S. J. (1999) Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes Infect*, 1:807–816.

FERNÁNDEZ, M. E.; CAMPERO, C. M.; MORRELL, E.; CANTÓN, G. J.; MOORE, D. P.; CANO, A.; MALENA, R.; ODEÓN, A. C.; PAOLICCHI, F.; ODRIOZOLA, E. R. (2007) Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)*, 88(6):246-254.

FINLAY, R. C.; RUCKERBAUER, G. M.; STOVELL, P. L. (1985) *Campylobacter fetus* in Artificial Insemination Unit and Slaughterhouse Bulls in Ontario. *Can J Comp Med*, 49:231-232.

GARCIA, M. M.; RUCKERBAUER, G. M.; EAGLESOME, M. D.; BOISCLAIR, W. E. (1983) Detection of *Campylobacter fetus* in artificial insemination bulls with a transport enrichment medium. *Can J Comp Med*, 47:336-340.

GIUFFRIDA, R. (2007) Fatores de risco e comparação de técnicas de diagnóstico para campilobacteriose genital bovina em touros do município de Presidente Prudente-SP. Tese (doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 105 p.

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

GOMES, M. J. P.; FERNANDES, J. C. T.; SILVA, C. E.; SOUSA, S. T. B. (1991) Identificação de *Tritrichomonas foetus* em bovinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq Fac Vet UFRGS*, 19:103-111.

GONZÁLEZ-CARMONA, L. C.; SÁNCHEZ-LADINO, M. J.; CASTAÑEDA-SALAZAR, R.; PULIDO-VILLAMARÍN, A. D. P.; GUÁQUETA-MUNAR, H.; ARANDA-SILVA, M.; RUEDA-VARÓN, M. J. (2012) Determination of presence of *Tritrichomonas foetus* in uterine lavages from cows with reproductive problems. *Rev Bras Parasitol Vet, Jaboticabal*, 21(3):201-205.

GRIFFITHS, I. B.; GALLEGU, M. I.; DE LEON, L. S. (1984) Levels of some Reproductive Diseases in the Dairy Cattle of Colombia. *Trop Anim Health Prod*, 16:219-223.

GROTELUESCHEN, D. M.; CHENEY, J.; HUDSON, D. B.; SCHWEITZER, D. J.; KIMBERLING, C. V.; TATON-ALLEN, G. F.; NIELSEN K. A.; MARSH, D. J. (1994) Bovine Trichomoniasis: Results of a Slaughter Survey in Colorado and Nebraska. *Theriogenology*, 42:165-171.

GUIDA, H. G.; RAMOS, A. A.; COELHO, N. M.; RAMOS, J. A.; MENDONZA, T. R. (1972) Incidência de *Trichomonas foetus* em Reprodutores Bovinos da Região Centro-Sul do Brasil. *Pesq Agropec Bras*, 7:23-25.

HANCOCK, A. S.; YOUNIS, P. J.; BEGGS, D. S.; MANSELL, P.D.; PYMAN, M. F. (2015) Infectious reproductive disease pathogens in dairy herd bulls. *Aust Vet J*, 93(10):349-353.

HOSSEINZADEH, S.; KAFI, M.; POUR-TEIMOURI, M. (2013) PCR detection of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in smegma samples collected from dairy cattle in Fars, Iran. *Vet Res Forum*, 4(4):227-231.

HUM, S.; QUINN, K.; BRUNNER, J.; ON, S. L. W. (1997) Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J*, 75:827-831.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Pesquisa Censo Agropecuário 2006. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1262&z=t&o=24>>. Acesso em: 02 jan. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Pesquisa Pecuária Municipal 2015. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo9.asp?e=c&p=PP&z=t&o=24>>. Acesso em: 01 jan. 2017.

JESUS, V. L. T.; PEREIRA, M. J. S.; ALVES, P. A. M.; FONSECA, A. H. (2004) Fatores intrínsecos do hospedeiro associados à prevalência de tricomonose genital bovina. *Rev Bras Parasitol Vet*, 13(4):159-163.

JESUS, V. L. T.; PEREIRA, M. J. S.; FOLHADELLA, D. S.; ALVES, P. A. M.; GOULART, I. L. (2003) Características da infecção por *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) em rebanhos leiteiros de Rio das Flores, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Reprod Anim*, 27(1):26-32.

JESUS, V. L. T.; TRÉS, J. E.; JACOB, J. C. F.; LATORRE, L. B. L. M.; SANTOS JÚNIOR, J. C. B. (1999) Campilobacteriose genital bovina: ocorrência nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. *R Bras Ci Vet*, 6(3):133-136.

JIMENEZ, D. F.; PEREZ, A. M.; CARPENTER, T. E.; MARTINEZ, A. (2011) Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Prev Vet Med*, 101:157-162.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. (2006) Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semin: Cien Agrar*, 27(2):289-298.

KENNEDY, J. A.; PEARL, D.; TOMKY, L.; CARMAN, J. (2008) Pooled polymerase chain reaction to detect *Tritrichomonas foetus* in beef bulls. *J Vet Diagn Invest*, 20:97-99.

KODAKARAM-TAFTI, A.; IKEDE, B. O. (2005) A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, from 1990 to 2001. *Can Vet J*, 46:635-637.

KVASNICKA, W. G.; TAYLOR, R. E. L.; HUANG, J. C.; HANKS, D.; TRONSTAD, R. J.; BOSOMWORTH, A.; HALL, M. R. (1989) Investigations of the Incidence of Bovine

Trichomoniasis in Nevada and of the Efficacy of Immunizing Cattle with Vaccines Containing *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology*, 31(5):963-971.

LADEIRA, S. R. L.; SCHILD, A. L. (2007) Campilobacteriose. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A; BORGES, J. R. J. Doenças de ruminantes e eqüídeos. Santa Maria: Pallotti. Cap. 3 (Doenças Bacterianas), p. 249-256.

LEAL, D. R.; FERNANDES, G. O.; GOUVEIA, F. F.; MIRANDA, K. L.; NEVES, J. P. (2012) Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal e em seu entorno. *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte*, 36(4):256-259.

LEITE, R. C. (1977) Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 38p.

LUCAS, J. J.; HAYES, G. R.; KALSI, H. K.; GILBERT, R. O.; CHOE, Y.; CRAIK, C. S.; SINGH, B. N. (2008) Characterization of a cysteine protease from *Tritrichomonas foetus* that induces host-cell apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 477:239–243.

MADOROBA, E.; GELAW, A.; HLOKWE, T.; MNISI, M. (2011) Prevalence of *Campylobacter foetus* and *Trichomonas foetus* among cattle from Southern Africa. *Afr J Biotechnol*, 10(50):10311-10314.

MAI, H. M.; IRONS, P. C.; KABIR, J.; THOMPSON, P. N. (2013a) Herd-level risk factors for *Campylobacter fetus* infection, *Brucella* seropositivity and within-herd seroprevalence of brucellosis in cattle in northern Nigeria. *Prev Vet Med*, 111:256– 267.

MAI, H. M.; IRONS, P. C.; KABIR, J.; THOMPSON, P. N. (2013b) Prevalence of bovine genital campylobacteriosis and trichomonosis of bulls in northern Nigeria. *Acta Vet Scand*, 55:56.

MARQUES, E. G.; SANTOS, K. J. G.; FARIA, W. N. (2005) Implantação de estação de monta em rebanhos de corte. *Revista Eletrônica FMB, Goiás*, ISSN 1808-8597, 1(1):13-21.

MARTÍN-GÓMEZ, S.; GONZÁLEZ-PANIELLO, R.; PEREIRA-BUENO, J.; ORTEGA-MORA, L. M. (1998) Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef bulls in northwestern Spain. *Vet Parasitol*, 75:265–268.

McMILLEN, L.; FORDYCE, G.; DOOGAN, V. J.; LEW, A. E. (2006) Comparison of culture and a novel 5' *Taq* nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *J Clin Microbiol*, 44(3):938-945.

MEDEIROS, P. M.; FIGUEIREDO, J. B. (1971) Tricomonose Bovina em alguns Municípios do Estado de Minas Gerais. *Arq Esc Vet UFRMG*, 23:143-147.

MELLO, M. R. (1954) Dados sobre a incidência de Tricomonose Bovina em alguns Estados do Brasil. *Boletim de Inseminação Artificial*, 6:16-23.

MENDOZA-IBARRA, J. A.; ORTEGA-MORA, L. M.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; ROJO-MONTEJO, S.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; GARCÍA-PEÑA, F. J.; NAVARRO-

- LOZANO, V.; CUEVAS-MARTÍN, M. D. C.; OSORO, K.; COLLANTES-FERNANDEZ, E. (2013) Differences in the prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef cattle farmed under extensive conditions in northern Spain. *Vet J*, 196:547–549.
- 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. (2012) High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. *Vet J*, 193:146–151.
- MICHI, A. N.; FAVETTO, P. H.; KASTELIC, J.; COBO, E. R. (2016) A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology*, 85:781–791.
- MICKELSEN, W. D.; PAISLEY, L. G.; ANDERSON, P. B. (1986) Prevalence of Postservice Pyometra in a Herd of Beef Cows Infected with Trichomoniasis: a Case Report. *Theriogenology*, 25(5):741-744.
- MIDDLEJ, V.; VILELA, R.; DIAS, A. B.; BENCHIMOL, M. (2009) Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. *Vet Parasitol*, 165:216–230.
- MIRANDA, K. L. (2005) Prevalência da infecção por *Campylobacter fetus* em bovinos de corte no Brasil - 2000. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 38p.
- MOLINA, L.; PEREA, J.; MEGLIA, G.; ANGÓN, E.; GARCÍA, A. (2013) Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Prev Vet Med*, 110:388– 394.
- MSHELIA, G. D.; AMIN, J. D.; EGWU, G. O. YAVARI, C. A.; MURRAY, R. D.; WOLDEHIWET, Z. (2010a) Detection of antibodies specific to *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in the vaginal mucous of Nigerian breeding cows. *Vet Ital*, 46(3):337–344.
- MSHELIA, G. D.; AMIN, J. D.; WOLDEHIWET, Z.; MURRAY, R. D.; EGWU, G. O. (2010b) Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reprod Domest Anim*, 45:221–230.
- MUKHUFHI, N.; IRONS, P. C.; MICHEL, A.; PETA, F. (2003) 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*, 60:1269–1278.
- MUTTO, A. A.; GIAMBIAGGI, S.; ANGEL, S. O. (2006) PCR detection of *Tritrichomonas foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation. *Vet Parasitol*, 136:357-361.
- NJIRO, S. M.; KIDANEMARIAM, A. G.; TSOTETSI, A. M.; KATSANDE, T. C.; MNISI, M.; LUBISI, B. A.; POTTS, A. D.; BALOYI, F.; MOYO, G.; MPOFU, J.; KALAKE, A.; WILLIAMS, R. (2011) A study of some infectious causes of reproductive disorders in cattle owned by resource-poor farmers in Gauteng Province, South Africa. *J S Afr Vet Assoc*, 82(4):213–218.

OIE (2008) Bovine genital campylobacteriosis. In: _____. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Épizooties. Volume 1, cap. 2.4.4. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.04_BGC.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2017.

OIE (2017) OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2017. Office International des Épizooties. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

OIE (2012) Trichomonosis. In: _____. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014. Office International des epizooties. Volume 1, cap. 2.4.16. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.16_TRICHOMONOSIS.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2017.

OLIVEIRA FILHO, R. B.; MALTA, K. C.; SANTANA, V. L. A.; HARROP, M. H. V.; STIPP, D. T.; BRANDESPIM, D. F.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JR, J. W. (2014) Spatial characterization of *Leptospira* spp. infection in equids from the Brejo Paraibano microregion in Brazil. *Geospatial Health*, 8:463-469.

OLIVEIRA, F. W. R.; MOLNÁR, L.; MOLNÁR, É. (2000) Ocorrência de tricomonose bovina no Estado do Pará, Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*, 24(2):106-112.

OLIVEIRA, J. M. B.; SILVA, G. M.; BATISTA FILHO, A. F. B.; BORGES, J. M.; OLIVEIRA, P. R. F.; BRANDESPIM, D. F.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JR, J. W. (2015) Prevalence and risk factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil. *Trop Anim Health Prod*, 47:549-555.

OTTE, M. J.; RAVENBORG, T.; HÜTTNER, K. (1995) A pilot study of elevated abortion and stillbirth ratios in cattle in the foothills of the Eastern plains of Colombia. *Prev Vet Med*, 22:103-113.

PARSONSON, I. M.; CLARK, B. L.; DUFTY, J. H. (1976) Early Pathogenesis and Pathology of *Tritrichomonas foetus* Infection in Virgin Heifers. *J Comp Pathol*, 86:59-66.

PAZ JÚNIOR, C.J.; ALMEIDA, H.J.O.; JÚNIOR, H.A.F.; D'ALENCAR, A.S.; GALINDO, M.K.F.; JESUS, V.L.T.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. (2010) Frequência de infecção por *Tritrichomonas foetus* (RIEDMULLER, 1928) em bovinos leiteiros do município de Sanharó – PE. *Med Vet (Recife)*, 4(1):6-11.

PEGORARO, L. M. C.; SAALFELD, M. H.; WEISSHEIMER, C. F.; VIEIRA, A. D. (2009) Manejo Reprodutivo em Bovinos de Leite. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 38 p.

PELLEGRIN, A. O. (2002) A Campilobacteriose e Tricomonose são doenças reemergentes? Corumbá: Embrapa Pantanal, 24 p.

PELLEGRIN, A. O.; FIGUEIREDO, J. F.; LEITE, R. C.; LAGE, A. P. (2003) Imunofluorescência direta: um teste sensível e específico para o diagnóstico da campilobacteriose genital em touros. Corumbá: Embrapa Pantanal. 38p. (Circular Técnica, 44).

- PELLEGRIN, A. O.; LAGE, A. P.; SERENO, J. R. B.; RAVAGLIA, E.; COSTA, M. S.; LEITE, R. C. (2002) Bovine Genital Campylobacteriosis in Pantanal, State of Mato Grosso Sul, Brazil. *Revue Élev Méd Vét Pays Trop*, 55(3):169-173.
- PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R. C. (2003) Atualização Sobre Tricomonose Genital Bovina. Mato Grosso do Sul: Embrapa, 22p.
- PEREZ, E.; CONRAD, P. A.; HIRD, D.; ORTUNO, A.; CHACON, J.; BONDURANT, R.; NOORDHUIZEN, J. (1992) Prevalence and risk factors for *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in northeastern Costa Rica. *Prev Vet Med*, v. 14, p. 155-165.
- PETER, D. A.; FALES, W. H.; MILLER, R. B.; YOUNGQUIST, R. S.; RANDLE, R. F.; GANJAM, I. K.; LYBYER, J. L. (1995) *Tritrichomonas foetus* infection in a herd of Missouri cattle. *J Vet Diagn Invest*, 7:278-280.
- RABELLO, E. X. (1955) Incidência da *Trichomonas foetus* Riedmüller, 1928, em touros usados para inseminação artificial no estado de São Paulo. *Rev Fac Med Vet S Paulo*, 5(3):539-550.
- RAE, D. O.; CREWS, J. E.; GREINER, E. C.; DONOVAN, G. A. (2004) Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. *Theriogenology*, 61:605–618.
- RAE, D. O.; CREWS, J. E. (2006) *Tritrichomonas foetus*. *Vet Clin Food Anim*, 22:595-611.
- RHYAN, J. C.; BLANCHARD, P. C.; KVASNICKA, W. G.; HALL, M. R.; HANKS, D. (1995) Tissue-invasive *Tritrichomonas foetus* in four aborted bovine fetuses. *J Vet Diagn Invest*, 7:409-412.
- ROCHA, F. S.; JESUS, V. L. T.; TORRES, H. M.; GOMES, M. J. P.; FIGUEIREDO, M. J.; NASCIMENTO, E. R.; FERREIRA, T.; AQUINO, M. H. C. (2009) Investigação de *Campylobacter fetus* e *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da região do Médio Paraíba, RJ. *Ciênc Rural*, 39(5):1586-1589.
- RODNING, S. P.; WOLFE, D. F.; CARSON, R. L.; WRIGHT, J. C.; STOCKDALE, H. D.; PACOLI, M. E.; BUSBY, H. C.; ROWE, S. E. (2008) Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in several subpopulations of Alabama beef bulls. *Theriogenology*, 69:212–217.
- ROEHE, R. (1948) Tricomoniase bovina. *Boletim da Diretoria da Produção Animal / Serviço de Epizootiologia e Divulgação Sanitária*, 4(6):21-26.
- SCHULZE, F.; BAGON, A.; MÜLLER, W.; HOTZEL, H. (2006) Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. *J Clin Microbiol*, 44(6):2019-2024.
- SERIN, I.; ALDEMIR, O. S.; CEYLAN, A.; SERIN, G. (2010) Prevalence of Trichomoniasis in dairy cows with some reproductive disorders in Aydin Province of Turkey. *J Anim Vet Adv*, 9(11):1646-1649.
- SILVA, A. S.; ZANETTE, R. A.; GALLIO, M.; FERNANDES, M. B.; MONTEIRO, S. G.; BADKE, M. R. T. Problemas reprodutivos em bovinos de corte de uma propriedade no sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. *Anais...* Gramado, 2008.

SILVA, A. S.; ZANETTE, R. A.; OLIVEIRA, C. B.; GALLIO, M.; PEREIRA, P. L.; FERNANDES, M. B.; TONIN, A. A.; BADKE, M. R. T.; MONTEIRO, S. G. (2009) Leptospirose e tritricomonose: isolamento em propriedade com problemas reprodutivos no sul do Brasil. *Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR*, Umuarama, 12(1):87-90.

SILVA, C. E.; GOMES, M. J. P.; SOUSA, S. T. B.; FERNANDES, J. C. T. (1991) Meios para isolamento e cultivo de *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). *Arq Fac Vet UFRGS*, 19:113-124.

SOUSA, S. T. B.; FERNANDES, J. C. T.; SILVA, C. E.; GOMES, M. J. P. (1991) Métodos para a colheita de *Tritrichomonas foetus* em fêmeas e machos bovinos. *Arq Fac Vet UFRGS*, 19:125-132.

SPÓSITO FILHA, E; OLIVEIRA, S. M. (2009) Divulgação técnica: Tricomonose bovina. *Biológico*, São Paulo, 71(1):9-11.

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

WALKER, R. L.; HAYES, D. C.; SAWYER, S. J.; NORDHAUSEN, R. W.; VAN HOOSEAR, K. A.; BONDURANT, R. H. (2003) Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. *J Vet Diagn Invest*, 15:14-20.

YAO, C. (2013) Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle? *J Medical Microbiol*, 62:1–9.

YAO, C. (2012) Opportunistic Human Infections Caused by *Tritrichomonas* species: A Mini-Review. *Clin Microbiol Newsl*, 34(16):127-131.

APÊNDICE



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO PARA TRICOMONOSE E
CAMPILOBACTERIOSE**

FICHA Nº:
DATA: / /
INVESTIGADOR:

PROPRIEDADE Nº

IDENTIFICAÇÃO

Fazenda:
Endereço:
Município:
Contatos:
Coordenadas geográficas:

Proprietário:

Número de animais

Sexo/Idade	<1 ano	1-2 anos	2-3 anos	>3 anos	Total
Macho					
Fêmea					
Total					

Área destinada aos bovinos:
Proporção Macho:Fêmea:
Quantidade de animais amostrados:

DADOS DO REBANHO

1) Tipo de criação

- a) Extensivo
- b) Semi-intensivo
- c) Intensivo

2) Tipo de exploração

- a) Corte
- b) Leite
- c) Mista

3) Raça predominante

Qual?

-
- a) Pura
 - b) Mestiça

4) Qualidade das cercas

- a) Boa
- b) Regular
- c) Ruim

5) Realizam-se incorporações de novos animais reprodutivamente ativos?

Machos: a) Sim b) Não
Fêmeas: a) Sim b) Não

6) Se sim, qual a procedência dos animais?

- a) comerciantes de animais
- b) exposição/leilão
- c) feira livre

7) Os animais adquiridos são virgens?

- a) Sim
- b) Não

8) Os touros permanecem sempre com o mesmo grupo de fêmeas?

- a) Sim
- b) Não

9) Tempo de permanência dos reprodutores com as fêmeas

- a) 0-3 meses
- b) 3-6 meses
- c) 6-9 meses
- d) 9-12 meses

Detalhar

meses: _____

10) Pastos comuns com outras propriedades

- a) Sim
- b) Não

11) Aluguel de pastos

- a) Sim
- b) Não

12) Realização de quarentena

- a) Sim
- b) Não

DADOS REPRODUTIVOS

13) Intervalo entre partos: _____

14) Manejo reprodutivo

- a) Monta natural
- b) Inseminação Artificial
- c) Transferência de embriões

15) Possibilidade de contato de fêmeas com touros de outras propriedades?

- a) Sim
- b) Não

16) As fêmeas apresentam abortos

- a) Sim
- b) Não

17) Houve aumento no número de abortos no último ano?

- a) Sim
- b) Não

18) As fêmeas apresentam repetição deaios?

- a) Sim
- b) Não

19) Notou aumento na frequência de repetição deaios?

- a) Sim
- b) Não

20) São feitos controles reprodutivos regularmente?

- a) Sim
- b) Não

21) Realiza provas diagnósticas em touros recém-adquiridos?

- a) Sim
- b) Não

22) Vacina contra enfermidades reprodutivas

a) Sim.

Quais? _____

b) Não

23) Fornece suplementos alimentares na época reprodutiva?

- a) Sim
- b) Não

24) Origem do sêmen

- a) Própria fazenda
- b) Central idônea
- c) Terceiros

25) Touro de repasse

- a) Sim
- b) Não

26) Consórcio de touros

- a) Sim
- b) Não

OUTROS DADOS

27) Tem conhecimento sobre tricomonose ou campilobacteriose?

- a) Sim
- b) Não

28) Já realizou exame contra tricomonose ou campilobacteriose?

- a) Sim
- b) Não

29) Se sim, os resultados foram positivos?

- a) Sim
- b) Não

30) Possui assistência veterinária

- a) Sim
- b) Não

ANEXOS

I - Licença para uso de animais em pesquisa



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	048/2014
Número do processo	23082.003578/2014
Data de emissão da licença	07 de Abril de 2014
Título do Projeto	Situação epidemiológica da infecção por Tritrichomonas foetus em bovinos na microrregião geográfica do Brejo Paraibano.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	José Wilton Pinheiro Júnior
Colaboradores	Ruy Brayner de Oliveira Filho; Antônio Fernando Barbosa Batista Filho; Júnior Mário Baltazar de Oliveira; Paulo Jedyson da Silva Feitosa; Jonas de Melo Borges
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Bovino ; total de 385 animais.



Prof. Dr. Marleyne Amorim
 Coordenadora CEUA

Prof. Dr. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
 (Presidente em Exercício da CEUA-UFRPE)

II - Normas do periódico Brazilian Journal of Microbiology

SCOPE OF THE JOURNAL

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers and reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication fee for this journal is USD 300 for non-Brazilian citizens, R\$ 840,00 for Brazilian citizens and USD 100 for Genome Announcements.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

- *Research paper*: the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.
- *Short Communication*: a Short Communication is new and significant findings. Submit form is the same way as research paper. They receive the same review, they are not published more rapidly than research paper.
- *Short-review*: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest (ONLY BY INVITATION).
- *Letter to the editor*: Letters to the Editor are intended only for comments on final, typeset articles published in the journal (manuscripts posted online are not accepted) and must cite published references to support the writer's argument.

Your manuscript must be written clearly, in comprehensible English.

The text submitted for publication has to be English reviewed before submission. To submit the manuscript, you must attach the issued certificate in supplementary files.

SECTIONS

Biotechnology and Industrial Microbiology

Bacterial Fermentation

- biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by bacteria.
- molecular aspects of bacterial biotechnology

Fungal Fermentation

- biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by fungi
- molecular aspects of fungal biotechnology

Food Microbiology

Technology

- applications of microorganisms (bacteria and fungi) for food production

Safety and Quality

- food borne diseases
- food spoilage
- microbial ecology in foods

Clinical Microbiology

Bacteria, Fungi, and Virus

- Laboratory diagnosis of human infections and the role of the laboratory in both the management of infectious diseases and the elucidation of the epidemiology of infections.
- Microbial resistance and mechanisms of antimicrobial agents.

Environmental Microbiology

Microbial Ecology

- ecology of natural microbial assemblages, microbial diversity of natural environments such as water, soil, sediments and higher organisms
- microbial interactions

- environmental aspects of public health
- biodegradation
- bioremediation

Bacterial and Fungal Molecular

Pathogenesis

- Genetic, biochemical, and structural basis of bacterial and fungal pathogenesis

Bacterial and Fungal Physiology

- Biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation, and other related process of bacteria and fungi

Veterinary Microbiology

- control and/or treatment of animals
- animal pathogen diagnostics
- veterinary or zoonotic pathogens

SUBMISSION OF A MANUSCRIPT

Submission of a manuscript to Brazilian Journal of

Microbiology is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

PUBLICATION OF A MANUSCRIPT

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a pre requisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

ETHICS

When the study, described in the manuscript, is related to experiments carried out with human beings and/or animals, author(s) must inform, within the text, if the research project has been approved by the Research Ethics Committee of their institution, according to the Declaration of Helsinki (http://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao_de_helsinki.pdf).

Experimental studies involving animals should follow the guidelines established by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>) (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996), and the *Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA) (Ethical Principles for Animal Experimentation of the

Brazilian College of Animal Experimentation - http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65).

PREPARATION OF A MANUSCRIPT

The manuscript should be submitted as one single WORD file. This single file should include: the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For research papers, the WORD file should contain:

- Title (100 characters)
- Running title (40 characters)
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 200 words)
- Three to five key-words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements (optional)
- References

For short communications, the WORD file should contain:

- Title
- Running title
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 50 words)
- Three to five key-words
- Text not divided in topics
- Acknowledgements (optional)
- References

For short-review, the WORD file should contain:

- Title (100 characters)
- Running title (40 characters)
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 200 words)
- Three to five key-words
- Text
- Acknowledgements (optional)
- References

For Letter to the Editor the WORD file should contain:

- Title (100 characters)
- Running title (40 characters)
- Authors and Affiliations
- Text (no more than 500 words and must be typed double-spaced)
- References

Author affiliations should be presented in decreasing hierarchical order (e.g. Harvard University, Harvard Business School, Boston, USA) and should be written as established in its own language (e.g. Université Paris-Sorbonne; Harvard University, Universidade de São Paulo).

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The lines in each page of the manuscript should be numbered too. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission. Manuscripts written in poor English will not be accepted. *Research papers* and *short-review* consist of 20 pages, including references, tables and figures. Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission (*Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*) and the units are to be used according to SI (*International Systems of Units*).

Suggested Reviewers

Authors may submit suggestions of reviewers to evaluate the manuscripts. The following information must be provided: reviewer name, e-mail address, and the home institution.

Use of plant extracts in microbiological experiments

Articles that present studies with plant extracts, or other complex substances, will be accepted only after identification of compounds.

ORGANIZATION

The full Title of the article should be as brief as possible, not exceed 100 characters including spaces, should not contain abbreviations, and be truly indicative of the subject of the paper. Authors should suggest a Running title that appears in the page header which should not exceed 40 characters, including spaces. Expressions like “Effects of”, “Influence of”, “Study on”, etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems. The Abstract should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper. The Introduction should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported. The Materials and Methods section should provide enough information for other investigators to repeat the experiments. Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand. The Results section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments, extensive interpretation of results has to be avoided but do so in the *Discussion* section. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text. The approximate location of tables and figures in the text should be indicated. The Discussion section should discuss the results in relation to the literature cited. In-text citations: Indicate references by (consecutive) superscript arabic numerals in the order in which they appear in the text. The numerals are to be used outside periods and commas, inside colons and semicolons. For further detail and examples you are referred to the AMA Manual of Style, A Guide for Authors and Editors, Ninth Edition, ISBN 0-683-40206-4, copies of which may be ordered from Lippincott Williams & Wilkins (<http://www.lww.com/index.html>).

Data references: This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. This identifier will not appear in your published article. [dataset] 5. Oguro M, Imahiro, S Saito, S Nakashizuka, T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley. Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

Reference list: Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

General rules from the 10th edition

- Items are listed numerically in the order they are cited in the text
- Include up to 6 authors
- For more than six, provide the names of the first three authors and then add et al

Examples:

1. Paivio A, Jansen B, Becker LJ. Comparisons through the mind's eye. *Cognition*. 1975;37(2): 635-647.
2. Yuen AWC. Lamotrigine: a review of antiepileptic efficacy. *Epilepsia*. 1994;35(suppl 5):S33-S36.
3. Glaser R, Bond L, eds. Testing: concepts and research. *Am Psychol*. 1981;36 [special issue].
4. Yasuda N, Takagi S-i, Toriumi A. Spectral shape analysis of infrared absorption of thermally grown silicon dioxide films. *Appl Surf Sci*. 1997;117-118(June (II)):216-220.
5. Assink EHM, Verloop N. Het aanleren van deel–geheel relaties [Teaching part–whole relations]. *Pedagogische Studiën*. 1977;54:130-142 [in Dutch].
6. H1 Collaboration. *Nucl Phys B*. 1997;504:3.
7. Weikert S, Freyer D, Weih D, et al. Rapid Ca²⁺-dependent NO-production from central nervous system cells in culture measured by NO-nitrite/ ozone chemoluminescence. *Brain Res*. 1997;748: 1-11.
8. VanDecar JC, Russo RM, James DE, Ambeg WB, Franke M. A seismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *J Geophys Res*. 2003;108:2043. doi:10.1029/2001JB000884.
9. Strunk Jr W, White EB. *The Elements of Style*. 3rd ed. New York: MacMillan; 1979 [chapter 4].
10. *College Bound Seniors*. Princeton, NJ: College Board Publications; 1979.
11. Luria AR. *The Mind of a Mnemonist* [Solotarof L, Trans.]. New York: Avon Books; 1969 [Original work published 1965].
12. Letheridge S, Cannon CR, eds. *Bilingual Education: Teaching English as a Second Language*. New York: Praeger; 1980.
13. Chaddock TE. Gastric emptying of a nutritionally balanced liquid diet. In: Daniel EE, ed. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Gastrointestinal Motility*. Vancouver, British Columbia, Canada: Mitchell Press; 1974:83-92.
14. Adams MJ, Briscoe BE, Sinha SK. Interface friction and energy dissipation in soft solid processing applications. In: Dowson D, Taylor CM, Childs THC, Godet M, Dalmaz G, eds. *Dissipative Processes in Tribology*. Amsterdam: Elsevier; 1994:223-234. Dowson D, ed. *Tribology Series*; vol. 27.
15. Wilson JG, Fraser FC, eds. *Handbook of Teratology*. Vols 1-4. New York: Plenum Press; 1977-1978.
16. Sluzki CE, Beavin J. Symmetry and complementarity. In: Watzlawick P, Weakland JH, eds. *The Interactional View*. New York: Norton; 1977:71-87. Reprinted from: *Acta Psiquiatr Psicol Am Lat*. 1965;11:321-330.
17. Yu F, Wu X-S. *Phys Rev Lett*. 1992;68:2996. Available from: hep-th/9112009.
18. Douglass F, Ball Th. Tracking and viewing changes on the web. In: *Proc. 1996 USENIX Technical Conference*; 1996.
19. See the references in: Buchdahl HA. *The Concepts of Classical Thermodynamics*. First published by Cambridge University Press; 1966. Also available electronically as *The Concepts of Classical Thermodynamics* [Last updated 1999]. This reference discusses the basic concepts in a very thorough manner. Its literature list is a main entry point into the discipline.
20. Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK.*; 2003 Accessed 13.03.03.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be

concise with columns and rows of data carefully centered below them. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURES: should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

PHOTOGRAPHS: Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

CONFLICTS OF INTEREST

It is Brazilian Journal of Microbiology policy that everyone involved in the publication process (authors, reviewers, editorial board members, and editorial staff) must be free from conflicts of interest that could adversely influence their judgment, objectivity or loyalty to the article and assignments. The BJM recognizes that any potential conflict of interest raised must be disclosed promptly to Editor. Conflicts of interest in publishing can be defined as conditions in which an individual holds conflicting or competing interests that could bias editorial decisions. Conflicts of interest may be only potential or perceived, or they may be factual. Personal, political, financial, academic, or religious considerations can affect objectivity in numerous ways.

AUTHORS' COPYRIGHT

Upon receipt of the galley proofs for approval, authors of approved manuscripts should fax or email the Author's Copyright Statement to the BJM (55-11-3037-7095, bjm@sbmicrobiologia.org.br). The statement (see text below) must be signed by at least one of the authors (who agrees to inform the other authors, if any).

TRANSFER OF AUTHORS' COPYRIGHT

“The undersigned author(s) state(s) that the article being submitted is original, does not infringe copyright laws or any other third-party property rights, has not been previously published, and is not being considered for publication elsewhere. The author(s) confirm(s) that the final version of the manuscript has been reviewed and approved by all authors. All manuscripts published become the permanent property of the Brazilian Journal of Microbiology and can not be published without authorization in writing from its Editors.”

Article No. _____

Title of the article:

“

_____”

Name(s) of the author(s) Signature(s)

Date: ____/____/____

III - Normas do periódico Acta Parasitologica

ACTA PARASITOLOGICA, an international, peer-reviewed journal, publishes original full length articles, short research notes, invited review articles and book reviews, of high scientific quality on all aspects of pure and applied parasitology. Casuistic notes and papers of local importance are not accepted. Submission of the manuscript implies that it has not been published before nor is being considered for publication elsewhere. The manuscript should be accompanied by a letter signed by the authors. If the article was prepared jointly with other authors, the signatory of this form warrants that he has been authorized by all co-authors to sign this agreement on their behalf, and agrees to inform his co-authors of the terms of this agreement. The corresponding author is requested to provide an e-mail address to facilitate.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Before submission of the manuscript Authors should register themselves first as new users and then upload their manuscripts along with a cover letter. Authors should submit their manuscripts online by using link <http://www.editorialmanager.com/ap/>. Then, please follow the instructions given on the screen. 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. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation. In case of any problems please contact directly to the Editorial Office actapar@twarda.pan.pl

Authors are asked to suggest at least three potential referees including their addresses, e-mail addresses and, if possible, telephone and fax numbers.

ETHICS IN PUBLISHING

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see https://www.google.pl/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwiOjKnaqdXQAhXJFSwKHQ0FABUQFgghMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.degruyter.com%2Fstaticfiles%2Fpdfs%2F140117_Publication_ethics_and_publication_malpractice_FINAL.pdf&usq=AFQjCNGIVoQ7iUv5kepg3iXTWAKYQ29EUQ&sig2=iuy1v4DwAmV_NL1530LdGw&cad=rja

PERMISSIONS

Authors wishing to include figures and/or text that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers.

PAGE CHARGES

There are no page charges for publication in *Acta Parasitologica*. Authors who decided to withdraw their article during its processing and/or after its acceptance they would be asked to cover editorial costs of 80 € (+local taxes) per page (1800 characters including spaces), however, not less than 500 € per article.

MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted in correct English checked by a native English-speaking biologist/parasitologist. Authors are responsible for the linguistic accuracy of their papers. Authors should clearly confirm that their manuscript submitted to this journal was neither sent to another journal nor any part of it has been published or is being considered for publication elsewhere in any form. The manuscript should contain: the title (as concise and informative as

possible); the affiliation(s) and address(es) of the author(s); corresponding author e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author; running title; abstract (preferably not exceeding 200–250 words) and keywords proposed by the authors (up to 6). The name(s) of the author(s). Papers should be typed in English with double-spacing, and wide margins including a left-hand margin of not less than 2.5 cm. The text should be composed of the Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion, provided with Acknowledgements if any, References, Tables and Figures. No part of the manuscript should be typed in capitals. Latin terms, including genus and species names should be written in italics. Only the generally accepted abbreviations and symbols are allowed. Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter. The description of new species should be supported, if possible, by results obtained by means of molecular analysis. Contributors of taxonomic studies are encouraged to use molecular analysis where this is appropriate and feasible. The text must also have line numbers to make it easier for reviewers making reviews. Each page of the manuscript must include continuous line numbers in the margin.

NOMENCLATURE

The authors should follow the international rules of nomenclature in the names of organisms they describe. Recommendations of the International Code of Zoological Nomenclature, London 1999 should be strictly adhered to.

REFERENCES

Only references cited in the text may be included in their list. They should be arranged in the alphabetical order in the following format **for journal article** author(s), year of publication, journal title (full name in italics), volume, range of pages, and full DOI should be provided by author(s). Include the names of the first six authors of a paper; after six, use *et al.*

Example: Dabert J., Skoracki M. 2007. *Syringoplutarchusia nordmanni*, a new genus and species of the feather mite family Syringobiidae (Acari, Astigmata, Pterolichoidea) from the Black-winged Pratincole *Glareola nordmanni* (Charadriiformes, Glareolidae). *Acta Parasitologica*, 52, 62–69. DOI: 10.2478/s11686-007-0008-1 Davids C. 1997. Watermijten als parasieten van libellen. *Brachytron*, 1, 51–55. (In Dutch)

For a book: Author(s), date, title, publisher, publication place. Example: Rohde K. (Ed.). 2005. Marine Parasitology. CSIRO Publishing, Collingwood VIC 3066, Australia and CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 565

For book chapter or article in an edited book: Author(s) of chapter, year, chapter title. In: Editors of the book (Eds), book title in italics, place of publication, publisher, chapter page range. Example: Cribb T.H. 2005. Family Opecoelidae Ozaki, 1925. In: (Eds A. Jones, R.A. Bray and D.I. Gibson) Keys to the Trematoda. Vol. 2. CABI Publishing and The Natural History Museum, Wallingford, pp. 443–531

For proceedings from a conference: Author(s), year of publication, title. In: Conference name, date, place of conference, page range. Example: Świdorski Z., Chomicz L., Grytner-Zięcina B., Sereda M.J. 2002. Ultrastructural characteristic of the oncospherical germinative cells in *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus*. In: Proceedings of the 10th International Congress of Parasitology ICOPA X: Symposia, Workshops and Contributed Papers, 4–9 August, 2002, Vancouver, Canada, pp. 551–554

For thesis: Author(s), year of publication, title, information, place of publication. Example: McKerr G. 1985. The fine structure and physiology of a trypanorhynch tapeworm *Grillotia erinaceus*. PhD Thesis, The Queen's University of Belfast, Northern Ireland, UK

Names of authors and titles of references should be given in original languages, except written in non Latin characters. The latter should be translated into English. When there is more than one reference of a given author in the same year, the references should be

distinguished by letter ‘a’ being used for the first reference and ‘b’, ‘c’ for the following. The method of citation in the text should correspond to that in recent issues of *Acta Parasitologica*. Correct references are the responsibility of the author(s). In addition, authors should provide complete, correct and properly structured DOI number to references, whenever it is possible. If the article and book has DOI number, the author should include it in the references. Please keep in mind that the DOI number will automatically make the active link.

TABLES

Tables must be provided in Word format with Roman numbering and clear headings should be typed on separate pages. The text should not duplicate information given in the Tables and Figures. Where necessary, results should be analysed using an appropriate statistical test.

FIGURES

When first submitting a manuscript for peer review, low-resolution versions of figures should be uploaded to limit file size. In the final submission the line drawings should not be larger than twice the final size. Lines should be bold enough to withstand reduction. Lettering, symbols and scale bars which appear on figures (kept to a minimum) should be of good quality and of sufficient size to withstand reduction. The legends should be typed on a separate page. All figures should be clearly marked with Arabic numbering. All figures should be send in TIFF. The following resolutions are optimal: photographs – 300 dpi, line figures – 600 dpi. All of the colored Figures are free of charges.

FINAL PROOFREADING

Authors will receive a pdf file with the edited version of their manuscript for final proofreading. This is the last opportunity to view an article before its publication. 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, 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.

ELECTRONIC REPRINTS

After publication the corresponding author receives a pdf file with the published version of the manuscript.

TRANSFER OF COPYRIGHT AGREEMENT

A properly completed TCA must be provided for each submitted manuscript.

OFFPRINTS

Offprints can be ordered by the corresponding author(s).

CARE OF EXPERIMENTAL ANIMALS

It is the responsibility of authors to ensure that their practices conform with their national animal ethics guidelines. Submitted papers must contain precise details on the care and use of animals and of experimental procedures, especially interventions such as surgery and tissue sampling, and methods of euthanasia. Referees are asked to indicate whether there is any reason to consider that experimental animals were not well treated or care not taken to avoid distress, and papers may ultimately be rejected on such grounds.

CONFLICT OF INTERESTS

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including

any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.