



MICHELE PLACEDINO ANDRADE BOTELHO

**DETECÇÃO DE *TRITRICHOMONAS FOETUS* E
CAMPYLOBACTER FETUS SSP. *VENEREALIS*
EM TOUROS POR MEIO DA PCR E PCR
MULTIPLEX**

LAVRAS-MG

2014

MICHELE PLACEDINO ANDRADE BOTELHO

**DETECÇÃO DE *TRITRICHOMONAS FOETUS* E *CAMPYLOBACTER
FOETUS* SSP. *VENEREALIS* EM TOUROS POR MEIO DA PCR E PCR
MULTIPLEX**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Geraldo Márcio da Costa

LAVRAS-MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Botelho, Michele Placedino Andrade.

Detecção de *Trichostrongylus axei* e *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* em touros por meio da PCR e PCR multiplex / Michele Placedino Andrade Botelho. – Lavras : UFLA, 2014.

71 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Geraldo Márcio da Costa.

Bibliografia.

1. Tricomonose. 2. Campilobacteriose. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Diagnóstico. 5. Bovino. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.2089

MICHELE PLACEDINO ANDRADE BOTELHO

**DETECÇÃO DE *TRITRICHOMONAS FOETUS* E *CAMPYLOBACTER*
FETUS SSP. *VENEREALIS* EM TOUROS POR MEIO DA PCR E PCR
MULTIPLEX**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de abril de 2014.

Dr. Christian Hirsch	UFLA
Dra. Elizângela Guedes	UFLA
Dr. Andrey Pereira Lage	UFMG

Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador

LAVRAS-MG

2014

OFEREÇO

A Deus e Nossa Senhora

DEDICO

*Aos meus pais Wander e Elba e
ao meu esposo Tiago.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, pelas inúmeras bênçãos recebidas, por me fornecer sabedoria e forças para evoluir sempre;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV), pela oportunidade de realização da formação acadêmica;

A todos os excelentes professores, especialmente Professor Christian Hirsch, pela disponibilidade, ensinamentos e conselhos;

Aos funcionários do DMV, pela convivência agradável nesse período;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu orientador, Professor Geraldo Márcio da Costa, pelos ensinamentos, paciência, compreensão e disponibilidade;

Aos professores e pesquisadores da banca examinadora, pela colaboração nessa jornada;

Aos meus pais, Wander e Elba, que não mediram esforços em me auxiliar na execução de parte deste projeto, acrescentando meus objetivos aos deles, sempre acreditando no meu potencial, pelo amor incondicional e exemplo de vida;

À minha irmã Polyana, ponto de apoio nas dificuldades, pela amizade, afeto e companheirismo;

À Tia Elza Maria, pela preocupação, incentivo e orações;

Aos meus avós, Vó Wilma e Vô Romeu, pelos ensinamentos de vida;

Ao meu esposo Tiago, pelo amor, compreensão e paciência ao dividir comigo cada momento, sempre apoiando e motivando meu trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia, incluindo os estagiários e pós-graduandos que por lá passaram nesse tempo, em especial à Gleí dos Anjos de Carvalho Castro e à Dircéia Aparecida da Costa Custódio, por toda ajuda;

A equipe do Professor José Batista de Jesus, da Universidade Federal de São João Del Rey, Cássia Luana de Faria Castro e Eliane Margoti e ao Professor Andrey Pereira Lage, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela disponibilidade e ajuda na obtenção de amostras, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho;

A todos os amigos da Pós-Graduação, em especial as amigas de Graduação e Pós-Graduação, Karen Yumi Ribeiro Nakagaki e Natália Amaral Ambrósio, pela ajuda, descontração e por compartilharem dos mesmos medos e anseios;

A todos os Médicos Veterinários, Ivana Gomes de Faria, Tatiany Fernandes e Silva, Cinara de Cássia Souza Santos, Luiz Cláudio Pepe Luz, Luana Figueiredo Louredo, Pauline de Lima Espíndola, ao funcionário Rodrigo e todos aqueles que passaram pelo meu caminho e que contribuíram com o projeto;

A todos os familiares e amigos que torceram por mim e que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho;

A todos os animais, especialmente ao Rick, fundamentais para o meu aprendizado, que nos motivam a querer buscar sempre mais.

RESUMO GERAL

Tritrichomonas foetus e *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* são considerados importantes agentes causadores de problemas reprodutivos em bovinos, caracterizados por aumento do intervalo de partos, repetição de cio em intervalos irregulares, abortamentos, piometra e infertilidade em bovinos submetidos à monta natural. Embora a ampla utilização da monta natural no Brasil favoreça a ocorrência de ambos os patógenos em seus rebanhos, são escassos os trabalhos que determinam a frequência e real importância dos mesmos em rebanhos nacionais. Neste estudo, investigou-se a presença de *T. foetus*, *C. fetus* ssp. *fetus* e *C. fetus* ssp. *venerealis* em reprodutores bovinos encaminhados para o abate, em Minas Gerais, Brasil. Para isso, 200 amostras de muco peniano e prepucial de bovinos foram coletadas em quatro abatedouros da região Sul de Minas Gerais, que recebem animais de diferentes cidades do Estado. Em todas as amostras foi realizada a PCR convencional para *T. foetus* (utilizando o par de *primers* TFR3/TRF4) cujo produto de amplificação compreende 347pb e PCR Multiplex para *C. fetus* ssp. *fetus* e *C. fetus* ssp. *venerealis* (utilizando os pares de *primers* MG3F/MG4R e VenSF/VenSR), cujos produtos são de 750pb e 142pb, respectivamente. Dos 200 bovinos, 16 (8%) foram positivos para *T. foetus*; 35 (17,5%) para *C. fetus* e 27 (13,5%) para *C. fetus* ssp. *venerealis*. Os achados do presente estudo sugerem que *T. foetus* e *C. fetus* ssp. *venerealis* são frequentes agentes causadores de problemas reprodutivos em bovinos da região estudada. Tanto a PCR convencional quanto a Multiplex se mostraram técnicas bastante úteis para diagnosticar as infecções causadas pelos agentes.

Palavras-chave: Tricomonose. Campilobacteriose. Reação em Cadeia da Polimerase. Diagnóstico. Bovino.

GENERAL ABSTRACT

Trichomonas foetus and *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* are considered important agents causing reproductive problems in cattle, characterized by increased calving interval, repeat estrus at irregular intervals, abortions, pyometra and infertility in cattle submitted to natural breeding. Although the wide use of natural breeding in Brazil predisposes the occurrence of both pathogens in Brazilian herds, there are few studies that determine the frequency and real importance of these agents into national herds. This study investigated the presence of *T. foetus*, *C. fetus* ssp. *fetus* and *C. fetus* ssp. *venerealis* in breeding cattle sent for slaughter, in Minas Gerais, Brazil. For this, 200 samples of penile and preputial mucus of cattle were collected in three slaughterhouses in the South region of Minas Gerais, receiving animals from different municipalities of the state. In all samples the conventional PCR was performed for *T. foetus* (using the primer pair TFR3/TRF4) whose amplification product comprises 347pb and Multiplex PCR for *C. fetus* ssp. *fetus* and *C. fetus* ssp. *venerealis* (using primer pairs MG3F/MG4R and VenSF/VenSR), whose products are 750pb and 142pb, respectively. Of the 200 analyzed samples, 16 (8%) were positive for *T. foetus*; 35 (17.5%) for *C. fetus*, and 27 (13.5%) for *C. fetus* ssp. *venerealis*. The findings of this study suggest that *T. foetus* and *C. fetus* ssp. *venerealis* are frequent agents causing reproductive problems in cattle of the region studied. Both conventional and Multiplex PCR showed to be very useful techniques for diagnosing infections caused by these agents.

Keywords: Trichomonosis. Campylobacteriosis. Polymerase Chain Reaction. Diagnosis. Bovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

Quadro 1	Taxa da Tricomonose Bovina em bovinos de diferentes estados brasileiros.....	21
Quadro 2	Taxa da Campilobacteriose Genital Bovina em bovinos de diferentes estados brasileiros.....	22

SEGUNDA PARTE

Quadro 1	Iniciadores utilizados para realização da PCR de <i>T. foetus</i> , <i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i> e <i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	59
Figura 1	Localização geográfica das cidades de origem dos animais amostrados no Estado de Minas Gerais, Brasil. Mapa gerado pelo DIVA-GIS 7.5.....	56
Figura 2	Eletoforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR para detecção de <i>T. foetus</i> . Controle positivo (1); controle negativo (2); Amostra positiva (3); Marcador molecular 100 pb DNA ladder (4).....	61
Figura 3	Eletoforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR Multiplex para detecção de <i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i> e de <i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i> . Marcador molecular 100 pb DNA ladder (1); Controles positivos (2); Amostras negativas para <i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i> e para <i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i> (3-7); Amostra positiva para <i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i> (8); Controle negativo (9).....	62
Figura 4	Eletoforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR Multiplex para detecção de <i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i> e de <i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i> . Marcador molecular 100 pb DNA ladder (1); Controles positivos (2); Amostras positivas para <i>C.</i>	

fetus ssp. venerealis (3-7); Controle negativo (8)..... 62

Figura 5 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR Multiplex para detecção de *C. fetus ssp. venerealis* e de *C. fetus ssp. fetus*. Marcador molecular 100 pb DNA ladder (1); Controles positivos (2); Amostras negativas (3 e 6); Amostras com bandas únicas para amplicon de 142 pb (4,5 e 7); Controle negativo (8)..... 63

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE – Introdução Geral.....	12
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Tricomonose bovina.....	15
2.2	Campilobacteriose genital bovina.....	17
2.3	Importância econômica.....	19
2.4	Estudos epidemiológicos.....	20
2.5	Diagnóstico.....	25
2.5.1	Microscopia <i>Tritrichomonas foetus</i>.....	26
2.5.2	Microscopia <i>Campylobacter fetus</i>.....	27
2.5.3	Isolamento em cultura <i>Tritrichomonas foetus</i>.....	27
2.5.4	Isolamento em cultura <i>Campylobacter fetus</i>.....	28
2.5.5	Mucoaglutinação <i>Tritrichomonas foetus</i>.....	30
2.5.6	Mucoaglutinação <i>Campylobacter fetus</i>.....	30
2.5.7	Testes imunológicos <i>Tritrichomonas foetus</i>.....	31
2.5.8	Testes imunológicos <i>Campylobacter fetus</i>.....	31
2.5.9	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	31
2.5.9.1	PCR <i>Tritrichomonas foetus</i>.....	34
2.5.9.2	PCR <i>Campylobacter fetus</i>.....	35
2.5.10	PCR Multiplex.....	36
2.6	Profilaxia e controle.....	36
	REFERÊNCIAS	39
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	51
	DETECÇÃO DE <i>Tritrichomonas foetus</i> E <i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>venerealis</i> EM TOUROS POR MEIO DA PCR.....	52
	Resumo.....	52
1	INTRODUÇÃO.....	54
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1	Local do estudo.....	56
2.2	Amostragem.....	56
2.3	Coleta das amostras.....	57
2.4	Isolamento em cultura.....	57
2.5	Reação em cadeia da polimerase.....	58
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	67

**PRIMEIRA PARTE -
INTRODUÇÃO GERAL**

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da bovinocultura no Estado de Minas Gerais apresenta aspectos socioeconômicos importantes, como a contribuição ao agronegócio e o auxílio à fixação do homem no campo. Um dos obstáculos a esse desenvolvimento são os problemas sanitários, que elevam o custo de produção e reduzem a competitividade dos produtos gerados. Dentre esses problemas, aqueles que interferem no desempenho reprodutivo do rebanho possuem destaque, pela forma disseminada e insidiosa que ocorrem e por atingirem diretamente a geração de novos animais.

Os importantes agentes causadores de problemas reprodutivos *Tritrichomonas foetus* e *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* possuem distribuição mundial (HO et al., 1994) e alta prevalência nos rebanhos bovinos brasileiros (ALVES et al., 2011). No Brasil, essas enfermidades possivelmente estão presentes em todos os estados da federação em função das práticas de manejo reprodutivo utilizadas no país, com a predominância da monta natural (FELLEISEN, 1997) principalmente em condições onde o sistema de produção é extensivo e o controle sanitário deficiente (WIKSE et al., 1990).

A presença de *T. foetus* e *C. fetus* ssp. *venerealis* em bovinos da região Sul de Minas Gerais é de importância principalmente em propriedades leiteiras. O estado de Minas Gerais, localizado na Região Sudeste, é atualmente o maior produtor de leite do país, com uma produção de 8,4 bilhões de litros de leite durante o ano de 2010 (27,3% de toda a produção nacional neste período) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2011).

Em rebanhos nacionais, o impacto econômico decorrente destas enfermidades é pouco estudado, sendo os estudos escassos e antigos e isso acontece, provavelmente, por ausência de diagnóstico sistemático em todo o

país, associado às dificuldades de envio e análise laboratorial de amostras clínicas e ao pequeno número de laboratórios com capacidade técnica para a realização do diagnóstico destas doenças (ALVES et al., 2011).

O objetivo com esta dissertação foi verificar a presença de *T. foetus* e *C. fetus* ssp. *venerealis* em amostras de esmegma de touros provenientes de abatedouros da região Sul de Minas Gerais, utilizando a técnica de PCR e PCR Multiplex.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tricomonose bovina

A denominação de *Trichomonas foetus* foi dada a este microorganismo por Riedmüller (1928). Atualmente, o parasito de transmissão venérea *Tritrichomonas foetus* (RIEDMÜLLER, 1928) está classificado no filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Trichomonadida, família Trichomonadidae e gênero *Tritrichomonas* (LEVINE, 1985).

A Tricomonose Bovina (TB) foi primeiramente diagnosticada no cenário da pecuária nacional em 1947 no Estado do Rio Grande do Sul, onde Roehe (1948) detectou o protozoário no sêmen de touros utilizados na inseminação artificial. De acordo com dados levantados por Alves et al. (2011), no Estado de Minas Gerais, o protozoário foi identificado pela primeira vez por Megale, em 1963. No Brasil, estudos sobre a TB utilizando diferentes testes laboratoriais apontaram frequências que variaram de 0 a 27% (ALVES et al., 2011).

É um parasito comensal (VISCOGLIOSI et al., 1996), anaeróbico ou microaeróbico que vive no trato genital dos bovinos e tende a reproduzir em um pH próximo de sete, favorável ao seu desenvolvimento, onde multiplica-se por divisão binária longitudinal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL, OIE, 2012).

Os hospedeiros naturais são os bovinos (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*), tanto o macho quanto a fêmea, embora sua presença também já tenha sido relatada em suínos (FITZGERALD et al., 1958), camelos (WERNERY, 1991) e em felinos acometidos por diarreia crônica (GOOKIN et al., 2002). Na espécie humana, existe um parasito filogeneticamente relacionado, *Trichomonas vaginalis*, protozoário que também é sexualmente transmissível que está

associado com quadros de vaginite e pode causar o nascimento de fetos prematuros e com baixo peso ao nascer (SUTTON et al., 2007).

Nas vacas infectadas, o parasito invade as mucosas da vagina e útero (NICKEL; OLSON; SCHULTZ, 2002) ocasionando morte embrionária com repetição de cio em intervalos irregulares, fetos macerados, abortamentos, piometra, resultando em infertilidade temporária e no aumento do intervalo de partos. Geralmente o parasito é eliminado do aparelho reprodutor feminino entre 2-5 meses pós-infecção (GRAHN et al., 2005). A maior frequência de abortamentos se dá até os cinco meses de gestação (SKIRROW; BONDURANT, 1988).

Algumas vacas podem ser portadoras inaparentes por períodos mais longos, o que torna a fêmea apta a transmitir a doença para um touro susceptível na próxima estação de monta (SKIRROW et al., 1985). Nestes casos, apesar de haver infecção, não ocorre o comprometimento embrionário ou fetal, ocorrendo o nascimento a termo de um bezerro normal (OIE, 2012).

No touro, o parasito é encontrado na mucosa peniana, na cavidade prepucial e, em alguns casos, ocorre invasão do orifício uretral. Na mucosa peniana e nas zonas adjacentes da mucosa prepucial observa-se a maior concentração de protozoários que não apresentam caráter invasivo, situando-se na superfície da mucosa, nas secreções e na luz glandular. É um parasito sensível ao calor e à luz ultravioleta. No meio ambiente o parasito sobrevive por poucos dias (SOUSA et al., 1991). O microrganismo pode sobreviver no sêmen congelado, na presença de um crioprotetor (MARTINS et al., 2008; OIE, 2012).

Touros mais velhos muitas vezes tornam-se portadores permanentes, servindo de reservatório para a doença (WALKER et al., 2003). Os machos não apresentam sinais clínicos associados com a infecção, no entanto, não adquirem imunidade natural contra a Tricomose Genital Bovina (TGB) (PELLEGRIN;

LEITE, 2003). O protozoário não interfere no comportamento sexual ou na qualidade do sêmen (ANDERSON; BARR; CONRAD, 1994).

Touros mais velhos são mais susceptíveis à infecção, por apresentarem as criptas da mucosa prepucial mais profundas e em maior quantidade, o que proporciona um ambiente de microaerofilia que favorece sobrevivência do agente (PARSONSON; CLARK; DUFTY, 1976). Deve-se levar em consideração também que os touros mais velhos geralmente são mais ativos em relação aos touros jovens (RAE et al., 2004).

2.2 Campilobacteriose genital bovina

O agente da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB), *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*, é uma bactéria Gram negativo, em forma de “S” ou “asa de gaiivota”, possui um ou dois flagelos polares (conferindo grande mobilidade) e não forma esporos (VANDAMME, 2000). Anteriormente denominada de vibriose, é uma doença venérea de bovinos e uma das causas de infecção relacionadas à infertilidade nesses animais (CATENA et al., 2003), apresentando características clínicas e epidemiológicas semelhantes à TB (McMILLEN et al., 2006).

O relato inicial do achado da bactéria causadora da CGB no Brasil se deve a D’Apice (1955) no Estado de São Paulo. No Estado de Minas Gerais, a bactéria foi identificada pela primeira vez por Castro et al. (1971 citados por ALVES et al., 2011).

No Brasil, estudos sobre a CGB utilizando diferentes testes laboratoriais apontaram índices de prevalência que variaram entre 3,5 a 66,9% (ALVES et al., 2011). No que se refere a esta doença, Stynen et al. (2003) verificaram índice de positividade de 25,5% em fêmeas em reprodução, pela técnica de imunofluorescência direta na cidade de Varginha, mesorregião Sul e Sudoeste de

MG, situada a 111 km de Lavras – MG , região de realização do presente projeto.

A espécie *C. fetus* é dividida em duas subespécies, cada qual com distintas características epidemiológicas, clínicas e econômicas (SCHULZE et al., 2006; BERGEN et al., 2005); *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* (Cff) pode ser encontrada no trato intestinal de bovinos e ovinos e pode esporadicamente causar aborto e infertilidade, enquanto que em seres humanos está associada com infecções sistêmicas (THOMPSON; BLASER, 2000; ON; HARRINGTON, 2001). Em contraste, *C. fetus* ssp. *venerealis* (Cfv) não é um patógeno relevante para seres humanos (CATENA et al., 2003) e está mais bem adaptado ao trato reprodutivo bovino, causando a Campilobacteriose Genital Bovina. O agente não sobrevive no trato intestinal de bovinos ou ovinos (WAGENAAR et al., 2001).

Técnicas de genotipagem foram desenvolvidas com sucesso para identificação do gênero *Campylobacter* (WASSENAAR; NEWELL, 2000), porém nos programas de controle veterinário para erradicação desta doença se faz crucial diferenciar as subespécies (BERGEN et al., 2005) por meio de ensaios sensíveis e específicos, tais como a PCR (McMILLEN et al., 2006).

Na fêmea bovina, a bactéria invade a mucosa da vagina, cérvix, útero e ovidutos (DEKEYSER, 2003). A literatura já tem descrito a existência de fêmeas persistentemente infectadas pelo *C. fetus* ssp. *venerealis*. Portanto, o repouso sexual das fêmeas infectadas, para que elas possam se recuperar da infecção, não é suficiente para o sucesso no controle da doença, devido à presença de fêmeas portadoras que podem manter a doença no rebanho (CIPOLLA et al., 1994).

Nos machos, *C. fetus* ssp. *venerealis* tem como habitat a cavidade prepucial. Neste local, as bactérias permanecem imersas no muco prepucial presente no interior das criptas prepuciais, sem que o sistema imune do animal

seja capaz de depurá-las, e sem causar problemas clínicos aos animais. Touros com idade superior a quatro anos, que possuem criptas prepuciais mais profundas e em maior quantidade apresentam uma maior probabilidade de portarem a bactéria (DUFTY; CLARK; MONSBOURGH, 1975).

Como exposto, a sintomatologia clínica se assemelha a da Tricomonose Bovina. Uma característica clínica que pode ajudar a diferenciar a CGB da TB é que pode haver presença de maceração fetal na infecção por *T. fetus* enquanto a infecção por *C. fetus* ssp. *venerealis* pode produzir fetos mumificados (STOESSEL, 1982).

2.3 Importância econômica

O Brasil tem o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo com mais de 212,8 milhões de cabeças, atrás apenas da Índia. Entre os estados da Região Sudeste, Minas Gerais se destaca por possuir o maior rebanho, equivalente a 11,2% do total nacional (IBGE, 2011). No entanto, os índices reprodutivos e produtivos da pecuária brasileira estão em nível pouco competitivo com relação aos países de primeiro mundo (PELLEGRIN, 2002). Estes índices desempenham um papel fundamental na rentabilidade (PAREZ, 1985; FELLEISEN et al., 1998). Entre as diferentes causas para o problema podem ser citadas as doenças da reprodução, onde se destacam a CGB e TB.

A TGB e a CGB são doenças que atingem tanto o gado de corte quanto o de leite. É um fato inegável que ambas as enfermidades determinam perdas de bezerros, causadas devido aos abortamentos e morte embrionária (CLARK, DUFTY, PARSONSON, 1983). Um baixo desempenho reprodutivo determina menor produção de leite a ser acrescido na receita da propriedade, incremento nas despesas de manutenção com vacas secas, além de maiores taxas de descarte (LEITE; MORAES; PIMENTEL, 2001). Além disso, causa danos indiretos,

incluindo honorários profissionais, gastos com diagnóstico, descarte, vacinação e/ou tratamento de animais positivos (PELLEGRIN, 2002).

Tricomonose e campilobacteriose fazem parte da lista de notificação obrigatória da OIE (World Organisation for Animal Health = Organização Mundial de Sanidade Animal) a qual inclui doenças transmissíveis que são consideradas de importância socioeconômica e/ou saúde pública entre países e são significativas no comércio internacional de animais e seus produtos (OIE, 2014).

Além do impacto na pecuária, tricomonas estreitamente relacionados com o *Tritrichomonas foetus* já foi identificado no pulmão de um paciente com AIDS, salientando o potencial zoonótico do protozoário (DUBOUCHER et al., 2006).

Em razão das características epidemiológicas de GCB e TB, a partir de um único resultado positivo, considera-se o rebanho ou lote como positivo e as medidas de controle devem ser adotadas (STOESSEL, 1982; LAGE, LEITE, 2000).

2.4 Estudos epidemiológicos

No Brasil, vários estudos epidemiológicos apontaram variações amplas quanto à prevalência dos agentes, conforme demonstrado nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 Taxa da Tricomonose Bovina em bovinos de diferentes estados brasileiros.

Ano	Estado^a	Método diagnóstico^b	Taxa (%)	Referência
1947	RS	-	1º relato Brasil	Roehe (1948)
1953-1954	CE, PB, PE, BA, RJ	I	7,3-9,0	Mello (1954)
1963	MG	I	1º relato em MG	Megale (1963)
1970	SP	I	8,0	Amaral et al. (1970)
1971	MG	I	14,4	Medeiros e Figueiredo (1971)
1981	PB	I	27,0	Bacalhau (1981)
1991	RS	I	1,88	Gomes et al. (1991)
1997	MG	I	5,9	Leite et al. (1997)
1958-2001	RJ	I	29	Jesus et al. (2004)
2000-2001	PE	I	0	Paz Júnior et al. (2010)
2009	RJ	I	0	Rocha et al. (2009)
2009	DF	I	0	Leal et al. (2012)

^a CE: Ceará; BA: Bahia; MG: Minas Gerais; PB: Paraíba; RJ: Rio de Janeiro; PE: Pernambuco; SP: São Paulo; RS: Rio Grande do Sul e DF: Distrito Federal. ^b I: isolamento.

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2011).

Quadro 2 Taxa da Campilobacteriose Genital Bovina em bovinos de diferentes Estados brasileiros.

Ano	Estado^a	Método diagnóstico^b	Taxa (%)	Referência
1955	SP	I	1º relato Brasil	D'Apice (1956)
1960-1961	RJ	MA	3,5	Guida et al. (1960)
1960	RS	MA	27	Mies Filho (1960)
1963	RS	MA	53,8	Mies Filho (1963)
1967	SP	MA	8,2	Castro et al. (1967)
1971	PR, RS, MG	MA	8,0	Castro et al. (1971)
1976	BA	MA	66,9	Costa (1976)
1974-1977	MG	IFD	28,9	Leite (1977)
1969-1976	RJ	MA	12,0	Ramos e Guida (1978)
1986	SP	I	23,9	Genovez et al. (1986)
1976-1996	MG	IFD	27,9	Lage et al. (1997)
1995-1996	MS	IFD	52,3	Pellegrin et al. (2002)
1996-1997	MG	MA	46,9	Jesus et al. (1999)

Ano	Estado^a	Método diagnóstico^b	Taxa (%)	Referência
1996-1997	RJ	MA	22,3	Jesus et al. (1999)
1996-1997	MG	I	16,7	Jesus et al. (1999)
1996-1997	RJ	I	42,3	Jesus et al. (1999)
1998	MG	IFD	25,5	Stynen et al. (2003)
1999 a 2010	RS	PCR	10,9	Ziech et al. (2014)
2000	BA, GO, MA, MT, MS, MG, PA, PR, RS, RO, SP e TO	IFD	19,7	Miranda (2005)
2006	MG	IFD	0	Freitas et al. (2006)
2007	ES	I	0	Bettero et al. (2009)
2009	RJ	IFD/I	35,9	Rocha et al. (2009)
2009	DF	IFD	11,1	Leal et al. (2012)

^a BA: Bahia; GO: Goiás; MA: Maranhão; MT: Mato Grosso; MS: Mato Grosso do Sul; MG: Minas Gerais; PA: Pará; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RS: Rio Grande do Sul; RO: Rondônia; SP: São Paulo; DF: Distrito Federal e TO: Tocantins; ^b IFD: Imunofluorescência direta; MA: Mucoaglutinação; I: isolamento.

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2011).

A principal forma de introdução da TB e da CGB em um rebanho se dá pela aquisição de touros ou vacas infectados (STOESSEL, 1982). Ambos os agentes são encontrados nas criptas epiteliais prepuciais de touros assintomáticos, onde podem persistir e são transmitidos para novilhas ou vacas durante o coito e vice-versa. No Brasil, acredita-se que estas enfermidades estejam presentes em todos os Estados da Federação em função das práticas de manejo reprodutivo utilizadas no país, tais como a monta natural (ALVES et al., 2011).

A transmissão mecânica durante a inseminação é rara, porém é possível a infecção por material ginecológico ou andrológico contaminado (YULE; SKIRROW; BONDURANT, 1989), ou por meio de um touro virgem, quando este se contamina durante a cobertura com uma vaca infectada ou portadora e, mecanicamente, contamina uma fêmea susceptível (PELLEGRIN, LEITE, 2003).

Estima-se que apenas 3,8% do rebanho nacional é submetido à inseminação artificial (VOLTA, 1996). Devido à preocupação com manejo sanitário nas centrais de inseminação artificial, os animais reprodutores são submetidos a testes intensivos, fato este que contribui para o controle destas enfermidades (FELLEISEN et al., 1998). Até seis culturas negativas obtidas semanalmente em intervalos consecutivos são necessários antes do sêmen de um touro ser declarado livre destes agentes (MONKE; MITCHELL, 1998). Porém, é o uso do touro de repasse em matrizes inseminadas que retornam ao cio depois da 2ª ou 3ª inseminação (PELLEGRIN, 2002), o que compromete o controle de várias doenças cujos agentes são transmitidos durante a monta (PELLEGRIN, LEITE, 2003).

Segundo Sousa et al. (1991), não há diferença de susceptibilidade entre as raças, porém Rae et al. (2004) relataram maior susceptibilidade de *Bos taurus taurus* em relação a *Bos taurus indicus*.

2.5 Diagnóstico

Estudos realizados em diversos países têm sido direcionados mais aos machos (CLARK; DUFTY; PARSONSON, 1983; BONDURANT, 1990; PELLEGRIN et al., 1998 ; RAE et al., 2004; ROCHA et al., 2009) que às fêmeas (STYNEN et al, 2003). Os machos são considerados como a fonte ideal para amostragem (McMILLEN et al., 2006) devido ao seu papel de disseminador da doença no plantel, por estarem em menor número na propriedade e por serem assintomáticos (PELLEGRIN, 2002; BONDURANT, 2005).

Devido ao fato de a infecção nas fêmeas ser geralmente eliminada dentro de alguns meses, pode ser difícil detectar as enfermidades nos animais nas fases tardias da infecção (OIE, 2012). Nestas, o material recolhido pode ser vaginal ou de fetos abortados e suas membranas fetais (CLARK; PARSONSON; WHITE, 1974).

Nos machos, o esmegma pode ser coletado por raspagem, pipeta de inseminação artificial ou lavado prepucial (GENOVEZ; SCARCELLI; PICONE, 1986). A raspagem como método de coleta em ambos os sexos em bovinos infectados produziu contagens mais elevadas dos agentes do que outras ferramentas de coleta avaliadas. Além disso, a raspagem é considerada mais fácil de ser realizada e isenta de impactos adversos sobre o animal (McMILLEN, 2006).

Deve-se enfatizar que seria ideal o repouso sexual dos touros antes e durante o intervalo de coletas. No entanto, o produtor geralmente não pode prescindir de seu reprodutor por um período de 45 dias, mesmo que isto diminua a sensibilidade do diagnóstico de seu rebanho (PELLEGRIN, 2002). Por esta razão, o repouso sexual previamente à amostragem é geralmente negligenciado.

2.5.1 Microscopia *Tritrichomonas foetus*

O diagnóstico da Tricomonose Bovina pode ser baseado em um exame microscópico do sedimento do lavado prepucial de touros e swabs de secreções cérvicovaginais nas fêmeas (FELLEISEN et al., 1998).

Na microscopia, as amostras são inicialmente testadas para mobilidade, forma piriforme ou fusiforme e são corados de modo que a morfologia e número de flagelos possam ser determinados. *Tritrichomonas foetus* possui 10-25 µm de comprimento e 3-15 µm de largura e uma membrana ondulante está presente ao longo de todo o comprimento do corpo, terminando com um único flagelo posterior e três anteriores (HAYES; ANDERSON; WALKER, 2003). Todos os flagelos participam do movimento do protozoário (MONTEIRO-LEAL; FARINA; SOUZA, 1996). Uma das principais características morfológicas de *T. foetus* é o movimento em sentido anti-horário (BONDURANT, 1997).

Nos machos, a identificação precisa do patógeno bovino *Tritrichomonas foetus* é, por vezes, dificultada devido à presença de outros protozoários semelhantes nas amostras clínicas da cavidade prepucial, como *Tetratrichomonas* (HAYES; ANDERSON; WALKER, 2003), *Pseudotrichomonas* ou *Monocercomonas* que podem gerar confusão variando no número de flagelos anteriores, porém estas diferenças podem não ser facilmente observadas com microscopia de luz padrão (BONDURANT; GAJADHAR; CAMPERO, 1999).

Estes outros protozoários são provavelmente de origem intestinal (DUFERNEZ et al., 2007). A presença destas espécies pode estar relacionada com práticas de sodomia (homossexualismo). Este meio de transmissão é pouco provável para o *T. foetus*, que é mais específico para o trato genital. Essa prática é geralmente observada em propriedades onde é comum a criação de touros de diferentes idades em um único local (PARKER et al., 2003).

A existência de outros *Tritrichomonas* no prepúcio bovino sugere que o teste de diagnóstico "padrão ouro", ou seja, a cultura de organismos vivos de secreções reprodutivas deve ser confirmada por um teste mais específico, tal como a PCR (CAMPERO et al., 2003).

2.5.2 Microscopia *Campylobacter fetus*

C. fetus ssp. *venerealis*, devido à presença de seus flagelos, possui mobilidade, que pode ser facilmente observada por meio de microscopia de contraste de fase (QUINN et al., 1994).

Espécimes que são suspensas em solução salina fisiológica provaram ser estáveis durante o transporte à temperatura ambiente por até 48 horas (McMILLEN et al., 2006).

2.5.3 Isolamento em cultura *Tritrichomonas foetus*

A inoculação de amostras em meios de cultura deve ser feita o mais rapidamente possível após a colheita (OIE, 2012). Os meios de cultura devem ser examinados microscopicamente desde o dia um ao dia sete após a inoculação (BRYAN; CAMBELL; GAJADHAR, 1999).

O crescimento de *T. foetus* pode ser inibido devido à contaminação por outros microrganismos e a quantidade de microrganismos pode não atingir número adequado para a utilização de microscopia de contraste de fase ou técnicas de coloração (BONDURANT, 1997).

Nas amostras em que o crescimento é adequado, é possível detectar e identificar os organismos por microscopia de contraste de fase (TAYLOR; MARSHALL; STACK, 1994) ou utilizar métodos de coloração, tal como

solução de lugol, Giemsa ou prata para ajudar na visualização do parasito (LUN; GAJADHAR, 1999).

Quando a amostra está contaminada ou apresentando baixo número de parasitas ou com parasitos inviáveis, essa técnica pode ser demorada e laboriosa, podendo levar a resultados falso-negativos (FELLEISEN et al., 1998). Outro fator é que tipos selvagens do parasito podem ser de difícil cultura, mesmo em condições ideais (RILEY et al., 1995).

MARTINS et al. (2004) estudou a utilização de água de coco para manutenção *in vitro* de *T. foetus*. Porém, o meio que vem sendo mais largamente empregado é o Diamonds pode, no entanto, ser utilizado o Rieck (leite em pó+antibióticos) ou Lactopep (peptona+leite em pó+antibióticos) que embora não sejam tão seletivos para o *Tritrichomonas* quanto o Diamonds tem, no seu fácil preparo e baixo custo, sua maior vantagem. O meio Lactopep é eficiente para o transporte e cultivo do parasito além de ser de fácil conservação (LOPES et al., 1995).

Um kit desenvolvido nos Estados Unidos, denominado InPouch™ (Biomed, San Jose-CA), que contém um meio de cultivo próprio para o isolamento de *T. foetus* tem sido utilizado largamente naquele país por apresentar tão boa sensibilidade quanto o meio de Diamonds, tendo como vantagem ser de fácil manuseio (PELLEGRIN, 2002).

2.5.4 Isolamento em cultura *Campylobacter fetus*

O isolamento e identificação do organismo pela cultura é aceito como método "padrão ouro" para confirmar o diagnóstico da infecção por *C. fetus*. No entanto, a viabilidade reduzida do agente em amostras clínicas pode afetar os resultados obtidos (BROOKS et al., 2004). A bactéria é microaerófila, tendo sua viabilidade limitada em níveis normais de oxigênio atmosférico, o que limita a

sua sobrevivência durante o transporte (CLARK et al., 1974). Esta necessita de atmosfera rica em CO₂ (10%) e reduzida concentração de O₂ (5%) para seu crescimento (VANDAMME, 2000). Recomenda-se que as amostras sejam inoculadas em até 48 horas após a coleta no meio seletivo (CLARK; DUFTY, 1978).

O ágar sangue parece ser o meio de escolha para a maioria dos testes de tolerância utilizados para a identificação de isolados de *Campylobacter* desde que outros fatores importantes (tais como o tamanho do inóculo e condições atmosféricas) sejam também considerados. Sempre que possível, prefere-se ágar sangue ao meio líquido, para evitar má interpretação dos resultados dos testes fenotípicos (ON; HOLMES, 1991).

O teste fenotípico prescrito pela Organização Mundial da Saúde Animal para diferenciar as duas subespécies de *C. fetus* é o teste da tolerância à glicina. Este teste é baseado no crescimento de Cff, mas não de Cfv em glicina a 1%. No entanto, a diferenciação fenotípica de isolados de *C. fetus* pode ser uma tarefa complicada. Em alguns laboratórios, variantes de ambas as subespécies de *C. fetus* têm sido observados, o que pode ser atribuído a padronização insuficiente ou inadequada não descartando o fato de que a tolerância à glicina pode ser adquirida por mutação (CHANG; OGG, 1971).

Outros exemplos de testes fenotípicos incluem a redução de selenito e sensibilidade a antibióticos (como metronidazol e cefoperazona). Estes são apenas indicativos, não discriminando completamente as subespécies (ON, 1996).

Comparando a reação em cadeia da polimerase (PCR) com o isolamento bacteriano, Groff et al. (2010) relataram a superioridade da técnica de PCR (maior rapidez, sensibilidade e especificidade) quando comparada com métodos padrão de isolamento, fornecendo evidências de sua utilização como um teste de melhor projeção para diagnóstico da CGB. Segundo estes autores, a utilização

da técnica de isolamento como o único método de diagnóstico compromete os dados epidemiológicos e dos programas de controle.

Quando os meios de transporte não são utilizados o isolamento tem produzido resultados praticamente insignificantes (GENOVEZ; SCARCELLI; ROJAS, et al., 1989). São meios enriquecidos de transporte: Clark (BROOKS et al., 2004), Cary Blair Transport medium (COBO et al., 2003), Skirrow's e Weybridge medium (McMILLEN et al., 2006), MacConkey agar medium (VARGAS et al., 2003).

Além de fatores relacionados ao transporte, o crescimento lento e as exigências nutricionais e relacionadas às condições atmosféricas especiais requeridas pelo *C. fetus* ssp. *venerealis* permitem o crescimento rápido de organismos contaminantes (CLARK et al., 1974).

2.5.5 Mucoaglutinação *Tritrichomonas foetus*

No passado já foi utilizado um teste de aglutinação utilizando muco recolhido a partir do colo do útero e um antígeno produzido a partir de organismos cultivados. Do mesmo modo, um teste intradérmico utilizando-se um precipitado do lisado do microrganismo em ácido tricloroacético também foi utilizado em rebanhos. No entanto, estes métodos não são recomendados para a detecção de *T. foetus* nos animais por apresentarem baixa sensibilidade e especificidade (OIE, 2012).

2.5.6 Mucoaglutinação *Campylobacter fetus*

A mucoaglutinação é realizada com o muco cérvicovaginal de fêmeas. O método é muito utilizado em diagnóstico de rebanho, porém não é capaz de detectar animais portadores, além de ter baixa sensibilidade e especificidade,

podendo apresentar resultados falso negativo e falso positivo (PELLEGRIN, 2002).

As tentativas para demonstrar anticorpos para Cfv em material do prepúcio coletados de touros infectados foram infrutíferas. Isso se deve ao fato de a bactéria não ter um caráter invasivo nos machos, não induzindo, portanto, grande produção de anticorpos (ZIECH et al., 2014).

2.5.7 Testes imunológicos *Tritrichomonas foetus*

Outro recurso de diagnóstico que pode ser empregado é a imunohistoquímica (RHYAN et al., 1995) ou sorologia (BONDURANT, 1997), sendo um problema dos testes imunológicos para a detecção de anticorpo (tais como ELISA) a sua utilização de preparações brutas contendo diversos antígenos que reagem de forma cruzada com outros microorganismos (IKEDA; BONDURANT; CORBEIL, 1995).

2.5.8 Testes imunológicos *Campylobacter fetus*

Outros métodos, tais como imunofluorescência direta (IFD) e ensaio imunoenzimático (ELISA) são também utilizados para o diagnóstico, no entanto, eles apresentam limitações em termos de sensibilidade e especificidade (BROOKS et al., 2004; McFADDEN et al., 2005, McMILLEN et al., 2006). A IFD não distingue as duas subespécies de *C. fetus* (FIGUEIREDO et al., 2002).

2.5.9 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR conta com a vantagem de que este método molecular pode acomodar um grande número de amostras, é fácil de realizar e é relativamente

rápido (HO et al., 1994), permitindo a detecção de microorganismos mortos (OIE, 2012). Já foi comprovado que este método pode ser utilizado com eficácia para o diagnóstico complementar a outros meios de diagnóstico ou até mesmo como diagnóstico primário e único da infecção (RILEY et al., 1995). A técnica permite, sem maiores dificuldades, a análise de amostras contaminadas por diferentes microrganismos como bactérias, fungos ou até mesmo outros protozoários, que dificultariam métodos de diagnóstico como o cultivo e o exame direto (FELLEISEN et al., 1998).

A viabilização das técnicas de diagnóstico molecular, baseadas na detecção de genes ou porções gênicas específicas dos agentes, ofereceu, entre outros benefícios, a possibilidade de superar alguns problemas de diagnóstico pelos métodos tradicionais, principalmente em relação à baixa sensibilidade e especificidade (McMILLEN et al., 2006).

No entanto, na presença de material do prepúcio, um maior número de agentes é necessário para produzir um resultado PCR positivo, o que é provavelmente devido à inibição pelos componentes do esmegma no prepúcio (OIE, 2012).

Os inibidores atuam geralmente em uma reação das seguintes maneiras: eles interferem com a lise da célula, necessária para a extração do DNA; por degradação do ácido nucleico alvo; ou inibem a atividade da polimerase para a amplificação do DNA alvo e assim reduzem a sensibilidade do teste (HO et al., 1994).

Durante a coleta de muco prepucial e cérvicovaginal, estas amostras podem facilmente tornar-se contaminadas com uma gama de materiais, incluindo urina, pus, sêmen, fezes e/ou sangue. Todos os cinco componentes têm sido documentados como contendo elementos que podem interferir com os testes de PCR (WILSON, 1997) a menos que medidas adequadas de purificação de

DNA sejam realizadas (AL-SOUD; RADSTRON, 2001; INGLIS, KALISCHUK, BUSZ, 2003).

Técnicas de lise pelo calor têm sido aplicadas com sucesso para o isolamento do DNA a partir de amostras para diagnóstico e, por conseguinte oferece uma redução de tempo de trabalho para a aplicação de rotina de diagnósticos baseados em DNA. Porém, o processamento da amostra bruta não remove todas as substâncias potencialmente inibidoras da PCR (KOROLIK et al., 2001).

No trabalho desenvolvido por Schmidt, Venter e Picard (2010), o limite de detecção do ensaio foi aparentemente afetado quando as amostras enriquecidas com até 50% de urina, espermatozoides ou sangue foram testadas. Contaminação fecal foi demonstrada ter um grande efeito inibitório sobre o mesmo ensaio em concentrações tão baixas como 1%. A inclusão de um controle interno na PCR é a forma viável de garantir que os resultados falsos negativos não serem apresentados como resultado das falhas de PCR devido à presença destes inibidores nas amostras.

Nos machos, a raspagem da mucosa peniana e prepucial foram consideradas mais rápidas, seguras, por onde a contaminação pela urina é facilmente evitada, o volume das amostras é menor e mais concentrado, a contaminação por poluentes ambientais é reduzida (IRONS; HENTON; BERTSCHINGER, 2002). Porém, como desvantagem, a raspagem sem cautela pode ser um método traumático, onde as amostras muitas vezes podem conter sangue e outros produtos de dano epitelial superficial (MUKHUFHI et al., 2003).

2.5.9.1 PCR *Tritrichomonas foetus*

Para detecção de *T. foetus*, um conjunto de iniciadores baseados na sequência de rRNA 5.8S demonstrou boa especificidade de diagnóstico (TFR3 e TFR4) (FELLEISEN et al, 1998) e são o conjunto de primers mais citados em literatura publicada (OIE, 2012).

Felleisen (1997) descreveu a análise comparativa da sequência do gene rRNA 5.8S e as regiões espaçadoras internas transcritas ITS1 e ITS2 de *T. foetus* de vários isolados originários de diferentes regiões geográficas e as sequências provaram ser muito similares em todas as estirpes analisadas. Portanto, estas sequências representam um alvo adequado para a amplificação por PCR (CHAKRABARTI et al., 1992).

No trabalho de Felleisen et al. (1998) a elevada sensibilidade do teste de PCR permitiu a detecção de um único organismo de *T. foetus* em meio de cultura de diagnóstico e cerca de 50 parasitas por ml de fluido de lavagem prepucial. Este baixo limite de detecção pode permitir o ensaio de PCR ser utilizado para aumentar a sensibilidade dos testes de diagnóstico atuais (PARKER; LUN; GAJADHAR, 2001).

Em um estudo realizado por Culberson et al. (1986) para avaliar a especificidade da PCR utilizando diferentes espécies de parasitos, observou-se que houve amplificação para as espécies *T. mobilensis* e *T. suis*. *T. mobilensis* tem sido descrito como um parasita intestinal do macaco esquilo e é, portanto, de menor importância em um diagnóstico diferencial. *T. suis*, no entanto, é um parasita de suínos, tendo a cavidade nasal e o trato digestivo (estômago, intestino delgado, grosso e ceco) como locais para os quais o organismo tem uma predileção (TACHEZY et al., 2002). *T. foetus* e *T. suis* indicam identidades de sequência nas suas unidades de genes de rRNA (FELLEISEN, 1997).

O trabalho de Xu, Lun e Gajadha (1998) aponta que os números cromossômicos de *T. foetus* e *T. suis* são os mesmos. Por conseguinte, este teste também poderia não discriminar entre as duas espécies. Assim, estas observações apoiam a hipótese, já formulada por outros pesquisadores (TACHEZY et al., 2002), de que os *Tritrichomonas* de bovinos, suínos e felinos (GRAHN et al., 2005) representam apenas as cepas ou variantes da mesma espécie, caracterizadas por diferenças na gama de hospedeiros e potencial patogenicidade (FELLEISEN, 1997).

2.5.9.2 PCR *Campylobacter fetus*

Para *Campylobacter* o ensaio de PCR tem sido utilizado tanto para a identificação de *Campylobacter fetus* (BLOM et al., 1995) quanto de suas subespécies (ON; HARRINGTON, 2001, WAGENAAR, et al., 2001). A especificidade, sensibilidade, praticidade e rapidez tornam a PCR uma alternativa mais eficiente para o diagnóstico da CGB, permitindo, assim, uma melhor estimativa da prevalência desta enfermidade em rebanhos, para a adoção de medidas de controle, visando aumentar a produtividade (GROFF; VARGAS, 2005). O protocolo de amplificação bastante utilizado compreende o descrito por Hum et al. (1997), com modificações realizadas por Vargas et al. (2003) e Groff et al. (2010), onde a amplificação baseia-se em dois pares de iniciadores, sendo o primeiro: MG3F e MG4R, com um amplicon de 750 pb de tamanho e o segundo VenSF e VenSR, com 142 pb de tamanho, específico para detectar a subespécie *venerealis*. Neste trabalho, utilizando DNA extraído pelo protocolo de CTAB, foi possível detectar 63 unidades formadoras de colônias de *C. fetus* por ml de meio na PCR.

2.5.10 PCR Multiplex

PCR Multiplex pode utilizar mais do que um conjunto de iniciadores numa mesma reação e pode ser usado para a detecção simultânea de vários patógenos (MOTHERSHED; WHITNEY, 2006).

Esta técnica tem potencial para produzir considerável redução de tempo e de esforço dentro do laboratório sem comprometer a utilidade do teste. No campo das doenças infecciosas, a técnica mostra ser um método valioso para a identificação de vírus, bactérias, fungos e parasitas (ELNIFRO et al., 2000).

Há trabalhos que utilizaram a técnica da PCR Multiplex que se destina a identificar e diferenciar subespécies *C. fetus* (SCHMIDT; VENTER; PICARD, 2010; PERSSON; OLSEN, 2005); enquanto há outros pesquisando a prevalência do *T. foetus* e do *C. fetus* em PCR's individuais para cada microorganismo (MADOROBA et al., 2011).

Existem pesquisas no desenvolvimento de PCR Multiplex para outras doenças reprodutivas, como para detecção de *Brucella*, *Leptospira* e Herpesvírus bovino-1 (BHURE et al., 2012), *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* sorovar *pomona*, *Campylobacter fetus* e *Haemophilus somnus* (DIAS et al., 2012). Porém, não foram encontrados trabalhos versando sobre a utilização da PCR Multiplex para detecção simultânea do *T. foetus* e do *C. fetus* ssp. *venerealis*.

2.6 Profilaxia e controle

A presença de animais velhos constitui um dos principais fatores que levam a tricomonose e campilobacteriose a perpetuar-se no rebanho. Em rebanhos infectados é recomendado o descarte de touros com sete/oito anos de idade e substituição por reprodutores jovens, se possível virgens ou testados

(BONDURANT, 1990). No entanto, em muitas propriedades, animais considerados geneticamente superiores são utilizados por muito mais tempo (PELLEGRIN, 2002).

É necessário também evitar touros “arrendados” ou utilizados em parceria e levar touros em pastagens comuns. A segregação de animais jovens para a formação de um rebanho livre dessas doenças sexualmente transmissíveis a partir de novilhas virgens e de touros não infectados seria ideal, mas é difícil de ser realizada na prática, porque é necessário que ocorra segregação total dos animais livres da infecção daqueles infectados. Essas enfermidades são de difícil controle em países com grandes rebanhos bovinos, como o Brasil (ALVES et al., 2011).

O controle efetivo tem sido dificultado pela insensibilidade do diagnóstico tradicional que se dá pela da microscopia óptica ou que exige o isolamento e o cultivo do agente (HO et al., 1994).

A proteção conferida pelas vacinas com *T. foetus* se apresenta em níveis muito baixos, com 45% de proteção. No entanto, sua utilização é preconizada, pois reduz os prejuízos dos proprietários, pela diminuição do tempo de infecção e pelo aumento da taxa de parição (KVASNICKA et al., 1992). A proteção estimulada pela vacinação contra TB é menor em touros, mas foi observado que a vacinação de touros induz imunidade sistêmica e local, o que leva à resistência ao desafio por *T. foetus* (CLARK; DUFTY; PARSONSON, 1983).

No estudo de PELLEGRIN et al. (1998), o uso tópico da acriflavina mostrou-se muito eficaz no tratamento da Tricomose Bovina, podendo ser uma alternativa de tratamento desta doença em nosso meio. Porém, no mercado nacional não há drogas aprovadas para o tratamento específico dos animais infectados (CORBEIL, 1994), sendo a vigilância estrita de touros por métodos sensíveis e precisos de diagnóstico uma medida eficaz para a prevenção da tricomose bovina (FELLEISEN et al., 1998).

Vacinas constituem um recurso adequado e importante para o controle da Campilobacteriose e estas são consideradas meios eficazes de controle da doença (McMILLEN et al., 2006). Outra medida de controle e prevenção amplamente difundida para a CGB é a aquisição de touros com certificação negativa para a doença (LAGE, LEITE, 2000).

A doença tem sido controlada por meio de uma gestão de medidas eficientes. Estas incluem a utilização de novilhas, período de descanso de vacas infectadas até que as culturas uterinas estejam negativas, bem como o abate de touros infectados e vacas menos valiosas (CORBEIL, 1994).

Rae et al. (2004) ressaltam que o conhecimento do proprietário acerca das doenças teve um efeito protetor e que a educação sobre as mesmas poderia auxiliar no seu controle. A falta de informação por parte dos produtores rurais ainda é um obstáculo quanto à sanidade do rebanho, sendo necessário divulgar as informações para que os mesmos possam utilizá-las, contribuindo para o aumento da produtividade dos rebanhos bovinos (VIANA; ZANINI, 2009).

REFERÊNCIAS

- AL-SOUD, W.; RADSTRON, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 485-493, Feb. 2001.
- ALVES, T. M. et al. Campilobacteriose genital bovina e tricomose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 4, p. 336-344, Jan. 2011.
- ANDERSON, M. L.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia, v. 10, n. 3, p. 439-461, Nov. 1994.
- BERGEN, M. A. P. van et al. Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 54, pt. 12, p. 1217-1224, Dec. 2005.
- BHURE, S. K. et al. Development of a novel multiplex PCR for detection of *Brucella*, *Leptospira* and *Bovine herpesvirus-1*. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 82, n. 11, p. 1285-1289, Nov. 2012.
- BLOM, K. et al. Identification of *Campylobacter fetus* by PCR-DNA probe method. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1360-1362, May 1995.
- BONDURANT, R. H. Abortion/infertility caused by *Tritrichomonas foetus*. In: KIRKBRIDE, C. A. (Ed.). **Laboratory diagnosis of livestock abortion in food animals**. Ames: Iowa State University, 1990. p. 161-164.
- BONDURANT, R. H.; GAJADHAR, A.; CAMPERO, C. M. Preliminary characterization of a *Tritrichomonas foetus*-like protozoan isolated from preputial smegma of virgin bulls. **Bovine Practice**, v. 33, n. 2, p. 124-127, 1999.
- BONDURANT, R. H. Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia, v. 13, n. 2, p. 345-361, July 1997.

BONDURANT, R. H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 383-408, July 2005.

BROOKS, B. W. et al. Evaluation of a monoclonal antibodybased enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 1-2, p. 77-84, Oct. 2004.

BRYAN, L. A.; CAMBELL, J. R.; GAJADHAR, A. A. Effects of temperature on the survival of *Tritrichomonas foetus* in transport, Diamond's and InPouch™ TF media. **Veterinary Record**, London, v. 144, n. 9, p. 227-232, Feb. 1999.

CAMPERO, C. M. et al. Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 112, n. 3, p. 167-175, Mar. 2003.

CATENA, M. et al. Efectos de la infección experimental con *Campylobacter fetus venerealis* sobre la preñez temprana en vaquillonas. **Investigación Veterinaria**, Buenos Aires, v. 5, n. 1, p. 37-44, 2003.

CHAKRABARTI, D. et al. Characterization of the rDNA unit and sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Tritrichomonas foetus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 75-84, May 1992.

CHANG, W.; OGG, J. E. Transduction and mutation to glycine tolerance in *Vibrio fetus*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 32, n. 4, p. 649-653, Apr. 1971.

CIPOLLA, A. L. et al. Persistence of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in experimentally infected heifers. **Veterinary Record**, London, v. 134, n. 24, p. 628, 1994.

CLARK, B. L.; DUFTY, J. H. Isolation of *Campylobacter fetus* [bovine vibriosis] from bulls. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 54, n. 5, p. 262-263, May 1978.

CLARK, B. L.; DUFTY, J. H.; PARSONSON, I. M. The effect of *Tritrichomonas foetus* on calving rates in beef. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 60, n. 3, p. 71-74, Mar. 1983.

CLARK, B. L. et al. Control of trichomoniasis in a large herd of beef cattle. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 50, n. 10, p.424-426, Oct. 1974.

COBO, E. R. et al. Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. **Journal and Veterinary Medicine: séries B**, Berlin v. 50, n. 2, p. 75-80, Mar. 2003.

CORBEIL, L. B. Vaccination strategies against *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 103-106, Mar. 1994.

CULBERSON, D. E. et al. *Tritrichomonas mobilensis* n. sp. (*Zoomastigophorea: Trichomonadida*) from the Bolivian squirrel monkey *Saimiri boliviensis boliviensis*. **The Journal of Veterinary Medicine**, Lawrence, v. 33, n. 2, p. 301-304, May 1986.

DEKEYSER, P. J. Bovine genital campylobacteriosis. In: MORROW, D. A. (Ed.). **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p. 263-266.

DIAS, F. E. F. et al. PCR Multiplex fluorescente para detecção de bactérias em sêmen bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 211-216, Mar. 2012.

DUBOUCHER, C. et al. Case reports: molecular identification of *Tritrichomonas foetus*-like organisms as coinfecting agents of human *Pneumocystis pneumonia*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 1165-1168, Mar. 2006.

DUFERNEZ, F. et al. Morphological and molecular identification of Non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad protozoa from the bovine preputial cavity. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 54, n. 2, p. 161-168, Mar. 2007.

DUFTY, J. H., CLARK, B. L., MONSBOURGH, M. J. The influence of age on the susceptibility of bulls to *Campylobacter fetus* subsp *venerealis*. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 51, n. 6, p. 294-297, June 1975.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 62, n. 8, p. 743-775, 1992.

ELNIFRO, E. M. et al. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 4, p. 559-570, Oct. 2000.

FELLEISEN, R. S. J. Comparative sequence analysis of 5·8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. **Parasitology**, Cambridge, v. 115, n. 2, p. 111-119, Aug. 1997.

FELLEISEN, R. S. J. et al. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 2, p. 513-519, Feb. 1998.

FITZGERALD, P. R. et al. Experimental infection of young pigs following intranasal inoculation with nasal, gastric, or cecal trichomonads from swine or with *Trichomonas foetus*. **Journal Parasitology**, Lawrence, v. 44, p. 597-602, 1958.

FIGUEIREDO, J. F. et al. Evaluation of direct fluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, Mexico, v. 44, n. 3-4, p. 118-123, July/Dec. 2002.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; PICONE, A. B. B. Avaliação de dois métodos de coleta de muco prepucial no diagnóstico da campilobacteriose genital em touros. **Biológico**, São Paulo, v. 52, p. 7-11, 1986.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S. Campilobacteriose genital bovina: proposta de um diagnóstico mais sensível em touros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 56, p. 5-7, 1989.

GOOKIN, J. L. et al. Single-tube *nested* PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 11, p. 4126-4130, Nov. 2002.

GRAHN, R. A. et al. An improved molecular assay for *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 33-41, Jan. 2005.

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

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

HAYES, D. C.; ANDERSON, R. R.; WALKER, R. L. Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 15, n. 4, p. 390-394, July 2003.

HO, M. S. Y. et al. Detection of bovine Trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 1, p. 98-104, Jan. 1994.

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

IKEDA, J. S.; BONDURANT, R. H.; CORBEIL, L. B. Bovine vaginal antibody responses to immunoaffinity-purified surface antigen of *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1158-1163, May 1995.

INGLIS, G. D.; KALISCHUK, L. D.; BUSZ, H. W. A survey of *Campylobacter* species shed in faeces of beef cattle using polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, n. 11, p. 655-661, Nov. 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. 2010/2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default_pdf.shtm>. Acesso em: 10 jan. 2014.

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

KOROLIK, V. et al. Specific identification, grouping and differentiation of *Campylobacter jejuni* among thermophilic campylobacters using multiplex PCR. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 127, n. 1, p. 1–5, Aug. 2001.

KVASNICKA, W. G. et al. Clinical evaluation of the efficacy of inoculating cattle with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 11, p. 2023-2027, Nov. 1992.

LAGE, A. P.; LEITE, R. C. Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). **Pecuária de Corte**, São Paulo, v. 100, p. 50-54, 2000.

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

LEITE, T. E.; MORAES, J. C. F.; PIMENTEL, C. A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 31, n. 3, p. 467-472, maio/jun. 2001.

LEVINE, N. D. Flagellates: the trichomonads. In: LEVINE, N. D. (Ed.). **Veterinary protozoology**. Ames: Iowa State, 1985. p. 59-79.

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

LUN, Z.; GAJADHAR, A. A. A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 11, p. 471-474, Sept. 1999.

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

MARTINS, N. E. et al. Use of coconut water (*Cocos nucifera*, Linnaeus) for in vitro maintainance of *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 85-87, 2004.

MARTINS, N. E. et al. Viabilidade de *Tritrichomonas foetus* após congelamento com diferentes crioprotetores. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 161-162, jul./set. 2008.

McFADDEN, A. M. et al. Investigation of bovine venereal campylobacteriosis in beef cow herds in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 53, n. 1, p. 45-52, Feb. 2005.

McMILLEN, L. et al. Comparison of culture and a Novel 5' *Taq* nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 938-945, Mar. 2006.

MONKE, D. R.; MITCHELL, J. R. Risk analysis: CSS testing protocol for trichomoniasis. In: CHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 17., 1998, Middleton. **Proceedings...** Middleton: Wisconsin, 1998. v. 25-26, p. 37-42.

MONTEIRO-LEAL, L. H.; FARINA, M.; SOUZA, W. de. Free movement of *Tritrichomonas foetus* in a liquid medium: a video-microscopy study. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, New York, v. 34, n. 3, p. 206-214, Feb. 1996.

MOTHERSHED, E. A.; WHITNEY, A. M. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 363, n. 1-2, p. 206-220, Jan. 2006.

MUKHUFHI, N. et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. **Theriogenology**: an international journal of animal reproduction, Stonehan, v. 60, n. 7, p. 1269-1278, Oct. 2003.

NICKEL, D. D.; OLSON, M. E.; SCHULTZ, G. A. An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 43, n. 3, p. 213-216, Mar. 2002.

ON, S. L. W.; HOLMES, B. Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of campylobacteria. **Journal Clinical Microbiology**, v. 29, n. 9, p. 1785-1788, Sept. 1991.

ON, S. L. W. Identification methods for campylobacters, helicobacters and related organisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 9, n. 3, p. 405-422, July 1996.

ON, S. L. W.; HARRINGTON, C. S. Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 285-293, Feb. 2001.

PAREZ, M. The most important genital diseases of cattle (Control, treatment and hygiene of semen collection). **Revue Sciences Techniques Office Internationales des Epizooties**, v. 4, n. 1, p. 69-87, 1985.

PARKER, S. et al. Diagnosis of trichomoniasis in 'virgin' bulls by culture and polymerase chain reaction. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 44, n. 9, p. 732-734, Sept. 2003.

PARKER, S.; LUN, Z.; GAJADHAR, A. Application of a PCR assay to enhance the detection and identification of *Tritrichomonas foetus* in cultured preputial samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 13, n. 6, p. 508-513, Nov. 2001.

PARSONSON, I. M.; CLARK, B. L.; DUFTY, J. H. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 86, n. 1, p. 59-66, Jan. 1976.

PELLEGRIN, A. O. **A campilobacteriose e tricomonose são doenças reemergentes?** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. p. 9-27. (Documentos, 41).

PELLEGRIN, A. O. et al. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos de corte do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 22, n. 1, p. 43-47, jan./mar. 1998.

PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R. C. **Atualização sobre Tricomonose genital bovina.** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. p. 1-22. (Documentos, 54).

PERSSON, S.; OLSEN, K. E. P. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 54, pt. 11, p. 1043-1047, Nov. 2005.

QUINN, P. J. et al. (Ed.). **Clinical veterinary microbiology.** London: Wolfe, 1994.

RAE, D. O. et al. Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. **Theriogenology**: an international journal of animal reproduction, Stonehan, v. 61, n. 4, p. 605-618, Feb. 2004.

RHYAN, J. C. et al. Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 7, n. 1, p. 98-101, Jan. 1995.

RIEDMÜLLER, L. Über die morphologie, übertragungsversuche, und klinische bedeutung der beim sporadischen abortus des rindes vorkommenden Trichomonaden. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 1, n. 108, p. 103–118, 1928.

RILEY, D. E. et al. PCR-Based study of conserved and variable DNA sequences of *Tritrichomonas foetus* isolates from Saskatchewan, Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1308-1313, May 1995.

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

ROEHE, R. Tricomoniase bovina. Bolm Direct. **Animal Production**, Bletchley, v. 3, n. 6, p. 21-26, 1948.

SCHMIDT, T.; VENTER, E. H.; PICARD, J. A. Evaluation of PCR assays for the detection of campylobacter fetus in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. **Journal / South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 81, n. 2, p. 87–92, June 2010.

SCHULZE, F. et al. Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 6, p. 2019-2024, June 2006.

SKIRROW, S. et al. Efficacy of ipronidazole against trichomoniasis in beef bulls. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 187, n. 4, p. 405-407, Aug. 1985.

SKIRROW, S. Z.; BONDURANT, R. H. Bovine trichomoniasis. **Veterinary Bulletin**: biuletyn Instytutu Weterynarii w Pulawach, Pulawy, v. 58, p. 591-603, 1988.

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

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

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

SUTTON, M. et al. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001–2004. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 45, n. 10, p. 1319–26, Nov. 2007.

TACHEZY, J. et al. Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 49, n. 2, p. 154-163, Mar./Apr. 2002.

TAYLOR, M. A.; MARSHALL, R. N.; STACK, M. Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. **British Veterinary Journal**, London, v. 150, n. 1, p. 73-80, Jan./Feb. 1994.

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

VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). **Campylobacter**. Washington: ASM, 2000. p. 3-26.

VARGAS, A. C. et al. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 93, n. 2, p. 121-132, May 2003.

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

VISCOGLIOSI, E. et al. Phylogenetic implication of iron-containing superoxide dismutase genes from trichomonad species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 80, p. 209-214, 1996.

VOLTA, M. A. Inseminação artificial faz parte do futuro do país. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 20, n. 3/4, p. 91, 1996.

WAGENAAR, J. A. et al. Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 39, n. 6, p. 2283-2286, June 2001.

WALKER, R. L. et al. Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 15, n. 1, p. 14-20, Jan. 2003.

WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Genotyping of *Campylobacter* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 1-9, Jan. 2000.

WERNERY, U. The barren camel with endometritis-isolation of *Trichomonas fetus* and different bacteria. **Zentralbl Veterinarmed B**, Ithaca, v. 38, n. 7, p. 523-528, Sept. 1991.

WIKSE, S. et al. Diagnosis and control of venereal diseases of beef cattle (Part. 1). **Agri-Practice**, Santa Bárbara, v. 11, p. 22-28, Nov./Dec. 1990.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, Oct. 1997.

XU, W.; LUN, Z.; GAJADHA, A. Chromosome numbers of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas suis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 78, n. 4, p. 247-251, Aug. 1998.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014**. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014>. Acesso em: 29 mar. 2014.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Trichomonosis:** terrestrial animal health code 2012. Chap. 2.4.17, v. II, p. 1-8, 2012. Disponível em:
<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.17_TRICHOMONOSIS.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2012.

YULE, A.; SKIRROW, S. Z.; BONDURANT, R. H. Bovine Trichomoniasis: reviews. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 5, n. 12, p. 373-377, Dec. 1989.

ZIECH, R. E. et al. *Campylobacter fetus* em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 44, n. 1, p. 141-146, Jan. 2014.

SEGUNDA PARTE
ARTIGO

ARTIGO

(Este artigo será submetido à revista Ciência e Agrotecnologia – Editora UFLA)

Título inglês: DETECTION OF *Tritrichomonas foetus* AND *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* in BULLS BY PCR

Título português: DETECÇÃO DE *Tritrichomonas foetus* E *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* EM TOUROS POR MEIO DA PCR

Michele Placedino Andrade Botelho¹

Geraldo Márcio da Costa²

Andrey Pereira Lage³

Christian Hirsh⁴

Resumo: O objetivo dos autores com o presente estudo foi determinar a prevalência da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) e da Tricomonose Genital Bovina (TGB) em touros encaminhados a quatro abatedouros da região sul de Minas Gerais, Brasil. Para isto, amostras de esmegma prepucial de 200 touros de diversas genealogias foram coletadas em quatro abatedouros da região supracitada, no ano de 2013, e foram submetidas ao cultivo e à PCR visando detectar a presença dos patógenos *Tritrichomonas foetus*, *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* e *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*. Todas as amostras apresentaram resultado negativo na cultura para isolamento de *T. foetus*. Por meio dos testes moleculares, verificou-se as prevalências de 8% (16/200) para *T. foetus*; de 17,5% (35/200) para *C. fetus* ssp. *fetus* e de 13,5% (27/200) para *C. fetus* ssp. *venerealis*. Os testes moleculares se mostraram eficientes para diagnosticar as infecções por *T. foetus* e por *Campylobacter fetus* ssp.

venerealis, evidenciando a ocorrência da TGB e da CGB em touros encaminhados a abatedouros da região sul de Minas Gerais, Brasil.

Termos para indexização: campilobacteriose, tricomonose, diagnóstico, reação em cadeia da polimerase, bovino.

1. Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, estimado em 212,8 milhões de cabeças. Entre os estados da região Sudeste, Minas Gerais (MG) se destaca por possuir o maior rebanho, equivalente a 11,2% do total nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2011).

O desenvolvimento da bovinocultura no Estado de Minas Gerais apresenta aspectos socioeconômicos importantes, como a contribuição ao agronegócio e o auxílio à fixação do homem no campo. Um dos obstáculos a esse desenvolvimento são os problemas sanitários, que elevam o custo de produção e reduzem a competitividade dos produtos gerados. Entre esses problemas, destacam-se as doenças da reprodução por ocorrerem de forma insidiosa e disseminada, comprometendo o desempenho produtivo e reprodutivo dos rebanhos afetados.

Entre os agentes causadores de problemas reprodutivos em bovinos submetidos à monta natural, destacam-se o protozoário *Tritrichomonas foetus* e a bactéria *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*, causadores da Tricomonose Genital Bovina (TGB) e da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB), respectivamente, enfermidades que possuem ampla distribuição mundial e para os quais os estudos apontam alta prevalência nos rebanhos brasileiros (Alves et al., 2011). No Brasil, a TGB e a CGB possivelmente estão presentes em todos os estados da federação em função das práticas de manejo reprodutivo utilizadas no país, com a predominância da monta natural em condições extensivas (Alves et al., 2011, BonDurant, 2005).

A CGB e a TGB são doenças que ganham destaque por imporem prejuízos econômicos relevantes à exploração pecuária, representados por infertilidade, prolongamento do intervalo de partos (Alves et al., 2011), e danos

indiretos incluindo honorário profissional, gasto com estabelecimentos de diagnóstico, descarte ou tratamento de animais positivos (Pellegrin, 2002). Além disto, elas fazem parte da lista de notificação obrigatória da OIE (Organização Nacional de Sanidade Animal) a qual inclui doenças transmissíveis que são consideradas de importância socioeconômica e/ou saúde pública entre países e são significativas no comércio internacional de animais e seus produtos (OIE, 2014).

Em rebanhos nacionais, o impacto econômico decorrente destas enfermidades é pouco estudado, sendo os estudos escassos e antigos e isso acontece provavelmente por ausência de diagnóstico sistemático em todo o país, associado às dificuldades de envio e análise laboratorial de amostras clínicas e ao pequeno número de laboratórios com capacidade técnica para a realização do diagnóstico destas doenças (Alves et al., 2011).

Os estudos brasileiros sobre a CGB e a TGB em sua maioria utilizam técnicas de diagnóstico tradicionais, tais como isolamento (Leite et al., 1997; Rocha et al., 2009), mucoaglutinação (Castro et al., 1971) e imunofluorescência direta (Stynen et al., 2003; Leal et al., 2012). Estes testes, no entanto, apresentam baixa sensibilidade e especificidade, o que constitui sério entrave para o monitoramento e conhecimento da real importância desta doença nos bovinos (McMillen et al., 2006).

O uso de técnicas moleculares, tal como a PCR que possibilita a análise de grande número de amostras e que é de fácil e rápida execução (Ho et al., 1994) para o diagnóstico dessas enfermidades, pode possibilitar superar as limitações dos métodos tradicionais de diagnóstico para estas enfermidades. Desta forma, o objetivo com este estudo foi verificar a presença de *T. foetus* e de *C. fetus* ssp. *venerealis* em amostras de esmegma prepucial de touros encaminhados a abatedouros da região sul de Minas Gerais por meio da PCR.

2. Material e Métodos

2.1 Local do estudo

O estudo foi realizado na região Sul de Minas Gerais/Brasil em amostras de esmegma coletadas em quatro frigoríficos de bovinos de três municípios do estado: Perdões, Boa Esperança e Campo Belo, com Serviços de Inspeção Municipal, Estadual e Federal, respectivamente. De acordo com as “guias de trânsito animal” (GTA), os animais eram touros provenientes de vários municípios de Minas Gerais, como demonstrado na Figura 1.

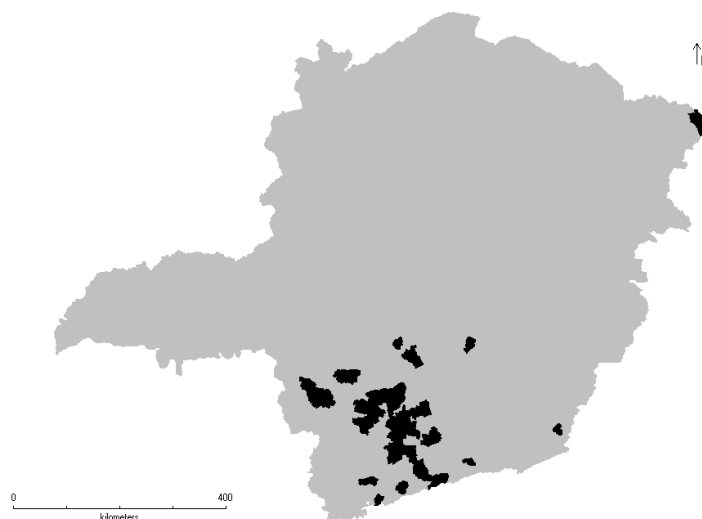


Fig. 1. Localização geográfica das cidades de origem dos animais amostrados no Estado de Minas Gerais, Brasil. Mapa gerado pelo DIVA-GIS 7.5.

2.2 Amostragem

Trata-se de um estudo no qual o objetivo é investigar a presença do *T. foetus* e do *C. fetus* ssp. *venerealis* em animais provenientes de abatedouros do Sul de Minas Gerais. Para tal, no período de dezembro de 2013, foi realizada uma amostragem aleatória, não probabilística de 200 reprodutores de diversas genealogias. Um total de 200 amostras de esmegma foi coletado, perfazendo 116

amostras dos abatedouros de Campo Belo, 20 do abatedouro de Perdões e 64 do abatedouro de Boa Esperança.

2.3 Coleta das amostras

Em todos os abatedouros, foram selecionados aleatoriamente, durante a linha de abate, bovinos machos não castrados, evitando-se lotes de confinamento e animais com idade inferior a dois anos. A coleta de amostras se deu logo após a insensibilização e morte dos animais, onde um funcionário do abatedouro seccionou, com auxílio de uma faca, o pênis juntamente com o prepúcio. As peças foram higienizadas com toalhas de papel quando havia excesso de sujidades.

Sobre uma bandeja, realizou-se a exposição do pênis com auxílio de uma pinça dente de rato e então raspagem de toda extensão da região peniana e prepucial com colheres de plástico descartáveis, recolhendo-se o esmegma. Todos os materiais eram renovados, incluindo as luvas, após a coleta de cada amostra, visando evitar a contaminação entre as amostras.

O esmegma foi armazenado em frascos esterilizados devidamente identificados e contendo solução salina estéril (5 mL). Os frascos contendo as amostras foram acondicionados em caixas isotérmicas, em temperaturas ambiente, e prontamente conduzidas ao laboratório. Uma alíquota das amostras de esmegma foi semeada em meio Lactopep, visando o isolamento de *T. foetus*. O restante das amostras foi congelado (-20 °C) até o momento da realização dos testes moleculares.

2.4 Isolamento de *T. foetus*

Uma alíquota de aproximadamente 200 µl de cada amostra recém-coletada foi semeada em meio de cultura Lactopep em, no máximo, 12 horas

após a coleta, visando o isolamento de *T. foetus*. O meio Lactopep foi preparado segundo Lopes et al. (1995).

Todas as culturas foram incubadas em estufa a 37 °C e analisadas por meio de microscopia de campo escuro (100 e 400X) diariamente do 1º ao 7º dia de incubação. A presença de pelo menos um protozoário dotado de morfologia microscópica e de mobilidade típicas foi interpretada como resultado positivo (Pellegrin et al., 1998).

2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada a partir do DNA extraído das amostras de muco. Previamente à extração de DNA das amostras, as mesmas foram concentradas no aparelho Concentrator (Eppendorf, Hamburg, Germany, modelo 5301), visando aumentar a sensibilidade dos testes moleculares. Para realizar a concentração das amostras, 1,5 ml de cada amostra diluída em solução salina foi concentrado para 150 µl.

Para a extração, foi utilizado o kit comercial (DNeasy[®] Blood & Tissue Kit; QIAGEN, Netherlands), utilizando a proteinase K, segundo as recomendações do fabricante. Após a extração as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e coradas em brometo de etídeo, visando avaliar a integridade do DNA extraído. Não estando o DNA viável, era procedida nova extração. O DNA extraído das amostras foi armazenado a -20 °C até o momento de realização da PCR.

Os iniciadores utilizados para a detecção de *T. foetus*, *C. fetus* ssp. *fetus* e *C. fetus* ssp. *venerealis* se encontram relacionados no Quadro 1.

Quadro 1 Iniciadores utilizados para realização da PCR de *T. foetus*, *C. fetus ssp. fetus* e *C. fetus ssp. venerealis*.

Agente	Sequência 5' para 3'	Produto de amplificação	Referência
<i>Trichomonas foetus</i>	TFR3-5'CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3' TFR4-5'CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3'	347 pb	Felleisen et al. (1998)
<i>Campylobacter fetus ssp. fetus</i>	MG3F-5'GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3' MG4R-5'TAGCTACAATAACGACAAC-3'	750 pb	Hum et al. (1997)
<i>Campylobacter fetus ssp. venerealis</i>	VenSF-5'CTTAGCAGTTTGCATATTGCCATT-3' VenSR-5'GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT-3'	142 pb	

Para *T. foetus* foram utilizados reagentes-padrão para as reações (Taq DNA Polimerase, Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil; Set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Roche Applied Science). As reações foram ajustadas para um volume final de 30 µL e as condições definidas para a PCR de cada reação foram: 3 µL de Tampão da Taq-polimerase (10x), 2,5 µL MgCl₂ 50 mM, 1,0 mM dNTPs, 2U Taq DNA Polimerase, 10 µM de cada *primer* e 10 µl de DNA template. Todas as reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), usando as seguintes condições: 95 °C por cinco minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação e abertura das fitas de DNA), alinhamento dos *primers* a 66 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos; e extensão final por 15 minutos a 72 °C.

Para a PCR Multiplex de *C. fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* foram utilizados os mesmos reagentes empregados na PCR para *T. foetus*. As reações foram ajustadas para um volume final de 30 µL e as condições definidas para a PCR de cada reação foram: 3 µL de Tampão da Taq-polimerase (10x), 2,5 µL

MgCl₂ 50 mM, 1,0 mM dNTPs, 1,5U Taq DNA Polimerase, 10 µM de cada primer e 10 µl de DNA template. Todas as reações foram realizadas em termociclador PT100 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), usando as seguintes condições: 95 °C por três minutos; 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação e abertura das fitas de DNA), alinhamento dos *primers* a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por dois minutos; e extensão final por 7 minutos a 72 °C.

Para *T. foetus*, como controle negativo, foi utilizado uma amostra de *Trichomonas vaginalis* (cepa X) e como controle positivo uma amostra de *T. foetus* (cepa K). Nos ensaios de PCR Multiplex visando à detecção de *C. fetus* ssp. *fetus* e de *C. fetus* ssp. *venerealis* foram utilizados como controles positivos as amostras de *C. fetus* ssp. *fetus* ATCC27374 e *C. fetus* ssp. *venerealis* ATCC19438. Como controle negativo foi utilizada a amostra de *C. jejuni* ATCC10351.

Os produtos de PCR foram adicionados de tampão de corrida 6X (Gel Loading Dye, Blue, New England[®] Biolabs Inc) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen Brasil, São Paulo), utilizando tampão de corrida TAE 1X (Tris-Acetate, 0,04 M; EDTA, 0,001 M), por duas horas a 60 V. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100 pb (New England Biolabs[®] Inc). Os géis foram corados por GelRed (Biotium) ou brometo de etídeo 0,5 µg/mL (Amresco) e as imagens registradas em aparelho transluminador (L-Pix Chemi Photo Digitizer - Loccus Biotecnologia, Brasil) para análise e edição.

3. Resultados e discussão

O cultivo das 200 amostras de muco em meio de cultura Lactopep não resultou em nenhuma cultura positiva até o sétimo dia de observação. Os *primers* utilizados se mostraram específicos, resultando na amplificação somente dos agentes para os quais foram desenhados.

Não foi possível a realização da PCR diretamente a partir das amostras brutas de muco (sem extração prévia do DNA), mesmo após a lise térmica, possivelmente devido à presença de inibidores nas amostras, o que implicou na necessidade de utilização de kits para a extração e purificação de DNA.

Entre as 200 amostras analisadas, 8% (16/200) foram positivas para *T. foetus* (Fig. 2); 17,5% (35/200) para *C. fetus* (Fig. 3) e 13,5% (27/200) para *C. fetus* ssp. *venerealis* (Fig. 4). Nos ensaios de PCR Multiplex para *C. fetus* e *C. fetus* ssp. *venerealis*, 5,5% (11/200) apresentaram amplificação somente para *C. fetus* ssp. *venerealis*, mas estas não foram contabilizadas como positivas (Fig. 5), considerando-se que para isto deveriam estar presentes dois amplicons, sendo um de 750 pb e outro de 142 pb (Fig. 3).

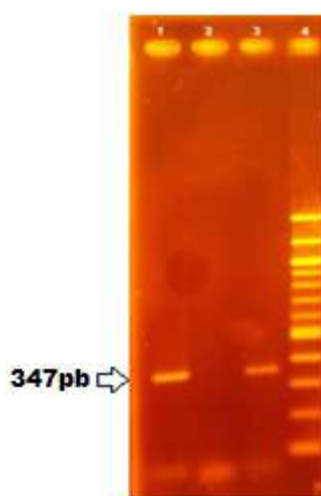


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR para detecção de *T. foetus*. Controle positivo (1); controle negativo (2); Amostra positiva (3); Marcador molecular 100 pb DNA ladder (4).

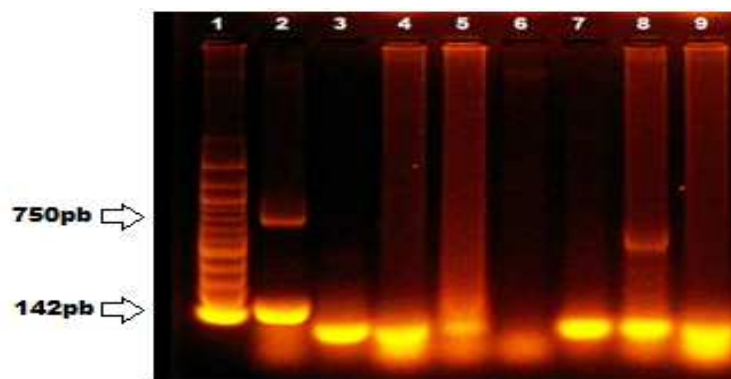


Fig. 3. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR Multiplex para detecção de *C. fetus* ssp. *venerealis* e de *C. fetus* ssp. *fetus*. Marcador molecular 100 pb DNA ladder (1); Controles positivos (2); Amostras negativas para *C. fetus* ssp. *venerealis* e para *C. fetus* ssp. *fetus* (3-7); Amostra positiva para *C. fetus* ssp. *fetus* (8); Controle negativo (9).

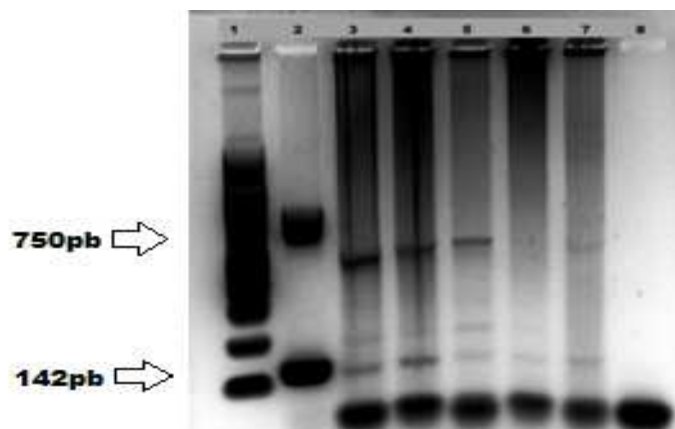


Fig. 4. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR Multiplex para detecção de *C. fetus* ssp. *venerealis* e de *C. fetus* ssp. *fetus*. Marcador molecular 100 pb DNA ladder (1); Controles positivos (2); Amostras positivas para *C. fetus* ssp. *venerealis* (3-7); Controle negativo (8).

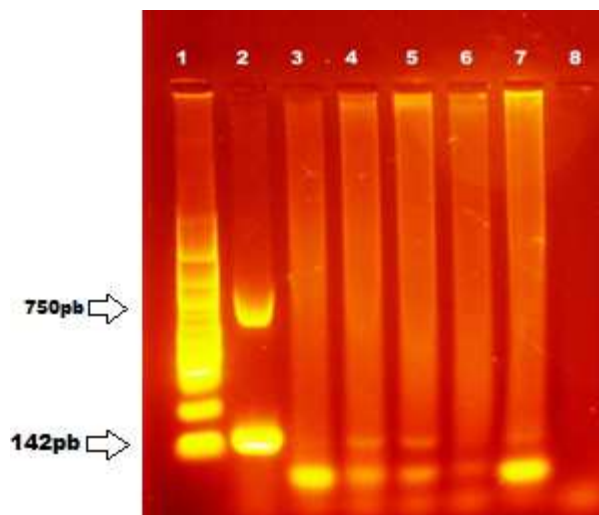


Fig. 5. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR Multiplex para detecção de *C. fetus* ssp. *venerealis* e de *C. fetus* ssp. *fetus*. Marcador molecular 100 pb DNA ladder (1); Controles positivos (2); Amostras negativas (3 e 6); Amostras com bandas únicas para amplicon de 142 pb (4,5 e 7); Controle negativo (8).

Quatro amostras apresentaram a presença concomitante de *T. foetus* e *C. fetus* e outras quatro apresentaram a presença concomitante de *T. foetus* e *C. fetus* ssp. *venerealis*, demonstrando a coexistência de ambos os agentes em um mesmo animal.

A escolha apenas de touros para a realização deste estudo se deu por estes serem considerados como a fonte ideal para amostragem por seu papel disseminador da doença no plantel e por estar geralmente em menor número na propriedade, o que diminui os custos com diagnóstico (Lage & Leite, 2000; Pellegrin, 2002; Bondurant, 2005).

As culturas visando o isolamento de *T. foetus* em meio de cultura Lactopep resultaram negativas, mesmo para amostras com resultados positivos na PCR. Tal fato pode ser atribuído à baixa sensibilidade do teste, que requer

três repetições consecutivas para se atestar a ausência da infecção pelo agente (Pellegrin & Leite, 2003). No presente estudo não foi possível proporcionar o repouso sexual de 45 dias dos touros antes da coleta de amostras visando o diagnóstico da TGB por meio do isolamento, o que também pode explicar os resultados negativos. Tentativas de se multiplicar em meio Lactopep a amostra de *T. foetus* utilizada como controle nos testes não foram exitosas, o que sugere a baixa eficiência deste meio para o isolamento e a multiplicação do agente.

No presente estudo não foi possível isolar o *T. foetus*, mesmo a partir das amostras positivas na PCR. Este resultado é corroborado por estudos que foram realizados nos estados de Pernambuco (Paz Júnior et al., 2010) e Distrito Federal (Leal et al., 2012) nos quais também não foi constatada a presença do *T. foetus* por meio da técnica tradicional de isolamento. De acordo com os resultados obtidos, a utilização somente da técnica de isolamento, como o único método de diagnóstico da TGB compromete a qualidade dos dados epidemiológicos e a eficiência dos programas de controle para a TGB.

No presente estudo, não foi possível realizar a amplificação diretamente a partir do muco bruto (sem extração prévia do DNA), o que sugere a presença de inibidores na amostra. Embora a técnica de amostragem por raspagem diminua a contaminação das amostras por sangue, urina e fezes, o problema ainda pode persistir. Estes contaminantes atuam como inibidores da reação de PCR, possivelmente interferindo com a lise da célula, necessária para a extração do DNA, por degradação do DNA ou inibindo a atividade da DNA-polimerase, reduzindo assim a sensibilidade do teste (Ho et al., 1994). No trabalho desenvolvido por Schmidt et al. (2010), o limite de detecção da PCR foi afetado quando as amostras estavam contaminadas por urina, esperma ou sangue. A contaminação fecal foi demonstrada ter um grande efeito inibitório sobre o mesmo ensaio em concentrações tão baixas como 1%. O problema relacionado

com a presença de inibidores de PCR no muco foi solucionado com a utilização de Kits comerciais para extração do DNA.

Os resultados obtidos pela utilização da PCR apontaram a presença de *T. fetus* de 8% nas amostras examinadas. Estudos prévios apontaram a presença da enfermidade em Minas Gerais. Medeiros & Figueiredo (1971) encontraram um índice de 14,4%, enquanto Leite et al. (1997) verificaram índice de 5,9%, através do isolamento como método de diagnóstico.

Estudos envolvendo a PCR como método de diagnóstico para a TGB foram realizados previamente, com registros de prevalências de 32% em bovinos de corte na Espanha (Mendoza-Ibarra et al., 2012); 5,5% em gado de corte no Texas (Szonyi et al., 2012) e de 4,1% em bovinos na África (Madoroba et al., 2011). Contudo, não foram encontrados registros prévios sobre a utilização da PCR como ferramenta de diagnóstico para a TGB no Brasil.

Os resultados apontaram 13,5% de amostras positivas para *C. fetus* ssp. *venerealis*, para as quais se verificou a presença de dois amplicons na PCR multiplex, sendo um de 750 pb para *C. fetus* e o outro de 142 pb *C. fetus* ssp. *venerealis*. Em estudos prévios (Persson & Olsen, 2005; Schmidt et al., 2010) a técnica da PCR Multiplex também foi realizada, visando identificar e diferenciar as subespécies de *C. fetus*.

Verificou-se nos ensaios de PCR multiplex para *Campylobacter* que houve a formação apenas do amplicon de 142 pb, indicativa de positividade para o *C. fetus* ssp. *venerealis*, em 5,5% amostras analisadas. Estas amostras não foram, no entanto, consideradas positivas, considerando-se que para tal o esperado seria a presença dos dois amplicons citados anteriormente. A realização do sequenciamento talvez possa aclarar a natureza destes resultados.

Também foi observada a presença de algumas amplificações inespecíficas para algumas amostras testadas. Tentativas de ajustes da PCR para eliminar as mesmas foram infrutíferas. A presença destas bandas inespecíficas

talvez possa ser explicada pela presença de outras espécies de *Campylobacter* saprófitas, tais como o *C. bubulus* e o *C. sputorum*, no trato genital dos bovinos. Estas espécies podem possuir sequências genéticas passíveis de reconhecimento pelos iniciadores utilizados, gerando os produtos inespecíficos na amplificação.

Estudos prévios realizados em rebanhos do Estado de Minas Gerais apontaram a ocorrência da CGB com frequências extremamente variáveis, com frequências de 0 a 46,9%, de acordo com levantamento realizado por Alves et al. (2011). Neste contexto, destaca-se o estudo de Stynen et al. (2003) conduzido na mesorregião sul e sudoeste de Minas Gerais no qual encontraram índice de 25,5% de positividade em fêmeas em reprodução ao utilizar a técnica de imunofluorescência direta (IFD). No entanto, a IFD não permite discriminar as subespécies de *C. fetus* (Rucherbauer et al., 1974), o que de acordo com os resultados obtidos no presente estudo pode ocasionar superestimativa da enfermidade, considerando que entre as amostras analisadas 17,5% (35/200) foram positivas para *C. fetus* ssp. *fetus*.

Em estudos nacionais, são encontrados poucos trabalhos nos quais se utilizou a PCR como ferramenta de diagnóstico para a CGB. Ziech et al. (2014) utilizaram a PCR para detecção em nível de espécie de *C. fetus*, o que em tese pode também ocasionar superestimativa da CGB.

Na literatura internacional, são encontrados estudos referentes à utilização da PCR para fins de diagnóstico da CGB. No trabalho de Madoroba et al. (2011), verificou-se prevalência 1,9% de *C. fetus* em bovinos na África. No estudo de Hamali et al. (2011), realizado no Irã, os autores relataram 3,9% de positividade para *C. fetus* ssp. *venerealis* em amostras de fetos abortados e de placenta.

Paralelos entre as frequências de infecção encontrados neste trabalho, de 8% para *T. foetus*, e de 13,5% para *C. fetus* ssp. *venerealis* devem ser realizados com critério, considerando-se que os delineamentos experimentais foram

geralmente distintos, além de empregarem técnicas de diagnóstico diferentes, que variam nas características de sensibilidade e especificidade.

4. Conclusões

Os resultados deste estudo evidenciaram a presença da infecção por *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* e por *Tritrichomonas foetus* em touros provenientes de abatedouros da região do sul de Minas Gerais.

Nas condições do experimento, o isolamento em meio Lactopep demonstrou ter baixa eficiência para a detecção de *T. foetus*.

A PCR demonstrou ser um recurso rápido e confiável para o diagnóstico da CGB e da TGB.

Agradecimentos

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pela concessão da bolsa de mestrado e aos pesquisadores, Andrey Pereira Lage e José Batista de Jesus, pelo fornecimento das amostras de microrganismos utilizados como controle nos ensaios moleculares.

Referências

ALVES, T.M. et al. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.31, n.4, p.336-344, jan. 2011.

BONDURANT, R.H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia, v.21, n.2, p.383-408, July 2005.

CASTRO, A.F.P.; GIORGI, W.; AOKI, D; HENRIQUES, J. Pesquisas de aglutininas anti-Vibrio fetus em mucos vaginais de rebanhos bovinos dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. **O Biológico**, São Paulo, v.37, p.115-118, 1971.

FELLEISEN, R.S.J.; LAMBELET, N.; BACHMANN, P.; NICOLET, J.; MÜLLER, N.; GOTTSTEIN, B. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA Enzyme Immunoassay Based on rRNA gene unit Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.2, p.513-519, Feb. 1998.

HAMALI, H.; NOFOUZI, K.; JAFARI, R. A molecular (PCR) survey on abortions caused by *Campylobacter spp.* in the dairy cattle of tabriz-iran. **Online Journal of Animal and Feed Research**, Shabestar, v.1, n.5, p.205-208, 2011.

HO, M.S.Y.; CONRAD, P.A.; CONRAD, P.J.; LEFEBVRE, R.B.; PEREZ, E.; BONDURANT, R.H. Detection of Bovine Trichomoniasis with a Specific DNA Probe and PCR Amplification System. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.1, p.98-104, Jan. 1994.

HUM, S.; QUINN K.; BRUNNER J.; ON S.L.W. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.75, n.11, p.827-831, Nov. 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. 2010/2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default_pdf.shtm>. Acesso em: 22 jan. 2014.

LAGE, A.P.; LEITE, R.C. Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). **Pecuária de Corte**, São Paulo, v.100, p.50-54, 2000.

LEAL, D.R.; FERNANDES, G.O.; GOUVEIA, F.F.; MIRANDA, J.P.; NEVES, K.L. Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal e em seu entorno. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.4, p.256-259, out./dez. 2012.

LEITE R.C.; PELLEGRIN, A.O.; MARTINS N.E.; SILVA N., GOMES L.I.; COSTA, G.M., REINATO, A.P.R.; GUIMARÃES P.H.S.; LAGE A.P. Tricomonose bovina: diagnósticos realizados na Escola de Veterinária da UFMG no período de 1979 a 1995. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.21, n.2, p.166-168, 1997.

LOPES, L.M.S.; GUIDA, H.G.; SERRA-FREIRE, N.M.; JESUS, V.L.T. de; ANDRADE, V.L.B. de; PEREIRA, E.B. Um novo meio de transporte e cultivo para *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928). I: Dias de viabilidade dos parasitos. **Semina: ciências biológicas e da saúde**, Londrina, v.16, n.2, p.260-263, 1995.

MADOROBA, E.; GELAW, A.; HLOKWE, T.; MNISI, M. Prevalence of *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus* among cattle from Southern Africa. **African Journal of Biotechnology**, Ibadan, v.10, n.50, p.10311-10314, Sept. 2011.

McMILLEN, L.; FORDYCE, G.; DOOGAN, V.J.; LEW, A.E. Comparison of Culture and a Novel 5' *Taq* Nuclease Assay for Direct Detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in Clinical Specimens from Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, n.3, p. 938-945, Mar. 2006.

MEDEIROS, P. M.; FIGUEIREDO, J.B. Tricomonose bovina em alguns municípios do Estado de Minas Gerais. **Arquivo da Escola de Veterinária de UFMG**, Belo Horizonte, v.23, p.143-147, 1971.

MENDOZA-IBARRA, J.A.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; GARCÍA-PEÑA, F. J.; ROJO-MONTEJO, S.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; SAN MIGUEL-IBÁÑEZ, E.; NAVARRO-LOZANO, V.; ORTEGA-MORA, L.M.; OSORO, K.; COLLANTES-FERNANDEZ, E. High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. **The Veterinary Journal**, London, v.193, n.1, p.146-151, July 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014**. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014>>. Acesso em: 29 mar. 2014.

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. Frequência de infecção por *Tritrichomonas foetus* (RIEDMULLER, 1928) em bovinos leiteiros do município de Sanharó – PE. **Medicina Veterinária**, Recife, v.4, n.1, p.6-11, jan./mar. 2010.

PELLEGRIN, A. O. **A campilobacteriose e tricomonose são doenças reemergentes?** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. p.9-27. (Documentos, 41).

PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R. C. **Atualização sobre Tricomonose genital bovina**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. p.1-22. (Documentos, 54).

PELLEGRIN, A.O.; SERENO, J.R.B.; LEITE, R.C.; COSTA, G.M.; SILVA, E.V.C. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos de corte do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 22, n. 1, p.43-47, jan./mar. 1998.

PERSSEN, S.; OLSEN, K. E. P. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 54, pt. 11, p. 1043–1047, Nov. 2005.

ROCHA, F.S.; JESUS, V.L.T.; TORRES, H.M., GOMES M.J.P.; FIGUEIREDO, M.J. de; NASCIMENTO, E.R. do; FERREIRA, T.; AQUINO, M.H.C. de. Investigação de *Campylobacter fetus* e *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da região do Médio Paraíba, RJ. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v.39, n.5, p.1586-1589, ago. 2009.

RUCHERBAUER, G. M.; MALKIN, K.; MITCHELL, D.; BUALANGER, P. Vibriosis: demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubulus* organisms in preputial fluid by immunofluorescence and culture techniques. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v.38, n.3, p.321-327, July 1974.

SCHMIDT, T.; VENTER, E. H.; PICARD, J. A. Evaluation of PCR assays for the detection of campylobacter fetus in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. **Journal / South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 81, n.2, p. 87–92, June 2010.

STYNEN, A.P.R.; PELLEGRIN, A.O.; FÓSCOLO, C.B.; FIGUEIREDO, J.F.; CANELLA FILHO, C.; LEITE, R.C.; LAGE, A.P. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha – Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.6, p.766-769, dez. 2003.

SZONYI, B.; SRINATH, I.; SCHWARTZ, A.; CLAVIJO, A.; IVANEK, R. Spatio-temporal epidemiology of *Tritrichomonas foetus* infection in Texas bulls based on state-wide diagnostic laboratory data. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.186, n.3-4, p.450–455, May 2012.

ZIECH, R. E. ; MACHADO, G.; KIRINUS, J. K.; LIBARDONI, F.; KESSLER, J. D.; PÖTTER, L.; VARGAS, A. C. de. *Campylobacter fetus* em bovinos no

estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v.44, n.1, p.141-146, jan. 2014.