

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

DISSERTAÇÃO

**Detecção de *Tritrichomonas foetus* em Sêmen Bovino Criopreservado
através de Isolamento e Reação em Cadeia da Polimerase**

Laura Ribeiro

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

**Detecção de *Tritrichomonas foetus* em Sêmen Bovino Criopreservado
através de Isolamento e Reação em Cadeia da Polimerase**

LAURA RIBEIRO

Sob a Orientação da Professora Doutora
Vera Lucia Teixeira de Jesus

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas

Seropédica, RJ

Dezembro de 2020

R484d Ribeiro, Laura, 30/06/1994-
Detecção de Tritrichomonas foetus em Sêmen Bovino
Criopreservado através de Isolamento e Reação em
Cadeia da Polimerase / Laura Ribeiro. - Seropédica,
2020.
21 f.: il.

Orientadora: Vera Lúcia Teixeira de Jesus.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas),
2020.

1. Tricomoníase. 2. sêmen congelado. 3. tricomonose
bovina. 4. fisiopatologia da reprodução. I. Jesus,
Vera Lúcia Teixeira de, 10/05/1959-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
(Patologia e Ciências Clínicas) III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(Patologia e Ciências Clínicas)

LAURA RIBEIRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/12/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar **como anexo ao final da tese / dissertação.**

Prof. Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus. UFRRJ
(Orientadora)

Prof. Dr. Marcia Cristina Mendes. IB São Paulo

Prof. Dra. Marilene de Farias Brito. UFRRJ



Emitido em 2021

TERMO N° 97/2021 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 08/02/2021 09:09)

MARILENE DE FARIAS BRITO QUEIROZ

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DESP (12.28.01.00.00.00.52)

Matricula: 6387102

(Assinado digitalmente em 07/02/2021 08:14)

VERA LUCIA TEIXEIRA DE JESUS

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)

Matricula: 1201559

(Assinado digitalmente em 06/02/2021 15:55)

MÁRCIA CRISTINA MENDES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 048.203.058-59

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número:
97, ano: 2021, tipo: TERMO, data de emissão: 06/02/2021 e o código de verificação: c898c5e9f0

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram e apoiaram, dando a força que eu precisava para prosseguir.

Em especial à minha mãe Jacqueline Penha Ribeiro, à minha avó Esmeralda Ribeiro, ao meu marido Helton Velloso de Castro Costa e ao meu filho Murilo Ribeiro Velloso de Castro Costa.

AGRADECIMENTOS

Sou grata à minha orientadora **Prof. Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus** por todos os ensinamentos, por me apoiar e incentivar ao longo desta longa jornada. Foram muitos desafios e percalços, mas para cada situação difícil vinha com sua calma e paciência para me auxiliar. Muito obrigada pela perseverança e generosidade.

Agradeço também às minhas amigas que me ajudaram muito com este projeto: **Caroline Couto, Ilka Silveira, Otávia Reis e Thayse Lima**, auxiliando no experimento em si e com palavras de apoio nos momentos mais difíceis.

Sou grata ao **Prof. Dr. Douglas McIntosh** por ter me auxiliado na primeira parte, da Parte 2 do meu trabalho, com quem aprendi as minúcias da biologia molecular e adquiri conhecimentos que levarei para a vida.

Aos colegas veterinários de campo **José Cardoso Macêdo Filho, Cristiano Silva e Bruno Ribeiro** e ao **Dr. Celso Rayol** por terem, gentilmente, cedido as amostras utilizadas neste trabalho.

Aos professores **Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes, Dra. Marilene de Farias Brito e Dr. Marco Roberto Bourg de Mello**, meu mais sincero agradecimento por todo ensinamento e por nossas conversas informais, onde aprendi não só sobre a vida acadêmica, mas também sobre caráter, profissionalismo e humildade. Ao Professor **José E. Três**, muito obrigada por ter cedido algumas tardes para me ensinar e acompanhar durante a Fase 1 do experimento. Sua experiência e perícia foram determinantes e cruciais no processo.

Além disso, gostaria de registrar meu agradecimento aos integrantes do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV)** por toda compreensão neste processo e ao técnico do setor de Reprodução da UFRRJ, José Xavier, por todo auxílio e pelas conversas ao longo dos dois anos em que estive presente no setor.

Por fim, gostaria de agradecer à pesquisadora **Fernanda Calvo Duarte** do Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto Biológico de São Paulo, por ter cedido espaço, material e tempo ao meu projeto. Obrigada por confiar em mim e por ter aberto o laboratório para que eu pudesse desenvolver minha pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

RIBEIRO, Laura. **Detecção de *Tritrichomonas foetus* em Sêmen Bovino Criopreservado através de Isolamento e Reação em Cadeia da Polimerase**. 2020. 42p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Zootecnia, Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

A Tricomonose Genital Bovina (TGB), uma doença infectocontagiosa causada pelo protozoário flagelado *Tritrichomonas foetus*, transmitida por via venérea e por fômites contaminados, possui grande importância econômica, pois sua principal consequência é o aborto no terço inicial da gestação, além de produzir infertilidade temporária. Em machos a doença é assintomática e permanente, caracterizando os touros como portadores silenciosos e ressaltando o direcionamento do diagnóstico nesta categoria de animais. A identificação e detecção do protozoário por meio de cultivo são tidas como “padrão ouro” dentre as técnicas diagnósticas nas centrais de inseminação artificial brasileiras. Entretanto, há a possibilidade de resultado falso negativo, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e eficazes de diagnóstico já que, até o momento, a Inseminação Artificial (IA) é a principal forma de prevenção da TGB. *T. foetus* já foi encontrado em amostras de sêmen e também é capaz de permanecer viável quando congelado, o que eleva a IA a um potencial fator de risco quando medidas sanitárias não são aplicadas ou o método diagnóstico é insuficiente. Com base no exposto, este trabalho teve por objetivo investigar a presença de *T. foetus* em 27 amostras de sêmen bovino congelado, por meio de cultivo e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Uma vez no laboratório, as amostras foram descongeladas em água a 37°C, parte foi inoculada em tubo de ensaio contendo meio Diamond, incubada a 35°C com consequente avaliação de crescimento e avaliadas a cada 24 horas, via exame direto em microscópio, e a outra parte foi diluída em PBS para posterior análise molecular. Após 10 dias de cultivo, todas as amostras foram negativas. Para a detecção molecular foi utilizado o Kit Quick-DNA Miniprep (Zymo Research) sem proteinase K para extração do DNA. Os iniciadores utilizados na PCR foram TRF3 e TRF4. O resultado da PCR foi negativo para todas as amostras, respaldando o resultado obtido no cultivo. Conclui-se que as amostras utilizadas foram realmente negativas para a presença do patógeno pesquisado em ambos os métodos diagnósticos, o que comprovou a inocuidade do sêmen comercial testado.

Palavras-chave: Tricomoníase, biologia molecular, sêmen congelado

ABSTRACT

RIBEIRO, Laura. ***Tritrichomonas foetus* detection in cryopreserved bovine semen by Isolation and Polymerase Chain Reaction**. 2020. 42p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine, Pathology and Clinical Sciences). Instituto de Zootecnia, Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

The Bovine Genital Trichomoniasis (BGT) is an infectious disease triggered by a protozoan called *Tritrichomonas foetus*, which is transmitted by venereal route and by contaminated fomites. The disease is economically relevant, since its main consequence is abortion, besides producing temporary infertility. In males the disease is asymptomatic and permanent, characterizing the bulls as silent nurses and emphasizing the direction of diagnosis in this category of animals. The identification and detection of the protozoan by microbiological culture are considered as "gold standard" among diagnostic techniques in Brazilian artificial insemination centers. However, the possibility of a false negative is a reality and is needed more sensitive and specific techniques of diagnose, since the Artificial Insemination (AI) is the current way to prevent BGT. *T. foetus* has already been found in semen samples and is also able to remain viable when frozen, raising AI to a risk factor when sanitary measures are not applied or the diagnostic method is insufficient. Thus, this study is aimed to detect the presence of *T. foetus* in samples of cryopreserved bovine semen, through culture and Polymerase Chain Reaction (PCR). The semen straws will be purchased from artificial insemination centers. A total of 27 samples were analyzed. Once in the laboratory, they were thawed in water at 37°C, part was inoculated in a test tube containing Diamond medium, incubated at 35°C with consequent growth evaluation and evaluated every 24 hours via direct microscope examination and the other part diluted in PBS for subsequent molecular analysis. After 10 days of cultivation, all samples were negative. For molecular detection, the Quick-DNA Miniprep Kit (Zymo Research) without proteinase K was used for DNA extraction. The primers used in PCR were TRF3 and TRF4. The PCR result was negative for all samples, corroborating with that obtained in the culture. It was concluded that the samples used were negative for the presence of *T. foetus* in both diagnostic methods, proving the innocuousness of the commercial semen tested.

Key words: Trichomoniasis, molecular biology, frozen semen

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Etiologia da Tricomonose Genital Bovina	2
2.2	Epidemiologia da TGB	4
2.3	Patogenia e Sinais Clínicos da TGB	7
2.3.	Diagnóstico da TGB	8
2.4	Controle e Profilaxia da TGB	9
2.5	<i>Tritrichomonas Foetus</i> em outras espécies animais	10
2.6	Patógenos Identificados em Sêmen Bovino	10
2.7	Importância Econômica da Bovinocultura	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1.	Origem das amostras	13
3.2.	Cultivo e isolamento	13
3.3.	Diagnóstico e identificação molecular	13
3.3.1.	<i>Extração do DNA genômico</i>	13
3.3.2.	<i>Iniciadores (primers)</i>	14
3.3.3.	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5	CONCLUSÃO	18
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1 INTRODUÇÃO

A Tricomonose Genital Bovina (TGB), ou Tricomoníase Bovina, é uma doença infecciosa transmitida por via venérea, e tem como agente etiológico o protozoário *Tritrichomonas foetus*. A enfermidade está presente em praticamente todo o mundo e causa grandes impactos econômicos, uma vez que em fêmeas pode causar, principalmente, aborto durante o terço inicial da prenhez. Em touros, a doença ocorre de maneira silenciosa, sendo esses animais, portanto, portadores assintomáticos e os principais disseminadores da tricomonose bovina nos rebanhos ao redor do mundo.

O diagnóstico é baseado no histórico reprodutivo da propriedade e nos sinais clínicos observados nas fêmeas, sendo confirmado pelo isolamento e identificação de *T. foetus* por meio de cultivo em laboratório. Devido às dificuldades de isolamento do agente, testes mais sensíveis e específicos como a imunistoquímica e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido preferíveis embora o custo ainda seja relativamente elevado. Apesar disso, o método padrão ainda é o cultivo microbiológico que sozinho, não apresenta resultados tão satisfatórios, podendo uma análise ter resultado falso negativo, já que depende da perícia do observador em detectar o agente na amostra.

A maior ocorrência da TGB está relacionada com a criação extensiva do gado onde a monta natural (MN) é a principal técnica reprodutiva; assim, uma das formas de prevenção seria o uso da Inseminação Artificial (IA). Contudo, outras formas de transmissão são relatadas como, por exemplo, o uso de vagina artificial contaminada ou sêmen de touros positivos.

A tricomonose ainda é considerada uma doença de difícil controle no Brasil, devido à característica de exploração extensiva da maioria das propriedades e utilização da MN, ao desconhecimento por grande parte dos pecuaristas sobre a existência da doença, à permanência de touros idosos nas propriedades, à falta de cuidados sanitários na preservação do sêmen bovino, dentre outros fatores que contribuem para a persistência e disseminação da enfermidade pelos rebanhos brasileiros.

Outro fator relevante é a capacidade de *T. foetus* sobreviver ao congelamento e se manter potencialmente infectante no sêmen de touros, podendo, portanto, elevar a IA ao posto de fator de risco quando realizada com material de baixa segurança sanitária (como os congelados a campo e compartilhados entre propriedades vizinhas, sem análise laboratorial prévia).

Alguns estudos já comprovaram a eficácia da PCR na detecção de patógenos no sêmen e sua superioridade em relação ao cultivo (CARDOSO et al., 2006; COBO et al., 2007; NARDI JUNIOR et al., 2014), porém pesquisas sobre *T. foetus* em sêmen bovino ainda são escassas na literatura.

No estado do Rio de Janeiro, os últimos estudos a respeito da prevalência de *T. foetus* foram publicados em 2004 por Jesus et al., apresentando 1,6% de animais positivos e em 2009 por Rocha e colaboradores, sem resultados positivos para a enfermidade. A partir de então, não se tem mais dados sobre a situação da doença no estado.

Portanto, esta é uma área que deve ser mais explorada devido ao impacto econômico e sanitário que a enfermidade provoca nos rebanhos, além da necessidade de adicionar a PCR à lista de técnicas diagnósticas confiáveis para a TGB, sendo uma ferramenta a mais no combate ao agente no Brasil.

Com base no exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar diferentes amostras de palhetas de sêmen comercial criopreservado a fim de detectar a presença de *Tritrichomonas foetus*, através de cultivo e PCR e comparar os resultados obtidos nas duas técnicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia da Tricomonose Genital Bovina

A TGB é uma doença venérea causada por um protozoário flagelado, atualmente denominado *Tritrichomonas foetus*. O agente foi observado pela primeira vez em 1888 por Kunstler na França, sendo descrito novamente em 1900 na Itália por Mazzanti que levou o crédito de primeiro relato (MORGAN, 1945). Na ocasião, Mazzanti associou o patógeno à ocorrência de vaginite, endometrite e infertilidade em vacas e nomeou o agente *Trichomonas uterovaginalis vitulae*, não atendendo às regras de nomenclatura científica (MAZZANTI, 1900 *apud* WEINRICH; EMMERSON, 1933).

Então, foi só em 1928 que seu nome foi dado por Riedmüller e aceito pela comunidade científica, sendo naquela época chamado de *Trichomonas foetus* (RABELLO, 1955). Foi também neste período que o protozoário foi descrito afetando a fertilidade de vacas, sendo associado ao aborto (RIEDMÜLLER, 1928 *apud* RABELLO, 1955). Na década posterior, o agente foi realocado para o gênero *Tritrichomonas* devido à presença de três flagelos anteriores, passando à denominação atual (WENRICH; EMMERSON, 1933).

Wenrich e Emmerson (1933) descreveram *T. foetus* como um organismo eucarionte, piriforme, que possui apenas um núcleo localizado na porção anterior do corpo, três flagelos anteriores e um posterior que percorre ao longo de toda membrana plasmática, constituindo a membrana ondulante, visível à microscopia.

Esses pesquisadores descreveram ainda, uma estrutura denominada blefaroplasto anterior, local de onde emergem outras estruturas, incluindo os flagelos anteriores e o posterior, o axóstilo, o corpo parabasal e a costa (Figura 1). Quando dotado de flagelos, possui formato piriforme e é denominado trofozoíto, apresentando cerca de 10-18 µm de comprimento e 3-6 µm de largura (WENRICH; EMMERSON, 1933; BENCHIMOL, 2004).

Tritrichomonas foetus possui estruturas únicas como axóstilo, costa e os hidrogenossomos (BENCHIMOL, 2004). Diferente de outras células eucariontes, nestes parabasalídeos as organelas responsáveis pela respiração celular como as mitocôndrias e peroxissomos estão ausentes, categorizando estes organismos como anaeróbios facultativos (SITES, 1978; STEINBÜCHEL; MÜLLER, 1986; BENCHIMOL, 2004).

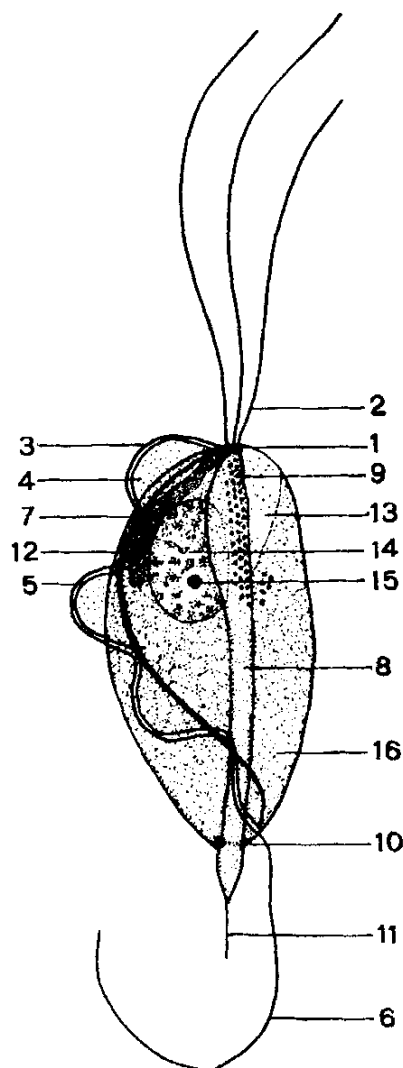


Figura 1. Diagrama elaborado por Wenrich e Emmerson (1933), que descreve as estruturas observadas em *Trichomonas foetus*: 1- blefaroplasto; 2- flagelo anterior; 3- flagelo posterior formando uma parte da 4- membrana ondulante; 5- filamento acessório na membrana ondulante; 6- flagelo posterior livre; 7- costa; 8- axóstilo; 9- grânulos do axóstilo; 10- anel cromático que envolve o axóstilo no ponto em que este emerge do corpo; 11- espinha terminal do axóstilo; 12- corpo parabasal; 13- cístostomo; 14- núcleo; 15- cariossoma; 16- citoplasma

Segundo Sites (1978), os tricomonádídeos de todas as espécies possuem estruturas muito parecidas com os peroxissomos, são os chamados hidrogenossomos. Tais organelas contêm enzimas que participam do metabolismo do piruvato durante a glicólise, são os sítios de formação de hidrogênio e formação de ATP (SITES, 1978), e parecem ter importância na aquisição de resistência a medicamentos (BENCHIMOL, 2004).

Esta última característica pode ser o que determina o insucesso das terapias impostas para a TGB em bovinos e explicar por que não há tratamento eficaz até os dias atuais.

O comportamento observado desse patógeno à microscopia óptica corresponde ao movimento anti-horário e irregular em relação ao campo. Esse movimento é rápido, com progressão enérgica auxiliada por seus flagelos e membrana ondulante (WENRICH; EMMERSON, 1933).

Quando exposto a situações desfavoráveis, *T. foetus* muda sua conformação internalizando seus flagelos e assumindo o formato de pseudocistos (GRANGER et al., 2000; BENCHIMOL, 2004).

Outro ponto interessante de sua biologia é que o agente parece ter diferentes comportamentos que variam conforme o tipo de interação patógeno-hospedeiro, fato visualizado em trabalho desenvolvido por Morin-Adeline et al. (2015). Em meios ácidos (pH 6), *T. foetus* assume uma forma mais arredondada, abandonando seu formato piriforme clássico, o que parece aumentar seu tamanho. Além disso, sua viabilidade é afetada, sugerindo que fatores intrínsecos do hospedeiro como o pH, por exemplo, podem afetar drasticamente a virulência de *T. foetus* e sua especificidade. Tal conclusão foi possível porque sob as mesmas condições, uma cepa obtida de felinos não sofreu tais interferências (MORIN-ADELINÉ et al., 2015).

Trichostrongylus axei acomete o trato reprodutivo dos bovinos e em um estudo feito por Hammond e Bartlett (1943), foi possível localizar *T. foetus* ao longo de toda cavidade prepucial dos touros infectados. Alguns anos depois, Parsonson, Clark e Dufty (1974) encontraram o protozoário também em secreções penianas e prepuciais, assim como no orifício uretral. Em fêmeas o agente pode ser encontrado em vagina, cérvix, útero e tuba uterina (PARSONSON; CLARK; DUFTY, 1976).

2.2 Epidemiologia da TGB

Trichostrongylus axei está presente em praticamente todo o mundo e devido ao grande impacto econômico que provoca, está listado como uma doença notificável de acordo com a Organização Internacional de Epizootias – OIE (OIE, 2012; 2020).

Sua prevalência em determinadas regiões apresenta estreita correlação com alguns fatores de risco, mas principalmente ao sistema de criação extensivo, com a monta natural sendo a principal ou única estratégia de manejo reprodutivo (RAE; CREWS, 2006; YAO, 2013).

Nos últimos anos, algumas pesquisas foram realizadas ao redor do mundo para detectar a presença de *T. foetus*. Em um estudo feito no Tennessee, EUA, foi utilizado como amostra esmegma prepucial de touros de matadouros e de propriedades rurais, as quais foram submetidas à análise microscópica, cultivo e PCR; em todas as amostras os resultados foram negativos (OKAFOR et al., 2017). Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos realizados na Polônia (DĄBROWSKA et al., 2020a) e na Suíça (BERNASCONI et al., 2014).

No Uruguai, um grupo de pesquisadores encontrou 2,25% de amostras positivas em seu estudo através do método da PCR, representando 7 de 310 amostras coletadas em 56 estabelecimentos da região estudada (SILVEIRA et al., 2020).

Outro país que realiza muitas pesquisas na área é o Canadá que, atualmente, apresenta resultados positivos bem abaixo do que já foi constatado em décadas anteriores (WALDNER et al., 2017).

Os primeiros relatos da presença de *T. foetus* no Brasil foram feitos por Roehe, em 1948, no Rio Grande do Sul e por Rabello, em 1955, em São Paulo, a partir de amostras coletadas de touros em Centrais de Inseminação Artificial (CIA) (RABELLO, 1955). Desde então, foram conduzidos diversos estudos epidemiológicos ao longo dos anos a fim de detectar a presença da TGB em diversos rebanhos do território nacional.

No estado do Rio de Janeiro, os últimos estudos a respeito da prevalência de *T. foetus* foram publicados em 2004 por Jesus et al., apresentando 1,6% de animais positivos e em 2009 por Rocha e colaboradores, sem resultados positivos para a enfermidade. A partir de então, não se tem mais dados sobre a situação da doença no estado.

Na década atual, estudos brasileiros publicados tratam da prevalência e ocorrência da TGB no Distrito Federal (LEAL et al., 2012), no Mato Grosso do Sul (FRIAS; SOUZA; KOZUSNY-ANDREANI, 2017), em Pernambuco (DE OLIVEIRA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016), em Minas Gerais (BOTELHO et al., 2018) e na Paraíba (FILHO et al., 2018), deixando uma grande lacuna a respeito da epidemiologia da doença em outras regiões do Brasil. Os resultados obtidos nestes estudos epidemiológicos estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Panorama da Tricomonose Genital Bovina no Brasil, no período entre 2012-2018.

Fonte	Estado	Total de amostras	Prevalência (%)	Técnica	Amostras
Leal et al. (2012)	DF	385	0	I	Muco vaginal e uterino
De Oliveira et al. (2015)	PE	383	33.4	PCR	Muco cérvico-vaginal
Oliveira et al. (2016)	PE	105	6.6	PCR	Esmegma prepucial
Frias; Souza; Kozusny-Andreani (2017)	MS	210	0	I	Esmegma prepucial
Botelho et al. (2018)	MG	200	8	I; PCR	Esmegma prepucial
Filho et al. (2018)	PB	349	3.7	I; PCR	Esmegma prepucial e muco cérvico-vaginal

DF- Distrito Federal; MS- Mato Grosso do Sul; MG- Minas Gerais; PB- Paraíba; PE- Pernambuco

I – Isolamento em cultivo; PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

A transmissão da TGB se dá por via venérea, de um animal infectado para um sadio, e através de fômites contaminados (MENDOZA-IBARRA et al., 2012; OIE, 2012). Dentre estes fômites está a vagina artificial utilizada para coleta de sêmen, que pode se contaminar com secreções prepuciais contendo *T. foetus* e, conseqüentemente, contaminando o sêmen.

Apesar de o sêmen comercial ser congelado, o que já é considerado um entrave para alguns microrganismos, *T. foetus* é capaz de sobreviver ao congelamento se mantendo potencialmente infectante e, inclusive, a sua preservação em nitrogênio líquido, em laboratório, é feita com os mesmos crioprotetores utilizados para o sêmen, portanto, falhas no diagnóstico podem elevar a inseminação artificial ao posto de fator de risco para a ocorrência da TGB (DIAMOND, 1964; CAMPERO, 1989; MUKHUFHI et al., 2003; PARKER, et al., 2003a; PARKER et al., 2003b; JESUS et al., 2004; COBO et al., 2007; MARTINS et al., 2008; PHILLIPS; MYERS; DEWELL, 2016).

Os principais fatores de risco correlacionados para a transmissão da doença são: utilização de monta natural, introdução de novos animais na propriedade sem os devidos cuidados sanitários, presença de touros velhos (acima de 5 anos de idade) na propriedade, desconhecimento dos produtores a respeito da doença, inseminação artificial com sêmen de touros infectados, compartilhamento de touros entre propriedades ou até mesmo fuga de animais para regiões vizinhas (RAE et al., 2004; MENDOZA-IBARRA et al., 2012; SZONYI et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2015; OKAFOR et al., 2017; FILHO et al., 2018). Além disso, Rae et al. (2004) relataram em seu estudo que rebanhos maiores tendem a ser mais suscetíveis à presença da TGB devido ao contato constante entre machos e fêmeas.

Apesar do conhecimento sobre a forma de transmissão via sexual da TGB, na literatura há relatos de testes com amostras de touros virgens que foram positivas para a presença de parabasalídeos (PARKER et al., 2003). Neste estudo, as amostras de dois touros foram submetidas ao cultivo e análise molecular por PCR, que resultou positivo para um deles. Na ocasião não foi possível detectar se tratava-se de fato, ou não, de *T. foetus*.

Porém, o mais interessante deste estudo, é que este touro que testou positivo estava no mesmo piquete que outros machos sabidamente positivos para *T. foetus*. Além disso, nas coletas subsequentes, no intervalo de 2 anos em que o animal foi submetido a testes, os resultados foram todos negativos (PARKER et al., 2003). Os autores comentam a possibilidade de ter ocorrido sodomização entre os animais ou de contaminação da amostra com fezes, durante a coleta, de forma que o organismo visto, provavelmente se tratava de outro parabasalídeo e não *T. foetus*.

Alguns anos depois deste trabalho de Parker e colaboradores (2003), outra pesquisa foi feita em cima da possibilidade de haver *T. foetus* no trato reprodutivo de touros virgens, porém não se obteve resultados positivos. De fato, encontraram parabasalídeos, mas estes eram membros das espécies *Tetratrichomonas* spp. e *Pentatrichomonas hominis* (CORBEIL et al., 2008), fato que só pode ser constatado através da PCR, uma vez que somente a microscopia não é 100% eficaz na correta diferenciação entre estes agentes.

Estudos relatam que a presença de um macho infectado em um rebanho impacta de maneira significativa a sanidade e a rentabilidade da propriedade (RAE et al., 2004). De acordo com estudo retrospectivo realizado por Jesus et al. (2004), a prevalência da tricomonose bovina no período de 1958-2001 no Rio de Janeiro foi 14 vezes maior em machos do que em fêmeas (9,9% e 0,7%, respectivamente), reforçando a condição dos touros como importantes mantenedores e disseminadores da enfermidade no plantel.

Além disso, touros são portadores silenciosos da doença e, ao contrário das fêmeas, permanecem infectados por longos períodos e muitas vezes, por toda a vida (BONDURANT, 1997). Estudos antigos mostraram que touros acima de 3 anos são mais propensos a se infectarem e permanecerem positivos por conta de suas criptas epiteliais no prepúcio, que são mais profundas do que em touros mais jovens (BONDURANT, 1997). Outros autores sugerem ainda, que a faixa etária mais comum é a partir dos 5 anos de idade (JESUS et al., 2004).

O que todos estes autores defendem é que o exame em touros se faz importante e menos dispendioso do que o exame em fêmeas, já que estes animais estão em menor número nas propriedades.

Segundo a OIE, países como Brasil, Estados Unidos, Uruguai, Venezuela, Espanha, Portugal, Paquistão, França, Costa Rica, Austrália e Argentina continuam animais confirmados para a doença em seus rebanhos. Os dados apresentados correspondem ao período de 2015-2019 e podem representar impactos consideráveis na produção bovina destes países enquanto a doença não for controlada e erradicada (OIE, 2020b).

2.3 Patogenia e Sinais Clínicos da TGB

Um dos primeiros estudos feitos em touros, pesquisou *T. foetus* em todo o trato genital masculino e concluiu que, embora o agente tenha sido encontrado em diversas porções, nenhuma anormalidade foi encontrada, apesar dos pesquisadores terem observado a presença de petéquias na glândula e em área adjacente ao prepúcio (HAMMOND; BARTLETT, 1943). Estes autores defenderam, em seu trabalho, que tais sinais não poderiam ser atribuídos à TGB devido ao seu aparecimento apenas ocasional e sem correlação com o número de *T. foetus* presentes, impossibilitando uma correlação consistente entre estes sinais observados e à doença em si.

Outro trabalho detectou a presença de inflamação da cauda do epidídimo e cistos na vesícula seminal, porém não foi possível fechar diagnóstico para TGB, uma vez que não foi detectada a presença de *T. foetus*, via exame direto e cultivo (PARSONSON; CLARK; DUFTY, 1974).

Na literatura mais antiga é possível encontrar possíveis sinais clínicos associados à TGB, porém os dados são inconsistentes e conflitam com dados da mesma época (FELLEISEN, 1999).

Por outro lado, a infecção em fêmeas apresenta diversos sinais clínicos. Dentre eles estão: foliculite, vaginite, endometrite, aborto no terço inicial de gestação, repetição de cio e infertilidade temporária (PARSONSON; CLARK; DUFTY, 1976; BONDURANT, 1997; YAO, 2013). Um estudo antigo detectou também a presença de salpingite, placentite e piometra. Nesta mesma pesquisa, duas vacas com gestação ainda em curso apresentaram placentomas hemorrágicos e descolamento de cotilédones (PARSONSON; CLARK; DUFTY, 1976).

As lesões em fêmeas ocorrem após cerca de 60 dias do início da infecção, sendo marcadas por uma vaginite severa e/ou inflamação crônica do trato genital (PARSONSON; CLARK; DUFTY, 1976). Entretanto, antes do aparecimento das lesões já é possível detectar *T. foetus* em todo o trato genital de vacas infectadas, inclusive no oviduto.

Em novilhas, a TGB provoca, principalmente, morte fetal precoce e infertilidade associada ao atraso em novas concepções (CLARK; DUFTY; PARSONSON, 1983). Tais resultados são encontrados em animais infectados pela primeira ou terceira vez. Inclusive, neste estudo de Clark, Dufty e Parsonson (1983), foi provado que a suscetibilidade de vacas às infecções subsequentes provavelmente está correlacionada com o tempo entre a resolução da infecção anterior e nova exposição a *T. foetus*, e que há uma perda progressiva de imunidade após a recuperação da fêmea.

Além disso, mesmo com uma pré-exposição ao agente, vacas que se curaram totalmente, se novamente expostas a *T. foetus* podem apresentar sintomas tão severos como se fosse a primeira infecção.

2.3. Diagnóstico da TGB

Em estudo feito por Hammond e Bartlet (1943), foi possível localizar *T. foetus* ao longo de toda cavidade prepucial dos touros infectados. Alguns anos depois, Parsonson, Clark e Dufty (1974) encontraram o protozoário também em secreções penianas e prepuciais, assim como no orifício uretral. Devido a essa localização, o principal material a ser coletado para o diagnóstico da TGB em touros é o lavado prepucial ou raspagem do esmegma.

O ideal para coleta de lavado prepucial é que o touro seja colocado em repouso sexual por, pelo menos, duas semanas, e que sejam feitas três coletas com intervalos de 15 dias (PELLEGRIN et al., 2003).

Parsonson, Clark e Dufty (1974) cultivaram amostras de sêmen de touros e obtiveram resultados negativos, inclusive de animais que foram diagnosticados para TGB através do cultivo de lavado prepucial. Esses dados comprovam o contrário do que foi apresentado por outros autores na época, que citaram a possibilidade do sêmen ser contaminado quando coletado via vagina artificial (JOYNER; MILLAR, 1952 *apud* CLARK; WHITE; BANFIELD, 1971).

Em fêmeas, o material para diagnóstico da TGB é o lavado ou a raspagem uterina e restos placentários ou de fetos abortados (PARSONSON; CLARK; DUFTY, 1976).

Nos primórdios do descobrimento da doença, a TGB era diagnosticada principalmente via microscopia direta, inoculação de lavado uterino ou prepucial em novilhas virgens e teste de aglutinação com amostras de soro sanguíneo (KERR; ROBERTSON, 1943; PIERCE, 1949; CLARK; WHITE; BANFIELD, 1971).

Após estes primeiros estudos, o método do cultivo com visualização do parasito via microscopia óptica foi desenvolvido e considerado o mais confiável dentre os existentes (CLARK; WHITE; BANFIELD, 1971; TEDESCO ; ERRICO; DEL BAGLIVI, 1979).

Os outros métodos foram aos poucos denominados como obsoletos e não confiáveis, já que dependiam: da presença do agente no material depositado em lâmina e gasto de tempo na inoculação de material coletado a partir de animais suspeitos em animais negativos, além do fato de que alguns animais positivos não reagem no teste de aglutinação sorológica, que foi um dos primeiros a serem estudados, gerando resultados falso-negativos (CLARK; WHITE; BANFIELD, 1971; TEDESCO ; ERRICO; DEL BAGLIVI, 1979).

Os métodos diagnósticos disponíveis atualmente para a TGB incluem: visualização direta em microscopia óptica, cultivo, imunoistoquímica e PCR, sendo que no Brasil o método padrão para identificação de *T. foetus*, segundo a Instrução Normativa N°48 de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é o cultivo em laboratório credenciado no que diz respeito ao controle sanitário em Centrais de Inseminação Artificial (CIA) (BRASIL, 2003).

Contudo, trabalhos recentes têm demonstrado falhas no cultivo microbiológico quando são feitas comparações com a PCR, sendo esta última mais sensível (YAO, 2013; FILHO et al., 2018; SILVEIRA et al., 2020). Estes mesmos estudos sugerem ainda, que ambas as técnicas sejam aplicadas em conjunto para melhores resultados.

Os meios de cultivo indicados para o crescimento de *T. foetus* são Diamond e Hanks enquanto para o transporte; o meio lactopep desenvolvido no Brasil, é o mais utilizado (LOPES et al., 1995, 1996; BONDURANT, 1997). O meio lactopep é simples de ser obtido, possui ótimo custo-benefício e pode ser transportado facilmente, além de manter os parasitos viáveis por um período suficiente (LOPES et al., 1995).

Um estudo realizado por Lopes e colaboradores concluiu que o meio lactopep atende às necessidades dos Médicos Veterinários brasileiros, uma vez que há diversas propriedades rurais situadas em áreas mais remotas, desta maneira, sendo necessário haver um meio de transporte

capaz de manter *T. foetus* viável por mais tempo, apesar da manutenção de temperatura adequada e distância do laboratório representarem grandes desafios (LOPES et al., 1996).

Um outro trabalho, desta vez internacional, comparou os meios Diamond, InPouch TF e meio tripticase (BRYAN; CAMPBELL; GAJADHAR, 1999) em relação ao tempo e à temperatura. Os resultados mostraram que a melhor faixa de temperatura para transporte e manutenção de *T. foetus* está situada entre 22 e 37°C. Em contrapartida, as amostras que foram congeladas nestes mesmos meios seletivos a -20°C perderam sua viabilidade. Em países como os Estados Unidos e Canadá, o meio que se mostrou mais adequado foi o InPouch TF, sendo eleito o meio de escolha para transporte até os dias de hoje.

Em relação à detecção de *T. foetus* via PCR, os primeiros trabalhos foram publicados ainda na década de 1990, com a finalidade de oferecer um meio de detecção sensível e específico como uma maneira de solucionar os gargalos que até então existiam, tais como: falsos negativos em cultivo, possibilidade de detecção do parasita morto e sensibilidade ótima mesmo em amostra contaminada por outros microrganismos (FELLEISEN et al., 1998; MUKHUFHI et al., 2003).

De fato, diversos trabalhos vem apontando os ótimos resultados que a PCR possui, principalmente se comparada ao cultivo e exame direto (FELLEISEN et al., 1998; MUKHUFHI et al., 2003; BOTELHO et al., 2018; FILHO et al., 2018; CLOTHIER et al., 2019). Entretanto, essa técnica sozinha não pode ser utilizada por também apresentar fatores limitantes (RAE; CREWS, 2006) como degradação do material genético em caso de demora na entrega das amostras ao laboratório, custo elevado, mínimo de 100 células por amostra para apresentar resultado positivo e falso negativo devido à presença de substâncias inibidoras da reação (MUTTO; GIAMBIAGGI; ANGEL, 2006; GARCÍA GUERRA et al., 2013; GINTER SUMMARELL et al., 2018).

Apesar disso, a PCR ainda é forte candidata ao melhor método de diagnóstico, em conjunto com o cultivo de *T. foetus*, podendo ser utilizada como método confirmatório (HAYES; ANDERSON; WALKER, 2003; SILVEIRA et al., 2020).

2.4 Controle e Profilaxia da TGB

A TGB ainda é considerada uma doença de difícil controle no Brasil, principalmente devido ao caráter extensivo da maioria das propriedades no país, ao desconhecimento por parte dos produtores em relação à doença e também ao diagnóstico falho, uma vez que apenas fêmeas apresentam sinais clínicos e estes podem ser confundidos com diversas enfermidades reprodutivas (JESUS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2016; FILHO et al., 2018). Além disso, há poucos estudos publicados que tratem da prevalência da doença no Brasil, que permitam elucidar alguns aspectos da epidemiologia da doença e porque o diagnóstico não tem sido realizado corretamente ao longo dos anos.

Devido ao caráter assintomático da doença em touros, este grupo deve ser o foco dos exames diagnósticos em rebanhos e CIA, uma vez que estão em menor número na propriedade o que facilita o manejo. De acordo com Ondrak (2016), todos os animais positivos devem ser descartados da propriedade, deve haver um manejo reprodutivo eficaz para evitar o aparecimento da doença no rebanho, além do uso de técnicas mais sensíveis e específicas de detecção do agente.

Animais recém-adquiridos devem ser testados antes de serem introduzidos no rebanho, deve-se utilizar preferencialmente a inseminação artificial com sêmen de qualidade, evitar o uso de touro de repasse e descartar touros acima de cinco anos de idade. Eaglesome e Garcia (1997) destacam ainda, que o controle sanitário em CIAs deve ser rigoroso, e deve-se realizar

o teste de todos os animais, periodicamente, e descartar todo o lote de palhetas quando há a detecção de *T. foetus* em algum reprodutor.

Outro ponto importante no combate à TGB é a conscientização dos produtores rurais sobre a existência da doença e os cuidados já citados acima.

2.5 *Tritrichomonas foetus* em outras espécies animais

Em gatos *T. foetus* já foi detectado no sistema gastrointestinal e provocou diarreia de consistência líquida a pastosa podendo também causar dor abdominal, irritação anal e anorexia (SANTOS et al., 2015; ZANZANI et al., 2016). A forma de transmissão da tricomonose felina é feco-oral, e sua importância está ligada à ocorrência em gatis de criadores e abrigos devido à sua disseminação rápida (DĄBROWSKA et al., 2019, 2020a).

Também já foi isolado *T. foetus* de suínos, na cavidade nasal, estômago e em todo o trato intestinal, porém como um mero comensal nesta espécie (DĄBROWSKA et al., 2019).

Há, no meio científico, uma busca incessante pela determinação das espécies que acometem bovinos e outros mamíferos, principalmente no que diz respeito ao parasita encontrado em suínos. Diversos estudos já fizeram a descrição gênica de tricomonádídeos encontrados em bovinos e suínos, inclusive ensaios clínicos foram realizados infectando vacas com amostras coletadas de suínos para comprovar que se tratava do mesmo agente. Entretanto, o nome *Tritrichomonas suis* ainda é muito citado na literatura (FELLEISEN et al., 1998; ŠLAPETA et al., 2010; DĄBROWSKA et al., 2020b).

2.6 Patógenos identificados em sêmen bovino

Na literatura existem dados consistentes da presença de diversos agentes patogênicos no sêmen bovino (GIVENS, 2018). Apesar dessa detecção, via PCR, não comprovar uma possível transmissão venérea da enfermidade, vale ressaltar a importância do monitoramento do sêmen bovino, uma vez que este material é amplamente utilizado em diversas propriedades brasileiras e pode servir de fonte de infecção para fêmeas suscetíveis (GIVENS; MARLEY, 2008; GIVENS, 2018).

Em um estudo foi pesquisada a presença de *Brucella abortus* no sêmen de touros, através dos testes AAT (Antígeno Acidificado Tamponado), 2-ME (2-mercaptoetanol), FC (Fixação de Complemento) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os resultados foram surpreendentes com 5 animais positivos de um total de 15 touros, no teste do AAT e 2 desses foram positivos na prova do 2-ME (NARDI JUNIOR et al., 2014).

Pela PCR sete touros foram positivos e o mais interessante é que na verdade se tratava de *B. abortus* cepa B19, a mesma cepa utilizada na vacinação de fêmeas bovinas, sendo contraindicadas para machos. Além disso, a PCR foi capaz de detectar dois outros animais positivos enquanto os outros testes e, inclusive, o cultivo microbiológico resultaram negativos (NARDI JUNIOR et al., 2014). Dada a importância da doença e a virulência da cepa vacinal, tal achado implica em uma preocupação com a saúde pública, principalmente no que diz respeito aos profissionais que lidam e manipulam diariamente sêmen em CIA, além da saúde animal uma vez que a PCR foi capaz de detectar duas amostras positivas que não apareceram em nenhuma das outras provas preconizadas pelo MAPA.

Um outro trabalho publicado recentemente por um grupo finlandês detectou a presença da bactéria *Mycoplasma bovis* em palhetas de sêmen que haviam sido utilizadas para

inseminação artificial em vacas de leite, causando mastite em duas propriedades (HAAPALA et al., 2018). Em ambas as propriedades o controle contra mastite era rigoroso e todo animal que apresentava o problema mamário era pesquisado para diversos patógenos, incluindo *M. bovis*. Além disso, o método reprodutivo adotado nas fazendas era unicamente a inseminação artificial, com o objetivo de evitar doenças da esfera reprodutiva. Todo sêmen utilizado vinha de CIA com todo controle de qualidade e sanitário, conforme a legislação finlandesa (HAAPALA et al., 2018).

Apesar de todo este controle, todas as fêmeas de ambos os rebanhos apresentaram mastite, com detecção de *M. bovis* via PCR. Resultado semelhante ao ser feita análise do sêmen utilizado para IA. Como nenhuma outra variável apresentou força suficiente na investigação epidemiológica, a fonte de infecção foi determinada como sendo o sêmen.

Outras bactérias também já foram detectadas em sêmen bovino: *Leptospira* spp., *Histophilus somnus*, *Ureaplasma diversum*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e *Chlamydia* (PHILPOTT, 1993; GIVENS; MARLEY, 2008; MARQUES et al., 2009; DIAS et al., 2014).

Além desses microrganismos, parasita como *Neospora caninum* já foi detectado em sêmen bovino (DOOSTI et al., 2015). Este estudo realizado por Doosti e colaboradores (2015) revelou 10.53% de amostras positivas, representando 6 de 57 amostras. Vale ressaltar que este trabalho foi realizado a partir de amostras de sêmen comercial, adquirido de diversas CIA e que, portanto, passaram por processamento e congelamento.

Sob este aspecto, *T. foetus* também sobrevive ao mesmo processo de congelamento ao qual o sêmen bovino é submetido (MARTINS et al., 2008; PHILLIPS; MYERS; DEWELL, 2016). Um experimento antigo realizado por Diamond (1964) descreve o processamento para congelar corretamente amostras de protozoários, mantendo-os viáveis após o descongelamento.

Estudo parecido foi realizado no Brasil com a finalidade de melhorar a preservação de *T. foetus* em laboratório, utilizando os mesmos crioprotetores usados para congelamento de sêmen bovino (MARTINS et al., 2008) o que eleva a preocupação a respeito da possibilidade de sobrevivência destes organismos após o processamento de sêmen e chances de transmissão, caso este material esteja contaminado.

2.7 Importância econômica da bovinocultura

Até 2019 o Brasil ocupava o segundo lugar em rebanho bovino do mundo, sendo o principal exportador e o segundo maior produtor de carne e o quinto maior produtor de leite (IBGE, 2019). Ainda de acordo com o IBGE, em 2019 o efetivo de vacas ordenhadas alcançou pouco mais de 16 milhões de animais. Enquanto isso, no setor de carne houve uma alta no número de animais, chegando à marca de quase 215 milhões de cabeças.

No caso da pecuária leiteira, o valor de produção em 2019 atingiu R\$43,1 bilhões, o que representa 72,8% do valor total de produtos agropecuários brasileiros no mesmo ano (IBGE, 2019).

De acordo com dados da Associação Brasileira de Inseminação Artificial, até setembro de 2020 foram coletadas 9.832.375 de doses de sêmen, oriundos de touros com aptidão leiteira e de corte (ASBIA, 2020).

Além disso, foram importadas quase 5 milhões de doses de sêmen bovino com aptidão para corte e um total de 2.825.772 de doses de sêmen oriundos de touros com aptidão para leite. Essas aquisições foram feitas, principalmente, dos EUA e Canadá (ASBIA, 2020).

Com uma participação tão expressiva na economia brasileira, é importante ter um controle rigoroso de doenças que possam afetar a produção. Nesse âmbito, doenças da esfera reprodutiva têm um papel crucial e impactam fortemente os resultados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem das Amostras

As amostras (n=27) consistiram em palhetas de sêmen bovino congelado comercial, de CIAs lotadas no Sudeste brasileiro, gentilmente cedidas por colegas Médicos Veterinários de campo. Não foram utilizados critérios específicos para escolha das amostras, uma vez que elas foram obtidas, via doação, conforme a disponibilidade.

Apesar deste trabalho não ter sido realizado com animais diretamente, ele foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da UFRRJ sob o número de protocolo 0081-10-2019 (Anexo A).

3.2. Cultivo e Isolamento

As amostras foram descongeladas em água a 37°C por 30 segundos, tendo 50µl pipetada em um eppendorf e congelada a -20°C para posterior extração e realização da PCR enquanto o restante foi inoculado em tubos devidamente identificados, contendo 2ml de meio Hanks e levado para incubação a 35°C em estufa.

A avaliação do crescimento em meio de cultivo foi realizada a cada 24 horas por meio do exame direto de uma gota do meio em lâmina e observada em microscopia óptica (Primo Star Zeiss®), em objetiva de 10.

A cada 72 horas foram realizados repiques para um meio de cultura novo e as culturas foram consideradas negativas após 10 dias de incubação sem crescimento do protozoário. Nenhum tubo contendo meio de cultivo inoculado foi desprezado até o fim dessa fase do experimento.

Toda essa etapa de cultivo foi realizada no Laboratório de Patologia da Reprodução, DPA, Anexo 1 do Instituto de Veterinária na Universidade Rural do Rio de Janeiro (IV-UFRRJ).

3.3. Diagnóstico e Identificação Molecular

As análises moleculares foram processadas no Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto Biológico de São Paulo e no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do IV-UFRRJ.

3.3.1. Extração do DNA Genômico

As amostras submetidas à extração do DNA consistiram do próprio sêmen. Foi utilizado o Quick-DNA miniprep kit, protocolo para sangue total, soro e plasma (Zymo Research®).

As alíquotas de 50µl foram descongeladas à temperatura ambiente e alocadas para tubos de micro-centrífuga de 1,5 mL aos quais foram adicionados 200µl de tampão de lise (Genomic

Lysis Buffer). Os tubos passaram então pelo vortex por 5 segundos e deixados sobre a bancada à temperatura ambiente, por 7 minutos.

Passado este período, todo o conteúdo foi então pipetado para um novo tubo, desta vez contendo uma coluna com filtro. Os tubos foram centrifugados a 10.000 xg, por 1 minuto e descartados; a coluna com filtro foi alocada para novo tubo no qual foi adicionado 200µl de DNA Pre-Wash Buffer. Novamente os tubos foram centrifugados da mesma forma que na etapa anterior.

Após centrifugação foram adicionados 500µl de g-DNA Wash Buffer em todos os tubos. Novo processo de centrifugação foi empregado a 10.000xg durante 1 minuto. Finalmente a coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e 70µl de Elution Buffer foram adicionados. As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e então centrifugadas por 30 segundos com a finalidade de eluir o DNA extraído.

Após este processo, as colunas foram descartadas e o material obtido no novo tubo foi congelado a -20°C para posterior análise molecular.

3.3.2. Iniciadores (Primers)

Para a detecção e leitura de *T. foetus* foi utilizado um conjunto de *primers* responsáveis pela amplificação da sequência de rRNA 5.8S e para as regiões ITS1 e ITS2 conforme descrito por Felleisen et al. (1998). Essas regiões ITS1 e ITS2 foram descritas como sendo marcadores moleculares específicos para a espécie *T. foetus* (FELLEISEN, 1997; FELLEISEN et al., 1998). Os *primers* foram TRF-3 (5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3') e TRF-4 (5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3' (FELLEISEN et al., 1998).

3.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para cada reação foram utilizados: 8µl de H₂O, 12.5 µl de Taq 2x Master mix RED 1.5mM MgCl₂ (Ampliqon®), 2.5 µl da amostra e 1 µl de cada primer.

Como controle positivo foi adicionado DNA de *T. foetus* isolado do trato genital de touro positivo, que consta no acervo do Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

Como controle negativo da reação foi utilizada uma alíquota, em igual volume, obtida da mistura dos produtos para reação, entretanto sem aplicação de amostra de sêmen ou cepa padrão.

A reação foi feita em termociclador (Axygen® MaxyGene Thermal Cycler II, EUA) utilizando-se a seguinte programação: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 67°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos. Foram, ao todo, 40 ciclos com uma etapa final de extensão de 15 minutos a 72°C.

As alíquotas produto dessa reação foram analisadas via eletroforese em ágar gel 1,5%, corado com brometo de etídio (dissolvido na solução de Tris-Borato-EDTA 0,5X) para visualização em fotodocumentador (Axygen® Gel Documentation System BL, EUA). Como referência foi utilizado marcador molecular de 1kb.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras analisadas foram negativas em meio de cultivo para parabasalídeos. Os tubos foram mantidos até 10 dias em estufa para análise e mesmo assim não foi possível visualizar *T. foetus* em nenhum deles. Tal resultado foi semelhante ao encontrado por (PARSONSON; CLARK; DUFTY, 1974), que também não conseguiram cultivo positivo para *T. foetus* a partir de sêmen, mesmo obtendo amostras do lavado prepucial dos mesmos touros.

O mesmo resultado negativo foi visto nas amostras submetidas à PCR, conforme demonstrado na Figura 2.

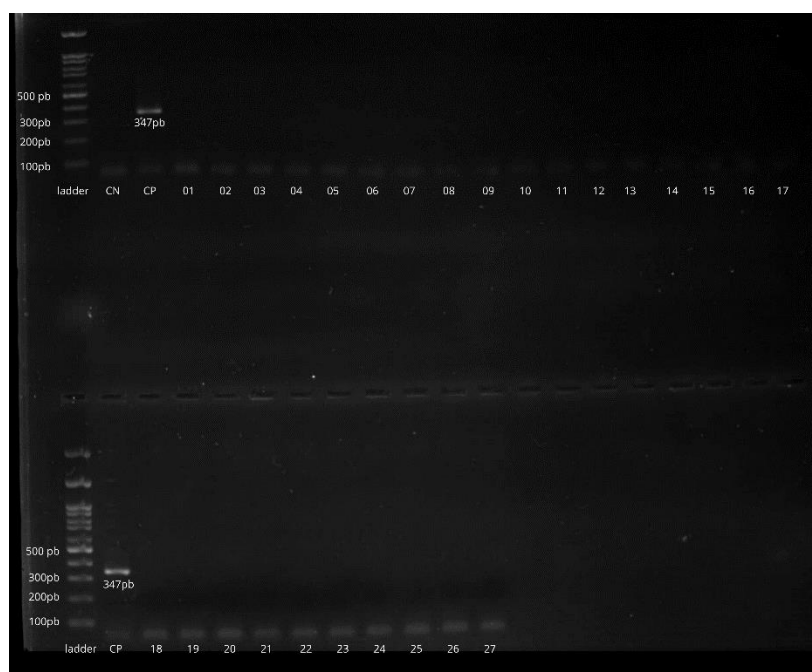


Figura 2. Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de PCR para *T. foetus*. CN – Controle negativo, CP – controle positivo, ladder – marcador molecular 1kb pb DNA.

A figura 2 mostra que todas as amostras clínicas foram negativas para a presença de *T. foetus* e que somente o controle positivo reagiu como era o esperado. É possível notar também que a reação provavelmente não possuía contaminantes, uma vez que o controle negativo não obteve nenhuma amplificação.

Ambos os resultados (cultivo e PCR) mostram a ausência do parasita nas amostras estudadas como deve ser. Não foi possível comparar as duas técnicas, já que os resultados foram negativos para as duas.

Esse resultado deve ser levado em conta, devido ao fato de serem amostras comerciais e, portanto, processadas previamente, além de serem obtidas de animais que também passaram por testes consecutivos para *T. foetus*. Por outro lado, não é possível dizer que o experimento teria este mesmo resultado se feito com sêmen fresco não processado.

Trichostrongylus foetus é um patógeno de importância e continua presente em rebanhos bovinos no Brasil. Apesar de menor ocorrência e prevalência do que no passado, a tricomonose genital bovina ainda não está erradicada e novos esforços devem ser feitos a fim de aprimorar os métodos diagnósticos e a vigilância epidemiológica (DE OLIVEIRA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

Alguns autores já encontraram agentes etiológicos em sêmen bovino criopreservado, apontando para a necessidade de intensificar o controle e número de pesquisas na área (EAGLESOME; GARCIA, 1997; DIAS et al., 2014; DOOSTI et al., 2015).

Com o avanço da tecnologia de métodos diagnósticos no campo, tanto na Medicina humana quanto na Medicina Veterinária, a PCR e suas variantes vêm ganhando cada vez mais espaço como uma técnica rápida, específica e sensível, e que muito contribui como uma ferramenta complementar na detecção de patógenos (FELLEISEN et al., 1998; RAE; CREWS, 2006; GIVENS; MARLEY, 2008; MARQUES et al., 2009).

É fato que a técnica tem sido utilizada cada vez mais e em uma variação enorme de amostras, e o sêmen é uma delas. Porém, a extração do DNA de agentes etiológicos a partir de sêmen não é tão simples, uma vez que este material apresenta diversos inibidores da técnica o que, conseqüentemente, interfere na amplificação, o que pode gerar resultados falsos.

Um dos inibidores mais importantes presentes no sêmen é o próprio material genético do hospedeiro, o qual contém enormes quantidades de DNA (VAN ENGELBURG et al., 1993). Portanto, uma forma de evitar a inibição, seria separar o máximo possível de material genético hospedeiro do restante do sêmen, como por exemplo, mantendo as cabeças dos espermatozoides intactas ou removendo-as da solução, a depender do agente pesquisado.

Neste trabalho não foi feita essa separação de frações e talvez possa ter sofrido algum impacto sobre o resultado. No entanto, em um estudo realizado por Takiuchi et al. (2003), os autores compararam alguns métodos de extração, também sem uma separação das frações do sêmen e, ainda assim, os resultados foram satisfatórios.

Um dos métodos mais citados para extração de DNA a partir de sêmen é através de fenol/clorofórmio, com ou sem digestão por proteinase K, sendo efetivo para diversos agentes etiológicos, inclusive bacterianos (TAKIUCHI et al., 2003; CARDOSO et al., 2006; MAGAJEVSKI; GIRIO, 2009), embora em alguns deles, a etapa de eletroforese também tenha sido determinante.

O presente estudo utilizou um kit comercial para extração de DNA o que também vem sendo relatado na literatura, por ser um método comprovadamente eficaz, prático, rápido e seguro, apesar de ter um custo mais elevado (YAO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016; DĄBROWSKA et al., 2020a; SILVEIRA et al., 2020).

Conforme destacado por Magajevski e Girio (2009), para materiais densos, viscosos e com possíveis inibidores como o sêmen, a padronização e escolha correta da técnica de extração é fundamental para a obtenção de resultados consistentes. Por este motivo e por questões de logística e segurança, é que a utilização de kit para extração foi escolhida para esta pesquisa, o que não impede, porém, a realização de novos estudos com o mesmo tema testando outros protocolos.

Como o conjunto de iniciadores utilizados era específico para *T. foetus*, não foi possível detectar a presença de outros parabasalídeos nas amostras analisadas. Já foi demonstrada a presença de outros tricomonádídeos em sêmen de touros utilizados para reprodução, no entanto, como se tratava de amostras de sêmen fresco, não é possível afirmar que o resultado seria o mesmo no presente estudo (ASADPOUR; SALEHI; JAFARI, 2011).

A escolha da amostra foi baseada na necessidade de pesquisar esta fonte para o agente em questão. Além disso, já foi citado na literatura a possibilidade da PCR ter melhores resultados quando realizada diretamente com a amostra pura ao invés do cultivo (GINTER SUMMARELL et al., 2018).

Embora estudos mais recentes já estejam usando outros tipos de PCR para detecção do agente, neste trabalho a PCR convencional foi a escolhida devido à logística. Um trabalho publicado por pesquisadores norte-americanos mostrou que a PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR) desenhada especialmente para o experimento, apresentou 100% de sensibilidade e especificidade para amostras de esmegma. Enquanto isso, as alíquotas provenientes do cultivo

tiveram uma queda de 5% na sensibilidade (GINTER SUMMARELL et al., 2018). Pode ser possível obter um resultado diferente do atual caso se aplique novas técnicas e metodologias.

Sendo assim, é importante testar diferentes metodologias e realizar micro experimentos com a finalidade de padronização da técnica, na busca pelo método mais sensível.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho não foi detectada a presença de *Tritrichomonas foetus* nas amostras utilizadas, a partir das técnicas escolhidas e metodologias empregadas.

É possível concluir que as amostras de sêmen analisadas se mostraram seguras ao seu emprego, uma vez que não continham traços de *T. foetus* e, portanto, inócuas, devido provavelmente, à origem do produto.

Entretanto, ainda se faz necessária a pesquisa com uso da biologia molecular, uma vez que cada vez mais trabalhos comprovam a superioridade da PCR frente aos métodos clássicos

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASBIA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **Index ASBIA 3º Trimestre de 2020**. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2020/11/INDEX-ASBIA-M%C3%8DDIA-3o-Trimestre-2020.pdf>>
Acesso em: 06 dez. 2020.
- ASADPOUR, R.; SALEHI, N.; JAFARI, R. PCR detection of trichomonad species in the semen of bulls. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 14, n. 4, p. 215–220, 2011.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, n. 5, p. 528–550, 2004.
- BERNASCONI, C.; BODMER, M.; DOHERR, M.G.; JANETT, F.; THOMANN, A.; SPYCHER, C.; ITEN, C.; HENTRICH, B.; GOTTSTEIN, B.; MÜLLER, N.; FREY, C.F. *Tritrichomonas foetus*: Prevalence study in naturally mating bulls in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 3–4, p. 289–294, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.029>>.
- BONDURANT, R. H. Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 13, n. 2, p. 345–355, 1997.
- BOTELHO, M. P. A.; HIRSCH, C.; LAGE, A.P.; DA ROCHA, C.M.B.M.; DORNELES, E.M.S.; CARDOSO, P.G.; DA COSTA, G.M.. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* among bulls slaughtered in the state of Minas Gerais, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 5, p. 2039–2048, 2018.
- BRYAN, L. A.; CAMPBELL, J. R.; GAJADHAR, A. A. Effects of temperature on the survival of *Tritrichomonas foetus* in transport , Diamond ' s and InPouch TF media. **Veterinary Record**, v. 144, p. 227–232, 1999.
- CAMPERO, C. M. Use of DMSO for the cryopreservation of *Tritrichomonas foetus* in liquid nitrogen. **Veterinary Parasitology**, v. 31, n. 3–4, p. 339–343, 1989.
- CARDOSO, M V; TEIXEIRA, S.R.; MIYASHIRO, S.; VASCONCELOS, S.A.; GREGORY, L.; GENOVEZ, M. E. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen in natura de touros de monta natural e central de inseminação artificial. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n.

- 1, p. 33–40, 2006.
- CLARK, B. L.; DUFTY, J. H.; PARSONSON, I. M. The effect of *Tritrichomonas foetus* infection on calving rates in beef cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, n. 3, p. 71–74, 1983.
- CLARK, B. L.; WHITE, M. B.; BANFIELD, J. C. Diagnosis of *Trichomonas Foetus* Infection in Bulls. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n. 5, p. 181–183, 1971.
- CLOTHIER, K. A.; MC NABB, B.; TORAIN, A.; REINL, S.; ONDRAK, J. Effects of Biological Materials and Collection Media on PCR Detection of *Tritrichomonas foetus*. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 09, n. 01, p. 121–128, 2019.
- COBO, E. R.; FAVETTO, P.H.; LANE, V.M.; FRIEND, A.; VANHOOSER, K.; MITCHELL, J.; BONDURANT, R.H.. Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. **Theriogenology**, v. 68, n. 6, p. 853–860, 2007.
- CORBEIL, L. B.; CAMPERO, C.M.; VAN HOOSER, K.; BONDURANT, R.H. Detection of trichomonad species in the reproductive tracts of breeding and virgin bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3–4, p. 226–232, 2008.
- DĄBROWSKA, J.; KARAMON, J.; KOCHANOWSKI, M.; SROKA, J.; ZDYBEL, J.; CENCEK, T. *Tritrichomonas foetus* as a causative agent of tritrichomonosis in different animal hosts. **Journal of Veterinary Research (Poland)**, v. 63, n. 4, p. 533–541, 2019.
- DĄBROWSKA, J.; KELLER, I.; KARAMON, J.; KOCHANOWSKI, M.; GOTTSTEIN, B.; CENCEK, T.; FREY, C.F.; MÜLLER, N. Whole genome sequencing of a feline strain of *Tritrichomonas foetus* reveals massive genetic differences to bovine and porcine isolates. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 227–233, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.12.007>>.
- DĄBROWSKA, J.; KARAMON, J.; KOCHANOWSKI, M.; SROKA, J.; SKRZYPEK, K.; ZDYBEL, J.; RÓZYCKI, M.; JABLONSKI, A.; CENCEK, T. *Tritrichomonas Foetus*: A Study of Prevalence in Animal Hosts in Poland. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 203, 10 mar. 2020b. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/9/3/203>>. Acesso em: 3 dez. 2020.
- DE OLIVEIRA, J.M.B.; DA SILVA, G.M.; FILHO, A.F.B.B.; BORGES, J.M.; DE OLIVEIRA, P.R.F.; BRANDESPIM, D.F.; MOTA, R.A.; PINHERO JR., J.W.. Prevalence and risk factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 3, p. 549–555, 2015.

- DIAMOND, L. S. Freeze-preservation of protozoa. **Cryobiology**, v. 1, n. 2, p. 95–102, 1964.
- DIAS, F. E. F.; NUNES, C.M.; CAVALCANTE, T.V.; DE SOUZA, J.F.; BARBOSA, S.M.; DE CASTRO, A.A.P.; MORAES JR., F.J.; OLIVEIRA, C.M.; GARCIA, J.F.. Detecção de *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) no sêmen bovino mediante reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 12, n. 1, p. 11, 15 jan. 2014. Disponível em: <<https://periodicos.pucpr.br/index.php/cienciaanimal/article/view/14722>>.
- DOOSTI, A.; KHAMESIPOUR, F.; NEKOEI, S.; LUTVIKADIC, I. Survey for the presence of *Neospora caninum* in frozen bull's semen samples by PCR assay. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 1, p. 7–12, 2015.
- EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 16, n. 1, p. 215–225, 1997.
- FELLEISEN, R. S. J. Comparative sequence analysis of 5-8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. **Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 111–119, 1997.
- 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**, v. 36, n. 2, p. 513–519, 1998.
- FELLEISEN, R. S. J. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 10, p. 807–816, 1999.
- FILHO, R. B. D. O.; MALTA, K.C.; BORGES, J.M.; DE OLIVEIRA, P.R.F.; FILHO, G.J.S.; NASCIMENTO, G.G.; MOTA, R.A.; JÚNIOR, J.W.P. Prevalence and risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in the state of Paraíba, Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 2, p. 346–353, 2018.
- FRIAS, D.F.R.; SOUZA, V.F.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Pesquisa de agentes causadores da campilobacteriose e tricomonose genital bovina em reprodutores puros de origem do estado de mato grosso do sul. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 37, n. 2, p. 50–53, 2017.
- GARCÍA GUERRA, A.; HILL, J.E.; WALDNER, C.L.; CAMPBELL, J.; HENDRICK, S. Sensitivity of a real-time polymerase chain reaction for *Tritrichomonas foetus* in direct individual and pooled preputial samples. **Theriogenology**, v. 80, n. 9, p. 1097–1103, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.011>>.

- GINTER SUMMARELL, C. C.; HAIRGROVE, T.B.; SCHROEDER, M.E.; CONLEY, R.; BOUNPHENG, M.A. Improvements in *Tritrichomonas foetus* molecular testing. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 4, p. 603–608, 2018.
- GIVENS, M. D. Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. **Animal**, v. 12, n. s1, p. s165–s171, 2018.
- GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 504–507, 2008.
- GRANGER, B. L.; WARWOOD, S.J.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v. 86, n. 9, p. 699–709, 2000.
- HAAPALA, V.; POHJANVIRTA, T.; VÄHÄNIKKILÄ, N.; HALKILAHTI, J.; SIMONEN, H.; PELKONEN, S.; SOVERI, T.; SIMOJOKI, H.; AUTIO, T. Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 216, n. February, p. 60–66, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.005>>.
- HAMMOND, D. M.; BARTLETT, D. E. The Distribution of *Trichomonas foetus* in the Preputial Cavity of Infected Bulls. **American Journal of Veterinary Research**, v. 4, n. 11, p. 270–275, 1943. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0372-5545\(17\)33105-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0372-5545(17)33105-X)>.
- 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**, v. 15, n. 4, p. 390–394, 2003.
- JESUS, V.L.T.; PEREIRA, M. J. S.; ALVES, PEDRO A. M.; FONSECA, A. H.. Fatores intrínsecos do hospedeiro associados à prevalência de tricomonose genital bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 4, p. 159–163, 2004.
- KERR, W. R.; ROBERTSON, M. A study of the antibody response of cattle to *Trichomonas foetus*. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 53, p. 280–297, 1943. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742\(43\)80027-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742(43)80027-8)>.
- LEAL, D.; FERNANDES, G.O.; GOUVEIA, F.F.; MIRANDA, K.L.; NEVES, J.P. Prevalência da campilobacteriose e da tricomonose genitais bovinas no Distrito Federal e em seu entorno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 256–259, 2012.
- LOPES, L. M. S.; SERRA-FREIRE, N.M.; JESUS, V.L.T.; GUIDA, H.G.; ANDRADE, V.L.B.; PEREIRA, E.B.B. Um novo meio de transporte e cultivo para *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). IV: Dias de viabilidade dos parasitos. **Revista Universidade Rural -**

- Série Ciência da Vida**, v. 17, n. 2, p. 1–4, 1995.
- LOPES, L. M. S.; SERRA-FREIRE, N.M.; JESUS, V.L.T.; GUIDA, H.G.; ANDRADE, V.L.B.; PEREIRA, E.B.B. Um novo meio de transporte e cultivo para *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). V. Lactopep como meio de cultivo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 3, n. 1, p. 23–28, 1996.
- MARQUES, L. M.; BUZINHANI, M.; NETO, R.L.; OLIVEIRA, R.C.; YAMAGUTI, M.; GUIMARÃES, A.M.; TIMENETSKY, J. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. **Veterinary Record**, v. 165, n. 19, p. 572–573, 2009.
- MARTINS, N. É.; LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.S.; DA COSTA, G.M.; LIMA, C.G.R.D.; PIRES, P.S.; DE ASSIS, R.A. Viabilidade de *Tritrichomonas foetus* após congelamento com diferentes crioprotetores. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 161–162, 2008.
- MORIN-ADELIN, V.; FRASER, S.T.; STACK, C.; SLAPETA, J. Host origin determines pH tolerance of *Tritrichomonas foetus* isolates from the feline gastrointestinal and bovine urogenital tracts. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 68–77, 2015.
- MUKHUFHI, N.; IRONS, P.C.; MICHEL, A.; PETA, F. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: Effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p. 1269–1278, 2003.
- MUTTO, A. A.; GIAMBIAGGI, S.; ANGEL, S. O. PCR detection of *Tritrichomonas foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3–4, p. 357–361, 2006.
- NARDI JUNIOR, G.; RIBEIRO, M.G.; MEGID, J.; CORTEZ, A.; LISTONI, F.; PAULIN, L. Relação entre Exame Andrológico, Sorologia, Cultivo Microbiológico e PCR do Sêmen na Brucelose Bovina e sua importância ao agronegócio. In: JORNACITEC, June 2015, **Anais...2014**.
- OKAFOR, C. C.; STRICKLAND, L.G.; JONES, B.M.; KANIA, S.; ANDERSON, D.E.; WHITLOCK, B.K. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in tennessee bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 243, n. June, p. 169–175, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.024>>.
- OLIVEIRA, J. M. B.; BATISTA FILHO, A.F.B.; BORGES, J.M.; SOARES, L.B.F.; ORTEGA-MORA, L.M.; BRANDESPIM, D.F.; MOTA, R.A.; PINHEIRO JUNIOR, J.W. *Tritrichomonas foetus* in bulls in the State of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de**

- Medicina Veterinaria**, v. 38, n. 4, p. 449–453, 2016.
- PARKER, S.; CAMPBELL, J.; MCINTOSH, K.; GAJADHAR, A. Diagnosis of trichomoniasis in “virgin” bulls by culture and polymerase chain reaction. **Canadian Veterinary Journal**, v. 44, n. 9, p. 732–734, 2003.
- PARSONSON, I. M.; CLARK, B. L.; DUFTY, J. H. The Pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* Infection in the Bull. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 10, p. 421–423, 1974.
- PARSONSON, I. M.; CLARK, B. L.; DUFTY, J. H. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. **Journal of Comparative Pathology**, v. 86, n. 1, p. 59–66, 1976.
- PELLEGRIN, A. O.; LEITE, R.C.; LAGE, A.P.; RAVAGLIA, E. Coleta de material para diagnóstico das doenças infecciosas que interferem com a reprodução de bovinos. Circular Técnica 45. n. Fig 1, p. 1–3, 2003.
- PHILLIPS, P. E.; MYERS, J. N.; DEWELL, G. A. **Viability of Tritrichomonas foetus Following the Freeze-Thaw Cycle Used for Freezing Bovine Semen** Iowa State University Animal Industry Report. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.iastatedigitalpress.com/air/article/id/6299/>>.
- PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**, v. 149, n. 4, p. 339–369, 1993.
- PIERCE, A. E. The Agglutination Reaction of Bovine Serum in the Diagnosis of Trichomoniasis. **British Veterinary Journal**, v. 105, n. 8, p. 286–294, 1949. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)53285-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1935(17)53285-6)>.
- RAE, D. O.; CREWS, J. E. *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 595–611, 2006.
- SANTOS, C. S.; JESUS, V.L.T.; MCINTOSH, D.; BERTO, B.P.; LOPES, C.W.G. Co-infection by *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in asymptomatic cats. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 980–988, 2015.
- SILVEIRA, C.S.; FRAGA, M.; MONESIGLIO, C.; DELPIAZZO, R.; MACÍAS-RIOSECO, M.; GIANNITTI, F.; RIET-CORREA, F. Detección de *Tritrichomonas foetus* por PCR en esmegma prepucial de toros en Uruguay. **Veterinaria**, v. 56, n. 213, p. 27–34, 2020. Disponível em: <http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092020000101404&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 3 dez. 2020.
- SITES, J. B. C. A. Respiration of Hydrogenosomes of *Tritrichomonas*. v. 253, n. 4, p. 1215–1218, 1978.

- ŠLAPETA, J.; CRAIG, S.; MCDONELL, D.; EMERY, D. *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 209–213, 2010.
- STEINBÜCHEL, A.; MÜLLER, M. Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 57–65, 1986.
- TEDESCO, L. F. ; ERRICO, F.; DEL BAGLIVI, L. P. Diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls using two sampling methods and a transport medium. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, p. 322–324, 1979.
- WALDNER, C.L.; PARKER, S.; GESY, K. N. ; WAUGH, T.; LANIGAN, E.; CAMPBELL, J. R. Application of direct polymerase chain reaction assays for *Campylobacter fetus* subsp. venerealis and *Tritrichomonas foetus* to screen preputial samples from breeding bulls in cow-calf herds i western Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 81, n. 2, p. 91–99, 2017.
- WENRICH, D. H.; EMMERSON, M. A. Studies on the morphology of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller) (protozoa, flagellata) from American cows. **Journal of Morphology**, v. 55, n. 1, p. 193–205, 1933.
- YAO, C.; BARDSLEY, K.D.; LITZMAN, E.A.; HALL, M.L.; DAVIDSON, M.R. *Tritrichomonas foetus* Infection in beef bull populations in Wyoming. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 02, n. 05, 2011.
- YAO, C. Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle? **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART1, p. 1–9, 2013.
- ZANZANI, S. A.; GAZZONIS, A.L.; SCARPA, P.; OLIVIERI, E.; BALZER, H.J.; MANFREDI, M.T. Coinfection with *Tritrichomonas foetus* and *Giardia duodenalis* in two cats with chronic diarrhea. **Case Report in Veterinary Medicine**, v. 2016, 2016.

Anexo A- Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 0081-10-2019



INSTITUTO DE ZOOTECNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IZ/UFRRJ

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“DETECÇÃO DE TRITRICHOMONAS FOETUS EM SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO ATRAVÉS DE ISOLAMENTO E REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE.”**, protocolo nº0081-10-2019, sob a responsabilidade de **Vera Lúcia Teixeira de Jesus e equipe**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) na XLII reunião de 04/12/2019.

Finalidade da Proposta: ensino e pesquisa
Vigência da Proposta: dezembro de 2019 a dezembro de 2020
Área: Ciências Agrárias/ Medicina Veterinária/ Reprodução Animal
Origem: Fazenda UFRRJ - SFRJA
Espécie: Bovina; Sexo: macho; Idade: 3 anos; Peso: 700 kg
Quantidade: 1

Seropédica, 13 de dezembro de 2019

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira
Coordenador da CEUA/IZ/UFRRJ