

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA

MARIA EDUARDA ROCHA JACQUES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Tritrichomonas foetus* EM TOUROS
PROVENIENTES DOS ESTADOS DO MATO GROSSO, MATO GROSSO DO SUL E
RIO GRANDE DO SUL**

Porto Alegre

2021

MARIA EDUARDA ROCHA JACQUES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Tritrichomonas foetus* EM TOUROS
PROVENIENTES DOS ESTADOS DO MATO GROSSO, MATO GROSSO DO SUL E
RIO GRANDE DO SUL**

Trabalho de Conclusão apresentado à Comissão de Graduação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Franciele Maboni Siqueira

Porto Alegre

2021

MARIA EDUARDA ROCHA JACQUES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Tritrichomonas foetus* EM TOUROS
PROVENIENTES DOS ESTADOS DO MATO GROSSO, MATO GROSSO DO SUL E
RIO GRANDE DO SUL**

Trabalho de Conclusão apresentado à Comissão de Graduação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Franciele Maboni Siqueira

Aprovado em: Porto Alegre, 12 de maio 2021

Banca examinadora

Prof^ª. Dra. Franciele Maboni Siqueira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ma. Silvia de Carli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Ângela Junges
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente à minha mãe Liane por sempre me apoiar e acreditar nos meus sonhos.

Ao meu namorado Felipe, pelo companheirismo, e por todo amor e carinho. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos que precisei.

Aos amigos que fiz durante a Faculdade, por proporcionarem momentos únicos, muitas risadas e por tornarem essa trajetória mais leve, especialmente à Meyre, Rejane e Giovanni. Levo vocês junto comigo para a vida toda.

À Professora Doutora Verônica Schmidt, pela primeira oportunidade e contato com a microbiologia.

À Professora Doutora Franciele Maboni Siqueira, pelo incentivo, conhecimento e dedicação. Muito obrigada pela oportunidade de fazer parte do LaBacVet, foi um privilégio tê-la como orientadora.

À equipe do LaBacVet, pelo acolhimento, crescimento e por todo aprendizado que adquiri com vocês.

E a todas as pessoas que de alguma forma somaram para a minha formação.

RESUMO

Tritrichomonas foetus é um protozoário flagelado causador da Tricomonose Genital Bovina, cujo habitat é o trato genital de bovinos. A Tricomonose é uma doença sexualmente transmissível e infecciosa, que acomete tanto os machos quanto as fêmeas. O macho é o portador assintomático, ou seja, não apresenta nenhuma manifestação clínica da doença. Por isso, o diagnóstico laboratorial é fundamental para um controle adequado e seguro da doença. Esta infecção possui grande importância econômica em decorrência aos problemas reprodutivos caracterizados pelas repetições de cio, elevada incidência de abortos e aumento do intervalo entre partos. O estudo tem como objetivo investigar a ocorrência de *T. foetus* em muco prepucial de touros provenientes de propriedades localizadas nos estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. O DNA genômico de 280 mucos prepuciais foram obtidos a partir de extração com kit comercial. A técnica utilizada para a identificação molecular foi a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. As reações de amplificação do material genômico de *T. foetus*, foram realizadas com um par de *primers* específicos para a espécie, que amplificam um fragmento de DNA de 347pb. Entre os 280 animais analisados, um animal foi positivo para a presença de *T. foetus* (0,36%). Levando em conta a baixa prevalência de *T. foetus* relatada em diversos países, os resultados obtidos indicam que também nas regiões estudadas do Brasil a prevalência da doença parece ser baixa.

Palavras-chave: *Tritrichomonas foetus*, PCR, tricomonose genital bovina, problemas reprodutivos

ABSTRACT

Tritrichomonas foetus is a flagellated protozoan that causes Bovine Genital Trichomonosis, whose habitat is the genital tract of cattle. Trichomonosis is a sexually transmitted and infectious disease, which affects both males and female. The male is the asymptomatic carrier, that is, he does not present any clinical manifestation of the disease. Therefore, laboratory diagnosis is essential for adequate and safe control of the disease. This infection has great economic importance due to reproductive problems characterized by repetitions of heat, high incidence of abortions and increased interval between deliveries. The study aims to investigate the occurrence of *T. foetus* in preputial bovine mucus from properties in the states of Rio Grande do Sul, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul. The genomic DNA of 280 preputial mucus was obtained from extraction with commercial kit. The technique used for the molecular identification was conventional polymerase chain reaction (PCR). The amplification reactions of the genomic material of *T. foetus* were carried out with a pair of primers specific to a species, which amplify a 347bp DNA fragment. Among the 280 analyzed animals, one animal was positive for the presence of *T. foetus* (0,36%). Taking into account the low prevalence of *T. foetus* reported in several countries, the results obtained indicate that the prevalence of the disease also appears to be low in the studied regions of Brazil.

Keywords: *Tritrichomonas foetus*, PCR, bovine genital trichomonosis, reproductive problems

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Mapa das notificações de Tricomonose Genital Bovina realizadas a OIE 12
- Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1% de produtos de PCR convencional para detecção de *T. foetus*. Amostras sem amplificação – negativas para *T. foetus* (colunas 1-13); Controle positivo (coluna 14); Controle negativo (coluna 15). A seta indica um fragmento de 347pb 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número total de propriedades de cada um dos estados brasileiros estudados 17

Tabela 2- Resultados dos ensaios de PCR convencional a partir das amostras de muco
prepuccial de touros..... 17

LISTA DE ABREVIATURAS

BLASTn	-	<i>Basic Local Alignment Search Tool Nucleotideo</i>
CGB	-	Campilobacteriose Genital Bovina
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleicacid</i>)
dNTPs	-	Desoxinucleotídeos trifosfato
NCBI	-	<i>National Center for Biotechnology Information/EUA</i>
pb	-	Pares de bases
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
Taq	-	<i>Thermus aquaticus</i>
TGB	-	Tricomonose Genital Bovina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	-	Graus
μl	-	Microlitros
U	-	Unidade
mM	-	Milimolar
mm	-	Milímetro
MgCl ₂	-	Cloreto de magnésio
ng	-	Nanograma
pmol	-	Picomol
%	-	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
	<i>Tritrichomonas foetus</i>	12
	Tricomonose genital bovina	12
	Diagnóstico da Tricomonose genital bovina.....	13
	Controle da Tricomonose genital bovina	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
	Obtenção das amostras	15
	Reação de PCR para identificação de <i>Tritrichomonas foetus</i>	15
	Análise do controle positivo	16
4	RESULTADOS	17
5	DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÃO.....	21
	REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

As doenças reprodutivas em bovinos possuem grande importância econômica devido aos prejuízos que trazem ao setor produtivo, caracterizados pelas repetições de cio, elevada incidência de abortos, endometrites e outras patologias do sistema genital bovino (LOPES *et al.* 1996). Com um menor número de nascimentos e o maior intervalo entre partos, eleva-se os custos de produção, com maior uso de sêmen, queda na produção de bezerros e produção de leite (GOODGER & SKIRROW, 1986; JUNQUEIRA & ALFIERI, 2006).

A Tricomonose Genital Bovina (TGB) e a Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) são doenças sexualmente transmissíveis e infecciosas, causadas pelo protozoário flagelado denominado *Tritrichomonas foetus* e pela bactéria *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, respectivamente. As características clínicas são similares em ambas as doenças, o que permite formular estratégias de controle de infecção a serem discutidas juntamente (ALVES *et al.* 2011). A principal manifestação clínica são as repetições de cio nas fêmeas (STOESSEL, 1982; BONDURANT, 2005). O macho é o portador assintomático, ou seja, não apresenta nenhuma manifestação clínica. Além disso, não adquirem imunidade natural (STOESSEL, 1982; PELLEGRIN *et al.* 2003) e são considerados os responsáveis pela disseminação dos agentes infecciosos (PELLEGRIN *et al.* 1998; JESUS *et al.* 2004). Com isso, a identificação dos touros infectados é fundamental para um controle adequado e seguro da doença nos rebanhos.

Existem diferentes métodos para identificação de *T. foetus*, o exame direto é realizado através da microscopia óptica com a observação de trofozoítos, porém o tempo necessário para a cultura do parasito e análise, bem como a baixa sensibilidade são considerados uma desvantagem. Por outro lado, a reação em cadeia da polimerase (PCR) mostra-se altamente eficiente para o diagnóstico devido ao aumento na sensibilidade de detecção, sendo capaz de detectar a presença de um único organismo. De acordo com Yao (2013) o teste de PCR se mostrou mais eficiente do que a técnica de exame direto para identificação de *T. foetus*. A partir desse método é possível o processamento de inúmeras amostras em apenas uma reação, possibilitando um resultado rápido (CHEN & LI, 2001; OIE, 2012).

A TGB tem distribuição mundial, tendo seus primeiros relatos no Brasil ocorrendo no Rio Grande do Sul em 1947 por Roehe (1948). Segundo Alves *et al.* (2011) e Oliveira *et al.* (2015) a prevalência de *T. foetus* em animais varia de 0 a 33,4% no Brasil. Regiões que

utilizam montas naturais como manejo reprodutivo possuem uma alta prevalência da TGB (LAGE, 2001; BONDURANT, 2005; RAE & CREWS, 2006).

No Brasil, existem poucos relatos desta infecção e estudos relacionados (JESUS *et al.* 2004; SILVA *et al.* 2009; LEAL *et al.* 2012). Para Alves *et al.* (2011) a ausência de diagnóstico em conjunto com os problemas no envio de amostras, análise laboratorial das amostras clínicas e o pequeno número de laboratórios com capacidade técnica para a realização do diagnóstico da TGB, fazem com que a situação permaneça desconhecida para a maioria dos técnicos e proprietários. Desse modo, o presente trabalho propõe um levantamento da ocorrência e *T. foetus* nos estados brasileiros que representam os principais produtores de bovinos do país.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

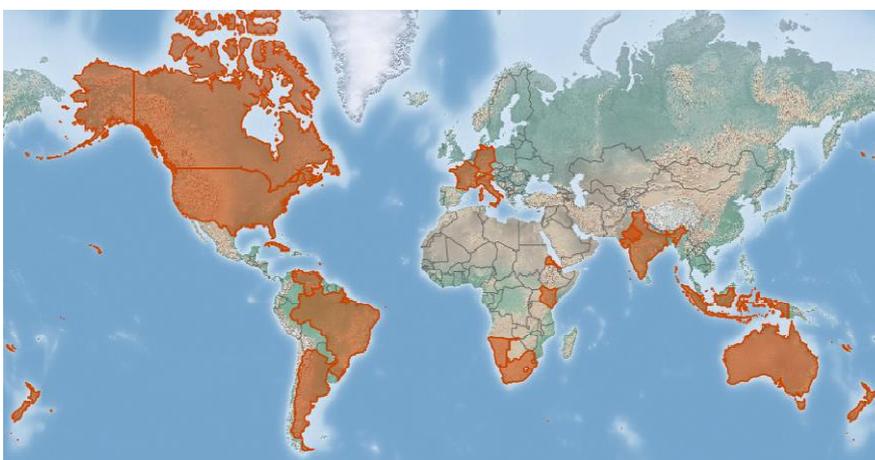
Tritrichomonas foetus

Tritrichomonas foetus é um protozoário piriforme, unicelular e ativamente móvel. Pertence ao filo Sarcomastigophora, classe Zoogomastigophorea, ordem Trichomonadida, família Trichomonadidae e gênero *Tritrichomonas* (LEVINE, 1985). Quanto a sua morfologia, apresenta aproximadamente 10-25mm de comprimento e 3-15mm de largura, possui quatro flagelos, dos quais três são localizados anteriormente, enquanto o quarto flagelo posteriormente (HAYES *et al.* 2003). A membrana ondulante, ao longo do corpo, é considerada uma característica importante para a diferenciação de *T. foetus* (ERA & CREWS, 2006). Possui estágio de trofozoíta e reprodução assexuada por fissão binária, sendo a reprodução sexual desconhecida (OIE, 2019).

Tricomonose genital bovina (TGB)

Estabelecida pela Organização Mundial da Saúde Animal, a TGB faz parte da lista de doenças notificáveis, a fim de manter os índices de incidência da doença ao redor do mundo atualizados (OIE, 2021). Apesar de a TGB possuir uma baixa prevalência e incidência, ela está disseminada em todo o mundo (Figura 1).

Figura 1. Mapa das notificações de Tricomonose Genital Bovina realizadas a OIE.



CABI, 2021. bovine venereal trichomonosis. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc>

● CABI Summary Data

É uma doença sexualmente transmissível e infecciosa, causada pelo protozoário *T. foetus*. Os bovinos são os hospedeiros naturais, tanto os machos quanto as fêmeas. As manifestações clínicas são caracterizadas pela repetição do cio em intervalos aumentados e irregulares, endometrite e aborto precoce. As fêmeas geralmente eliminam a infecção depois de três a seis ciclos (STOESSEL, 1982; FELLEISEN, 1999; BONDURANT, 2005).

Por outro lado, os machos são clinicamente assintomáticos. Touros mais velhos são considerados o principal reservatório da doença durante toda vida reprodutiva (WALKER *et al.* 2003; YAO, 2013; OIE, 2018). A transmissão ocorre do touro infectado para fêmea durante a cópula ou vice-versa, através da monta natural (ALVES *et al.* 2011). O contágio também pode ocorrer por meio da inseminação artificial ou exame ginecológico (RIET-CORREA *et al.* 2007; OIE, 2018).

Diagnóstico da Tricomonose genital bovina

Para o diagnóstico correto da TGB, devem ser observados os sinais clínicos, o desempenho reprodutivo do rebanho e o histórico dos animais. A identificação e isolamento do protozoário *T. foetus* pode ser realizado a partir de amostras do lavado prepucial ou esmegma prepucial de touros. Nas fêmeas, amostras de muco vaginal ou fetos abortados (ALVES *et al.* 2011). O diagnóstico através do exame direto permite observar a movimentação característica dos trofozoítos vivos de *T. foetus* (BONDURANT, 1997), porém, sua visualização pode ser dificultada devido à existência de outros protozoários semelhantes. A identificação por métodos moleculares tem sido usada com sucesso, sendo que a reação de PCR traz vantagens, como o aumento da sensibilidade, diagnóstico mais rápido, permitindo detecção mesmo se o parasito não estiver mais viável (OIE, 2019).

Controle da Tricomonose genital bovina

O controle da TGB é realizado por um conjunto de medidas, os animais utilizados na reprodução devem ser testados regularmente para a presença de *T. foetus*. O manejo dos animais positivos baseia-se na retirada desses animais da reprodução, para que haja a eliminação do protozoário da propriedade. Deve-se evitar a utilização de touros de repasse e os sistemas de monta natural. A inseminação artificial é uma medida segura, desde que o

sêmen seja de qualidade e a sua procedência seja de touros confiáveis (BONDURANT, 2005; ALVES *et al.* 2011).

Embora existam estudos isolados de vacinas experimentais, a proteção apresenta níveis baixos de eficácia, estimulada em 45% de proteção (KVASNICKA, 1992; BONDURANT, 2005). Apesar da existência dos estudos de vacinas experimentais, ainda não há vacinas disponibilizadas no mercado nacional para promover proteção e reduzir a propagação da doença (SINDAN, 2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Neste estudo, foram analisados muco prepucial de touros, previamente coletados por médicos veterinários e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBacVet) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras eram remetidas ao LaBacVet para diagnóstico de agentes infecciosos causadores de problemas reprodutivos bovinos. No período de janeiro/2019 a dezembro/2020 foram recebidas 280 amostras de touros, sendo 267 amostras provenientes do estado do Rio Grande do Sul, três amostras do estado de Mato Grosso e 10 amostras do Mato Grosso do Sul. O DNA genômico dos mucos foi previamente extraído com o emprego do kit comercial (Biopur Mini Spin Plus, Biometrix, Curitiba, Brasil) e armazenado a -20°C até o momento do uso.

Reação de PCR para identificação de *Trichomonas foetus*

Para identificação de *T. foetus*, os DNAs foram submetidos à reação de PCR convencional com o par de *primers* nomeados TRF3 (5' CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC 3') e TRF4 (5' CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA 3'), específicos para o gene ribossomal 5.8S e as regiões interespaçadoras transcritas ITS-1 e ITS-2 de trichomonadídeos (Felleisen *et al.* 1998), cujo fragmento de DNA corresponde a 347pb. Como controle positivo, DNA de *T. foetus* isolado de campo foi empregado.

Cada reação foi composta por um volume final de 12µl contendo 5U de Taq DNA polimerase (Quatro G, Porto Alegre, Brasil), 10x tampão de reação, 50mM de MgCl₂, 10 pmol de cada primer, 1mM desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) e 30ng de DNA.

Os ciclos de amplificação foram conduzidos sob as seguintes condições: desnaturação inicial de 05 minutos a 94°C, seguidos por 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, e 72 °C por 90 segundos, e uma etapa de extensão adicional 72 °C por 05 minutos, descritas por Felleisen *et al.* (1998). Todas as reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, MiniAmp Thermal Cycler, Waltham, EUA). Os amplicons foram

visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Sybr Green para a visualização dos ácidos nucleicos em um transiluminador com iluminação ultravioleta. A voltagem aplicada para corrida de eletroforese foi de 100 V, e o tempo variou de 20 a 30 minutos.

Análise do controle positivo

O DNA do controle positivo utilizado nas reações de PCR foi amplificado de acordo com as condições citadas anteriormente. Em seguida, purificado com o kit comercial (PureLink, Invitrogen, Carlsbad, EUA). A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Waltham, EUA), conforme instruções do fabricante. Após, o amplicon foi enviado para o sequenciamento de Sanger e as sequências recebidas foram analisadas usando o software Geneiousv10.2.3 (Biomatters Ltd., Auckland, Nova Zelândia).

4 RESULTADOS

Amostras de muco prepucial de touros provenientes de fazendas com relatos de problemas reprodutivos, especificamente, infertilidade das fêmeas, foram recebidas no LaBacVet, de modo aleatório. As amostras recebidas foram previamente coletadas por médicos veterinários, e todas as amostras de touros recebidas dentro do período de janeiro/2019 a dezembro/2020 foram incluídas neste estudo. Ao todo, muco prepucial de 280 touros foram estudados. Os animais foram provenientes de três estados brasileiros: Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. A Tabela 1 apresenta o número total de propriedades avaliadas em cada um dos estados estudados.

Tabela 1. Número total de propriedades avaliadas em cada um dos estados brasileiros estudados.

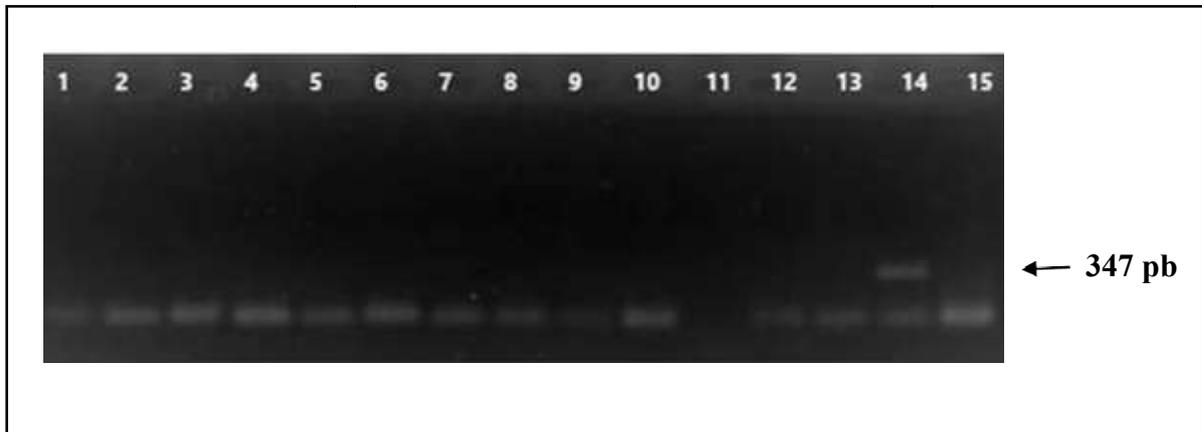
Estado	Número de Propriedades
Rio Grande do Sul	18
Mato Grosso	1
Mato Grosso do Sul	2

A reação de PCR foi aplicada à 280 DNAs de muco prepucial dos touros. Dentre todos os animais analisados, um foi positivo para *T. foetus* (0,36%), sendo esse animal pertencente a uma propriedade localizada no estado do Rio Grande do Sul (Tabela 2). O restante das amostras foram negativas para a identificação de *T. foetus*. A Figura 2 apresenta uma imagem ilustrativa de um gel de agarose 1% com resultado de uma das reações de PCR realizadas.

Tabela 2. Resultados dos ensaios de PCR convencional a partir das amostras de muco prepucial de touros.

Resultado da PCR	Estados		
	Rio Grande do Sul	Mato Grosso	Mato Grosso do Sul
Positivos	1	0	0
Negativos	266	3	10
Total de amostras	267	3	10

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1% de produtos de PCR convencional para detecção de *T. foetus*. Amostras sem amplificação – negativas para *T. foetus* (colunas 1-13); Controle positivo (coluna 14); Controle negativo (coluna 15). A seta indica um fragmento de 347pb.



Fonte: arquivo pessoal.

O amplicon gerado a partir do isolado de *T. foetus* empregado como controle positivo das reações de PCR foi sequenciado. O resultado do sequenciamento foi alinhado e montado, e após, comparado com o auxílio da ferramenta BLASTn, no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information/EUA*), apresentando 99% de similaridade com *T. foetus*. A sequência parcial sequenciada e analisada foi depositada no banco de dados Genbank do NCBI, sob número de acesso MW726033.

5 DISCUSSÃO

A Tricomonose Genital Bovina (TGB) tem sido relatada em diversos países. No Brasil, ainda há poucos relatos e estudos relacionados a essa infecção (GOMES *et al.* 1991; JESUS *et al.* 2004; SILVA *et al.* 2009; LEAL *et al.* 2012).

Os resultados obtidos nesse trabalho, 0,36% (1/280) dos animais infectados, estão abaixo dos relatos por Gomes *et al.* (1991) que observaram, a prevalência média anual de 1,88% (43/2286), no estado do Rio Grande do Sul entre o período de 1972 a 1987. Vale destacar, porém, que o estudo supracitado foi realizado por microscopia direta, o qual diferentemente dos ensaios moleculares, pode gerar resultados falso-positivos, com identificação de *Trichomonas* saprófitas, devido à dificuldade de interpretação, sendo, o exame direto, descrito como menos específico para identificação de *T. foetus*.

No estado da Paraíba, a prevalência de infecção por *T. foetus* usando ensaio de PCR foi de 3,7% (FILHO *et al.* 2018). Em Pernambuco, a prevalência relatada foi de 33,4% em amostras positivas com base na reação de PCR (OLIVEIRA *et al.* 2015). No entanto, na região do Médio Paraíba, pesquisadores utilizaram a técnica de exame direto a partir do lavado prepucial para identificação de *T. foetus*, e não foram detectadas amostras positivas (ROCHA *et al.* 2009). Da mesma forma, Leal *et al.* (2012) no Distrito Federal não isolaram *T. foetus* nas amostras por eles testadas através de exame direto.

Botelho *et al.* (2018) pesquisaram a prevalência de *T. foetus* no estado de Minas Gerais, e mostraram que os testes moleculares identificaram 8% dos animais positivos para *T. foetus*, enquanto o exame direto realizado para as mesmas amostras falhou para detecção do protozoário. Também, Jesus *et al.* (2004), relataram em um estudo realizado em propriedades rurais localizadas no Estado do Rio de Janeiro, que a prevalência de *T. foetus* encontrada foi de 1,6%. Além disso, os mesmos autores realizaram uma análise por sexo, onde nos machos a prevalência foi 14 vezes maior do que em fêmeas (JESUS *et al.* 2004).

Estudos com rebanhos bovinos demonstraram uma oscilação na frequência de *T. foetus* de 0 a 14,4% em animais americanos (RODNING *et al.* 2008; OKAFOR *et al.* 2017; COKER *et al.* 2018; MOLINA *et al.* 2018). No continente europeu a ocorrência variou de 0 a 32% (MENDOZA-IBERRA *et al.* 2012; BERNASCONI *et al.* 2014). Pesquisas recentes da Espanha relataram a reemergência da tricomonose em touros variando de 12,7 a 32% (MENDOZA-IBERRA *et al.* 2012; COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.* 2019).

Destacamos novamente que a grande variação de resultados encontrados entre os estudos com *T. foetus* pode estar relacionada as diferenças de metodologias empregadas. Apesar de algumas técnicas apresentarem resultados diferentes, deve-se considerar, também na interpretação dos resultados, importante todo o processo, desde a coleta, transporte do material, tipo da amostra a ser analisada e por fim o método utilizado para identificação do parasita. Neste sentido os métodos moleculares de identificação de *T. foetus* ganham destaque por proporcionarem alta especificidade e sensibilidade. Além do mais, não há necessidade de manutenção do organismo viável para a obtenção dos resultados, o que facilita o transporte das amostras suspeitas.

Ainda, outra diferença entre o presente estudo e os anteriormente publicados e citados que deve ser levada em conta é o número de animais testados. No nosso estudo analisamos o número amostral bem acima da média anteriormente publicada.

Finalmente, outros agentes envolvidos em falhas reprodutivas de bovinos, especialmente a infertilidade, podem ser os causadores das desordens descritas pelos produtores e veterinários que encaminharam as amostras dos animais suspeitos. Bactérias como *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma bovis* são comumente relacionadas à quadros similares, sendo, assim como *T. foetus* carregadas pelos touros de modo crônico e assintomático (BONDURANT, 2005; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS *et al.* 2013; AZEVEDO *et al.* 2017; PARKER *et al.* 2018).

Portanto, o diagnóstico diferencial das bactérias citadas e *T. foetus* é essencial para a correta e precisa identificação dos agentes causais de perdas reprodutivas em bovinos. No caso dos animais testados neste presente estudo, paralelamente *C. fetus* subsp. *venerealis*, *M. bovis*, *U. diversum* e *M. bovis* foram também pesquisados.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu observar a ocorrência de *T. foetus* no estado do Rio Grande do Sul. Nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul não foram detectados animais positivos, deve-se levar em conta o número de animais analisados nos estados serem significativamente menor comparado ao estado do Rio Grande do Sul. Em resumo, a prevalência de TGB parece ser baixa nos estados brasileiros estudados.

Ainda assim, destaca-se a importância da prevenção e manejo do rebanho com problemas reprodutivos, sendo que o diagnóstico laboratorial tem papel fundamental para o controle da doença. Além disso, é imprescindível que haja maiores estudos sobre a prevalência do protozoário nos estados brasileiros.

REFERÊNCIAS

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

AZEVEDO, J. B. et al. **Presence of *Ureaplasma diversum* in the genital tracts of female dairy cattle in Mato Grosso State, Brazil.** Tropical Animal Health and Production, v. 49, p.311–316, 2017.

BERNASCONI, C. et al. ***Tritrichomonas foetus*: Prevalence study in naturally mating bulls in Switzerland.** Veterinary Parasitology, v. 200, p. 289–294, 2014.

BONDURANT, R. H. **Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle.** Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v. 13, n. 2, p.345-361, 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, v. 21, n. 2, p. 383-408, 2005.

BOTELHO, M. P. A. et al. **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.

CABI, 2021. **Bovine Venereal Trichomonosis. Distribution Maps.** Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/91749#toDistributionMaps>> Acesso em: de jun. 2021.

CHEN, X. G; LI, J. **Increasing the sensitivity of PCR detection in bovine preputial smegma piked with *Tritrichomonas foetus* by the addition of agarandresin.** Parasitology Research, v. 87, n. 7, p. 556–558, 2001.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. et al. **Prevalence of bovine trichomonosis and associated risk factors in bulls from Spanish beef herds.** Theriogenology, v. 128, p. 116-121, 2019

COKER, K. E. et al. Freedom from *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in St. Kitts. *Tropical Animal Health and Production*, v. 50, p. 1171–1173, 2018.

D'ÁPICE, M. Ocorrência do aborto no Estado de São Paulo devido ao *Vibrio fetus*. *Biológico*, v. 22, p. 15-18, 1956.

FELLEISEN, R. S. et al. Detecção de *Tritrichomonas foetus* por imunoenensaio de PCR e enzima de DNA com base nas sequências de unidades de gene de rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 513-519, 1998.

FELLEISEN, R. S. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes and Infection*, v. 1, n. 10, p. 807-816, 1999.

FILHO, R. B. O. et al. Prevalence and risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in the state of Paraíba, Brazil. *Acta Parasitologica*, v. 63, p. 346–353, 2018.

GOMES, M. J. P. et al. Identificação de *Tritrichomonas foetus* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Arquivo Faculdade Veterinaria UFRGS, Porto Alegre*, v.19, p.103-111, 1991

GOODGER, W.J; SKIRROW, S.Z. Epidemiologic and economic analysis of an unusually long epizootic of trichomoniasis in a large California dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 189, p. 772-776, 1986.

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. 390-4, 2003.

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

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

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

LAGE, A. P. **Epidemiologia e controle da campilobacteriose genital bovina**. Simpósio Pfizer sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos, São Paulo, p. 17-25, 2001.

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

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

LOPES, L.M.S. et al. **Um novo meio de transporte e cultivo para (Riedmuller, 1928). *V. Lactopep* como meio de cultivo**. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 3, n. 1, p. 23-28, 1996.

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

MOLINA, L. L. et al. **A retrospective epidemiological analysis of shared risk factors for 337 bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina)**. Preventive Veterinary Medicine, v. 161, p. 109–114, 2018.

OKAFOR, C. C. et al. **Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in tennessee bulls**. Veterinary Parasitology, v. 243, p. 169-175, 2017.

OLIVEIRA, J. M. B. et al. **Prevalence and risk factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil**. Tropical Animal Health Production, v. 47, n. 3, p. 549-555, 2015.

PARKER, A. M. et al. **A review of mycoplasma diagnostics in cattle**. Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 32, p. 1241–1252, 2018.

PELLEGRIN, A. O. et al. **Campilobacteriose Genital Bovina em touros do Mato Grosso do Sul**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.22, n. 1, p.43-47, 1998.

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

RAE, D. O; CREWS, J.E. ***Tritrichomonas foetus***. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v. 22, n. 3, p. 595-611, 2006.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e equídeos**. v.1. 3 ed. São Paulo: Varela, p. 722, 2007.

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, vol.39, n.5, p.1587-1590, 2009.

RODNING, S. P. et al. **Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in several subpopulations of Alabama beef bulls**. Theriogenology, v. 69, n. 2, p. 212-217, 2008.

ROEHE, R. **Tricomoníase bovina**. Boletim de Produção Animal, v. 4, n. 6, p. 21- 26, 1948.

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

SINDAN. **Compêndio de Produtos Veterinários, 2021**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Disponível em:
<<https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/pesquisar.aspx>> Acesso em: 31 mar. 2021

STOESSEL, F. **Las enfermedades venéreas: Trichomoniasis y vibriosis genital**. Zaragoza: Acribia, p. 163, 1982.

VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L. et al. **Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay**. Journal of Microbiological Methods, v. 95, n. 1, p. 93-97, 2013.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **OIE-Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012**. 7.ed, Disponível em: <<https://www.oie.int/doc/ged/d12009.pdf>>. Acesso em 31 mar. 2021.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Trichomonosis: Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019**. Chap. 3.4.15., v. I, p. 1210-1221. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.15_TRICHOMONOSIS.pdf>. Acesso em 31 mar. 2021.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2021**. Disponível em: <<https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2021/>>. Acesso em 31 mar. 2021.

YAO, C. **Diagnosis of *Tritrichomonas foetus*-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle?** Journal of medical microbiology, USA, v. 62, n. 1, p. 1–9, 2013.