

**DIOGO FRANCISCO GUILHERME DE  
MEIRELES**

**TRITRICHOMONOSE BOVINA EM  
PORTUGAL**

Orientador: Professor Doutor Helder Cortes

Co-orientador: Professor Doutor Carlos Bettencourt

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2017**

**DIOGO FRANCISCO GUILHERME DE  
MEIRELES**

**TRITRICHOMONOSE BOVINA EM  
PORTUGAL**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 30 de Novembro de 2017 com o Despacho nº 413/2017 com a seguinte composição de Júri:

Presidente: Professora Doutora Margarida Alves

Arguente: Professor Doutor Cannas da Silva

Orientador: Professor Doutor Helder Cortes

Co-orientador: Professor Doutor Carlos Bettencourt

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2017**

*Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias pelos conteúdos nele apresentados.*

*...Eu já vi nascer o Sol no  
cabeço de Monsanto, enganei-  
me era a Lua! O Sol não  
madruga tanto...*

*Ti Maria d`Almeida,*

*Beira Baixa*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os Professores do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, ao Departamento de Medicina Veterinária, representado pela Sr.<sup>a</sup> Professora Doutora Laurentina Pedroso, pelo contributo à minha formação.

Agradeço, à Universidade de Évora, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro, em especial ao Sr. Professor Doutor Helder Cortes, pela sua disponibilidade e ajuda preciosa no meu trabalho de fim de Curso e à Sr.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria João, pelo profissionalismo e amabilidade, demonstrados.

À Sr.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Feliciano, como Professora e pela prontidão em me receber na sua Clínica como estagiário.

Ao Sr. Professor Doutor Carlos Bettencourt, como Professor e pela disponibilidade em me ajudar nesta fase final da conclusão do meu trabalho.

Ao Sr. Dr. Luis Pissarra, pela sua experiência e incentivo.

Ao Sr. Rui e toda equipa da Sociedade Veterinária de Coruche.

Ao Sr. Professor Doutor José Pedro Canas Simões, pela sua amizade e entusiasmo que me incutiu pela clínica de Espécies Pecuárias.

Ao Sr. Dr. Miguel Matos, pela sua disponibilidade de ajuda e colaboração

Ao Sr. Dr. Álvaro Lopes; Sr. Dr. António Manteigas e Sr. Dr. Fernando Monteiro pela sua amizade, disponibilidade e incentivo.

A todos os amigos e colegas de Curso.

À minha Família. Aos que já partiram e aos que me acompanham ainda, Avós e Pais, por todos os ensinamentos de vida, em especial à força da minha Mãe!

## RESUMO

A tritrichomonose bovina, doença venérea de declaração obrigatória, causada pelo parasita *Tritrichomonas foetus* é responsável por falhas reprodutivas e infertilidade nos rebanhos. Sendo o touro assintomático o principal agente de transmissão do protozoário, deverão ser pesquisados agentes venéros infecciosos na realização do exame andrológico. Nas vacas caracteriza-se por aumento do intervalo entre partos, repetição de cios irregulares, aborto e piómetra. Com elevada prevalência mundial e forte impacto negativo na rentabilidade das explorações de bovinos de carne, onde é usual a cobrição natural. Em Portugal, não existindo dados relativos a surtos, está notificada a presença da patologia, sendo que recentemente no Norte de Espanha, foram diagnosticados animais positivos. Este trabalho, teve como objectivo a pesquisa de *T. foetus* em touros, obtendo-se amostras por lavagem e raspagem prepucial, seguido de diagnóstico direto com cultivo e diagnóstico molecular, com amplificação de DNA por PCR. Dos 104 touros provenientes de 12 explorações extensivas do Alentejo, todos foram negativos. Apesar dos resultados obtidos, a tritrichomonose bovina poderá estar subdiagnosticada em Portugal, sendo um factor decisivo para o sucesso da prevenção, controlo e erradicação, a relação entre o Laboratório, o Médico Veterinário e o Criador.

Palavras-chave: *Tritrichomonas foetus*, Diagnóstico, Bovinos de Carne, Portugal

## ABSTRACT

Bovine tritrichomoniasis, venereal pathology of obligatory declaration, caused by the parasite *Tritrichomonas foetus* is responsible for the causing numerous reproductive failures and infertility in the herds. As the asymptomatic bull is the main agent of transmission of the protozoan, infectious venereal agents should be investigated in the accomplishment of the andrological examination. In cows it is characterized by increased interval between births, irregular repetition of oestrus, abortion and pyometra. With high global prevalence and strong negative impact on the profitability of beef cattle farms where natural breeding is usual. In Portugal, in the absence of data on outbreaks, the presence of the disease has been reported, and recently in the north of Spain, positive animals were diagnosed. The objective of this study was to study *T. foetus* in bulls, obtaining samples by washing and preputial scraping, followed by direct diagnosis with culture and molecular diagnosis with DNA amplification, PCR. Of the 104 bulls coming from 12 extensive farms in the Alentejo, all were negative. Despite the results obtained, bovine tritrichomoniasis may be under diagnosed in Portugal, being a decisive factor for the success of prevention, control and eradication, the relationship between the Laboratory, Veterinarian and Breeder.

Key words: *Tritrichomonas foetus*, Diagnosis, Beef Cattle, Portugal



## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

- ´ - Minuto
- `` - Segundos
- BVD- Diarreia viral bovina, do inglês (Bovine Viral Diarrhoea)
- CEE- Comunidade Económica Europeia
- d`NTP- Desoxirribonucleotído fosfatado
- ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês (Enzyme linked Immunosorbent Assay)
- Fig.- Figura
- IA- Inseminação artificial
- Ig- Imunoglobulina
- IBR- Rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, do inglês (Infectious Bovine Rhinotracheitis)
- IEP- Intervalo entre partos
- OIE- Organização Internacional de Epizootias
- pb - Par de bases
- PBS- Tampão fosfato salino, do inglês (Phosphate buffered saline)
- PCR- Reação em cadeia da polimerase, do inglês (Polymerase chain reaction)
- pH- Potencial de hidrogénio
- RNAr- Ácido ribonucleico ribossomal
- rpm - Rotações por minuto
- TB- Tritrichomonose Bovina
- UI- Unidades internacionais

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	8
ÍNDICE GERAL.....	9
Índice de Figuras.....	12
Índice de Gráficos.....	13
Índice de Tabelas.....	14
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Breve descrição do Estágio Curricular.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Sector Pecuário em Portugal - Enquadramento histórico.....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Caracterização dos sistemas de produção de bovinos de carne em Portugal.....	20
<b>2.2 Infertilidade na Vaca – Doenças Infeciosas de transmissão venérea.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Exame andrológico no Touro.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Aborto por protozoários na Vaca.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Tritrichomonose Bovina.....</b>	<b>24</b>
2.5.1 Etiologia.....	24

2.5.2	Ciclo de Vida.....	27
2.5.3	Epidemiologia.....	29
2.5.3.1	Factores de risco.....	32
2.5.4	Patogenia e Imunidade.....	33
2.5.4.1	Patogenia no touro.....	33
2.5.4.2	Patogenia na vaca.....	34
2.5.5	Sinais Clínicos.....	35
2.5.6	Imunoprofilaxia.....	37
2.5.7	Tratamento.....	38
2.5.8	Impacto económico.....	39
2.5.9	Diagnóstico clínico.....	40
2.5.9.1	Técnicas de recolha de amostras.....	40
2.5.9.1.1	No touro.....	41
2.5.9.1.2	Na vaca.....	43
2.5.9.2	Diagnóstico Laboratorial.....	43
2.5.9.2.1	Exame direto.....	43
2.5.9.2.2	Cultura "In vitro".....	44
2.5.9.2.3	Diagnóstico por PCR.....	46
2.5.9.2.4	Diagnóstico Imunohistoquímico.....	47
2.5.9.2.5	Testes serológicos.....	47
2.5.9.2.6	Teste Intradérmico.....	48
2.5.9.2.7	Contaminação da cultura.....	48
2.5.10	Prevenção e controlo da tritrichomonose bovina.....	48
2.5.11	Controlo num efectivo bovino infectado.....	49
<b>2.6</b>	<b>Objectivos do Estudo.....</b>	<b>51</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Pesquisa de <i>Tritrichomonas foetus</i> em explorações de bovinos, explorados extensivamente no Alentejo. Caracterização dos animais a rastrear.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2</b>	<b>Tamanho e distribuição das amostras.....</b>	<b>53</b>

<b>3.3</b>	<b>Colheita de amostra</b> .....	<b>53</b>
<b>3.4</b>	<b>Meios de cultura</b> .....	<b>56</b>
<b>3.5</b>	<b>Transporte</b> .....	<b>57</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise da amostra</b> .....	<b>58</b>
<b>3.7</b>	<b>Verificação por PCR</b> .....	<b>59</b>
<b>3.8</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>DISCUÇÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>74</b>
	<b>APÊNCICES</b> .....	<b>I</b>
	Anexo I – Listagem de colheita de amostras e informação sobre o manejo reprodutivo na exploração.....	<b>I</b>
	Anexo II – Exame andrológico, modelo praticado.....	<b>III</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática de <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	26
Figura 2. Ilustração esquemática do ciclo de vida do <i>T.foetus</i> .....	28
Figura 3. Países, com TB, clinicamente demonstrada.....	29
Figura 4. Pormenor de utensílio usado na técnica de raspagem para recolha de conteúdo prepúcial no touro.....	42
Figura 5. <i>Tritrichomonas foetus</i> , cultura” <i>in vitro</i> ”, 1000X.....	45
Figura 6. Oligonucleótidos utilizados na PCR, para amplificação do segmento do gene de rRNA 5.8S.....	47
Figura 7. Abordagem esquemática para prevenção e erradicação de <i>T. foetus</i> numa exploração de bovinos.....	50
Figura 8. Distribuição geográfica das explorações analisadas nos concelhos do Alentejo (NUTT II).....	52
Figura 9. Material usado na recolha das amostras dos touros.....	54
Figura 10. Pormenor do acoplamento da seringa à cânula uterina de equinos, para raspagem e aspiração das amostras.....	54
Figura 11. Contenção do touro para recolha de amostra prepúcial.....	55
Figura 12. Meios de cultura e transporte usados no isolamento de <i>T. foetus</i> durante o estudo.....	57
Figura 13. Observação directa ao microscópio das amostras inoculadas no In Pouch®.....	58
Figura 14. Análise por electroforese em gel de agarose a 2%, dos produtos resultantes de ampliação por PCR, das 12 explorações analisadas, no rastreio de <i>T. foetus</i> .....	67

## Índice de Gráficos

Gráfico 1. Crescimento do efectivo bovino em Portugal.....	20
Gráfico 2. Modelo computadorizado, estimativa das taxas de incidência de falhas reprodutivas, num rebanho de vacas infectado por <i>T. foetus</i> .....	36
Gráfico 3. Representação da idade dos touros por exploração, analisados no estudo.....	64
Gráfico 4. Representatividade da idade dos touros analisados, <3 e ≥3 anos.....	64
Gráfico 5. Quantificação da presença de falha reprodutiva nas 12 explorações inquiridas.....	65
Gráfico 6. Representatividade de Exames Andrológicos.....	65

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Nova classificação taxonómica, <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	27
Tabela 2. Distribuição da tritrichomonose bovina na última década na Europa.....	31
Tabela 3. Resumo do prejuízo económico num rebanho infectado por <i>T.foetus</i> .....	39
Tabela 4. Representação da amostragem, sua localização e técnica utilizada.....	63
Tabela 5. Resultados obtidos do Laboratório de Parasitologia Vítor Caeiro, Universidade de Évora, no isolamento de <i>T. foetus</i> , na totalidade dos touros.....	66
Tabela 6. Resultados obtidos do Laboratório SEGALAB, no isolamento de <i>T. foetus</i> e <i>C. fetus sp venerealis</i> na Exploração 11 e 12.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A tritrichomonose, causada por um protozoário flagelado, o *Tritrichomonas foetus* é uma patologia que afecta os gatos e os bovinos. Nos gatos caracteriza-se por um quadro diarreico severo crónico, de transmissão feco-oral. Apesar do agente infeccioso ser o mesmo, estudos recentes, indicam que o protozoário apresenta um mecanismo de patogenicidade diferente conforme o seu hospedeiro, não se comprovando a passagem directa entre hospedeiros de diferentes espécies (Stockdale et al., 2008).

Nos bovinos, a tritrichomonose bovina (TB), é uma doença venérea, de declaração obrigatória, que afecta o trato genital do touro e da vaca. Apresentando um ciclo de vida simples, na sua única forma infectante de trofozoíto, passa do touro à vaca pela cópula, podendo em condições mais desfavoráveis adquirir a forma de pseudoquisto, reversível (Pereira-Neves et al., 2011). Esta patologia está descrita na lista de doenças infecciosas de bovinos, da Organização Mundial de Epizootias, (OIE, Terrestrial Animal Health Code, 2013), devido ao seu grande impacto económico de perda de rentabilidade nas explorações, refugo de animais (Clark et al., 1983b), falha reprodutiva e restrições ao mercado de sémen internacional, a animais positivos, conforme Directiva Europeia (88/407/EEC), (EUR-Lex, 1988).

Apresentando uma distribuição mundial, a TB prevalece em países onde a cobrição natural é o método reprodutivo mais praticado, sobretudo em bovinos com aptidão para a produção de carne, explorados em regimes extensivos, acarretando grandes prejuízos económicos nas explorações. Em países da Europa ocidental, pelo uso recorrente da Inseminação Artificial (IA), sobretudo em vacas de aptidão leiteira e rastreio de machos reprodutores, a TB encontra-se controlada (Bondurant, 2005). No entanto assiste-se a um melhor conhecimento, dado à implementação de manejo reprodutivo que inclui o rastreio da doença



em manadas de aptidão cárnea no sul da Europa, em países como Espanha; França e Portugal (Mendoza-Ibarra et al., 2012).

Em Portugal, apesar de não existirem dados concretos, relativamente à localização dos surtos, em 2015 e 2016, foi sinalizada a patologia, reportando-a à OIE.

Os sinais clínicos da TB, são vagos e reduzidos apresentando-se como uma patologia de grupo. Nos machos, não afectando a fertilidade ou a libido, essencialmente nos mais velhos, o protozoário aloja-se na cavidade prepucial tornando-os portadores assintomáticos. Na vaca, ainda que possa adquirir imunidade natural e expulsão do agente infeccioso, poderá ocorrer vaginites, endometrites, piómetras, morte do embrião ou abortos, nos primeiros meses de gestação, com repetição de ciclos irregulares; aumento do intervalo entre partos (IEP); baixa taxa de gestação e em raras ocasiões serem portadoras do protozoário no pós-parto, passando à próxima época de cobrição a patologia (Skirrow, 1987).

No que respeita ao tratamento, em machos está estabelecido quer pela dificuldade de eliminar o parasita, quer pelo tempo de tratamento e custos associados, não deve proceder-se a qualquer medicação e devem estes animais ser abatidos. Por este motivo o sucesso da erradicação da TB, passa pelo diagnóstico contínuo, eliminação de touros infectados e a adopção de medidas preventivas nas explorações.

O presente trabalho decorreu no seguimento do Estágio Curricular na Sociedade Veterinária de Coruche, em colaboração com o Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro da Universidade de Évora. Durante o estudo foi também possível colaborar com a *Pfizer Animal Health*, atual Zoetis, na pesquisa do agente infeccioso. Pretendeu-se averiguar a presença de *Tritrichomonas foetus* nas várias explorações visitadas, correlacionando registos de exploração, com sintomatologia clínica. No total foram avaliadas amostras prepúciais de 104 touros de 12 explorações distintas. As amostras foram recolhidas por lavagem e raspagem prepucial, com cânula uterina de equinos com posterior

transferência para o meio de transporte, solução de PBS e meio de cultura Diamond`s. Foi também utilizado o kit comercial InPouch® TM em duas explorações.

Segue-se uma revisão bibliográfica sobre a presente patologia e a realização de um estudo de pesquisa do agente infeccioso nas diversas explorações portuguesas, aleatoriamente visitadas.

Foi adoptada a Norma American Psychological Association (APA,2001) para citações e referenciação bibliográfica.

## 1.1 Breve descrição do Estágio Curricular

No âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, decorrido maioritariamente na Sociedade Veterinária de Coruche (SVC), iniciado a Outubro de 2010, na área Clínica de Animais de Pecuária, pude acompanhar brigadas sanitárias da Organização de Produtores Pecuários (OPP) coordenadas por médicos veterinários da SVC; realização de intervenções cirúrgicas a diferentes espécies animais (cesarianas; deslocamento de abomaso, enucleação ocular em bovinos; traumatologia; entre outros); clínica do aparelho reprodutivo (gestão reprodutiva em bovinos de carne; diagnóstico e resolução de mastites; retenções placentárias; prolapsos uterinos). Foi também possível acompanhar o Professor Doutor João Pedro Canas Simões, na realização de vários exames andrológicos a touros de diversas vacadas, na zona Centro e Sul de Portugal.

Este trabalho, surge por interesse próprio e sugestão dos meus orientadores de Estágio e teve como principal objectivo a pesquisa do protozoário *T. foetus* em diversas explorações de bovinos produtores de carne, explorados em regime extensivo. Desta forma, pretendeu-se salientar a crescente importância da TB na reprodução de bovinos e o seu impacto financeiro no sector, contribuindo, para o conhecimento da TB em Portugal.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Sector Pecuário em Portugal - Enquadramento histórico**

Desde a fundação do reino no século XI o sector pecuário em Portugal sofreu várias alterações sendo subvalorizado em relação à agricultura (Vale, 1949), mas foi com a entrada do país para Comunidade Económica Europeia em 1986, que os agricultores portugueses, praticando um tipo de agricultura familiar, puderam recorrer ao programa europeu, designado por Política Agrícola Comum, PAC, do qual resultou em curto espaço de tempo o grande investimento na agricultura e pecuária nacional. Várias medidas e incentivos governamentais foram tomados no sentido dos produtores remodelarem as suas explorações, tornando-as mais produtivas e rentáveis e os agricultores responderam cabalmente nos mais diferentes sectores de actividade (INE,2001).

Actualmente e tendo em conta a conjuntura política e económica nacional e internacional assiste-se a uma redução diária das importações. Os produtores, face aos aumentos consecutivos dos factores de produção, foram obrigados a rentabilizar as suas explorações. Na pecuária e em especial na bovinicultura, houve necessidade de adquirir formação especializada; registos actualizados; acompanhamento veterinário e conseqüente melhoramento higiosanitário dos efectivos; aumento da área das explorações e do encabeçamento, tal como, com a heterose, com a introdução de raças bovinas mais precoces e produtivas.

### 2.1.1. Caracterização dos sistemas de produção de bovinos de carne em Portugal

Em Portugal o sector pecuário apresenta um aumento do efectivo bovino, face à última década (Gráfico1). Na zona Centro e Sul do país a maioria das explorações agrícolas pratica um regime extensivo com encabeçamentos baixos. Com a continua procura de aumento da rentabilidade surgiu a necessidade de prevenir e diagnosticar falhas reprodutivas responsáveis por, retorno do cio e aumento do intervalo entre partos (IEP) difíceis de mensurar, na maioria das explorações acarretando elevadas perdas de rentabilidade para os produtores.

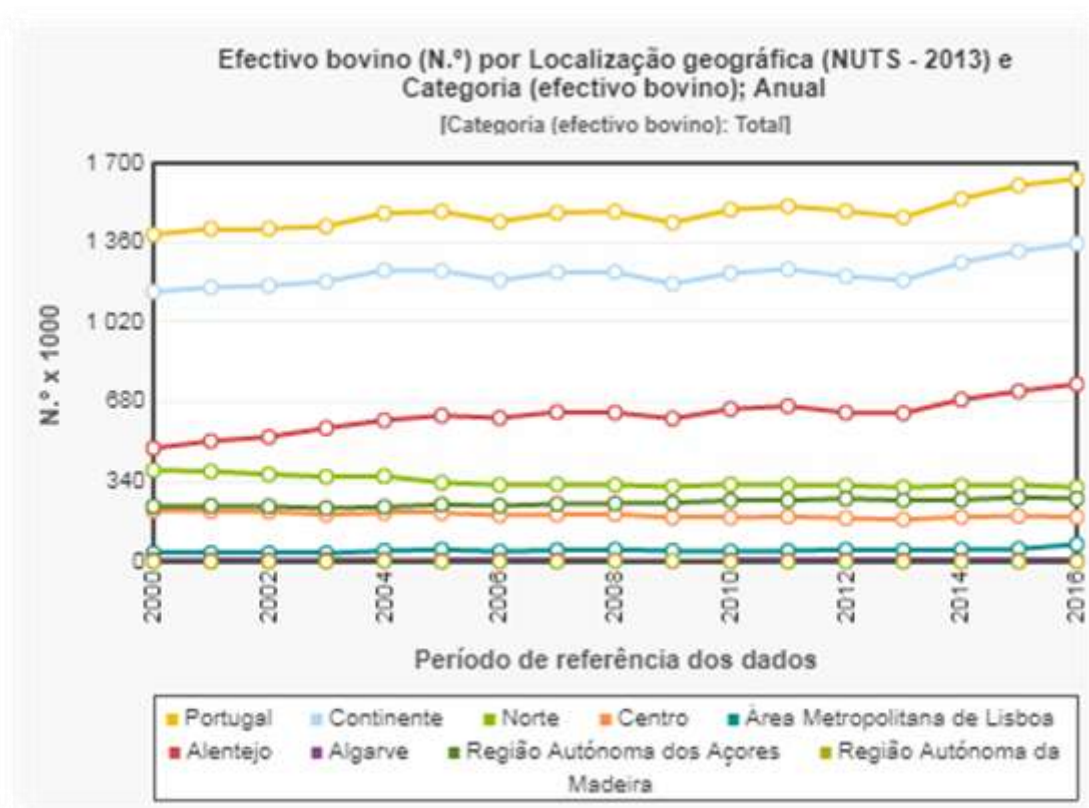


Gráfico 1. Crescimento do efectivo bovino em Portugal. (adaptado, Instituto Nacional de Estatística), in [www.ine.pt](http://www.ine.pt) (consultado em Agosto de 2017)

O acompanhamento diário e a manutenção de registos actualizados juntamente com o aconselhamento médico-veterinário é decisivo para a melhoria da rentabilidade na exploração.

## **2.2. Infertilidade na Vaca - Doenças Infecciosas com transmissão venérea.**

Nos bovinos destacam-se como doenças infecciosas de transmissão venérea a brucelose, a campilobacteriose e a tritrichomonose, tendo sido descritas com grande impacto direto ou indireto no desempenho reprodutivo da vaca, influenciando a sobrevivência e transporte do sémen no útero, modificando o ambiente intrauterino, levando a perdas embrionárias, fetos mumificados, abortos, nado-mortos ou vitelos de fraco vigor ao nascimento (Geoffrey H. Arthur, 2001).

Apesar do padrão de prevalência das doenças reprodutivas dos bovinos nos últimos 50 anos ter mudado, essencialmente pela objectividade do diagnóstico e implementação de medidas de erradicação nos rebanhos bovinos de aptidão leiteira, no que respeita à criação de bovinos de aptidão carne, criados extensivamente, assiste-se, possivelmente a um recrudescimento de certas doenças, em que o touro assume um papel importante na dispersão de vários agentes infecciosos, em especial com transmissão venérea a campilobacteriose genital bovina, agente bacteriano *Campylobacter fetus subsp. Venerealis* e a tritrichomonose bovina, o protozoário, da responsabilidade de *Tritrichomonas foetus*.

Considerando que um touro infectado poderá permanecer, toda a sua vida, portador assintomático de *T. foetus*, num rebanho, será de esperar uma rentabilidade anual inferior, na exploração, pela menor relação do número de vitelos desmamados por ano, por vacas colocadas à cobrição, (Collantes-Fernández et al., 2014; Ondrak, 2016). Agrava o facto do diagnóstico e controlo da TB não ser obrigatório em Portugal e que muitas explorações apresentam vários factores de risco, como a cobrição natural e trocas comerciais de machos reprodutores sem rastreio da presença do agente infeccioso.

A realização periódica do exame andrológico, assume um papel importante na sanidade do touro (Thundathil et al., 2016), como momento oportuno para recolha de amostra de lavado prepucial e posterior realização de diagnósticos complementares das principais patologias venéreas em bovinos.

### **2.3. Exame Andrológico no Touro**

Hoje em dia, a realidade dita, que muitos criadores, estão sensibilizados e dispostos a avaliar os touros, quer motivados pela compra e venda de um reprodutor, quer para teste de aptidão reproductiva antes da época de cobrição no rebanho. No entanto, alguns criadores, só solicitam o exame andrológico ao touro, quando existe suspeita de infertilidade.

O exame andrológico, estimando o potencial reprodutor de um macho (Canas Simões, 2010), deverá ser rigoroso e objectivo, restringindo-se às observações relevantes por forma a evitar custos elevados ao criador, devendo no final ser emitido um certificado de aptidão reproductiva, assinado por um Médico Veterinário. Apenas no caso de reprovação poderá existir correlação directa com a baixa fertilidade, sendo que o contrário não se poderá afirmar como verdade, existindo muitas variáveis antes e durante o exame a influenciarem o resultado.

A fertilidade, real, de um touro pode ser confirmada, expondo-o a 50 novilhas durante 9 semanas, considerando-o de excelente fertilidade, se 65% dessas novilhas ficarem gestantes nos primeiros 21 dias de exposição ao touro (Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010).

Com a realização do exame andrológico deverá obter-se informação precisa sobre a capacidade de salto e capacidade de produção de espermatozóides férteis em número suficiente, devendo sempre incluir: história progressa, exame de estado geral; exame do

aparelho genital; avaliação do ejaculado e por último, realização de provas complementares, para pesquisa de agentes infecciosos com repercussão na reprodução e/ou transmissão venérea. Precisamente, na pesquisa de agentes infecciosos, incluindo a avaliação serológica para (brucelose; IBR; BVD; leptospirose, etc.) e colheita de amostra de lavagem prepucial, para pesquisa de (*T. foetus* e *C. fetus* spp *venerealis*), com posterior envio para um laboratório de referência.

A Sociedade de Teriogenologia, recomenda aprovação do reprodutor, com base num sistema de classificação por pontos. Sendo mundialmente aceite, estabelece como reprodutor satisfatório  $\geq 60$  pontos; reprodutor questionável =30-59 pontos; rejeição de reprodutor <30 pontos. Recentemente a classificação foi aferida, como pontuação máxima para a morfologia espermática de 70 pontos e pontuação máxima para motilidade espermática de 20 pontos, sendo que a circunferência escrotal, é ajustada à idade do animal, tendo estabelecidos mínimos admissíveis (Hopkins & Spitzer, 1997) .

Tendo em conta a vulnerabilidade das características seminais de um touro, face à temperatura ambiente adversa, possibilidade de má técnica de recolha e processamento do ejaculado, patologias e terapias anteriores não relatadas, será sempre difícil justificar a rejeição do animal. Por esse motivo é aconselhado e sempre que se justifique, a repetição do exame, passados cerca de 2 meses.

## 2.4 Aborto por Protozoários na Vaca

Nos bovinos, destacam-se três protozoários causadores de falhas reprodutivas, *Besnoitia besnoiti* e *Neospora caninum* (esporozoados) e *Tritrichomonas foetus* (flagelado), destes apenas o *T.foetus* têm realmente capacidade de infecção venérea, sendo responsável pela maior percentagem de aborto, a nível mundial, onde a cobrição natural



é praticada. Esta patologia apresenta poucos sinais clínicos, onde as lesões macroscópicas são inespecíficas, requerendo sempre pesquisa laboratorial (Ortega-Mora, et al, 2007).

## **2.5 Tritrichomonose Bovina**

### **2.5.1 Etiologia**

*Tritrichomonas foetus*, é o agente responsável pela doença venérea, tritrichomonose bovina (TB), acarretando graves problemas reprodutivos na vaca, com elevado impacto económico na exploração (BonDurant et al., 1990; Collantes-Fernández et al., 2014; Ondrak, 2016; Rae, 1989a; Rae, et al., 2004a). Trata-se de um protozoário eucariota, flagelado, que na sua única forma infectante de trofozoíto apresenta-se piroforme ou ovóide, de 8-18 $\mu$  de comprimento e 4-9 $\mu$  de largura, três flagelos anteriores e um posterior bem como uma membrana ondulante, extensão deste último, contribuindo para o seu típico movimento ameboide. A reprodução ocorre de forma assexuada por divisão binária.

Tendo sido descrita pela primeira vez em França, por Kunstler em 1888, com o isolamento do protozoário do muco vaginal de uma vaca. Posteriormente em 1928, Reidmuller, de um estudo de 105 fetos abortados, em 9 foi diagnosticado TB, propondo o nome para o agente etiológico de *Tritrichomonas foetus*. Sucessivos investigadores estabeleceram a relação do *T. foetus* com infertilidade, abortos precoces e piómetras em vacas e verificaram o parasitismo na cavidade prepucial dos machos. Actualmente a TB apresenta um carácter cosmopolita estando presente em todos os continentes.

A família de protozoários, Trichomonadidae spp, caracteriza-se por apresentar um corpo basal; de três a cinco flagelos anteriores livres; uma membrana ondulante com prolongamento do flagelo no pólo posterior e um axóstilo. A classificação é feita segundo o número de flagelos anteriores. Genéricamente são comensais de baixa

patogenicidade com tropismo para o intestino e cavidade oro-nasal, como os géneros *Tetratrichomonas* spp e *Pentatrichomona* spp, excepção do *Trichomonas vaginalis* e o *Tritrichomonas foetus* com tropismo para o aparelho reprodutor, responsável pela grave doença venérea nos humanos e falha reprodutiva em bovinos, respectivamente (Frey & Müller, 2012).

Morfologicamente (Figura 1), o *T. foetus* apresenta um cisto esqueleto constituído pelo complexo pelta-axostilar, com núcleo e corpos basais; a costa, com função de suporte; um axostilo, que auxilia no suporte e reprodução; filamentos parabasais e um complexo de Golgi simples. Em situação de stress, como, diferenças térmicas, alterações de pH, o trofozoíto, poderá adquirir uma forma redonda de pseudoquisto, interiorizando o flagelo. Reproduz-se de forma assexuada, por divisão binária, a sua fonte de alimentação são as bactérias existentes no trato genital, recorrendo a processos de pinocitose e fagocitose. Com uma estrutura celular elementar, sem mitocôndrias, obtém energia, por via anaeróbia por catabolismo de hidratos de carbono, desempenhando o hidrogenossoma, através da regulação o pH, um papel importante na adaptabilidade do protozoário à colonização do aparelho genital do hospedeiro.

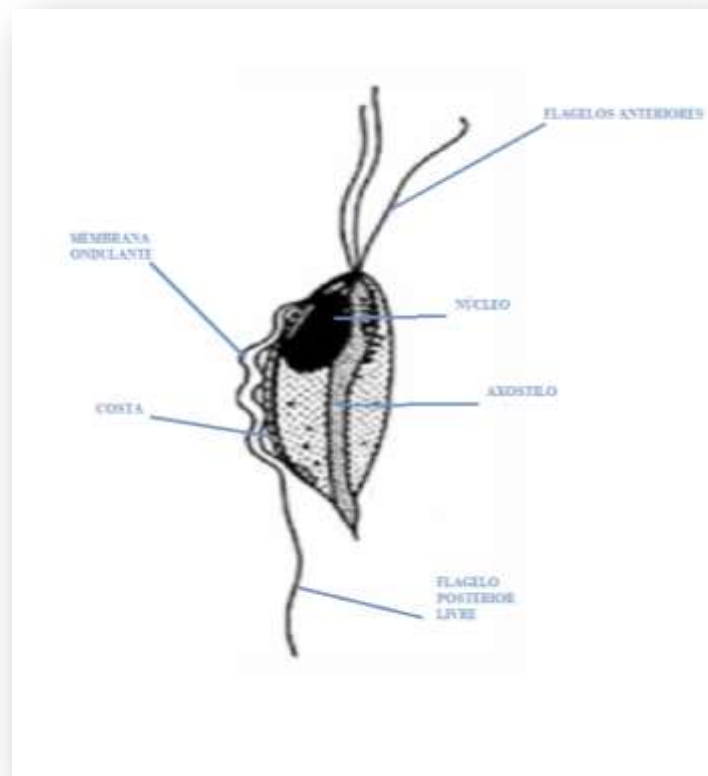


Figura 1. Representação esquemática de *Tritrichomonas foetus*, adaptado de (Mehlhorn, 2016, pp. 2844–2852)

Recentemente classificado no filo Parabasalia (Adl et al., 2005) (Tabela 1), o *T. foetus*, pertencem também a esta Família Trichomonadidae, outros protozoários que afectam o Homem (*T.vaginalis*); as Aves (*T.gallinae*) e os Suínos (*T.suis*). O *T. suis*, originalmente descoberto no século XIX, parasita comensal apatogênico, presente na cavidade oro-nasal e trato gastrointestinal dos suínos, considera-se por estudos morfológicos recentes, ser o mesmo agente da TB, (Tachezy et al., 2002). Mais recentemente, foi proposto a distinção de genótipo felino e bovino, dentro da espécie *T.foetus*, visto apresentarem alguma variabilidade genética em amostras de DNA de gatos e bovinos (Frey & Müller, 2012; Morin-Adeline et al., 2015).

Tabela 1. Nova classificação taxonómica, *Tritrichomonas foetus*, adaptado (Adl et al., 2005)

<b>Reino</b>	Protista
<b>Subreino</b>	Protozoa
<b>Filo</b>	Parabasalia
<b>Classe</b>	Trichomonada
<b>Ordem</b>	Trichomonadida
<b>Família</b>	Trichomonadidae
<b>Subfamília</b>	Tritrichomonadinae
<b>Genero</b>	<i>Tritrichomonas</i>
<b>Espécie</b>	<i>Tritrichomonas foetus</i>

### 2.5.2 Ciclo de vida

De ciclo direto, monóxeno, o *T. foetus*, apresenta como único hospedeiro definitivo os bovinos (Figura 2), podendo ainda infectar outras espécies de mamíferos como o porco; o gato; o Homem, entre outros. O protozoário, transmite-se de forma directa do touro para a vaca e vice-versa através da cópula, podendo também transmitir-se entre machos, em grupos onde coabitem machos de diferentes faixas etárias, não apresentando forma de vida livre, ou por via mecânica, por inseminação artificial com sémen contaminado, através de fómites, estando descrito a sobrevivência em sémen fresco a 5°C e criopreservado (Ortega-Mora et al., 2007).

No macho o *T. foetus*, localiza-se na cavidade prepucial, na mucosa peniana e mucosa prepucial posterior, permanecendo como portador crónico, já na fêmea encontra-se preferencialmente nas pregas do cérvix e corpo do útero, apresentando um carácter autolimitante, eliminando-o do trato genital em 90-95 dias após a infecção (BonDurant, 2007; Rae et al., 2004b).

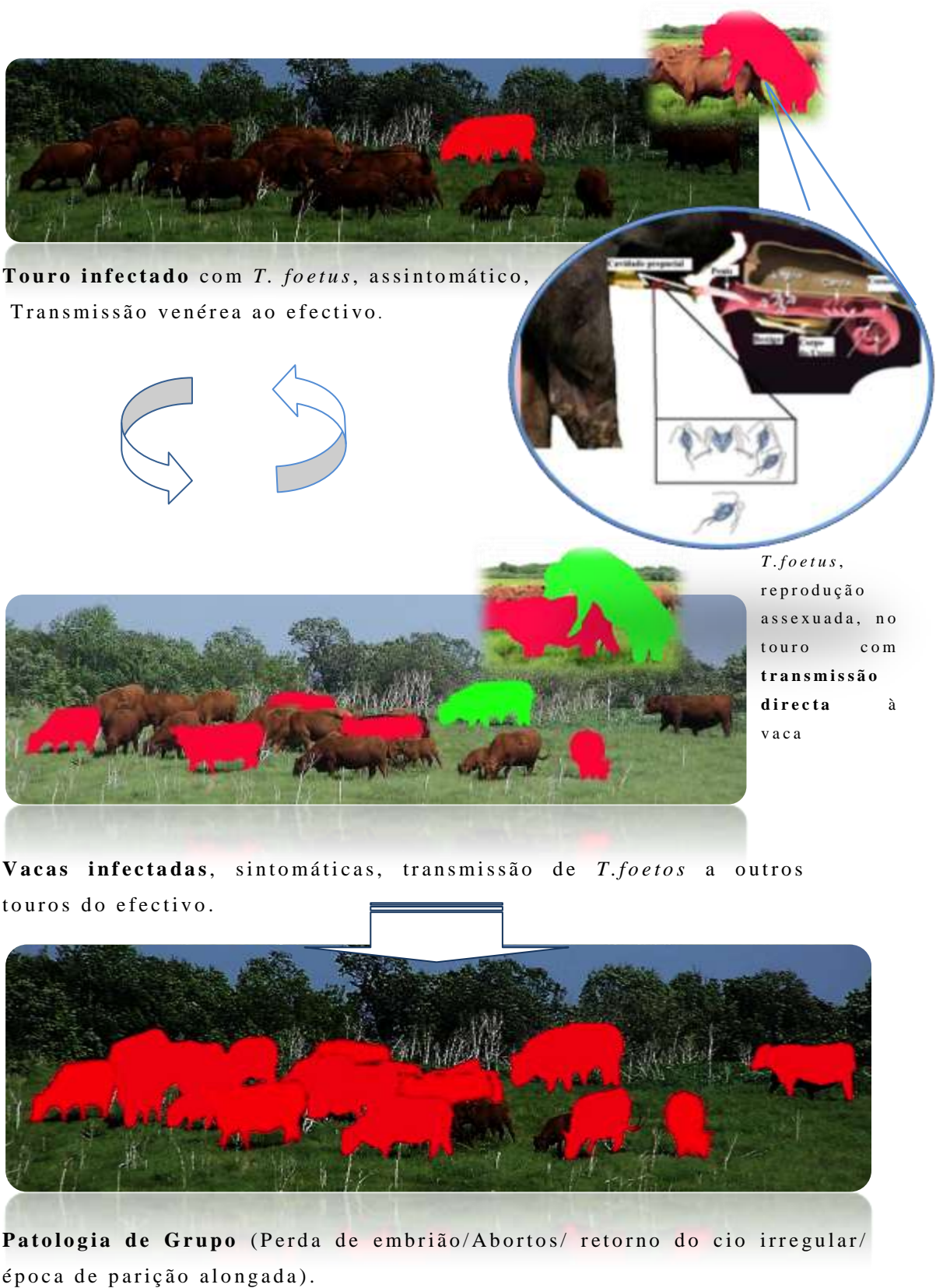


Figura 2. Ilustração esquemática do Ciclo de vida do *T. foetus*

### 2.5.3 Epidemiologia

A nível mundial com a introdução de novas biotecnologias reprodutivas, em especial a IA nos bovinos de leite, assistiu-se a uma redução da prevalência de doenças venéreas, incluindo a TB (BonDurant, 2005). Apesar de em alguns países produtores de carne bovina, onde a cobrição natural predomina em explorações extensivas, ter diminuído, pelo reconhecimento da importância da TB e adopção de medidas preventivas, a prevalência desta patologia cosmopolita, têm-se mantido elevada (Gay et al., 1996) (Figura 3). Estudos feitos com diferentes tamanhos de amostragem, revelam uma prevalência de 1,1% de touros infectados, sendo de 5,1% os rebanhos positivos na Argentina (Molina et al., 2013); 54,28% de touros infectados no Iraque (Bagdá) (Khitam & May, 2016); nos Estados Unidos (Flórida) encontram-se prevalências de 6%, de touros infectados sendo 30,4% dos rebanhos positivos.



Figura 3. Países, com TB, clinicamente demonstrada (adaptado, OIE, relatório de Julho 2016 a Junho de 2017)

Na Europa e América do Norte a partir de 1940, foram implementados programas de rastreio de doenças venéreas em bovíos, por serem consideradas uma das maiores causas de diminuição reprodutiva (Geoffrey, 2001; Mendoza-Ibarra et al., 2012).

Em Portugal, segundo informação da OIE a patologia está clinicamente demonstrada (Tabela 2), no entanto a prevalência da TB não é conhecida, tendo sido na última década apenas notificada a presença do agente *T.foetus*, em animais domésticos no período de 2015 e 2016, não existindo informação do número de surtos. Em Espanha, de acordo com a OIE, a patologia encontra-se limitada a uma região. Num estudo feito recentemente, no Norte de Espanha, numa raça autóctone, na montanha Asturiana, Mendoza-Ibarra e colaboradores (2012), em 103 touros de 65 rebanhos pesquisados, explorados em regime extensivo, foi demonstrada a prevalência individual de 32% para 41,5% de prevalência de rebanhos infectados, de salientar que a par desta pesquisa foi feito o rastreio para *Campylobacter fetus* spp *Veneralis*, tendo sido todos negativos à presença da bactéria.

Não sendo considerada uma patologia zoonótica, o agente etiológico da TB, já foi isolado em diversos humanos, apresentando um carácter oportunista, (Duboucher et al., 2006; Okamoto et al., 1998; Suzuki et al., 2016). Estudos recentes colocam a hipótese de o gato desempenhar um papel na transmissão do agente epidemiológico, de *T. foetus*, para os bovinos (Gookin et al., 1999).

País	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017	
	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.	jan.-jun.	jul.-dez.
Alemanha																						
Andorra																						
Arménia																						
Áustria																						
Azerbaijão																						
Bélgica																						
Bulgária																						
Chipre																						
Croácia																						
Dinamarca																						
Eslováquia																						
Eslovénia																						
Espanha																						
Estónia																						
Finlândia																						
França																						
Geórgia																						
Grécia																						
Hungria																						
Irlanda																						
Islândia																						
Itália																						
Letónia																						
Liechtenstein																						
Lituânia																						
Luxemburgo																						
Malta																						
Noruega																						
Países Baixos																						
Polónia																						
Portugal																						
Reino Unido																						
Roménia																						
Rússia																						
Suécia																						
Suíça																						
Ucrânia																						

Legenda	
	Não há informação disponível
	Doença nunca assinalada
	Doença ausente
	Suspeita da doença, mas não confirmada
	Infeção
	Doença presente
	Doença limitada a uma ou mais zonas
	Infeção limitada a uma ou mais zonas
	Suspeita da doença, mas não confirmada, limitada a uma ou mais zonas

Quando a situação sanitária difere entre animais domésticos e animais selvagens, a informação é dividida em duas células, sendo a superior referente aos animais domésticos e a inferior referente aos animais selvagens.

Tabela 2. Distribuição da tritrichomonose bovina na última década na Europa (adaptado OIE, 2017)



### 2.5.3.1 Factores de risco

No touro, a presença do *T. foetus* poderá estar relacionada com a idade. Vários autores descrevem prevalências de 2% em touros com idade inferior a 3 anos para 6,7% em touros com idade superior a 4 anos, (BonDurant et al., 1990) sendo que em outros estudos epidemiológicos a idade média de infecção foi de 5,5 anos (Rae et al., 1999). Este padrão de idade, justifica-se face ao tempo de permanência no rebanho e exposição ao agente etiológico e do número de fêmeas infectadas, possivelmente portadoras, expostas ao touro.

Também alguns autores referem que em touros mais velhos, o protozoário apresenta um tropismo paras as criptas do epitélio da mucosa prepucial (Christensen et al., 1977). Um estudo mais recentemente demonstrou não existir esta relação (Strickland, 2010), podendo estar relacionado com a ligação a proteínas como a lectina e a hidratos de carbono, com elevada concentração no local, favorecendo a adesão do protozoário ao epitélio genital (Felleisen, 1999). Touros jovens que coabitam com outros machos infectados nos mesmos cercados, por comportamentos sexuais entre si, poderão revelar-se infectados ou positivos a outros protozoários da família Trichomonidae spp de origem intestinal (*Tetratrichomonas* spp e *Pentatrichomonas* spp), dificultando o diagnóstico laboratorial da TB.

Considera-se que a taxa de infecção do agente infeccioso, é proporcional à frequência de cobrição do touro infectado no rebanho. Contribuem para a dispersão do agente infeccioso, rebanhos onde existam vários touros de diferentes faixas etárias, onde os mais velhos, com maior probabilidade de estarem infectados, dominam sobre os mais jovens. Práticas agrícolas de extensificação recorrendo à cobrição natural assim como a livre circulação de animais, quer por venda ou cedência temporária, entre explorações, sem prévio rastreio da infecção constituem um problema à erradicação da TB em zonas endémicas.

## **2.5.4 Patogenia e Imunidade**

O estabelecimento da infecção e persistência de *T.foetus*, nos bovinos, está relacionado com a sua capacidade de fuga ao sistema imunitário do hospedeiro (Cobo et al., 2011), quer pela variabilidade de apresentação antigénica, quer pela inativação de mecanismos de resposta imunitária. Estão reconhecidos 3 serótipos de *T. foetus*: Belfast (predominante na Europa); Manley e Brisban, de acordo com Skirrow & BonDurrant (1988) citado no (*Manual Terrestre,OIE*, 2012) . Os estudos não são recentes, mas indicam ser morfológicamente indiferenciáveis e de patogenicidade similar na infecção natural de bovinos. Recentemente foi isolado na Namíbia um novo serótipo, Sul Africano(Casteriano et al., 2016).

Relativamente à expressão antigénica de *T. foetus*, estudos serológicos em vacas, permitiram identificar vários antigénios distintos, distinguíveis e classificados pelo seu peso molecular. Face à exposição a determinados antigénios, o hospedeiro definitivo, poderá desencadear uma resposta humoral de linfócitos B, desenvolvendo memória imunitária, levando à produção de anticorpos numa segunda exposição ao mesmo antígeno, ou pela estimulação de linfócitos T, facilitando o processo de eliminação celular, mediante activação do sistema complemento favorecendo a opsonização e eliminação do protozoário do trato genital das vacas (Hodgson et al, 1990).

### **2.5.4.1 Patogenia no Touro**

No touro, uma vez infectado, permanece como reservatório do agente infeccioso, tornando a TB endémica no rebanho. Na maioria dos casos, não afecta a qualidade do sémen ou da libido, apresentando ausência de patologia macroscópica e microscópica específica. Apesar de se terem feito ensaios de infecção experimental e natural, o mecanismo de resposta humoral no touro, não está completamente

definido, sabe-se que a capacidade de produção de anticorpos é insuficiente, permitindo a infecção (Cobo et al., 2009a).

A nível histológico, poderá observar-se uma infecção local na cavidade prepucial, estando descrito, um aumento de neutrófilos e leucócitos juntamente com uma estratificação do epitélio da glândula e prepúcio (Rhyan et al., 1999) e uma resposta imunológica local limitada à infecção, no entanto num trabalho “*in vitro*”, sugere que o *T. foetus* na presença de espermatozóides, desencadeia um mecanismo de fagocitose, por adesão celular, levando à morte dos espermatozóides (Benchimol et al., 2008) . Este facto poderá contribuir para a infertilidade do touro, a considerar num diagnóstico diferencial de falha reprodutiva.

#### **2.5.4.2 Patogenia na Vaca**

A patogenia na vaca ainda não é totalmente conhecida, podendo estar relacionada com uma falha da imunidade local, devido a mecanismos de actuação do agente infeccioso. Tal mecanismo, constituído pela elevada concentração de parasitas no trato genital, sua citotóxicidade e alteração do meio intrauterino, levando ao desenvolvimento de uma resposta imunitária local por parte do hospedeiro, frente à infecção produzida.

Estudos, comprovam, que o *T. foetus*, possui características próprias, como adesinas e enzimas citotóxicas, que favorecem a sua colonização e adesão no trato genital (Felleisen, 1999). Quando ocorre um processo de infecção aguda, no espaço de 2 semanas, o tracto genital da vaca é colonizado pelo protozoário, sendo máxima a sua concentração, no muco cervico-vaginal nos dias que antecedem o estro (Ortega-Mora et al., 2007). A nível histológico é observado, acumulação de granulócitos polimorfonucleares; macrófagos; linfócitos e células plasmáticas. Foi também relatado que, vacas no pós-parto, permaneceram infectadas, até às 9 semanas (Skirrow, 1987), contribuindo para a dispersão do agente infeccioso na época de cobrição seguinte, mantendo a endemia no

efectivo. As lesões fetais, ocorrem maioritariamente entre o segundo e quinto mês de gestação, sendo frequente existir uma reacção infamatória dos cotiledones, com presença de macrófagos e neutrófilos. Alguns autores defendem, que é nesta altura que o parasita através do líquido amniótico poderá colonizar o feto, essencialmente o abomaso, o intestino e os pulmões (BonDurant, 1997).

A imunidade temporária da fêmea está relacionada com a produção local de imunoglobulinas, IgA, IgG1 e IgG2, libertadas pela mucosa vaginal, sendo que em fêmeas portadoras, ocorre uma falha na resposta humoral, dificultando o reconhecimento do agente infeccioso, inviabilizando a produção de anticorpos. Recentemente uma experiência, "in vitro" provou o efeito citotóxico do *T. foetus* em células de oviducto da vaca, sugerindo uma hipótese no mecanismo de perda embrionária (Midlej et al., 2009)

### **2.5.5 Sinais Clínicos**

A TB, não apresenta sinais patognomónicos, sendo que no macho é assintomática. Na vaca, os sinais clínicos normalmente não são evidentes, podendo em alguns casos, observar-se após a infecção, sinais de vaginite moderada; cervicite e/ou endometrite e corrimento vaginal mucopurulento. Nos animais que ficam gestantes, verifica-se que grande percentagem de falha reprodutiva ocorre cerca dos 17 dias pós fertilização, altura em que é estabelecido o reconhecimento fetomaternal, dificultando a fixação do embrião ao útero, levando à reabsorção embrionária e conseqüente repetição irregular do cio, detectável no rebanho, pelos criadores mais atentos. O aborto, apesar de menos frequente, poderá ocorrer até ao 5º mês de gestação, sendo mais provável que ocorra no primeiro trimestre. A recuperação da perda fetal, poderá ocorrer normalmente entre segundo e o sexto mês após a infecção, sendo que em alguns casos, ou por retenção do feto ou pela manutenção da progesterona segregada pela falha de luteinização do corpo lúteo, poderá estabelecer-se piómetra, aumentando a

probabilidade da vaca ficar infértil e ser refugada (Ortega-Mora et al., 2007). De um modo geral, num rebanho infectado (Gráfico 2), será de esperar a presença de vacas com repetição irregular deaios, não gestantes ou inférteis, resultando numa época de parição alongada, com aumento do IEP e redução na taxa de parição.

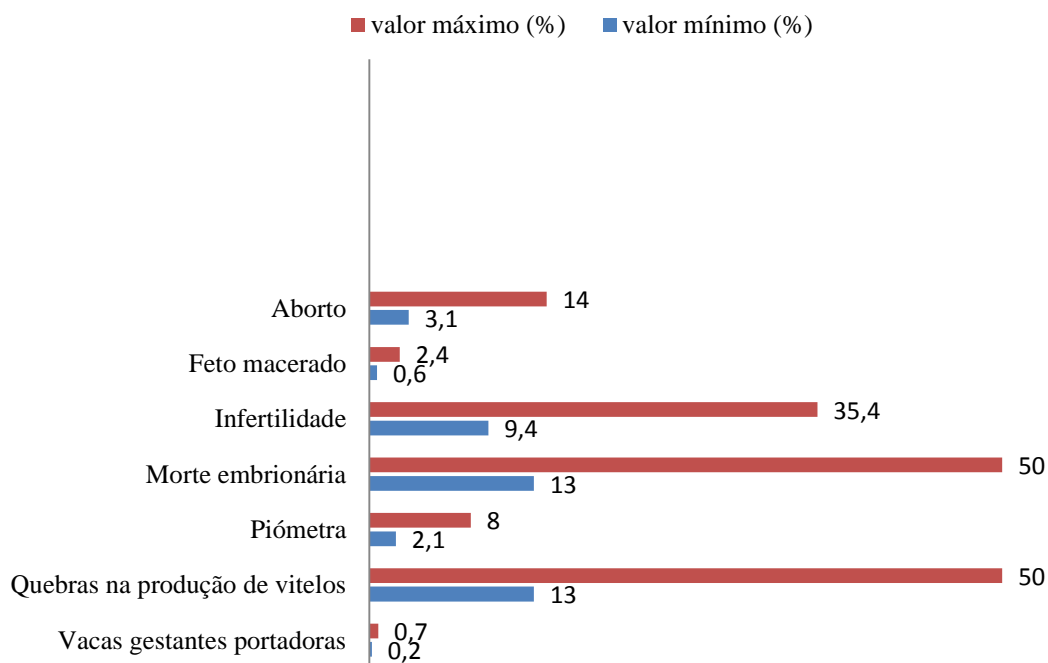


Gráfico 2. Modelo computadorizado, estimativa das taxas de incidência de falhas reprodutivas, num rebanho de vacas infectado por *T. foetus* adaptado, (Rae, 1989b)

### 2.5.6 Imunoprofilaxia

Actualmente, o benefício do uso de vacina para controlo da TB revela-se insuficiente face ao curto tempo de protecção e dificuldade na produção de anticorpos por parte do hospedeiro.

Alguns estudos, revelam benefício na frequência de vacinação de touros, revelando uma melhoria da protecção local, resultando num aumento de produção de IgG1 e IgG2, conferindo resistência à infecção (Cobo et al., 2009b). Outros estudos, mais antigos, feitos com vacina morta, revelam uma ineficiência de protecção em touros com idade superior a 5 anos, salientando existir, em animais mais novos, uma resistência inata à infecção (Clark et al., 1983a). Apesar de na Europa não existir uma vacina comercializada, nos Estados Unidos, a primeira vacina aprovada monovalente, morta de *T. foetus*, de administração subcutânea, *TrichGuard*® (Boehringer, Ingelheim), têm a possibilidade de associação a *Campylobacter* spp e *Leptospira* sp. Estudos realizados em rebanhos imunizados, comprovam melhoria na taxa de gestação aos 30 e 60 dias pós-cobrição (Kvasnicka et al., 1992). Para além de vacinas com o agente vivo ou inactivado, recentemente, tem-se assistido mundialmente à formulação de vacinas com antigénios recombinantes, contendo antigénios específicos da superfície do *T. foetus*, no entanto serão necessários mais estudos, que possibilitem a compreensão do reconhecimento do agente infeccioso por parte do hospedeiro.

Apesar da incerteza na protecção contra a infecção em touros, nas vacas, está comprovada a redução da gravidade e duração da infecção, aumentando a taxa de partos (Kvasnicka et al., 1992).

Uma simulação analisando vários fatores de risco e o seu potencial impacto económico na exploração, permitiu concluir, que efectivos imunizados tendem a minorar prejuízos financeiros (Villarrol et al., 2004), sendo que o sucesso da erradicação da TB está no diagnóstico do agente etiológico e refugo de touros infectados antes da época de cobrição.

### 2.5.7 Tratamento

Apesar de várias tentativas, actualmente não existe uma terapêutica eficaz no tratamento da TB, estando preconizado o refugo ou abate do animal. O tratamento nos touros é discutível, variando com idade e nível de infecção, sendo dispendioso e difícil, a sua deliberação implica objectivos claros. Face à dificuldade de eliminação do protozoário do trato genital dos hospedeiros, várias abordagens terapêuticas têm sido executadas, no entanto todas se revelam insatisfatórias, sendo a prevenção a chave de sucesso na erradicação da patologia. Nos últimos anos, têm sido empregues, antissépticos associados a antibioterapia tópica e outros fármacos por via local ou sistémica. Medicamentos como o metronidazol, usado para o tratamento do *T. vaginalis* em humanos, estão proibidos em animais que entrem na cadeia alimentar humana, pelo seu possível efeito residual carcinogénico. No entanto, nos Estados Unidos, tratamentos sistémicos de metronidazol experimentais em touros (60 mg/kg endovenoso, durante 2 dias), revelam elevada taxa de sucesso no tratamento da TB (Love, et al., 2017).

Recentemente estudos experimentais, apontam resultados satisfatórios na autodestruição celular do protozoário, por terapia fotodinâmica, através da activação dos seus lisossomas (Silva, et al., 2007), assim como comprovaram a ligação do protozoário a moléculas de oxido de grafeno, podendo este, actuar como veículo de fármacos (Zanin et al., 2014). Um estudo feito em carraças do género *Rhipicephalus* (*Boophilus*), revela a capacidade de resistência a determinadas bactérias nelas presentes, contra o biofilme bacteriano incluindo a resistência à actividade do *T. foetus* sugerindo um modelo para o mecanismo de resistência dos bovinos à TB (Zimmer et al., 2013).

### 2.5.8. Impacto económico

Devido a falhas reprodutivas precoces, como a reabsorção embrionária ou o aborto antes dos 120 dias, com consequente repetição deaios irregulares, e aumento do IEP, a rentabilidade da exploração vê-se prejudicada, traduzindo-se numa diminuição de bezerros desmamados/vaca/ano, agravando o prejuízo, o elevado número de animais refugados e sua substituição no rebanho. Com o prolongamento da época de parição, aumentam os gastos em alimentação das vacas reprodutoras e a época de venda dos vitelos fica à mercê dos meses de maior oferta no mercado. Segundo vários autores, a diminuição de rendimento pode chegar aos 35% para cada vaca exposta a um touro infectado, com uma prevalência de Infecção no rebanho de 40% (Rae et al., 1999).

Num estudo realizado em Espanha (Tabela 3), num rebanho de bovinos da raça autóctone, com animais infectados por *T. foetus*, explorada em regime extensivo, quantificou, que numa exploração pecuária de 20 vacas e 1 touro, registaram-se aumentos do IEP em 79,5 dias e perdas de rentabilidade de 68,7 %, totalizando 5275€ de perda de receita anual (Collantes-Fernández et al., 2014).

Tabela 3. Resumo do prejuízo económico num rebanho infectado por *T.foetus*, adaptado de (Collantes-Fernández et al., 2014).

<b>Categoria de custos</b>	<b>Percentagem de perdas (%)</b>
Valor do vitelo desmamado	26,2
Subsídios governamentais	8,1
Preço de mercado por vitelo	18,1
Perdas dia/vaca	32,9
Abate e reposição de touros	9,6
<b>Total</b>	<b>68.7</b>



### **2.5.9 Diagnóstico Clínico**

A história de problemas reprodutivos no efectivo, poderá sugerir várias possibilidades de diagnóstico diferencial, incluindo a TB. Como não apresenta sinais clínicos patognomónicos, será sempre necessário recorrer ao diagnóstico laboratorial, para confirmação da suspeita e isolamento do agente etiológico. Como se trata de uma doença de declaração obrigatória, a nível internacional, o Laboratório que apresente resultados, deverá estar supervisionado pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, INIAV, laboratório do Estado Português, que detem competências nessa área.

No touro, a amostra terá origem em lavados prepúciais ou raspagem da mucosa prepúcial, já na vaca poderá ser recolhida amostra de muco vaginal juntamente com a possibilidade de recolha de material de fetos abortados especificamente abomaso e membranas fetais.

#### **2.5.9.1 Técnicas de recolha da amostra**

Para o diagnóstico da TB é aconselhável, pesquisar o agente infeccioso nos machos reprodutores, uma vez que nas fêmeas a infecção apresenta um carácter autolimitante e temporário, assumindo como método de referência de diagnóstico, o descrito no *Manual Terrestre da OIE, 2012*, utilizado para a comercialização internacional de sémen de bovino. O isolamento de *T. foetus*, após recolha de amostra de um touro sob suspeita de infecção, terá sempre por base a observação directa e cultura em meio selectivo, do protozoário, revelando ser de extrema importância a realização de uma técnica correcta na recolha da amostra, contribuindo para a diminuição dos falsos negativos. A presença de contaminantes na amostra, poderá confundir o técnico laboratorial na identificação do protozoário, sendo que outros protozoários comensais da família Trichomonidae spp, muito semelhantes morfológicamente, de

origem gastrointestinal podem surgir durante a visualização ao microscópio. De referir, que existem vários condicionantes do diagnóstico durante a recolha e processamento das amostras, tais como: o uso de soluções desinfectantes na recolha da amostra, estando aconselhado o abrigo da exposição directa à luz solar, temperatura que ronde os 30°C e o mínimo de tempo possível até à chegada e incubação no Laboratório, que não deverá ultrapassar as seis horas.

#### **2.5.9.1.1 No Touro**

Preferencialmente após um período de 2 semanas de repouso sexual deverá proceder-se a uma contenção adequada do animal, através de uma manga ou tronco e proceder à técnica de recolha de amostras. Existem vários procedimentos descritos, sendo que o lavado prepúcial e a raspagem da mucosa são os mais usuais. Depois de proceder à limpeza da região prepúcial, evitando soluções desinfectantes, podendo recorrer-se a sabão neutro com posterior secagem com tolas descartáveis de papel. Deverá estimular-se a micção massajando o óstio prepúcial.

Na lavagem prepúcial, sendo um dos métodos mais eficientes, obtêm-se por regra uma boa amostra, apesar da contaminação por urina ser frequente. Para tal utiliza-se uma solução de soro fisiológico isotónico, seguindo-se uma massagem vigorosa da cavidade prepúcial, durante algum tempo, para posterior recolha do material por gravidade onde é acrescentado o meio de transporte e cultura.

A técnica de raspagem, recorrendo a um utensílio próprio (Figura 4), criado pelos autores da técnica, consiste em recolher conteúdo da mucosa peniana e mucosa prepúcial, o mais profundo possível. A amostra obtida é colocada em solução tampão fosfato-salino (PBS) e posteriormente adicionado meio de cultura.

Colheita por pipeta de IA, muito semelhante ao método de raspagem, sendo apenas diferente pela injeção de solução de PBS no interior da cavidade prepúcial, seguida de vigorosa massagem da cavidade prepúcial e raspagem com a extremidade da pipeta de IA sobre

as mucosas peniana e prepúcial, na tentativa de remoção do protozoário das criptas epiteliais. Posteriormente o material recolhido é inoculado em meio de transporte e cultura.



Figura 4. Pormenor de utensílio usado na técnica de raspagem para recolha de conteúdo prepúcial no touro, adaptado de (Ortega-Mora et al., 2007)

Por último, a recolha por zaragatoa, de 8cm de comprimento, por 1-2 cm de diâmetro acoplada a uma haste metálica, sendo introduzida na cavidade prepúcial, seguindo-se vários movimentos em várias direcções sobre as mucosas peniana e prepúcial. Ao material recolhido é acrescentado 1 ml de solução de PBS, sendo posteriormente centrifugado e acrescentado o meio de crescimento selectivo.

#### **2.5.9.1.2 Na Vaca**

Na vaca, o isolamento do protozoário é mais difícil, devido à sua curta resposta humoral, e conseqüente possibilidade de eliminação do agente infeccioso. No entanto, nos dias que antecedem o cio; 15 a 20 dias após a cobertura e na presença de corrimentos vaginais suspeitos de piómetra, poderá realizar-se uma recolha de amostra de muco cérvico-vaginal, através de zaragatoa, pipetas de IA ou lavagem da cavidade vaginal. No caso de fetos abortados, podem ser recolhidas amostras com seringas ou zaragatoas de líquidos fetais e abomaso, com posterior envio para o laboratório.

#### **2.5.9.2 Diagnóstico Laboratorial**

A maioria das recomendações relativas ao diagnóstico laboratorial da TB, estão descritas no *Manual Sanitário* da OIE, incluindo os requisitos necessários para o comércio de sêmen bovino internacional. Tais orientações, não garantem a exclusão da doença, sugerindo a necessidade de exames de diagnóstico moleculares complementares (Ortega-Mora et al., 2007) de PCR, como teste primário ou segundo passo em amostras de cultura positiva.

##### **2.5.9.2.1 Exame direto**

Na observação ao microscópio de contraste de fase, o *T.foetus*, apresenta um movimento ondulante em todas as direcções do campo. Normalmente este simples método de observação não é suficiente para um diagnóstico conclusivo, sendo necessária a cultura em meio enriquecido de crescimento.

### 2.5.9.2.2 Cultura “*in Vitro*”

Durante um período de tempo, de cerca de 28 horas, o protozoário é avaliado no laboratório, num meio de cultura enriquecido, através da observação directa ao microscópio óptico de contraste de fase com ampliações de (100x a 1000x) (Figura 5). Existindo vários meios de cultura, está demonstrado que a probabilidade de visualização do agente infeccioso diminui, com o aumento do tempo decorrido entre a sua recolha e inoculação em meio de cultura (Bryan et al., 1999)

Relativamente ao meio de cultura selectivo, Diamond modificado, (Diamond, 1957), a sua preparação consiste em:

1- Na dissolução, em 80 ml de água destilada esterilizada, adicionar:

- 2 g de Peptona
- 1g de Extrato de levedura
- 0,5g de Mono-hidratado de maltose
- 0,1g de Hidroclorato de Cisteína-L
- 0,2g de Ácido ascórbico
- 0,08g de Di-hidrogenofosfato de potássio

2- Ajustar o pH para o valor 6,9, através de NaOH3

3- Ajustar para 90ml com água destilada esterilizada

4- Autoclavagem

5- Adição de 10% soro de cavalo esterilizado e antibióticos (penicilina 100UI/ml; estreptomina, 100µg/ml e anfotericina B 2,5µg/ml) adicionalmente poderá juntar-se vancomicina (100µg/ml).

Seguidamente, as amostras recolhidas são incubadas a 37°C em microtubos com tampa, observando-se de 12 em 12 horas ao microscópio, devendo em caso de positividade, renovar-se o meio 2 a 3 vezes durante a semana, salientando que todos os meios deverão estar dentro do período de validade, verificando-se regularmente a qualidade da água e podendo juntar antifúngicos ao preparado.

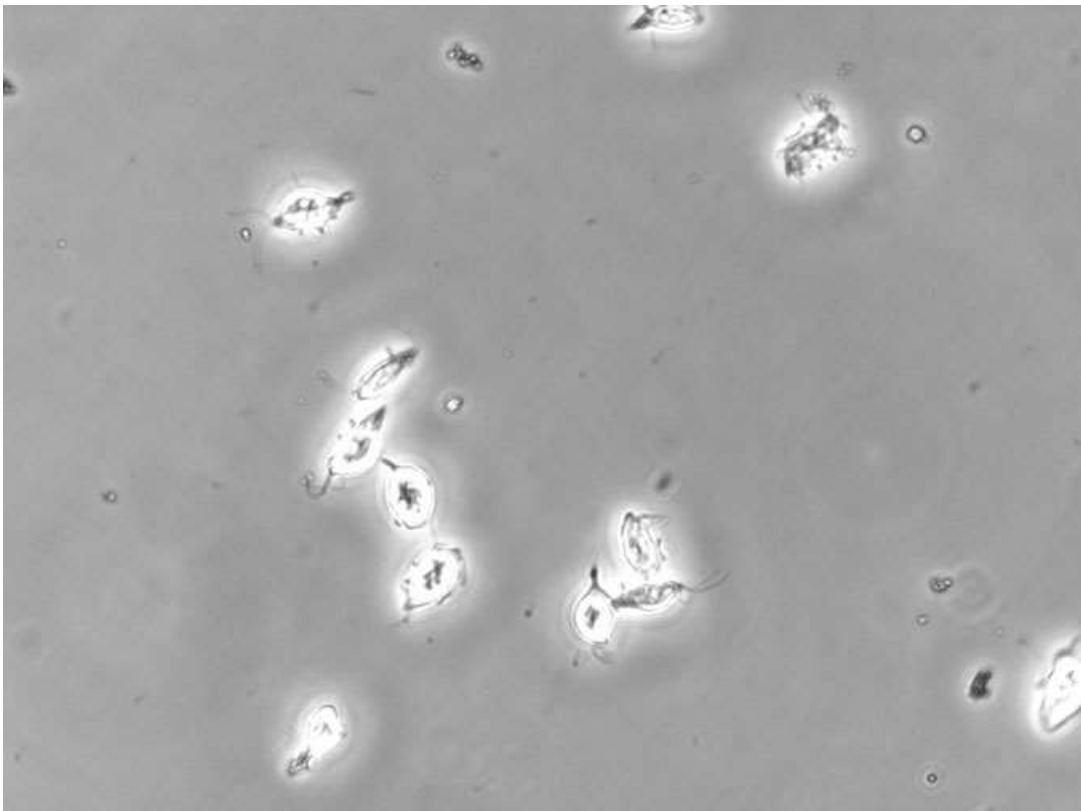


Figura 5 *Tritrichomonas foetus*, cultura "in vitro", 1000X, Adaptado (Ortega-Mora et al., 2007)

Optando pela cultura em kit comercial In Pouch® TF (EUA), este é constituído por uma bolsa plástica com sistema de dois compartimentos contendo o meio de cultura. Um estudo refere, ser 7 vezes mais provável o isolamento do protozoário em relação ao meio Diamond's (Parker et al., 2003), com a possibilidade de uma maior sensibilidade, o estudo não comprovou a especificidade, sendo que neste tipo de meios, compete ao técnico de laboratório analisar a diferenciação morfológica. Este kit comercial, revela-se estável à

temperatura ambiente servindo de meio de transporte e cultivo, conferido comodidade na sua utilização a campo.

O método consiste, em introduzir cerca de 1ml de amostra prepúcial, dentro do primeiro compartimento, fazendo descer o conteúdo, para o segundo compartimento, terminando com a dobragem e selagem, da parte superior da bolsa mantendo-a numa posição vertical. O kit, poderá ser visualizado ao microscópio logo após a sua inoculação, revelando o seu carácter prático em condições de campo. Posteriormente segue para o laboratório, protegido da luz solar e à temperatura ambiente sendo incubado a 37°C, observando-se o kit ao microscópio ótico 2 vezes por dia até ao 3º dia(Ortega-Mora et al., 2007).

#### **2.5.9.2.3 Diagnóstico por PCR**

O diagnóstico molecular, baseado na tecnologia que utiliza a reação de cadeia polimerase, (PCR), têm apresentado vantagens como, a alta especificidade e sensibilidade analítica no isolamento do *T. foetus*, a rapidez de diagnóstico, a possibilidade de deteção de pequenos fragmentos do protozoário ou em número reduzido(Campero et al., 2003) no entanto revela ser uma técnica onerosa.

Para pesquisa de *T.foetus*, a comunidade científica têm empregue vários métodos. A sensibilidade da PCR, é proporcional à eficiência do método de extracção, dos inibidores de contaminação e variável conforme os iniciadores utilizados. O processo consiste, na extracção específica de material genético das amostras recolhidas, e ampliação de DNA utilizando para isso sequências iniciadoras específicas, “primers”.

Segundo Falleisen, um conjunto de iniciadores (TFR3 e TFR4) (Figura 6), baseados na sequência do gene ribossómico DNA 5.8s, demonstrou uma boa especificidade no diagnóstico de *T. foetus* (Felleisen et al., 1998), permitindo a distinção entre protozoários da família

Trichomonadiae spp, no entanto revela-se difícil a distinção intraespecífica, como *T.suis* (Lun et al., 2005) e *T.mobilensis*. De forma geral a pesquisa de *T.foetus*, pela técnica de PCR revela uma alta sensibilidade e boa especificidade (Campero et al., 2003; García et al., 2014).

Agente	Primers, sequências 5` para 3`	Produto de ampliação	Referência
<i>T.foetus</i>	TFR3-5`CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3` TFR4-5`CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTAA-3`	347 pb	Felleisen et al. (1998)

Figura 6. Oligonucleótidos utilizados no PCR, para amplificação do segmento do gene de rRNA 5.8S, adaptado (Ortega-Mora et al., 2007)

#### 2.5.9.2.4 Diagnóstico Imunohistoquímico

Sendo uma técnica de diagnóstico dispendiosa e de carácter retrospectivo, a análise de fetos abortados, muitas vezes, em más condições para o isolamento e cultura do agente infeccioso, torna-se possível através da pesquisa de estruturas apresentadoras de antígenos (recorrendo a anticorpos específicos) em amostras fixadas em formol e parafina, tais como tecido pulmonar, intestinal ou membranas fetais (Rhyan et al., 1995). Para este propósito é importante que as amostras não tenham mais de 24 horas de fixação em formol.

#### 2.5.9.2.5 Testes serológicos

Devido à fraca resposta imunitária na produção de anticorpos pelos animais afectados, o recurso a este método diagnóstico é limitado e pouco usual, sendo frequente o aparecimento de falsos positivos, pela



possível exposição a diferentes antigénios, resultantes de infecções cruzadas de outros tipo de protozoários pertencentes à família Trichomonidae spp.

#### **2.5.9.2.6 Teste Intradérmico**

Não sendo usado por rotina (Ortega-Mora et al., 2007), consiste na inoculação intradérmica, na região cervical dos bovinos, 0,1ml de antigénio tricina, aguardando entre 30` a 60`, sendo positivo o animal que apresente uma prega de pele > 2mm.

#### **2.5.9.2.7 Contaminação da Cultura**

A presença de fezes, contaminação por urina ou sangue, nas amostras recolhidas dos touros, para isolamento do agente infeccioso, associada à falta de inibidores de crescimento bacteriano nos meios de cultura, diminuem a especificidade destes, podendo inibir a reação de PCR (Clothier et al., 2015).

#### **2.5.10 Prevenção e controlo da tritrichomonose bovina. Formas de diminuição do risco e infecção, numa exploração.**

Em rebanhos de pequena dimensão, a forma mais eficaz de controlo da TB, será a utilização de IA, com sémen proveniente de touros livres de *T. foetus*, já em rebanhos de maior dimensão, explorados extensivamente poderá optar-se por determinadas práticas.

Numa exploração livre, medidas a adoptar preventivamente:

- Diagnostico de rotina aos touros do rebanho, substituindo com regularidade os mais velhos;
- Introdução de novos animais com confirmação de ausência do agente infeccioso, preferencialmente, novilhos virgens;
- Manutenção das vedações em bom estado, de modo a evitar o contacto de animais livres com infectados;
- Evitar cedências temporárias de touros reprodutores entre distintas explorações.

### **2.5.11 Controlo num efectivo bovino infectado**

Existem diferentes medidas a adoptar para reduzir o impacto económico e eliminar o agente infeccioso num rebanho positivo (Figura 7). Tais como:

- Análise dos touros antes da época de cobrição, abatendo os positivos ao *T. foetus*, assim como o rastreio de infecção, na reposição destes, adquiridos a outras explorações. Privilegiar épocas de cobrição curtas de 3 a 4 meses, evitando o aumento de IEP em fêmeas infectadas;
- Separar o efectivo num grupo de baixo risco de infecção, de novilhas virgens e novilhos não infectados, sendo que as restantes reprodutoras passariam para este grupo, quando comprovada a eliminação do agente infeccioso;
- Diagnósticos de gestação dos 45- 60 dias, identificando vacas não gestantes, transferindo-as para o grupo dos animais infectados. Aeste grupo poderá juntar-se fêmeas suspeitas de aborto ou não gestantes com corrimento vaginal suspeito.

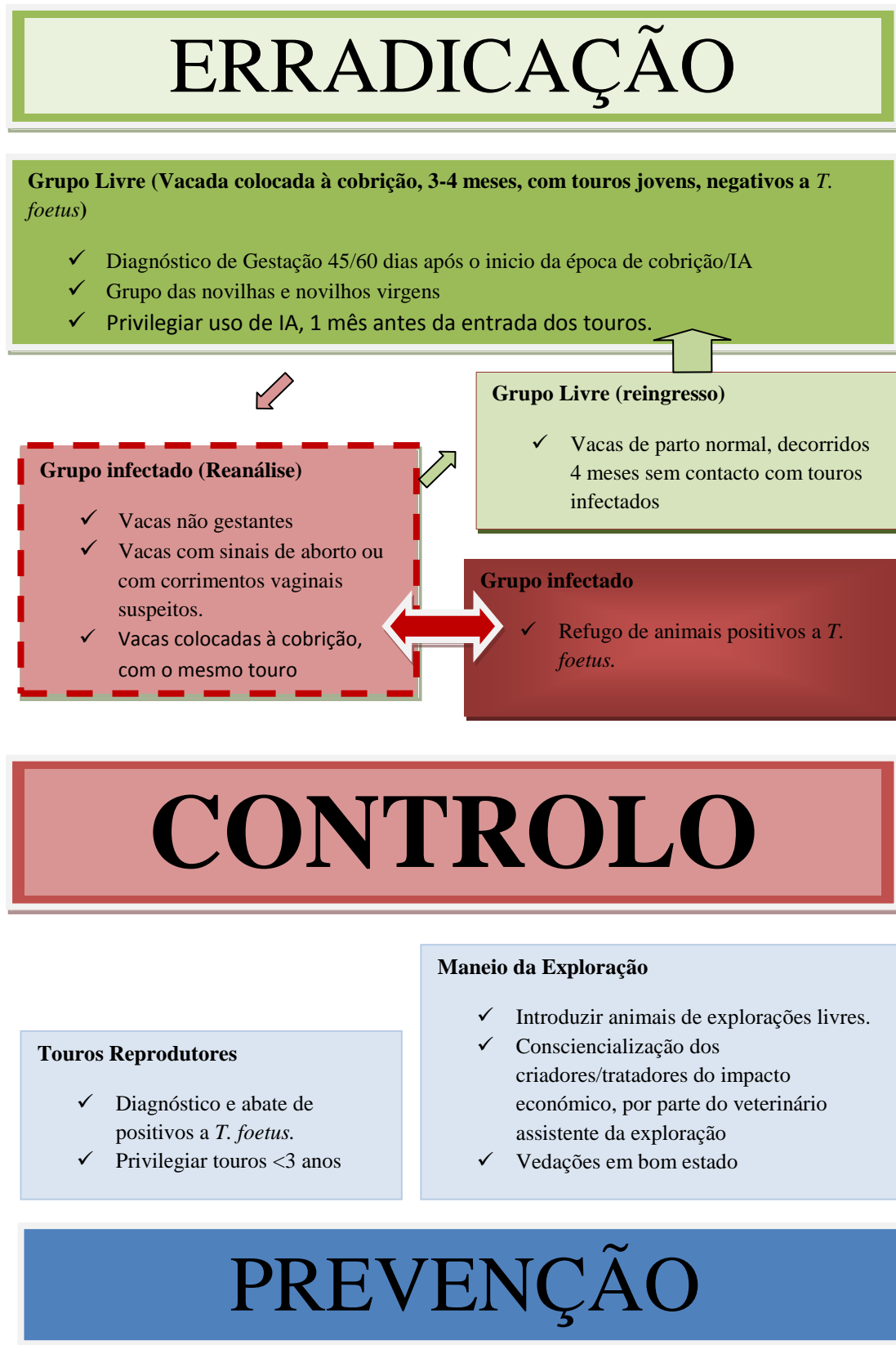


Figura 7. Abordagem esquemática para prevenção e erradicação de *T. foetus* numa exploração de bovinos, adaptado (Yao, 2013)

## 2.6 Objectivos do Estudo

Considerando que a patologia reprodutiva em bovinos, têm um impacto direto na rentabilidade das explorações e sabendo que maioritariamente os diagnósticos são feitos sobre sinais clínicos específicos, o interesse pelo rastreio de *T. foetus* em bovinos de carne explorados extensivamente, surge pela necessidade de colmatar uma lacuna de informação acerca da presença do protozoário em Portugal, onde a cobertura neste tipo de animais é feita predominantemente por cobertura natural. De salientar, a presença nos últimos anos de surtos de TB em Espanha, alguns, limítrofes ao nosso país, motivo pelo qual também justificou este trabalho (Mendoza-Ibarra et al., 2012).

Neste sentido foram recolhidas amostras prepúciais de touros, de explorações distintas, localizadas no Alentejo. Foram utilizadas duas técnicas de recolha de amostras prepúciais, por lavagem e raspagem, assim como abordados dois métodos de diagnóstico laboratorial, o exame direto e cultura do protozoário com posterior observação morfológica ao microscópio óptico e a confirmação da sua presença por técnica molecular de reacção de cadeia polimerase (PCR).

Com este trabalho, procurou-se de forma prática, contribuir para o esclarecimento desta patologia de grupo em Portugal, relevando o seu importante impacto financeiro nas explorações infectadas, assim como valorizar factores de risco, medidas preventivas e normas a adoptar, face à presença de um surto.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Pesquisa de *Tritrichomonas foetus* em explorações de bovinos, explorados extensivamente no Alentejo. Caracterização dos animais a rastrear.

Por suspeita de infertilidade e ocorrências de problemas reprodutivos em efectivos de bovinos, em várias explorações do Alentejo (NUTS II) (Figura 8), entendeu-se pesquisar o agente infeccioso, *T.foetus*. O diagnóstico foi dirigido aos touros, recolhendo-se amostras prepúciais, privilegiando machos com idade  $\geq 3$  anos e com a sua presença durante a época reprodutiva no rebanho.

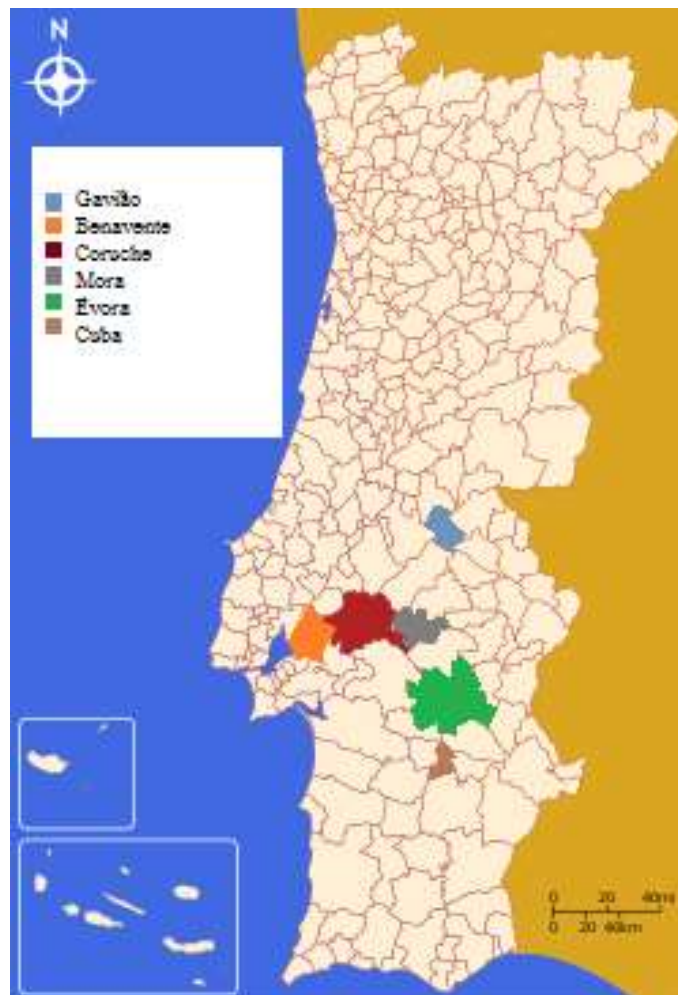


Figura 8. Distribuição geográfica das explorações analisadas nos concelhos do Alentejo (NUTT II)

A recolha de amostras, foi organizada, segundo a visita à exploração previamente agendada, coincidindo com dias de sanidade do rebanho ou por ocasião da realização do exame andrológico aos touros decorrendo ente Novembro de 2011 a Outubro de 2012.

Foi também possível numa exploração, em colaboração com a *Pfizer Animal Health*, atual *Zoetis*, fazer a pesquisa conjunta de *T. foetus* e *Campylobacter fetus* sp *venerealis*. Todos os dados de identificação, relativos às Propriedades/Explorações, detentores e animais, retratados neste trabalho, foram sujeitos a confidencialidade, reportando-se apenas a sua localização geográfica.

### **3.2 Tamanho e distribuição das amostras**

Foram recolhidas amostras prepúciais de 104 touros provenientes de 12 explorações distintas, ou rebanhos geograficamente diferentes na região do Alentejo (NUTS II), nos concelhos de Benavente; Coruche; Cuba; Évora; Gavião e Mora

### **3.3 Colheita de amostra**

Previamente, procedeu-se à recolha do meio de transporte, solução de PBS (pH 7,2) e meio de cultura Diamond`s (Figura 9), nas instalações do Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro da Universidade de Évora, Departamento de Medicina Veterinária.

Foram abordadas duas técnicas para a recolha de amostras nos diversos touros analisados. Fez-se lavagem da cavidade prepúcial através de sonda uterina de equinos, com soro fisiológico, massagem e posterior recolha de material. Nos restantes animais, fez-se raspagem com a extremidade da sonda uterina de equinos, seguido de massagem vigorosa, procedeu-se à aspiração do conteúdo presente no prepúcio.



Figura 9. Material usado na recolha das amostras dos touros (arquivo pessoal 2012)

Optou-se por sondas uterinas de equinos, muito semelhantes às usuais cânulas de IA em bovinos, pela facilidade de acoplamento direto de uma seringa (Figura 10), necessária à recolha da amostra por vácuo.



Figura 10. Pormenor do acoplamento da seringa à cânula uterina de equinos, para raspagem e aspiração das amostras (arquivo pessoal 2012)

Procedeu-se à contenção dos touros, numa manga e à imobilização do membro posterior, com corda de algodão, do lado onde foi recolhida a amostra. Foram adoptados comportamentos de forma a não prejudicar o bem estar animal (Figura 11).



Figura 11. Contenção do touro para recolha de amostra prepúcial (arquivo pessoal 2012)

Após a tricotomia e limpeza do óstio prepúcial, seguiu-se a secagem com tolas de papel, de forma a diminuir a contaminação fecal e sujidade nesse local, podendo afectar a viabilidade do agente infeccioso e diminuir a sensibilidade do diagnóstico. Antes da introdução da sonda, foi estimulada a micção, massajando a zona do óstio prepúcial. Sempre que ocorreu micção durante o procedimento de colheita de amostra, o processo foi repetido, fazendo lavagem com soro fisiológico. A sonda esterilizada, foi introduzida na cavidade prepúcial, com a bainha de plástico, sendo esta rasgada, já no interior da cavidade prepúcial, avançando para a porção medial e distal, diminuindo a contaminação bacteriana. Posteriormente foram executados diversos movimentos (cerca de 15 a 20), vigorosos, em várias direcções na zona distal da cavidade prepúcial e mucosa peniana, obtendo uma amostra de conteúdo prepúcial. Esta amostra foi de imediato colocada em solução de PBS, protegida da luz solar, devendo de forma ideal, ser branca turva e não conter sangue. Decorridos alguns minutos, o sedimento da solução de PBS, foi aspirado com seringa e agulha esterilizada e refundido no meio de cultura Diamond`s, obtendo-se duas amostras por animal. Os tubos de ensaio contendo a solução de PBS, foram transportados a acerca 4°C, já os tubos contendo o meio de cultura



foram transportados à temperatura ambiente, cerca de 26°C e regressaram ao Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro em período de tempo inferior a 6 horas.

Como referido anteriormente, nas explorações 11 e 12, para além da recolha de amostra para solução de PBS e meio de cultura Diamond`s, foi também utilizado o Kit comercial In Pouch®TM. Foram adicionados cerca de 1-2ml de amostra prepúcial, em cada dispositivo, respeitante a cada touro. Introduzindo-se a amostra directamente da sonda uterina, no primeiro compartimento, fazendo descer o conteúdo para o compartimento inferior. Posteriormente protegidas da luz solar; dobradas e numa posição vertical foram identificadas e seguiram para o laboratório SEGALAB à temperatura ambiente.

Todos os tubos, foram identificados com o número do touro e agrupados pela respectiva exploração.

Conforme objectivo inicial, foram abordados dois métodos de diagnóstico, o de exame direto com cultura e a confirmação de presença de *T. foetus*, por diagnóstico molecular (PCR), assim sendo, apenas se procedeu a uma colheita de amostra por touro.

### **3.4 Meios de cultura**

Durante a realização deste trabalho, o meio preferencial de crescimento de *T. foetus*, foi o meio Diamond`s. Uma vez obtidas as amostras, foram processadas e analisadas no Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro da Universidade de Évora, Departamento de Medicina Veterinária, foi também utilizado em duas explorações (Explorações 11 e 12) o kit comercial In Pouch™®, posteriormente analisado no Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar, S.A., SEGALAB (Figura 12).



Legenda: Figura A (meio de cultura Diamond`s e meio de transporte, Solução de PBS); Figura B (kit comercial de transporte/cultura In Pouch ®TM)

Figura 12. Meios de cultura e transporte usados no isolamento de *T. foetus* durante o estudo (arquivo pessoal 2012)

### 3.5 Transporte das amostras

As amostras recolhidas para o meio de cultura Diamond`s foram transportadas à temperatura ambiente (15 a 37°C), tendo sido entregues no Laboratório num período de tempo inferior a 6 horas, sendo que as amostras colocadas em solução de PBS, visando o diagnóstico molecular (PCR), foram transportadas numa mala térmica de temperatura controlável, acerca de 4°C.

Relativamente às amostras recolhidas para o kit comercial, seguiram pela transportadora à temperatura ambiente, chegando ao laboratório no prazo máximo de 24 horas.

### 3.6 Análise da amostra

Na maioria das amostras recolhidas, existe uma concentração baixa de protozoários, sendo necessário proceder à cultura e crescimento “*in vitro*”. Para isso as amostras, uma vez chegadas ao Laboratório, foram centrifugadas e inoculadas em novo meio de crescimento Diamond`s esterilizado, contendo este, um estabilizador de pH, antibióticos e antifúngicos. Posteriormente as amostras foram colocadas na incubadora a 37°C.

As amostras foram observadas ao microscópio em ampliações de 100x a 1000x, durante 3 dias de 12 em 12 horas. Para fixação do esfregaço, foi utilizado o metanol e o corante Giemsa.

A identificação ao microscópio do *T. foetus* baseou-se na forma piroforme, tamanho e movimento característico, ameboide. Sempre que surgiram dúvidas observou-se um controlo positivo. Trata-se de uma amostra de *T. foetus*, fundamental na comparação morfológica de outros protozoários semelhantes pertencentes à mesma Família.

As amostras transportadas no kit comercial, poderão ser directamente visualizadas sob a platina do microscópio (Figura 13).



Figura 13. Observação directa ao microscópio das amostras inoculadas no In Pouch®, arquivo pessoal (arquivo pessoal 2012)

### 3.7 Verificação por PCR

Como inicialmente previsto, independentemente dos resultados de identificação morfológica ao microscópio, procedeu-se à técnica de diagnóstico molecular por PCR para confirmação da presença de *T. foetus*.

As amostras individuais dos respectivos touros, previamente recolhidas para tubo com PBS, foram reunidas por exploração ou efectivo e conservadas a 4°C, obtendo-se 12 amostras pertencentes a 12 Explorações.

Resumidamente, foi extraído e purificado o DNA das 12 amostras, amplificado, e posteriormente interpretados os resultados por electroforese.

No Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro da Universidade de Évora, Departamento de Medicina Veterinária, procedeu-se à extracção e purificação do material genético das 104 amostras. Para tal foi utilizado um kit comercial (Qiagen, Netherlands), de extracção de DNA em tecidos animais, protocolo (*DNeasy® 96 Protocol*).

Seguindo o protocolo, fez-se extracção, através de um processo de lise da membrana celular dos protozoários, libertando o seu DNA, seguindo-se um processo de purificação da amostra, impedindo a sua contaminação e deste modo diminuindo a interferência directa no resultado da PCR.

Lise:

1. Pipetaram-se 200µL do conteúdo tubo que continha a amostra em PBS;
2. Juntaram-se 20µL de proteínase K e 200µL de Buffer AL, promovendo a lise, agitando-se num vortex (1000 rpm) durante

10`` (segundos), finalizando num termobloco a 56°C durante 20` (minutos), acelerando o processo.

3. Juntou-se 200µL de etanol, para precipitação do DNA e agitou-se no vortex 10``.

Para purificar o material obtido:

4. Colocou-se numa coluna de extracção de DNA, todo o conteúdo do tubo, decorrido o processo de lise, seguido de centrifugação (8000rpm) à temperatura ambiente durante 1`, eliminando-se a solução que passou pela coluna.

5. Seguidamente juntaram-se 500µL de Buffer AW1, sendo centrifugado a (8000rpm) à temperatura ambiente durante 1`, eliminando-se a solução que passou pela coluna.

6. Repetido o processo anterior, com a diferença de adição de 500µL de Buffer AW2, sendo centrifugado a (14000rpm) à temperatura ambiente durante 3`, eliminando-se a solução que passou pela coluna.

7. À coluna, foram adicionados 20µL de Buffer AE, deixou-se incubar durante 1` e de seguida centrifugado a (8000rpm) à temperatura ambiente durante 1`. Este processo foi executado 2 vezes, tendo-se recolhido de cada amostra cerca de 40µL de solução de DNA.

O material de DNA extraído e purificado foi conservado a uma temperatura de -20°C, até realizar o processo de amplificação por PCR. O restante processamento de ampliação do DNA, assim como a análise dos resultados de PCR por electroforese, decorreu no Institute of Parasitology of the Vetsuisse Faculty, University of Bern, Switzerland, levado a cabo pelo Professor Doutor Helder Cortes.

Como descrito anteriormente, a reacção de cadeia de polimerase, consistiu na ampliação sequencial da sequência específica 5.8s rRNA, resultando num produto com a dimensão de 347 pares de bases (pb).

O processo de ampliação do DNA, consistiu em:

Preparação das misturas para ampliação por PCR em câmara própria, diminuindo fontes de contaminação com aerossóis contendo DNA a baixas temperaturas (mantendo as amostras em gelo), para evitar a degradação de reagentes.

Foram adicionados dois oligonucleótidos “Primers” específicos, TFR3 (TFR3-5`CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3`)

e TFR4 (TFR4-5` CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3`), para o segmento a fragmentar, 5.8s rRNA. Seguidamente foi adicionado à preparação DNA polimerase, dNTPs, tampão e cloreto de magnésio e água até perfazer um volume de 25µL. A técnica consistiu em 40 ciclos repetidos em que se sucederam 3 fases a diferentes temperaturas:

- 1 Desnaturação do DNA (94°C) durante 30``
- 2 Emparelhamento dos “primers” (67°C) durante 30``
- 4 Extensão da sequência pela DNA Polimerase (72°C) durante 30``

Sendo o resultado final um produto de ampliação exponencial do fragmento inicialmente marcado.

Posteriormente as 12 amostras foram analisadas por electroforese em gel de agarose a 2%, com a aplicação de corante fluorescente de brometo de etídio para posterior visualização. Com aplicação de um potencial eléctrico, foi possível visualizar a migração das moléculas pela rede do poslissacárido. Moléculas com menor número de pb, percorreram maior distância. Nos diferentes poços, do gel de agarose foram pipetados de forma sequencial 1µL de: marcador de massa molecular  $\phi$ x174 RF ,DNA *Hae III digest* (Invitrogen®,EUA) de tamanho e concertação conhecida, facilitando a estimativa visual do

tamanho de fragmentos de DNA; controlo positivo de DNA de *T. foetus*; controlo negativo, água e as 12 amostras das 12 explorações retratadas no estudo.

Além do tampão adicionado, conferindo densidade e cor à solução, todas as amostras correram no gel de agarose em duplicado, estando uma delas em associação com o controlo interno, incluído na reacção de PCR.

### **3.8 Análise Estatística**

O tratamento estatístico dos resultados deste trabalho foi feito com recuso ao programa informático *Microsoft Excel® 2010*. Para o efeito foram executadas tabelas e gráficos correlacionando resultados obtidos no trabalho com fatores de risco e medidas preventivas adoptas nas diversas explorações analisadas.

## 4. RESULTADOS

Do total de 12 explorações pecuárias distribuídas por 6 concelhos do Alentejo (NUTSII), 104 touros foram analisados, em que 14 (n=14) foram recolhidas amostras por raspagem da cavidade prepúcial e 90 (n=90) por lavagem da cavidade prepúcial (Tabela 4).

Tabela 4. Representação da amostragem, sua localização e técnica utilizada

			<b>Técnica de amostragem</b>
<b>Explorações</b>	<b>Localização</b>	<b>Nº de Touros</b>	
Exploração 1	Gavião	6	Raspagem Prepúcial
Exploração 2	Coruche	2	Raspagem Prepúcial
Exploração 3	Benavente	3	Lavagem Prepúcial
Exploração 4	Coruche	3	Lavagem Prepúcial
Exploração 5	Mora	1	Lavagem Prepúcial
Exploração 6	Évora	9	Lavagem Prepúcial
Exploração 7	Mora	16	6 por Raspagem/10 por Lavagem
Exploração 8	Mora	2	Lavagem Prepúcial
Exploração 9	Benavente	12	Lavagem Prepúcial
Exploração 10	Coruche	9	Lavagem Prepúcial
Exploração 11	Cuba	13	Lavagem Prepúcial
Exploração 12	Cuba	28	Lavagem Prepúcial
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>104</b>	<b>(n=14) Raspagem Prepúcial</b> <b>(n=90) Lavagem Prepúcial</b>

Da amostragem, para este estudo constaram touros maioritariamente superiores a 3 anos de idade, representando 57% (n=62), da totalidade (Gráfico 3; 4). Foram também realizados exames andrológicos a 66% dos touros (n=69) e mencionado histórico de falha reprodutiva em 33% das explorações (n=4) (Gráfico 5;6).



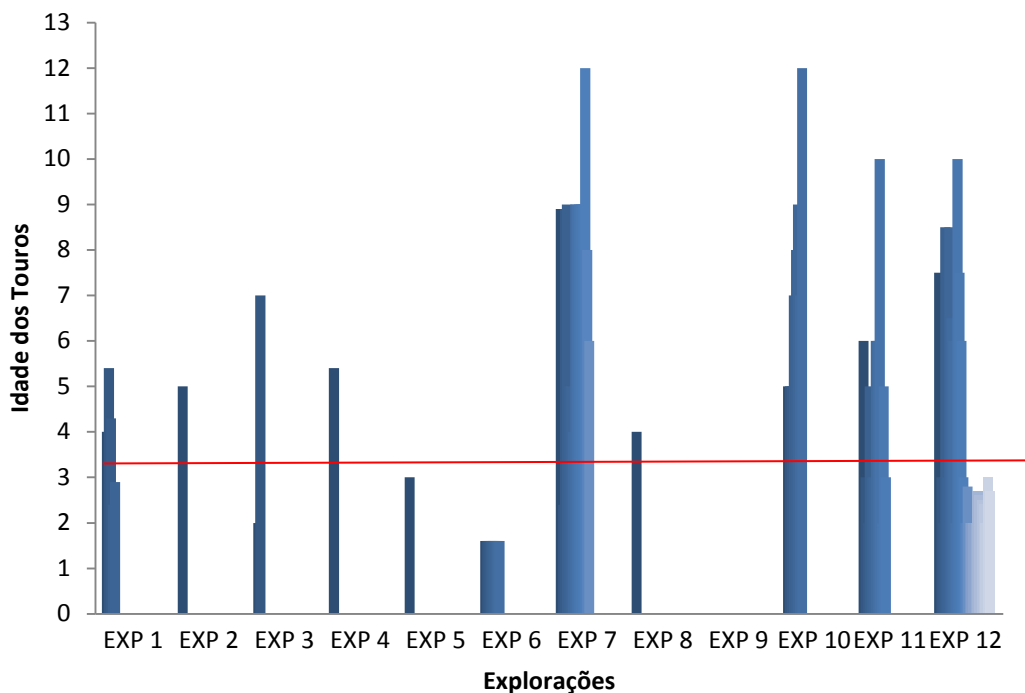
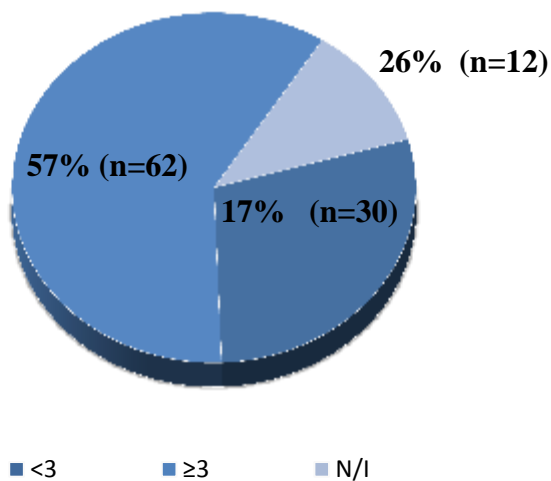


Gráfico 3. Representação da idade dos touros por exploração, analisados no estudo



Legenda: N/I – Não Identificado

Gráfico 4. Representatividade da idade dos touros analisados, <3 e ≥3 anos

## Presença de Falha Reprodutiva nas Explorações

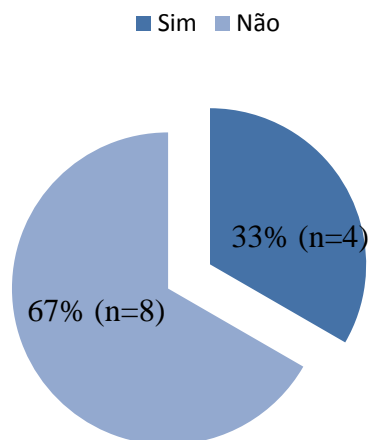


Gráfico 5. Quantificação da presença de falha reprodutiva nas 12 explorações inquiridas

## Realização do Exame Andrológico aos Touros

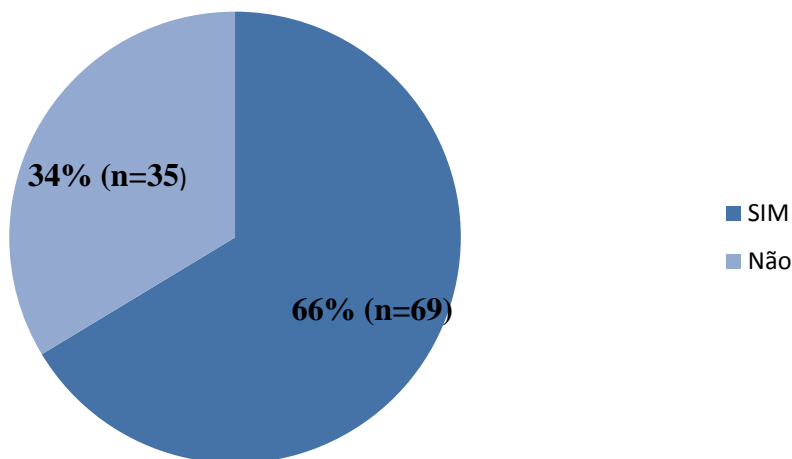


Gráfico 6. Representatividade de Exames Andrológicos

Os resultados finais obtidos do exame direto ao microscópio e cultura, bem como a confirmação pelo diagnóstico molecular por PCR (Figura 14), demonstraram ausência de *T. foetus* em todas as amostras prepúciais recolhidas (Tabela 5), exceptuando três resultados (Tabela 5) na exploração 1; 10 e 11, onde houve inibição da PCR e um falso

positivo (Tabela 6), na exploração 11, revelando esta amostra individual, colhida para In Pouch TM, ser um *Tetratrichomonas* spp, confirmando posteriormente, por PCR individual, a ausência de *T. foetus*.

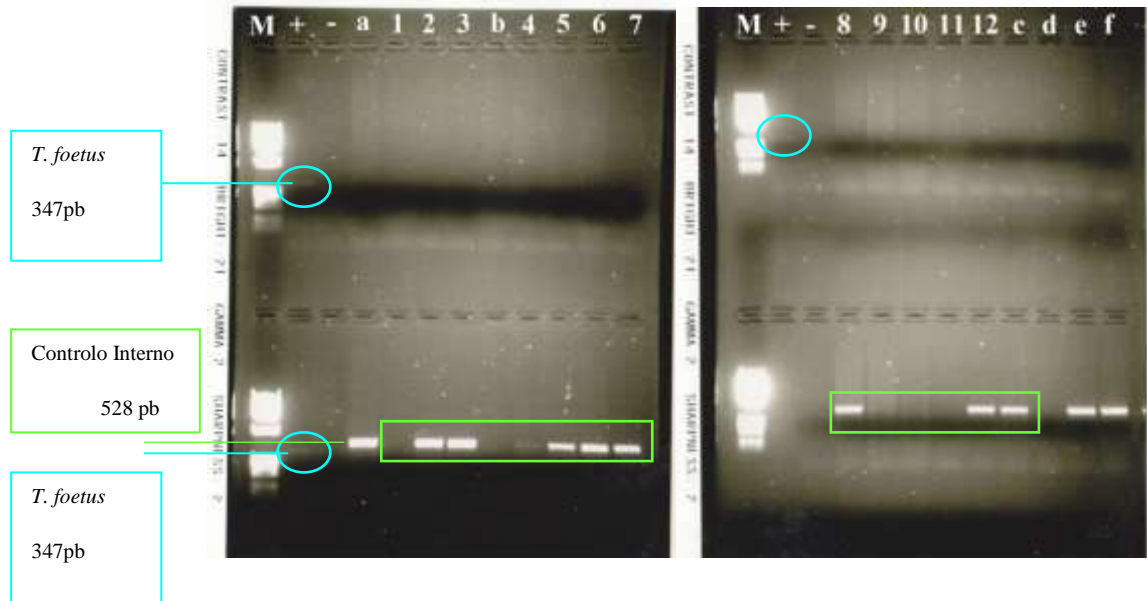
Tabela 5. Resultados obtidos do Laboratório de Parasitologia Vítor Caeiro, Universidade de Évora, no isolamento de *T. foetus*, na totalidade dos touros presentes no estudo

Explorações	Localização	Nº de Touros	Resultado laboratorial	
			Exame Direto/Cultura	Exame Molecular (PCR)
			<i>Tritrichomonas foetus</i>	
			Por touro	Por Exploração
			Meio de transporte/cultura	
			Solução de PBS/ Diamond	
Exploração 1	Gavião	6	NEGATIVO	INIBIÇÃO
Exploração 2	Coruche	2	NEGATIVO	NEGATIVO
Exploração 3	Benavente	3	NEGATIVO	NEGATIVO
Exploração 4	Coruche	3	NEGATIVO	NEGATIVO
Exploração 5	Mora	1	NEGATIVO	NEGATIVO
Exploração 6	Évora	9	NEGATIVO	NEGATIVO
Exploração 7	Mora	16	NEGATIVO	NEGATIVO
Exploração 8	Mora	2	NEGATIVO	NEGATIVO
Exploração 9	Benavente	12	NEGATIVO	NEGATIVO
Exploração 10	Coruche	9	NEGATIVO	INIBIÇÃO
Exploração 11	Cuba	13	NEGATIVO	INIBIÇÃO
Exploração 12	Cuba	28	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>104</b>	<b>(n=104)</b>	<b>(n=12)</b>

Tabela 6. Resultados obtidos do Laboratório SEGALAB, no isolamento de *T. foetus* e *C. fetus* sp *venerealis* na Exploração 11 e 12.

Explorações	Localização	Nº de Touros	Resultado laboratorial	
			Exame Direto/Cultura	
			<i>Tritrichomonas foetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i> sp. <i>Venerealis</i>
			Meio de transporte/cultura	Meio de transporte/cultura
			In Pouch ®TM	Weybridge /Skirrow
Exploração 11	Cuba	13	12 N / 1 P	13N
Exploração 12	Cuba	28	28N	28N
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>41</b>	<b>(n=40) N / (n=1) P</b>	<b>(n=41)N</b>

Legenda: P, positivo; N, negativo



Legenda: M, marcador de peso molecular  $\phi$ x174 RF, DNA *Hae III* digest (invitrogen); +, Controlo positivo, DNA de *T. foetus*, 347pb; -, controlo negativo, água; a;b;c;d;e;f, amostras não pertencentes ao estudo; 1;2;3;4;5;7;8;9;10;11 e 12, amostras respeitantes às explorações, recolhidas durante o estudo.

Figura 14. Análise por electroforese em gel de agarose a 2%, dos produtos resultantes de ampliação por PCR, das 12 explorações analisadas, no rastreio de *T. foetus*.

## 5. DISCUSSÃO

Com o aumento da prevalência mundial da tritrichomonose em efectivos de bovinos de carne explorados extensivamente (Ortega-Mora et al., 2007), este estudo contribuiu de forma simplificada para a análise da presença do agente infeccioso em explorações portuguesas e das dificuldades e limitações ao estudo, sugerindo práticas de prevenção, métodos de diagnóstico e formas de actuação face à presença de um surto clínico. A ausência de *T. foetus* no estudo (Tabela 4; 5 e Figura 14), poderá estar relacionada com o tamanho da amostra, sendo insuficiente os resultados para poder estimar a prevalência atual da TB em Portugal.

Das técnicas abordadas para recolha de amostra, o método por raspagem, revelou ser mais rápido, com menor contaminação bacteriana, no entanto foi detectada a presença de sangue nas amostras obtidas quer por raspagem, quer por lavagem pré-cial, podendo contribuir para inibição da PCR, facto que foi observado na exploração 1; 10 e 11 das 12 amplificações obtidas e que reforça a necessidade de incluir um controlo interno aquando do diagnóstico por PCR.

Diversos fatores externos poderão ter diminuído a sensibilidade do diagnóstico direto e cultura (Parker et al., 2003), como, falta de optimização na execução da técnica de recolha da amostra; contaminação, por fezes e urina; em alguns animais, o facto não se ter respeitado o repouso sexual e as condições de transporte para o laboratório. Alguns autores, apontam sensibilidade de 70,04% e especificidade de 95,7% no isolamento de *T. foetus* em recolhas de amostras prepúciais em touros, sendo recomendado 2 ou 4 culturas negativas (Perez et al., 2006).

Neste estudo e como objectivo inicial, apenas se procedeu uma recolha por touro (Tabela 3), confirmando-se os resultados obtidos, por PCR, estando descrito que no diagnóstico por exame direto com cultura,

uma só recolha por animal diminui a sensibilidade do diagnóstico, aumentando a possibilidade de falsos-negativos (Parker et al, 2003).

Constatou-se que a sensibilidade do meio Diamond`s e do meio comercial In Ppouch®, foram semelhantes nas Explorações 11 e 12 (Tabela 4 e 5), salientando a facilidade da utilização a campo, do meio de transporte e cultura comercial. Embora no estudo, o tempo de transporte das amostras, tenha sido inferior a 6 horas, diversos autores referem que, tempo superior a 24 horas, assim como altas temperaturas diurnas, diminuem a viabilidade do protozoário e a sensibilidade do diagnóstico (Kvasnicka et al., 1992), devendo, idealmente, a amostra chegar ao laboratório no início da semana, permitindo o seu processamento de forma seguida.

Na observação ao microscópio, a combinação da cultura ao exame direto, facilitou a pesquisa do agente etiológico, devido ao aumento esperado da sua concentração, contribuindo para o aumento da sensibilidade do diagnóstico. Ficou demonstrado a baixa especificidade, problema comum, em distinguir protozoários pertencentes à mesma Família, tendo sido encontrado um falso-positivo na exploração 11, tratando-se de um *Tetratrichomonas* spp, de origem intestinal apatogénico, comprovado individualmente negatividade a *T. foetus*, por PCR. A presença de células epiteliais, poderá indicar uma boa técnica de recolha de amostra, visto que o protozoário se localiza sobre o tecido epitelial, no entanto a presença de sangue poderá inibir o PCR, facto demonstrado nas explorações 1; 10 e 11 (Tabela 5). Sendo o segundo e terceiro dia, o mais apropriado para identificação do protozoário, quer pelo tempo decorrido de incubação, quer pelo menor crescimento bacteriano e fúngico, em algumas amostras houve crescimento bacteriano de *Pseudomonas* spp e *Bacillus* spp.

O diagnóstico por PCR, não se revelou influenciado pela técnica adotada na recolha das amostra prepúciais. Sendo que as amostras que continham sangue estiveram associadas à inibição da PCR.

O diagnóstico molecular, apresenta elevada especificidade e sensibilidade (Felleisen et al., 1998). No entanto a sensibilidade poderá diminuir, consoante a contaminação da amostra; a presença de enzimas segregadas pelo próprio protozoário e o tempo de preservação da amostra. Sendo uma técnica rápida, apresenta como benefício, a dispensa de vários dias de observação, por técnicos laboratoriais altamente especializados. No entanto deverá salientar-se que o primeiro passo para o diagnóstico da TB, deverá ser a cultura, apresentando uma sensibilidade aproximada de 90% (Ortega-Mora et al., 2007; Skirrow et al., 1985).

A introdução de uracil-DNA-Glicosilase (UDG), substituindo o nucleótido dTTP da mistura pelo nucleótido introduzido dUTP, teve a finalidade de evitar a contaminação cruzada, destruindo selectivamente os contaminantes do processo de ampliação de reacções anteriores. Desta forma, pela inactivação de UDG A 95°C, no termociclador, foi possível evitar falsos positivos no diagnóstico final.

Na eletroforese, a ausência do produto de ampliação, do fragmento do gene 5.8s r RNA, inicialmente seleccionado, devido à sua elevada especificidade permitiu concluir a ausência de *T. foetus* nas amostras recolhidas, respeitantes às 12 Explorações. Diferentes concentrações de agarose variam a eficiência de separação de diferentes tamanhos de DNA, revelando ser essencial o uso marcadores comerciais, na leitura final dos produtos amplificados. Foi também utilizado um controlo Interno (CI), constituído por cerca de 10 cópias de um fragmento de DNA recombinante, com o objectivo de detectar uma possível inibição da PCR. Para tal cada amostra foi preparada em duplicado, sendo que este se liga aos “primers” TFR3 e TFR4 dando origem a um produto de ampliação, com cerca de 528pb, superior ao tamanho do produto de diagnóstico (Ortega-Mora et al., 2007).

Na explorações 11 e 12, a par do isolamento de *T. foetus* foi efectuada pesquisa de *Campylobacter fetus* sbp *venerealis*, onde todos os animais foram negativos a ambos os agentes infecciosos. Sendo, a campilobacteriose um dos diagnósticos diferenciais a considerar como

causa de infertilidade num rebanho, será sempre de grande utilidade incluí-la, juntamente com a TB, como exame complementar do exame andrológico do touro. Recentemente um estudo feito no Alentejo, demonstrou existir em várias explorações patologia clínica, salientando o autor o carácter reemergente desta patologia em Portugal (Cartaxo Sousa, 2014)

Sustentando a hipótese de presença de TB, nas explorações analisadas, face aos resultados obtidos em questionário aos criadores/tratadores, relativamente ao histórico de falhas reprodutivas; à presença de vacas não gestantes; de abortos e conseqüente aumento o IEP do rebanho e tendo sido descartada a presença de *T. foetus*, nos rebanhos analisados, cabe ao Médico Veterinário responsável pela exploração o dever de incluir na lista de agentes etiológicos, outros diagnósticos diferenciais de doenças com implicação na reprodução, tais como: campilobacteriose, IBR; BVD; leptospirose; neosporose, entre outras, sustentando a sua escolha com os dados epidemiológicos locais.



## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu, para uma actualização dos dados epidemiológicos da tritrichomonose bovina em Portugal, sobretudo em animais de aptidão cárnea explorados extensivamente, não tendo sido isolado *T. foetus*, nos touros analisados.

Das amostras dos touros, recolhidas por lavagem e raspagem prepúcial, o exame direto e com cultura, revelou-se consistente com os resultados do prático, rápido e fiável, mas oneroso diagnóstico molecular, PCR. A chave do sucesso no diagnóstico laboratorial da tritrichomonose bovina, assenta na obtenção e processamento adequado das amostras a analisar, podendo a interpretação dos resultados falsos-negativos, justificarem a desvalorização desta patologia em Portugal, reforçando a necessidade de incluir o seu rastreio por rotina no exame andrológico. Foi também possível com este trabalho descrever algumas medidas a implementar face à entrada do agente infeccioso, num rebanho.

Podendo a tritrichomonose bovina em Portugal estar subdiagnosticada, em Espanha, em condições de exploração muito semelhantes, foram identificados animais positivos e com percentagens elevadas (Mendoza-Ibarra et al., 2012). Reconhecendo, que a produtividade das explorações pecuárias está directamente relacionada com a eficiência reprodutiva dos efectivos, o primeiro passo para o diagnóstico de problemas reprodutivos deverá ter por base os registos dos índices de produção e o histórico de problemas que orientem a recolha adequada de material para análise.

Compete ao Médico Veterinário assistente da exploração, a consciencialização dos proprietários da necessidade de prevenção e do impacto económico, bem como da vigilância contínua dos rebanhos mais susceptíveis, incluindo a pesquisa de agentes venéreos infecciosos no exame andrológico do touro. O papel do Laboratório e seus técnicos

responsáveis, assume especial importância, na orientação da técnica de recolha de amostras e seu transporte, contribuindo o seu êxito para a fiabilidade dos resultados do diagnóstico.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Taylor, M. F. J. R. (2005). The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399–451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>
- Benchimol, M., de Andrade Rosa, I., da Silva Fontes, R., & Burla Dias, A. J. (2008). Trichomonas adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitology Research*, 102(4), 597–604. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0793-3>
- BonDurant, R. H. (1997). Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 13(2), 345–361.
- BonDurant, R. H. (2005). Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 21(2), 383–408. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2005.03.002>
- BonDurant, R. H. (2007). Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology*, 68(3), 461–473. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.022>
- BonDurant, R. H., Anderson, M. L., Blanchard, P., Hird, D., Danaye-Elmi, C., Palmer, C., Weigler, B. J. (1990). Prevalence of trichomoniasis among California beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196(10), 1590–1593.
- Campero, C. M., Rodriguez Dubra, C., Bolondi, A., Cacciato, C., Cobo, E., Perez, S., BonDurant, R. H. (2003). Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-T. foetus trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. *Veterinary Parasitology*, 112(3), 167–175.
- Canas Simões, J. P. (2010). *Exame Adrológico de Bovinos*. Apresentado na Pós Graduação em Clínica, Reprodução, Maneio, Economia e Epidemiologia de Ruminantes.
- Cartaxo Sousa, R. D. (2014). *Campilobacteriose Genital em Touros mantidos em extensivo no Alentejo*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

- Casteriano, A., Molini, U., Kandjumbwa, K., Khaiseb, S., Frey, C. F., & Šlapeta, J. (2016). Novel genotype of *Tritrichomonas foetus* from cattle in Southern Africa. *Parasitology*, *143*(14), 1954–1959. <https://doi.org/10.1017/S003118201600158X>
- Christensen, H. R., Clark, B. L., & Parsonson, I. M. (1977). Incidence of *Tritrichomonas foetus* in young replacement bulls following introduction into an infected herd. *Australian Veterinary Journal*, *53*(3), 132–134.
- Clark, B. L., Dufty, J. H., & Parsonson, I. M. (1983a). Immunisation of bulls against trichomoniasis. *Australian Veterinary Journal*, *60*(6), 178–179.
- Clark, B. L., Dufty, J. H., & Parsonson, I. M. (1983b). The effect of *Tritrichomonas foetus* infection on calving rates in beef cattle. *Australian Veterinary Journal*, *60*(3), 71–74.
- Clothier, K. A., Villanueva, M., Torain, A., Hult, C., & Wallace, R. (2015). Effects of bacterial contamination of media on the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* by culture and real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, *208*(3–4), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.006>
- Cobo, E. R., Corbeil, L. B., & BonDurant, R. H. (2011). Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. *Journal of Reproductive Immunology*, *89*(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.02.002>
- Cobo, E. R., Corbeil, L. B., Gershwin, L. J., & BonDurant, R. H. (2009a). Preputial cellular and antibody responses of bulls vaccinated and/or challenged with *Tritrichomonas foetus*. *Vaccine*, *28*(2), 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.039>
- Cobo, E. R., Corbeil, L. B., Gershwin, L. J., & BonDurant, R. H. (2009b). Preputial cellular and antibody responses of bulls vaccinated and/or challenged with *Tritrichomonas foetus*. *Vaccine*, *28*(2), 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.039>
- Collantes-Fernández, E., Mendoza-Ibarra, J. A., Pedraza-Díaz, S., Rojo-Montejo, S., Navarro-Lozano, V., Sánchez-Sánchez, R., ... Osoro, K. (2014). Efficacy of a control program for bovine trichomonosis based on testing and culling infected bulls in beef cattle managed under mountain pastoral systems of Northern Spain. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, *200*(1), 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.003>
- Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology*, *43*(4), 488–490.
- Duboucher, C., Cabay, S., Dufernez, F., Chabé, M., Gantois, N., Delgado-Viscogliosi, P., Viscogliosi, E. (2006). Molecular identification of *Tritrichomonas foetus*-like

- organisms as coinfecting agents of human Pneumocystis pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1165–1168. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1165-1168.2006>
- EUR-Lex. (1988). (88/407/EEC) Acedido em Agosto de 2017: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A01988L0407-20111101>
- Felleisen, R. S. (1999). Host-parasite interaction in bovine infection with Tritrichomonas foetus. *Microbes and Infection*, 1(10), 807–816.
- Felleisen, R. S., Lambelet, N., Bachmann, P., Nicolet, J., Müller, N., & Gottstein, B. (1998). Detection of Tritrichomonas foetus by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 513–519.
- Frey, C. F., & Müller, N. (2012). Tritrichomonas--systematics of an enigmatic genus. *Molecular and Cellular Probes*, 26(3), 132–136.
- García Guerra, A., Hill, J. E., Campbell, J., Waldner, C. L., & Hendrick, S. H. (2014). Use of pooled protozoal cultures of preputial scraping samples obtained from bulls for the detection of Tritrichomonas foetus by means of a real-time polymerase chain reaction assay. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(3), 352–356. <https://doi.org/10.2460/javma.244.3.352>
- Gay, J. M., Ebel, E. D., & Kearley, W. P. (1996). Commingled grazing as a risk factor for trichomonosis in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209(3), 643–646.
- Geoffrey H. Arthur, D. E. N. (2001). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics* (8 edition). London: Saunders Ltd.
- Gookin, J. L., Breitschwerdt, E. B., Levy, M. G., Gager, R. B., & Benrud, J. G. (1999). Diarrhea associated with trichomonosis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 215(10), 1450–1454.
- Hodgson, J. L., Jones, D. W., Widders, P. R., & Corbeil, L. B. (1990). Characterization of Tritrichomonas foetus antigens by use of monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, 58(9), 3078–3083.
- Hopkins, F. M., & Spitzer, J. C. (1997). The new Society for Theriogenology breeding soundness evaluation system. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 13(2), 283–293.
- Khitam, J. Y., & May, (primeiro)H. Kawan2. (2016, Julho). STUDY THE PREVALENCE OF BOVINE TRICHOMONIASIS OF CATTLES IN BAGHDAD (ABU-GRAIB) BY

USING IN-POUCH CULTURE DIAGNOSTIC SYSTEM. *International Journal of Recent Scientific Research*, pp. 12580–12584.

- Kvasnicka, W. G., Hanks, D., Huang, J. C., Hall, M. R., Sandblom, D., Chu, H. J., ... Acree, W. M. (1992). Clinical evaluation of the efficacy of inoculating cattle with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. *American Journal of Veterinary Research*, 53(11), 2023–2027.
- Love, D., Fajt, V. R., Hairgrove, T., Jones, M., & Thompson, J. A. (2017). Metronidazole for the treatment of *Tritrichomonas foetus* in bulls. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0999-2>
- Lun, Z.-R., Chen, X.-G., Zhu, X.-Q., Li, X.-R., & Xie, M.-Q. (2005). Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends in Parasitology*, 21(3), 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.12.001>
- Manual Terrestre OIE - *World Organisation for Animal Health*. (2012) (7<sup>a</sup>). Obtido de <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/>
- Mehlhorn, H. (Ed.). (2016). *Encyclopedia of Parasitology* (4th ed. 2016 edition). New York, NY: Springer, 2844–2852
- Mendoza-Ibarra, J. A., Pedraza-Díaz, S., García-Peña, F. J., Rojo-Montejo, S., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., San Miguel-Ibáñez, E., ... Collantes-Fernandez, E. (2012). High prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in Asturiana de la Montaña beef cattle kept in extensive conditions in Northern Spain. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 193(1), 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.020>
- Midlej, V., Vilela, R., Dias, A. B., & Benchimol, M. (2009). Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. *Veterinary Parasitology*, 165(3–4), 216–230. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.021>
- Molina, L., Perea, J., Meglia, G., Angón, E., & García, A. (2013). Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Preventive Veterinary Medicine*, 110(3–4), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.019>
- Morin-Adeline, V., Mueller, K., Conesa, A., & Šlapeta, J. (2015). Comparative RNA-seq analysis of the *Tritrichomonas foetus* PIG30/1 isolate from pigs reveals close association with *Tritrichomonas foetus* BP-4 isolate «bovine genotype». *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.012>

- Okamoto, S., Wakui, M., Kobayashi, H., Sato, N., Ishida, A., Tanabe, M., ... Ikeda, Y. (1998). Trichomonas foetus meningoencephalitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 21(1), 89–91. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701032>
- Ondrak, J. D. (2016). Tritrichomonas foetus Prevention and Control in Cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 32(2), 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.010>
- Ortega-Mora, L., Gottstein, B., Conraths, F., & Buxton, D. (2007). *Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control* (First edition). Wallingford, UK ; Cambridge, MA: CABI,232-262
- Parker, S., Campbell, J., & Gajadhar, A. (2003). Comparison of the diagnostic sensitivity of a commercially available culture kit and a diagnostic culture test using Diamond's media for diagnosing Tritrichomonas foetus in bulls. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 15(5), 460–465. <https://doi.org/10.1177/104063870301500510>
- Parker, S., Campbell, J., Ribble, C., & Gajadhar, A. (2003). Sample collection factors affect the sensitivity of the diagnostic test for Tritrichomonas foetus in bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 67(2), 138–141.
- Pereira-Neves, A., Campero, C. M., Martínez, A., & Benchimol, M. (2011). Identification of Tritrichomonas foetus pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Veterinary Parasitology*, 175(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.007>
- Perez, A., Cobo, E., Martínez, A., Campero, C., & Späth, E. (2006). Bayesian estimation of Tritrichomonas foetus diagnostic test sensitivity and specificity in range beef bulls. *Veterinary Parasitology*, 142(1–2), 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.021>
- Rae, D. O. (1989b). Impact of trichomoniasis on the cow-calf producer's profitability. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 194(6), 771–775.
- Rae, D. O., Chenoweth, P. J., Genho, P. C., McIntosh, A. D., Crosby, C. E., & Moore, S. A. (1999). Prevalence of Tritrichomonas fetus in a bull population and effect on production in a large cow-calf enterprise. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214(7), 1051–1055.

- Rae, D. O., Crews, J. E., Greiner, E. C., & Donovan, G. A. (2004a). Epidemiology of Tritrichomonas foetus in beef bull populations in Florida. *Theriogenology*, 61(4), 605–618.
- Rhyan, J. C., Wilson, K. L., Burgess, D. E., Stackhouse, L. L., & Quinn, W. J. (1995). Immunohistochemical detection of Tritrichomonas foetus in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, 7(1), 98–101. <https://doi.org/10.1177/104063879500700116>
- Rhyan, J. C., Wilson, K. L., Wagner, B., Anderson, M. L., BonDurant, R. H., Burgess, D. E., ... Corbeil, L. B. (1999). Demonstration of Tritrichomonas foetus in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. *Veterinary Pathology*, 36(5), 406–411. <https://doi.org/10.1354/vp.36-5-406>
- Robalo Silva, J., & Lopes da Costa, L. (2010). Avaliação da função reprodutiva do touro para sistemas de produção em extensivo: componentes da avaliação, protocolos e guia de interpretação. *Revista Portuguesa de Buiatria*, 14(15).
- Silva, N. S., Ribeiro, C. de M., Machado, A. H. A., & Pacheco-Soares, C. (2007). Ultrastructural changes in Tritrichomonas foetus after treatments with AlPcS4 and photodynamic therapy. *Veterinary Parasitology*, 146(1–2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.006>
- Skirrow, S. (1987). Identification of trichomonad-carrier cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 191(5), 553–554.
- Skirrow, S., BonDurant, R., Farley, J., & Correa, J. (1985). Efficacy of ipronidazole against trichomoniasis in beef bulls. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(4), 405–407.
- Stockdale, H. D., Dillon, A. R., Newton, J. C., Bird, R. C., Bondurant, R. H., Deinnocentes, P., ... Blagburn, B. L. (2008). Experimental infection of cats (Felis catus) with Tritrichomonas foetus isolated from cattle. *Veterinary Parasitology*, 154(1–2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.024>
- Strickland, L. G. (2010, Agosto 9). *Surface Architectural Anatomy of The Penile and Preputial Epithelium of Bulls*. Auburn University, Auburn, Alabama. Obtido de <https://etd.auburn.edu/handle/10415/2216>
- Suzuki, J., Kobayashi, S., Osuka, H., Kawahata, D., Oishi, T., Sekiguchi, K., ... Iwata, S. (2016). Characterization of a human isolate of Tritrichomonas foetus (cattle/swine



- genotype) infected by a zoonotic opportunistic infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78(4), 633–640. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0644>
- Tachezy, J., Tachezy, R., Hampl, V., Sedinová, M., Vanacová, S., Vrlík, M., Kuldaa, J. (2002). Cattle pathogen tritrichomonas foetus (Riedmüller, 1928) and pig commensal Tritrichomonas suis (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(2), 154–163.
- Thundathil, J. C., Dance, A. L., & Kastelic, J. P. (2016). Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology*, 86(1), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.054>
- Vale, J. M. (1949). *Gado Bissulco. A Terra e o Homem*. Livraria Sá da Costa.
- Villarroel, A., Carpenter, T. E., & BonDurant, R. H. (2004). Development of a simulation model to evaluate the effect of vaccination against Tritrichomonas foetus on reproductive efficiency in beef herds. *American Journal of Veterinary Research*, 65(6), 770–775.
- Yao, C. (2013). Diagnosis of Tritrichomonas foetus-infected bulls, an ultimate approach to eradicate bovine trichomoniasis in US cattle? *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt 1), 1–9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.047365-0>
- Zanin, H., Margraf-Ferreira, A., da Silva, N. S., Marciano, F. R., Corat, E. J., & Lobo, A. O. (2014). Graphene and carbon nanotube composite enabling a new prospective treatment for trichomoniasis disease. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 41, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.020>
- Zimmer, K. R., Seixas, A., Conceição, J. M., Zvoboda, D. A., Barros, M. P., Tasca, T., Termignoni, C. (2013). Cattle tick-associated bacteria exert anti-biofilm and anti-Tritrichomonas foetus activities. *Veterinary Microbiology*, 164(1–2), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.029>

## APÊNCICES

Anexo I – Questionário de manejo reprodutivo na exploração e listagem de colheita de amostras.

DADOS DA EXPLORALÃO	Estatuto Sanitário	T. efectivo	Proporção touro/VACAS	Vacinação	História de Problemas reproductivos
Exploração 1 ; Gavião	B3 T3 L4	160	1T/25V	não	6Abortos /20Vacas
Exploração 2, Coruche	B3 T3 L4	120	1T/60V	não	N/I
Exploração 3, Benavente	B4 T3 L4	80	1T/25V	não	N/I
Exploração 4; Coruche	B3 T3 L4	120	1T/40V	não	N/I
Exploração 5; Mora	B3 T2 L4	70	1T/70V	não	N/I
Exploração 6; Évora	B3 T3 L4	254	1T/50V	não	N/I
Exploração 7; Mora	B3 T3 L4	375	1T/75V	não	20Abortos
Exploração 8; Mora	B3 T3 L4	200	1T/100V	não	N/I
Exploração 9; Benavente	B3 T3 L4	276	1T/50V	não	20Abortos/70Vacas
Exploração 10; Coruche	B3 T3 L5	N/I	N/I	N/I	N/I
Exploração 11; Cuba	B3 T3 L6	N/I	N/I	N/I	50não prenhas/140 à cobrição
Exploração 12; Cuba	B3 T3 L7	N/I	N/I	N/I	N/I

Técnica de recolha prepuccial						
DATA AMOS	DADOS DO TOURO					
	Exploração/ Localização G	Nº Touro	Raça/Idade	Origem	same Andrológi	Notas
21-11-2011	Exploração 1; Gavião	1	Limousine;4A	Compra	sim	Amostra Raspagem
		2	Limousine;2 e 4 M	Compra	sim	Amostra Raspagem
		3	Limousine;5 e 4 M	Compra	sim	Amostra Raspagem
		4	Limousine;4 e 3 M	Compra	sim	Amostra Raspagem
		5	Limousine;2 e 4 M	Compra	não	Amostra Raspagem
24-11-2011	Exploração 2, Coruche	6	CZ Limousine;2 e 9 M	Casa	não	Amostra Raspagem
		7	Limousine;5 A	Compra	não	Amostra Raspagem
		8	Limousine;5A	Compra	não	Amostra Raspagem
20-12-2011	Exploração 3, Benavente	9	Limousine;2A	Compra	sim *	Amostra L. Prepuccial
		10	Limousine;7A	Compra	sim *	Amostra L. Prepuccial
		11	Limousine;7A	Compra	sim *	Amostra L. Prepuccial
23-12-2011	Exploração 4; Coruche	12	Limousine;5A e 4M	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		13	Blonde d'A.; 11A e 7M	Importação	não	Amostra L. Prepuccial
10-01-2011	Exploração 5; Mora	14	Limousine;3A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		15	Limousine; 3A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
17-01-2011	Exploração 6; Évora	16	Raça Alentejana;1A e 6M	Casa	sim*	Amostra L. Prepuccial
		17	Raça Alentejana;1A e 6M	Casa	sim*	Amostra L. Prepuccial
		18	Raça Alentejana;1A e 6M	Casa	sim*	Amostra L. Prepuccial
		19	Raça Alentejana;1A e 6M	Casa	sim*	Amostra L. Prepuccial
		20	Raça Alentejana;1A e 6M	Casa	sim*	Amostra L. Prepuccial
		21	Raça Alentejana;1A e 6M	Casa	sim*	Amostra L. Prepuccial
		22	Raça Alentejana;1A e 6M	Casa	sim*	Amostra L. Prepuccial
		23	Raça Alentejana;1A e 6M	Casa	sim*	Amostra L. Prepuccial
		24	Raça Alentejana;1A e 6M	Casa	sim*	Amostra L. Prepuccial
		25	Limousine;8A e 9M	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
06-02-2012	Exploração 7; Mora	26	Limousine;8A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		27	Limousine;2A e 4M	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		28	Limousine;8A e 9M	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		29	Limousine;9A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		30	Limousine;5A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
16-02-2012		31	Limousine;5A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		32	Limousine;4A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		33	Limousine;9A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		34	Limousine;9A	Compra	não	Amostra Raspagem
		35	Limousine;9A	Compra	não	Amostra Raspagem
17-02-2012		36	Limousine;9A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		37	Limousine;9A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		38	Limousine;12A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
23-02-2012		39	Alentejano;8A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		40	Alentejano;6A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
23-02-2012	Exploração 8; Mora	41	Limousine;4A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
		42	Limousine;4A	Compra	não	Amostra L. Prepuccial
29-02-2012	Exploração 9; Benavente	43	Limousine	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		44	Alentejano	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		45	Limousine	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		46	Alentejano	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		47	Limousine	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		48	Alentejano	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		49	Limousine	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		50	Limousine	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		51	Limousine	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		52	Limousine	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		53	Limousine	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		54	Limousine	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		01-03-2012	Exploração 10; Coruche	55	Limousine; 5A	N/I
56	Limousine; 8A			N/I	Não	Amostra L. Prepuccial
57	Limousine; 5A			N/I	Não	Amostra L. Prepuccial
58	Limousine; 5A			N/I	Não	Amostra L. Prepuccial
59	Limousine; 7A			N/I	Não	Amostra L. Prepuccial
08-03-2012		60	Limousine; 8A	N/I	Não	Amostra L. Prepuccial
		61	Limousine; 9A	N/I	Não	Amostra L. Prepuccial
		62	Limousine; 7A	N/I	Não	Amostra L. Prepuccial
		63	Limousine; 12A	N/I	Não	Amostra L. Prepuccial
19-09-2012	Exploração 11; Cuba	64	Limousine; 6A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		65	Limousine; 3A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		66	Limousine; 3A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		67	Limousine; 2A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		68	Limousine; 5A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		69	Limousine; 3A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		70	Limousine; 3A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		71	Limousine; 6A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		72	Limousine; 6A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		73	Limousine; 10A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		74	Limousine; 2A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		75	Limousine; 5A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		76	Limousine; 3A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		26-09-2012	Exploração 12; Cuba	77	Limousine; 7,5A	N/I
78	Limousine; 7,5A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
79	Limousine; 3A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
80	Limousine; 2A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
81	Limousine; 8,5A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
82	Limousine; 3A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
83	Limousine; 8,5A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
84	Limousine; 6,5A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
85	Limousine; 6A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
86	Limousine; 3A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
87	Limousine; 10A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
88	Limousine; 7,5A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
89	Limousine; 6A			N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
02-10-2012				90	Limousine; 3A	N/I
		91	Limousine; 2A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		92	Limousine; 2,8A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		93	Limousine; 2A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		94	Limousine; 2A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		95	Limousine; 2A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		96	Limousine; 2A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		97	Limousine; 2,7A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		98	Limousine; 2,6A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		99	Limousine; 2,5A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		100	Limousine; 2,4A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		101	Limousine; 2A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		102	Limousine; 3A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
		103	Limousine; ?	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial
104	Limousine; 2,7A	N/I	SIM	Amostra L. Prepuccial		

Anexo II – Exame Andrológico, Exemplo de modelo praticado.

**Relatório de avaliação da função reprodutiva do touro**

Proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Identificação do touro:  
Nº SIA \_\_\_\_\_ Nº do brinco \_\_\_\_\_ Raça \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Outra identificação \_\_\_\_\_

Justificação do pedido: \_\_\_\_\_

Data do exame: \_\_\_\_\_

Exame físico:

1. Anomalias físicas relacionadas com a reprodução\*: \_\_\_\_\_

2. Circunferência escrotal: \_\_\_\_\_ cm \*\*

3. Morfologia e consistência das caudas dos epidídimos\*\*\*: \_\_\_\_\_

4. Simetria, regularidade e consistência dos testículos\*\*\*: \_\_\_\_\_

5. Cordões espermáticos, prepúcio e pênis\*\*\*: \_\_\_\_\_

\* No dia do exame não foram identificadas anomalias físicas capazes de provocar redução do potencial reprodutivo (caso tenham sido, preencher em concordância)  
\*\*Está acima, dentro do, abaixo do padrão para um animal desta idade.  
\*\*\*Consistentes com função normal (havendo anomalias, preencher em concordância)

Características do ejaculado:

Volume: \_\_\_\_\_ mL      Concentração: \_\_\_\_\_ x 10<sup>6</sup> /mL

Mobilidade massal: \_\_\_\_\_      Mobilidade Individual: \_\_\_\_\_ %

Anomalias morfológicas: \_\_\_\_\_ %      Tipo: \_\_\_\_\_

Classificação do Touro: \_\_\_\_\_

Comentários e Conclusões:

Data: \_\_\_\_\_

Identificação e assinatura do médico veterinário: \_\_\_\_\_