

INCIDÊNCIA DA *TRICHOMONAS FOETUS* Riedmüller, 1928, EM TOUROS USADOS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NO ESTADO DE SÃO PAULO *

(*TRICHOMONAS FOETUS* IN BULLS FROM ARTIFICIAL INSEMINATION CENTERS IN S. PAULO STATE)

ERNESTO XAVIER RABELLO
Biólogo do Departamento da Produção Animal

2 estampas (3 figuras)

INTRODUÇÃO

O presente trabalho é o resultado preliminar de pesquisas realizadas em postos de inseminação artificial a fim de observarmos a incidência da *Trichomonas foetus* Riedmüller, 1928 (fig. 1), no Estado de São Paulo.

MAZZANTI, na Itália, em 1900, verificou pela primeira vez a presença de *Trichomonas* em vacas estéreis enviadas ao matadouro. Seu achado não suscitou a atenção merecida e foi somente em 1928 que RIEDMÜLLER descreveu a espécie e fez sentir a sua importância como causa do aborto precoce e esterilidade nos bovinos.

Desde então vários pesquisadores em todo o mundo assinalam a presença da *Trichomonas foetus*, contaminando os rebanhos.

A importância da *Trichomonas foetus*, em Medicina Veterinária, é devida principalmente aos avultados prejuízos econômicos que esse protozoário acarreta.

Ao lado de outras alterações, a perda de valor das vacas atacadas pela protozoose é grande, devido ao emagrecimento característico.

SCHOOP (em Roehe, 1948) focalizou este assunto em 14 distritos da Alemanha, abrangendo 46 regiões. Cada região possuía em média 200 vacas, das quais cerca de 80 eram estéreis ou haviam abortado.

* Trabalho do Departamento de Parasitologia (Diretor: Prof. Samuel B. Pessoa) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Departamento da Produção Animal (Diretor: Dr. Quineu Corrêa) da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. Apresentado ao II Congresso Pan-Americano de Medicina Veterinária, realizado em São Paulo, 3 a 10 de abril de 1954.

A perda de leite, por animal, foi calculada em 1.000 l anuais, representando 80.000 l em cada região e 3.680.000 l em tôda a área estudada. Ainda se perderam 3.680 bezerros. Todos êsses prejuizos foram devidos à infecção pela *Trichomonas foetus* nos rebanhos aludidos.

ABELEIN (1934), também na Alemanha, concluiu que a percentagem de nascimentos de bezerros baixa consideravelmente, quando a criação é atacada pela referida protozoose.

GOULD (1941), nos Estados Unidos, ainda menciona os prejuizos consideráveis devidos ao mesmo agente causal.

Segundo WAGNER e HEES (1937), após extensas investigações levadas a efeito em Giessen, ficou provado que o gado vaccum dessa região se apresentava muito parasitado pela *Trichomonas foetus*. Os danos causados na criação por essa moléstia, em Wiesbaden, determinaram a proibição da cobertura de vacas atacadas pelas *Trichomonas*.

HARTMANN-SCHILLING (1917) atribuem êsse emagrecimento a uma alteração de albumina, cuja regeneração é por outro lado muito diminuída. O tecido gorduroso mostra-se pouco alterado. Por isso, relatam WAGNER e HEES (op. cit.), não é de admirar que as suas primeiras pesquisas terapêuticas, se bem que tacteantes, mostrassem nos animais tratados um surpreendente aumento de pêso e visível robustecimento, em contraste com os não tratados.

Como se vê, pelos poucos trabalhos acima citados, verifica-se a grande importância econômica da Tricomonose bovina. Entretanto, essa protozoose tem sido pouco investigada entre nós. PINTO (1938) afirmava que, embora a *Trichomonas foetus* não tivesse sido assinalada no Brasil, devia ser certa a sua presença entre nós.

E com efeito, ROEHE (1948) deu à publicidade um trabalho permitindo concluir que a Tricomonose bovina existe há vários anos e está bastante disseminada entre o gado leiteiro localizado nos arredores de Pôrto Alegre.

Examinando quatro criações, encontrou o parasita em três.

Por circulares e informações verbais do Dr. Antonio Mies Filho e Dr. Mario Rubens de Mello, já foram vistos diversos casos desta protozoose na Baixada Fluminense, estando os técnicos do Ministério no momento trabalhando arduamente em outros Estados da Federação para assinalarem êste parasita.

No que diz respeito ao Estado de São Paulo, a única referência que encontrámos foi a apresentada na 8ª Reunião Anual da Sociedade

Paulista de Medicina Veterinária, em 4 de novembro de 1952, por D'APICE e MELLO (Ocorrência de Trichomoníase bovina em São Paulo).

Com efeito, se em outros países se vem demonstrando a importância dessa tricomonose para a pecuária, mister se fazem investigações sistemáticas sobre a mesma entre nós, para avaliar sua incidência, estudar os malefícios e, por fim, poder assentar os meios de combatê-la.

Nesta primeira nota, vamos apenas focalizar os nossos primeiros dados obtidos no Estado de São Paulo.

Resolvemos iniciar as nossas pesquisas pelo exame de touros que são usados para a inseminação artificial.

Dividimos o nosso trabalho em duas partes: fizemos exame clínico dos animais e em seguida procedemos à pesquisa de *T. foetus*.

Assim estudamos 44 animais. Nenhum apresentava qualquer perturbação geral ou local por ocasião do exame. Entretanto, em 4 dos mesmos, ou seja, em 9,09%, pudemos verificar a presença da *T. foetus*, conforme demonstra o quadro I.

Dêses animais, 29 foram submetidos apenas a um exame, mas os restantes foram examinados de duas até cinco vezes. Observamos casos em que animais com um primeiro exame negativo se tornaram positivos em exames subseqüentes. Por outro lado, animais positivos podem apresentar-se negativos em exames posteriores. Tal fato tem muita importância, pois indica que, quando se deseja saber a incidência do protozoário entre êses animais, não se pode contentar com um só exame.

TÉCNICA DE ESTUDO

Resolvemos fazer a pesquisa direta do parasita que era examinado a fresco entre lâmina e lamínula e sob coloração pelo processo de Laveran e pela hematoxilina férrica segundo a técnica de AMARAL e RAMALHO (comunicação verbal).

Damos nas figs. 2 e 3 um desenho do protozoário corado pelos dois métodos, lâminas 18 e 19, respectivamente (Col. D.P.A.).

O método de Laveran permite um melhor estudo dos flagelos e membrana ondulante, mas o da hematoxilina férrica fornece melhores detalhes da estrutura nuclear.

Em nossas pesquisas usamos a seguinte técnica de rotina para coleta de material, preparação e diagnóstico.

N° de touros examinados	Idade dos touros	Positivos — Técnica usada				Positivos	
		Lavagem prepúcio		Líquido seminal		Raça	Procedência
		Positivos	%	Positivos	%		
20	1½ a 3 anos	—	—	—	—	Holandêsa preto e branco	Capital
11	3½ a 5 anos	—	—	—	—		2 U.S.A.
4	5½ a 7 anos	1	25,00%	1	25,00%		e
7	7½ a 9 anos	3	42,85%	—	—		1 Caçapava S.P.
2	9½ a 11 anos	—	—	—	—		
Total — 44		4	9,09%	1	2,27%		

Quadro n° 1 — Incidência da *Trichomonas foetus* Riedmüller, 1928 nos touros examinados.

1 — *Coleta de material*

Toilette

- a) Cortar os pêlos do orifício do prepúcio.
- b) Lavar externamente com água corrente e sabão a região prepucial.
- c) Enxugar com pano limpo e sêco (um pano para cada animal).

2 — *Material para as diversas coletas (*)*

- a) Cânula de borracha de 0,5 cm de diâmetro por 25 cm de comprimento.
- b) Seringa de vidro de 20 ml no mínimo.
- c) Funil de vidro de 10 cm de diâmetro.
- d) Erlenmeyer de 200 ml.
- e) Solução fisiológica estéril (para lavagem do prepúcio): 20 ml para cada animal.
- f) Tubos de ensaio (para transporte do material para o laboratório e para exame no campo; 1 tubo para cada tipo de coleta que se vai fazer).
- g) Vagina artificial (para coleta do sêmen).

3 — *Técnica de coleta de secreção do prepúcio*

- a) Contenção do animal.
- b) Introduzir no prepúcio a cânula de borracha o máximo possível.
- c) Com a seringa injetar sob pressão 20 ml de solução fisiológica, tendo o cuidado de com a mão apertar o orifício do prepúcio para evitar a perda do líquido.
- d) Retirar a cânula com cuidado para evitar que o líquido se escoe.
- e) Fazer lentamente com alguma pressão, massagem externa em todo o comprimento da bainha do pênis até próximo ao saco escrotal, durante mais ou menos 1 minuto.
- f) Deixar escorrer o líquido da lavagem por um funil, tendo o cuidado de continuar a massagem para facilitar êsse escoamento.

* Todo o material deve ser esterilizado antes de ser usado.

4 — *Coleta de líquido seminal*

- a) Fazer como se acha especificado no item 3, *a, b*.
- b) Injetar sob pressão 50 a 100 ml de água destilada ou fervida previamente, no prepúcio, de acordo com o que está descrito no item 3, *d, e*.
- c) Deixar escorrer o líquido todo.
- d) Toilette, de acordo com o item 1, *a, b, c*.
- e) Deixar o touro excitar-se em presença de uma vaca e quando exteriorizar a glândula, coletar o líquido que goteja, em funil, diretamente em tubo de ensaio (ter o cuidado de não coletar o líquido quando o pênis estiver recolhido, pois poderá ainda haver contaminação com secreção prepucial).

5 — *Coleta de sêmen*

- a) Rigorosa limpeza dos órgãos genitais.
- b) Em vagina artificial esterilizada, coletar o sêmen, segundo a técnica própria do método.

TÉCNICA DE EXAME NO LABORATÓRIO (*Método direto*)

- 1 — Homogenizar por agitação o material recebido.
- 2 — Centrifugar mais ou menos a 1.200 r.p.m. durante 5' (menos para o sêmen).
- 3 — Com uma pipeta retirar uma gota do sedimento, colocar entre lâmina e lamínula e examinar ao microscópio com 400 aumentos.

Este método pode ser usado para o material de lavagem do prepúcio e líquido seminal. Para o sêmen devem-se imobilizar os espermatozóides pelo ácido acético, sendo dispensada a centrifugação.

MÉTODO DE COLORAÇÃO (Laveran)

- 1 — Fazer esfregaços delgados em lâmina, com 1 gotícula de sedimento e 1 gotícula de sôro sangüíneo.
- 2 — Secar rapidamente, agitando a lâmina.
- 3 — Fixar a preparação em imersão durante 15' na seguinte mistura:

Alcool a 95%	98 ml
Tintura de iodo a 10 %	2 ml

- 4 — Lavar o preparado em imersão durante 10' em álcool a 95%.
- 5 — Secar rapidamente.
- 6 — Corar a preparação em imersão durante 45' na seguinte mistura:

Giemsa	45 gotas
Água destilada	15 ml
Sôro sangüíneo	1 ml

- 7 — Lavar em água destilada imergindo a lâmina.
- 8 — Secar.
- 9 — Examinar ao microscópio com 400 aumentos ou com imersão.

TÉCNICA DE COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA FÉRRICA
(Segundo Amaral e Ramalho)

Primeira etapa: fixação

- 1 — Fazer esfregaços em laminulas finas presas por uma das bordas a um pedaço de borracha de forma semicircular de cêrca de 15 milímetros de diâmetro e de 3 de espessura; prende-se a lamínula à êste suporte, encaixando-a num entalhe que se faz na borda reta do mesmo, por meio de um bisturi fino ou de uma lâmina Gillette; o suporte de borracha tem por fim facilitar a manipulação do preparado durante os diferentes tempos de fixação e coloração e permitir a identificação do material mediante a gravação de um número numa das faces planas do fragmento de borracha; podem-se assim corar amostras de diferentes animais ao mesmo tempo.
- 2 — Os esfregaços não devem ser muito espessos; se o material não aderir à lamínula, consegue-se a aderência emulsionando o mesmo numa gota de sôro sangüíneo.
- 3 — Sem deixar secar os esfregaços, colocá-los com a face contendo o material sôbre o fixador de Schaudinn com 5% de ácido acético.

Solução de Schaudinn:

Solução saturada de sublimado corrosivo ...	2 partes
Álcool absoluto ou a 96%	1 parte
Ácido acético puro	5%

Os esfregaços devem permanecer no fixador durante 15 minutos.

- 4 — Passar os esfregaços para o álcool a 50%: 10 minutos; nesta passagem que se faz prendendo o suporte de borracha com uma pinça pequena, o esfregaço será imerso na solução alcoólica com a face contendo o material para cima.
- 5 — Imergir os esfregaços no álcool a 70% iodado, isto é, contendo algumas gotas de tintura de iodo, de modo a adquirir uma côr de vinho do Pôrto: 15 minutos.
- 6 — Transferir os esfregaços para o álcool a 95%: 10 minutos.

Se não se quiser fazer logo a seguir a coloração, os esfregaços poderão permanecer neste álcool vários dias.

Segunda etapa: coloração

- 1 — Passar os esfregaços para os álcoois a 70% e 50%: 2 minutos em cada um.
- 2 — Lavá-los em água corrente: 2 minutos.
- 3 — Mordencá-los no alúmen de ferro a 2%, a frio: 5 minutos.
- 4 — Lavá-los em água corrente: 2 minutos.
- 5 — Corá-los numa solução aquosa de hematoxilina a 0,5% (preparada no mínimo com 48 horas de antecedência): 5 minutos.
- 6 — Lavá-los em água corrente: 2 minutos.
- 7 — Colocar em solução acética a 7%: 5 minutos.
- 8 — Lavar em água corrente: 2 minutos.
- 9 — Diferenciá-los no alúmen de ferro a 2%; não é necessário o uso do microscópio para a diferenciação; adquirindo o esfregaço uma coloração cinzento-azulada clara, a diferenciação ter-se-á processado satisfatòriamente.
- 10 — Lavar novamente os esfregaços na água corrente durante 10 a 15 minutos.
- 11 — Desidratá-los nos álcoois a 70%, 80%, 90% e absoluto, permanecendo 2 minutos em cada um deles.
- 12 — Clarificar os esfregaços no creosoto, aquecendo ligeiramente, e montá-los em bálsamo do Canadá.

Os esfregaços precisam conservar-se úmidos durante todos os tempos do processo de coloração, desde o momento em que são feitos até a montagem final; os esfregaços sêcos devem ser desprezados.

TÉCNICA DE PESQUISA NO CAMPO

- 1 — Deixar o material sedimentar em tubo de fundo cônico, durante 30'.
- 2 — Pipetar o sedimento e colocar 1 gôta entre a lâmina e laminula.
- 3 — Pesquisar ao microscópio com 400 aumentos; se fôr positivo fixar a lâmina no local e trazer para corar no laboratório.

AGRADECIMENTOS

Desejamos deixar aqui os nossos mais sinceros agradecimentos aos Drs. Antonio Mies Filho, Mario Rubens de Mello, Helio Gustavo Guida, pela amável acolhida e esclarecimentos prestados quando de nossa visita aos seus laboratórios (S.F.P.R.I.A.).

Ao Prof. Dr. L. Riedmüller do I.B.A., pelos ensinamentos, literatura e momentos que tão amavelmente nos proporcionou quando o visitámos em seu laboratório.

Ao Dr. Dacio Franco do Amaral, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas sugestões, ensinamentos e facilidades que nos proporcionou para a feitura do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. José Maria Gonzaga de Lacerda Jr. e Dr. Dinoberto Chacon de Freitas, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, pelo preparo de meios de cultura e sugestões.

Ao Dr. Claudio Ferreira pelo seu auxilio nas colorações. Ao Sr. Antonio Candido Rodrigues Ramalho pelas magníficas colorações e desenhos; e a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a confecção do presente trabalho.

RESUMO

Apresentamos os resultados preliminares de investigações sôbre Trichomonose Bovina no Estado de São Paulo.

Quarenta e quatro touros de diversos proprietários foram examinados, dos quais 4 ou sejam 9,09% se achavam positivos, devendo notar-se que todos êles estavam sendo usados em serviços de inseminação artificial e aparentavam perfeita saúde.

O diagnóstico de *T. foetus* fêz-se após exame direto e com as colorações de Laveran e a da hematoxilina férrica, segundo AMARAL e RAMALHO.

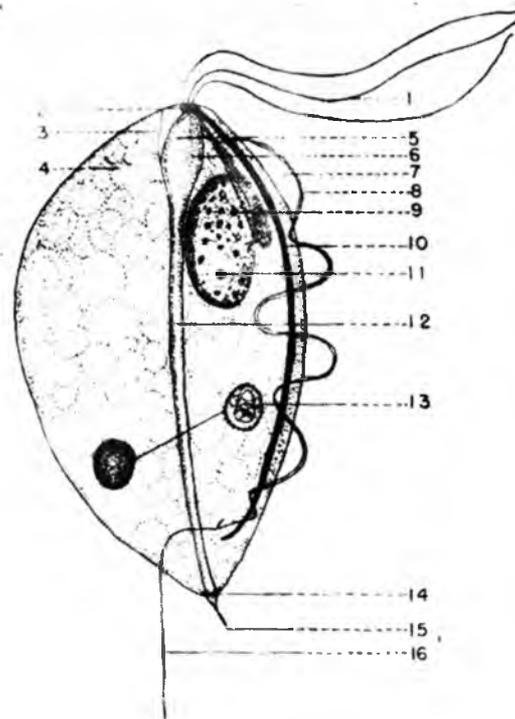
Foi preocupação do A. descrever minuciosamente as técnicas empregadas, a fim de facilitar o trabalho de outros investigadores interessados no problema.

SUMMARY

The first results of an investigation made on bovine *Trichomonas* are given in this paper. Forty four bulls, from the State of S. Paulo, belonging to several owners were examined. All bulls were being used for artificial insemination. Four bull averaging 9.09% were found to be infected with *T. foetus*. Diagnosis of the parasite was made by direct examination and coloured by Laveran's and ferric haematoxylin method (after AMARAL and RAMALHO). We noted that none of the infected animals showed local or general symptoms of the disease. We describe minutely the technique which were used in our work with the intention of making future research easier.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- ABELEIN, R. — 1934 — Bekämpfung der Trichomonadenseuche. *Deutsch. Tierärztztl. Wochenschr.*, 42(29):449
- GOULD, G. N. — 1941 — The control and treatment of infertility in bovines. *Vet. Rec.*, 53(35):504-507
- HARTMANN — SCHILLING — 1917 — Die pathogenen Protozoen und die durch sie verursachten Krankheiten. Berlin, J. Springer, pp. 462
- MORGAN, B. B. — 1946 — Bovine Trichomoniasis. Burgess Publ. Co. Minneapolis, Minn.
- PINTO, C. — 1938 — Zoo-parasitas de interesse médico e veterinário. Rio de Janeiro, Pimenta de Mello & Cia.
- RIEDMÜLLER, L. — 1928 — Ueber die Morphologie, Uebertragungsversuche und klinische Bedeutung der beim sporadischen Abortus des Rinder vorkommenden Trichomonaden. *Zbl. Bakt. Jena*, Abt. I (Orig.), 108:103-108. 4 figs. no texto
- ROEHE, R. — 1948 — Tricomoniose bovina. *Bol. Dir. Prod. Animal*, Pôrto Alegre, R. G. do Sul, 4(6):21-26
- WAGNER, O. e HEES, E. — 1937 — 156 positive Trichomonasblutbefunde bei Mensch und Tier. *Centralbl. f. Bakt. Parasit. u. Infektionskrank.* I Abt. (Orig.), 138(5-6):273-290



TRICHOMONAS FOETUS

Fig. 1 Reproduzida de Morgan, B. B. -
1946 Bovine Trichomoniasis. (Burgess
Publ. Co. Minneapolis, Minn.).

- | | | | |
|---|------------------------------|----|----------------------------------|
| 1 | Flagelos anteriores | 9 | Núcleo |
| 2 | Blefaroplasto | 10 | Costa |
| 3 | Citostoma | 11 | Cariosoma |
| 4 | Citoplasma | 12 | Axostilo |
| 5 | Capitulum | 13 | Vacúolos |
| 6 | Grânulos endoaxostilar | 14 | Anel cromático |
| 7 | Membrana ondulante | 15 | Espinho terminal |
| 8 | Margem da membrana ondulante | 16 | Extremidade posterior do flagelo |



A



B

Fig. nº 2 - A-B - *T. foetus* Ried. 1928, corados pela hematoxilina fêrrica (seg. Amaral e Ramanho).

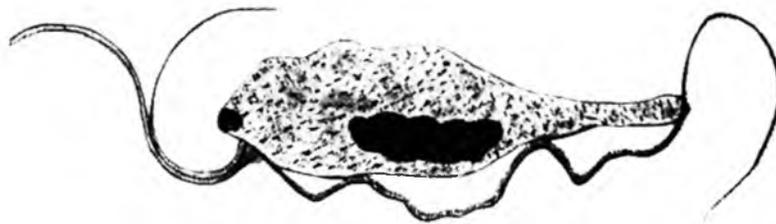


Fig. nº 3 - *T. foetus* Ried. 1928, corado pelo Giemsa (mêt. Laveran).