

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO
OBRIGATÓRIO

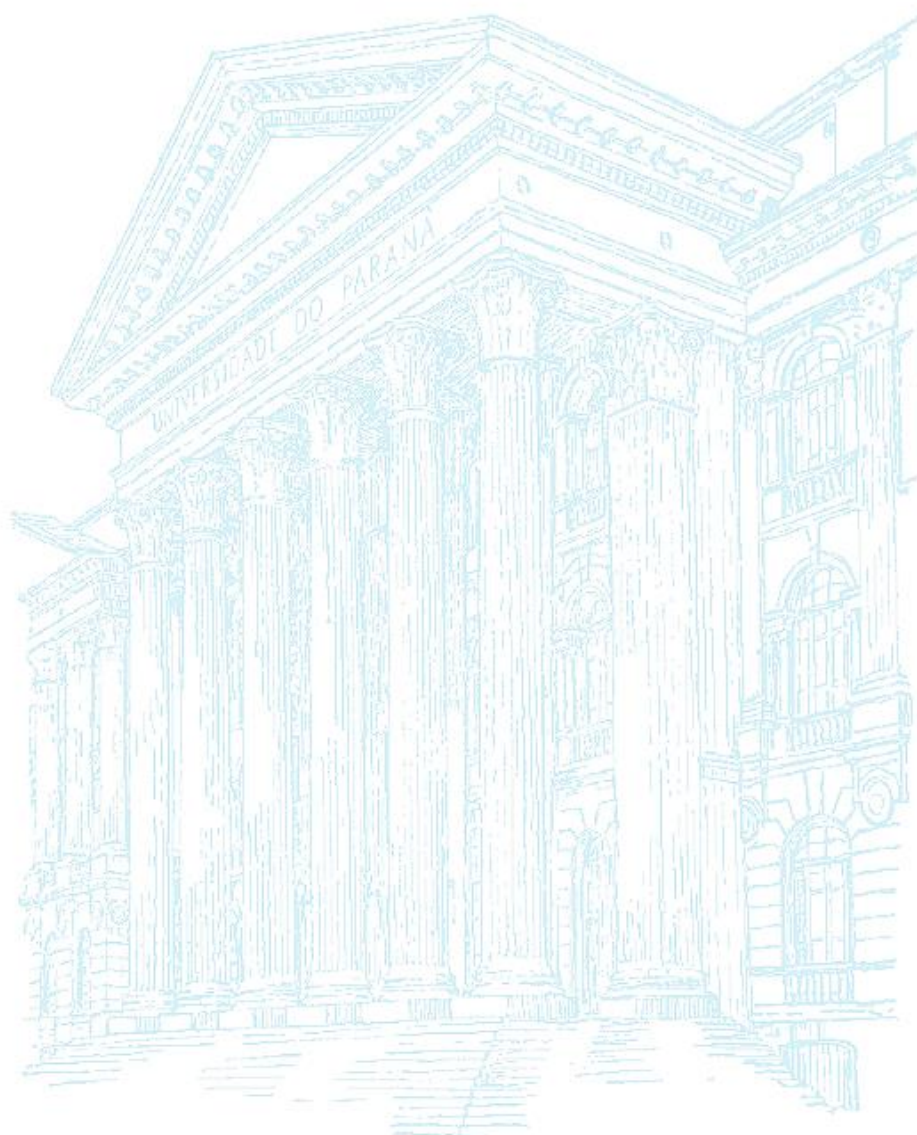
Área: Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais e Tecnologia de
sêmen bovino

Aluna: Aline Alexandra Adam
Orientador: Prof. José Antônio de Freitas
Supervisores: Alexandre Gustavo Michelin Herzog
e Neimar Correa Severo

Trabalho de conclusão de curso
apresentado, como parte das
exigências para a conclusão do Curso
de Graduação em Medicina Veterinária
da Universidade Federal do Paraná.

PALOTINA – PR
Novembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA



PALOTINA – PR
Novembro de 2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade Federal do Paraná
Setor Palotina
Curso de Medicina Veterinária

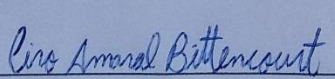
Relatório Final de Estágio Supervisionado
Área de Estágio: Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais e Tecnologia
de sêmen.

Acadêmico: Aline Alexandra Adam
Orientador de Estágio: Prof. José Antônio de Freitas
Supervisor de Estágio: M.V Alexandre Gustavo Michelin Herzog e
Neimar Correa Severo.

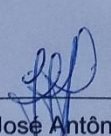
O PRESENTE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO FOI
APRESENTADO E APROVADO PELA SEGUINTE BANCA
EXAMINADORA:



Prof. Alexandre Leseur



M.V. Ciro Amaral Bittencourt



Prof. José Antônio de Freitas
Supervisor

Palotina - PR, Dezembro de 2016

Tudo posso naquele que me fortalece.

Filipenses 4:13

Dedico este trabalho aos meus pais, Armindo e Ivone Adam, minha fonte de inspiração, sabedoria e amor, a minha irmã Marli por sempre me dar forças nas horas que preciso e principalmente ao meu sobrinho, Augusto Bifaroni, pela alegria recebida durante essa jornada e a todas as pessoas que me apoiaram durante esse período.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre me deu forças nos momentos que precisei, pelo dom da vida, coragem, saúde e sabedoria para seguir em frente, iluminando meu caminho e o de minha família, por ter me acompanhado a cada passo nessa jornada, somente pela sua bondade e amparo foi possível concluir mais essa meta da minha vida.

Aos meus pais, Armindo Adam e Ivone Isoldi Adam que foram fundamentais na construção dos meus valores, ensinando-me a ser justa e digna, que sempre me apoiaram em todos os momentos e escolhas da minha vida, acreditando no meu potencial. Pelo amor, disciplina, humildade e conselhos principalmente nos momentos de dificuldade. Sem vocês, nada disso seria possível.

A minha irmã, Marli que, apesar das brigas, sempre foi companheira e conselheira para todas as horas, juntamente com meu sobrinho que recebi durante essa minha jornada, o qual trouxe muita alegria e inspiração para minha família.

A Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, pela oportunidade da realização do meu sonho de ser médica veterinária e pela possibilidade de conhecer pessoas maravilhosas que me ajudaram nos momentos em que mais precisei. Agradeço as minhas colegas Daiane Rodrigues e Mayhume Narok, que me acompanharam o curso todo, sempre com paciência, com seus sábios conselhos, nos momentos de estudo e risadas. A minha família palotinese, moradoras do 658, Jaqueline, Jessica e Eliane, que sempre terão lugar especial no meu coração.

Ao meu professor e orientador José Antônio de Freitas, pela ajuda e orientação para a conclusão desse trabalho, pela confiança, dedicação, compromisso e conhecimento. Muito Obrigada.

Aos meus supervisores de estágio Alexandre Herzog e Neimar Severo, que dedicaram o seu tempo e paciência para me ensinar, por todo o aprendizado técnico e prático adquirido durante esse período de estágio. Agradeço também, a toda a equipe da Alta Genetics, pela oportunidade e confiança, os meninos do laboratório de reprodução, Romulo Antônio e Rafael Cleiton, ao Médico Veterinário João, que estiveram comigo durante dois meses, pela apoio concedido e a oportunidade de aprendizagem.

A todos os meus professores da universidade que passaram por mim durante esses cinco anos, obrigada por me ensinar o que vocês mais sabiam, em especial professor Luciano Oliveira e a Professora Geane Pagliosa que contribuíram para minha formação profissional e pessoal durante o curso. Muito Obrigada.

A XXIII turma de Medicina Veterinária da UFPR de Palotina, pelas amizades cultivadas, pelos ensinamentos compartilhados e pelos muitos momentos de dificuldade que foram superados juntos. Muito obrigada e sucesso à todos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, fizeram parte dessa conquista, mesmo não citados aqui. Dedico a estas pessoas, minha eterna gratidão e que Deus ilumine o caminho de todos.

RESUMO

O presente trabalho de conclusão de curso relata as atividades técnicas desenvolvidas no período do dia 08 de agosto de 2016 à 15 de novembro de 2016, perfazendo um total de 528 horas, divididas em dois locais de estágio. No primeiro estágio, entre o período do dia 08 de agosto de 2016 a 09 de setembro de 2016, na área de clínica médica e cirúrgica de bovinos, com o supervisor Médico Veterinário Alexandre Gustavo Michelin Herzog e o segundo, na empresa Alta Genetics do Brasil, comandada pelo supervisor de estágio Neimar Correa Severo, na área de tecnologia de sêmen bovino, entre os dias 15 de setembro a 15 novembro de 2016, dentro da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório da Universidade Federal do Paraná, orientada pelo professor José Antônio de Freitas. Neste trabalho, são contempladas as atividades de assistência veterinária a campo, relacionadas com a área de clínica médica, clínica cirúrgica e obstetrícia em bovinos e as atividades em reprodução animal, com ênfase em processamento de sêmen bovino. Dentre a casuística acompanhada, são descritos os casos clínicos mais relevantes e os procedimentos técnicos mais frequentemente acompanhados. É relatada a estrutura e o funcionamento dos estabelecimentos, bem como a descrição de protocolos terapêuticos, as rotinas laboratoriais como a coleta, manuseio, processamento e envase do sêmen bovino. O estágio supervisionado possibilitou o aproveitamento dos conhecimentos teórico e prático aprendidos na universidade, aplicando-os diretamente a campo, proporcionando maior experiência e promovendo um crescimento profissional e pessoal, possibilitando o contato com profissionais da área e aprendendo novas condutas de trabalho.

Palavras-chave: Coleta de sangue; Laboratório; Medicação.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tubos para coleta de sangue no exame de brucelose.	24
Figura 2. Realização e leitura do teste AAT de brucelose.....	24
Figura 3. Marcação de bezerra com ferro candente.....	26
Figura 4. Animal apático, magro e com mucosa vaginal ictérica.	28
Figura 5. Coleta e transfusão de sangue no bovino durante o ECO.....	29
Figura 6. Administração de hidratação via enteral no bovino durante o ECO.....	30
Figura 7. Estrutura da empresa Alta Genetics.....	33
Figura 8. Casqueamento preventivo e lesão na sobreunha do touro, ocorrido no desembarque do animal.....	34
Figura 9. A - Tronco de contenção e local de realização dos exames sanitários; B - Piquetes individuais do quarentenário.....	35
Figura 10. Rotina de exame de sanitário.....	37
Figura 11. A – Inserção do swab estéril no prepúcio do touro; Raspagem do swab na mucosa prepucial; Retirado do swab com esmegma do prepúcio.....	38
Figura 12. Retirada de esmegma do prepúcio do touro para exame de tricomonose.....	41
Figura 13. Coleta de sangue para exame de Diarreia Viral Bovina.....	44
Figura 14. Coleta de sangue para exame de brucelose.....	46
Figura 15. Aplicação de vacina para raiva, botulismo e carbúnculo.....	48
Figura 16. Calendário nacional de vacinação dos bovinos e bubalinos contra febre aftosa 2016.....	49
Figura 17. Manequim vivo e tronco de contenção.....	50
Figura 18. Unidade central –Estrutura direcionada para coleta de sêmen.....	50
Figura 19. Execução do eletroejaculador.....	52
Figura 20. Coleta do ejaculado através do eletroejaculador.....	53
Figura 21. Utilização de manequins vivos para coleta de sêmen.....	54
Figura 22. Lavagem extremamente do prepúcio.....	55
Figura 23. Vagina artificial desmontada e estufa de armazenamento (50°C).....	56
Figura 24. Desvio do pênis do touro.....	57
Figura 25. Coleta de sêmen através da vagina artificial.....	57
Figura 26. Capa protetora para tudo de sêmen.....	58

Figura 27. Laboratório – Sala de processamento de sêmen.....	58
Figura 28. Sala de vagina artificial.....	59
Figura 29. Rotina do laboratório de sêmen.....	59
Figura 30. Banho maria com amostra de sêmen.....	60
Figura 31. Sêmen contendo terra e sangue, respectivamente.....	61
Figura 32. Aferição do volume do ejaculado.....	61
Figura 33. Adição de antibiótico.....	62
Figura 34. Associação de antibióticos pro sêmen.....	63
Figura 35. Aferição da concentração espermática.....	64
Figura 36. Avaliação de vigor e motilidade do sêmen.....	64
Figura 37. Primeira diluição do sêmen.....	66
Figura 38. Preparação do diluente.....	67
Figura 39. Pesagem da segunda diluição e conservação.....	67
Figura 40. Avaliação morfologia espermática – Espermatozoides com cauda dobrada e enrolada.....	69
Figura 41. Avaliação morfologia espermática – Espermatozóide teratogênia.....	69
Figura 42. Avaliação morfologia espermática – Espermatozoides com cauda dobrada e gota citoplasmática distal.....	69
Figura 43. Avaliação morfologia espermática – Espermatozoide com defeito de acrossoma.....	70
Figura 44. Ficha de controle interno das taxas de defeitos espermáticos de cada touro.....	70
Figura 45. Bancada de refrigeração com diluição final do sêmen.....	71
Figura 46. Procedimentos para a realização do teste de pré congelamento.....	72
Figura 47. Máquina de impressão de palhetas.....	72
Figura 48. Máquina de envase de sêmen.....	73
Figura 49. Contagem e cuba de congelamento de sêmen.....	74
Figura 50. Armazenamento das doses de sêmen e estoque.....	75
Figura 51. Máquina de raqueamento e contagem manual de palhetas de sêmen nos globetes.....	77
Figura 52. Estrutura do estoque e bancos de nitrogênios líquidos.....	77

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Número total e frequência (%) de afecções clínicas acompanhadas durante o ECO realizado com o médico veterinário Alexandre Herzog no período de 08/08 à 09/09/2016.....	18
Tabela 2: Número total e frequência (%) de procedimentos cirúrgicos acompanhadas durante o ECO realizado com o médico veterinário Alexandre Herzog no período de 08/08 à 09/09/2016.....	18
Tabela 3: Número total e frequência (%) de outras atividades na área de veterinária acompanhadas durante o ECO realizado com o médico veterinário Alexandre Herzog no período de 08/08 à 09/09/2016.....	18
Tabela 4: Número total e frequência (%) de todas as atividades desenvolvidas durante o ECO realizado com o médico veterinário Alexandre Herzog no período de 08/08 à 09/09/2016.....	18
Tabela 5. Interpretação do TCC da tuberculose bovina. Adaptada: BRASIL, 2006.....	21
Tabela 6. Valor adicional da primeira diluição conforme a concentração espermática.....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AAT – Antígeno Acidificado Tamponado
- Bpm – Batimentos por minuto
- BVD – Diarreia Viral Bovina
- ECO – Estágio Curricular Obrigatório
- FC – Fixação de complemento
- IBGE – Instituto Biológico de Geográfico
- IBR – Rinotraqueíte infecciosa Bovina
- IM – Intramuscular
- L – Litros
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MAPA – Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento
- MG – Minas Gerais
- mL – Mililitro
- OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
- PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação De Brucelose e Tuberculose
- TAL – Teste do anel do leite
- TCC – Técnica Cervical Comparativa
- TCS – Teste cervical simples
- TPT – Tristeza Parasitária Bovino
- TTRL – Teste de termo resistência lenta
- UFPR –Universidade Federal do Paraná
- UI – Unidade internacional
- ΔA – Diferença tuberculina aviária
- ΔB – Diferença tuberculina bovina
- μg - Microgramas
- 2 – ME – 2-Mercaptoetanol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO I	16
2.1 ALEXANDRE HERZOG – ASSOCIAÇÃO LEITE OESTE	16
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS COM VETERINÁRIO ALEXANDRE HERZOG ...	17
3.1 TUBERCULOSE BOVINA.....	18
3.2 BRUCELOSE BOVINA	22
3.2.1 Vacinação de Brucelose	25
3.3 TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA (TPB)	26
4. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO II	31
4.1 ALTA GENETICS DO BRASIL LTDA.....	31
5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA ALTA GENETICS DO BRASIL LTDA.....	33
5.1 QUARENTENÁRIO	35
5.1.1 Campilobacteriose Genital Bovina (Vibriose)	37
5.1.2 Tricomonose / Tricomoníase Genital Bovina (TGB).....	40
5.1.3 Diarreia Viral Bovinal (BVD).....	43
5.1.4 Brucelose Bovina	45
5.1.5 Tuberculose Bovina	46
5.1.6 Profilaxia	47
6. ÁREA DE RESIDÊNCIA DOS ANIMAIS	49
6.1 UNIDADE CENTRAL.....	49
6.2 UNIDADE ESPECIAL DE MANEJO DE ANIMAIS INDÓCEIS	50
6.3 UNIDADE DE EXPANSÃO.....	50
7. COLETA DE SÊMEN	53
7.1 PREPARO DOS MANEQUINS	53
7.2 PREPARO DOS TOUROS.....	54
7.3 VAGINA ARTIFICIAL.....	55

7.4 TRANSPORTE DO EJACULADO	57
8. LABORATÓRIO	58
9. ROTINA DO LABORATÓRIO DE SÊMEN	59
10 ESTOQUE DE SÊMEN	75
11. CONCLUSÃO.....	78
12. REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

A produção de leite é uma importante atividade econômica para a grande maioria dos países, assim como no Brasil. A região sul destaca – se como uma das principais produtoras de leite, apresentando a maior produtividade do país (SANTOS et al. 2010).

O resultado da exploração leiteira depende das habilidades do produtor em conduzir de forma adequada todos os fatores que contribuem ao processo produtivo da atividade, como a alimentação, genética, reprodução, sanidade, manejo e gerenciamento (OHI et al., 2010).

De acordo com o IBGE, em 2006, os maiores produtores de leite do país são Minas Gerais (28%), Paraná (10,6%), Rio Grande do Sul (10,3%), Goiás (10,2%) e São Paulo (6,8%), sendo que entre 1995 a 2006, o estado do Paraná passou da quarta para a segunda posição no *ranking* da produção nacional de leite (SANTOS et al., 2010).

O controle sanitário é de extrema importância em uma propriedade, pois um animal doente significa prejuízo, seja com gastos de medicamentos ou por perda de produção. Para que tais circunstâncias não ocorram, alguns cuidados sanitários para garantir a saúde do rebanho são importante ser observados, como a seleção de touros e vacas saudáveis, cura do umbigo, manejo de ordenha, diarreias, tristeza parasitária, vacinação e controle de carrapatos (OHI et al., 2010).

A brucelose e tuberculose são enfermidades que estão disseminadas em todo o território nacional, tanto na pecuária de corte como leiteira e são zoonoses que representam riscos aos trabalhadores do setor, na eficiência da produção e para a população consumidora, sendo que animais contaminados podem ser responsáveis pela infecção da doença no homem, através da ingestão de produtos lácteos sem o devido controle sanitário (SANTOS et al., 2008).

Na reprodução, a inseminação artificial é uma técnica importante desenvolvida para o melhoramento genético dos animais, enquanto que poucos reprodutores selecionados produzem sêmen suficiente para inseminar milhares de fêmeas anualmente (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

As vantagens em utilizar a inseminação artificial no rebanho é permitir o uso de bons reprodutores, dificultar a propagação de doenças transmitidas pela cópula, possibilitar o acasalamento entre animais de diversos tamanhos, idades e raças, evitar

despesas com a manutenção de touros, ter aproveitamento de touros com defeitos e incapacidades de cobrir e permitir que o rebanho seja melhorado rapidamente (BATTISTON, 1977). Porém, as desvantagem da inseminação artificial são as dificuldades de profissionais treinados em técnicas adequadas e dispor de boas condições de manuseio das fêmeas durante a terapia hormonal, além de detectar o cio em condições de criação à campo (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

O estágio permite ao acadêmico o contato com a área de interesse, aprofundando e aumentando os conhecimentos. É de extrema importância, pois complementa a formação, proporciona a experiência acadêmico-profissional e aperfeiçoa as habilidades técnico-científicas essenciais ao exercício profissional.

A área de atuação de clínica médica e cirúrgica é exclusiva do Médico Veterinário, sendo que este atua promovendo e preservando a saúde dos animais. Quando estes objetivos são atingidos, ele também proporciona ao produtor a melhor produtividade no rebanho e, conseqüentemente a lucratividade. Além disso, diminui o risco de transmissão de doenças, principalmente as de caráter zoonóticos e proporciona um alimento com maior segurança e qualidade ao consumidor.

O presente relatório tem como objetivo relatar as atividades acompanhadas durante os estágios supervisionados obrigatório na área de clínica médica e cirúrgica de bovinocultura leiteira e em tecnologia de sêmen na reprodução animal.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO I

2.1. ALEXANDRE HERZOG – ASSOCIAÇÃO LEITE OESTE

Alexandre Gustavo Michelin Herzog, Médico Veterinário graduado pela Universidade federal do Paraná–Setor Palotina, no ano de 2011 e desde então tem atuado nas áreas de clínica médica e cirúrgica de bovinos. Atualmente, Alexandre presta há 2 anos, serviços de assistência técnica e consultoria para associados e demais clientes da entidade Associação Leite Oeste. Nesse ano, ingressou no mestrado na área de nutrição animal, na UFPR–Setor Palotina e realiza projetos na área.

A Associação leite oeste, é uma organização composta por associados e não visa fins lucrativos, situa-se na rua Dom João VI, número 935, centro da cidade de

Marechal Cândido Rondon – Paraná, foi fundada no ano de 1989. A Associação é na maioria composta por produtores de leite da região oeste do Paraná, sendo que possui 223 associados atualmente. Os serviços oferecidos são na área de assistência técnica veterinária de grandes animais, produtos para nutrição e medicamentos. Na assistência técnica, realizam exames de tuberculose, exames e vacinas para brucelose, clínica médica e cirúrgica em bovinos, casqueamento, consultoria nas propriedades, formulação de dietas para ruminantes, controle leiteiro e inseminação artificial.

A cada mês, o presidente da entidade, Rodrigo Bellé, reuni os associados para definir e planejar o cronograma de atividades com o objetivo de atender melhor seus clientes. Além do presidente, a entidade conta com três veterinários e um zootecnista.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS COM VETERINÁRIO ALEXANDRE HERZOG

A primeira etapa do estágio foi desenvolvida com o médico veterinário Alexandre Gustavo Michelin Herzog, juntamente com a entidade Associação Leite Oeste, no período do dia 08 de agosto à 09 de Setembro de 2016, perfazendo 192 horas.

As principais atividades acompanhadas foram exames de tuberculose e brucelose, vacinação de brucelose em novilhas entre 3 a 8 meses de idade, inseminação artificial, procedimentos clínicos e cirúrgicos, casqueamento, manejo reprodutivo do rebanho e outras atividades voltadas à sanidade e produção animal.

Nas propriedades, o estagiário era incumbido de desempenhar funções de auxílio ao médico veterinário em cada procedimento realizado.

Ao todo foram realizados 6 casos clínicos (Tabela 1), 4 procedimentos cirúrgicos (Tabela 2) e 821 de outras atividades na área veterinária (Tabela 3), perfazendo um total de 831 procedimentos durante o período de estágio (Tabela 4).

Tabela 1. Número total e frequência (%) de afecções clínicas acompanhadas durante o ECO realizado com o médico veterinário Alexandre Herzog no período de 08/08 à 09/09/2016.

Afecção Clínica	Total	Freq. %
Tristeza Parasitária Bovina	2	0,24
Pneumonia	1	0,12
Retículo Pericardite Traumática	3	0,36
Total	6	0,72

Tabela 2. Número total e frequência (%) de procedimentos cirúrgicos acompanhadas durante o ECO realizado com o médico veterinário Alexandre Herzog no período de 08/08 à 09/09/2016.

Procedimentos Cirúrgicos	Total	Freq. %
Prolapso Uterino	1	0,12
Hérnia Umbilical	1	0,12
Castração	1	0,12
Descorna	1	0,12
Total	4	0,48

Tabela 3. Número total e frequência (%) de outras atividades na área de veterinária acompanhadas durante o ECO realizado com o médico veterinário Alexandre Herzog no período de 08/08 à 09/09/2016.

Outras atividades	Total	Freq. %
Mochação	7	0,84
Casqueamento preventivo	5	0,60
Casqueamento corretivo	16	1,93
Exame Tuberculose	404	48,61
Exame Brucelose	352	42,36
Vacinação Brucelose	33	3,98
Inseminação Artificial	4	0,48
Total	821	98,80

Tabela 4. Número total e frequência (%) de todas as atividades desenvolvidas durante o ECO realizado com o médico veterinário Alexandre Herzog no período de 08/08 à 09/09/2016.

Procedimentos Cirúrgicos	Total	Freq. %
	831	100

3.1. TUBERCULOSE BOVINA

É uma doença infecto – contagiosa, cujo o nome é devido à formação de nódulos nos órgãos aonde o agente etiológico se aloja, chamado de tubérculos (MILLEN, 1975).

O agente etiológico que desenvolve a tuberculose nos bovinos é o *Mycobacterium bovis*, sendo que bovinos não adoecem quando infectados pelas outras micobactérias patogênicas para mamíferos (MODA et al., 1996). O *M. bovis* possui uma adaptabilidade maior ao hospedeiro, pois se apresenta como agente infeccioso não só para o bovino, mas também para o homem, cão, gato, porco, ovelha, cabra e cavalo (BEER, 1988).

O Brasil constitui com um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, mais de 165 milhões de cabeça, conforme estudos, revelam que cerca de 1,3 % do rebanho bovino nacional está infectado por *M. bovis* (EMPRAPA, 2004).

A importância econômica da doença, está baseada nas perdas diretas com a mortalidade de animais, queda no ganho de peso, diminuição da produção de leite, descarte precoce e eliminação de animais de alto valor zootécnico, condenação de carcaças no abate e ainda a perda de prestígio e credibilidade da unidade de criação onde a doença é constatada (BRASIL, 2006). Os microrganismos são eliminados em secreções do trato respiratório, fezes, leite, urina, sêmen e corrimento genital (CARTER, 1988).

A principal via de transmissão da tuberculose bovina é a digestória e respiratório, outras vias são menos usuais, como a infecção cutânea com a contaminação de uma lesão primária, pela infecção congênita, da mãe para o feto através dos vasos umbilicais, pela via genital com sêmen e os órgãos sexuais do macho e da fêmea infectados durante o coito (NEILL et al., 1994). Uma grande quantidade do agente é eliminado pelas fezes e urina, porém, pastagem e alimentos contaminados são de menor importância para a transmissão da doença (MORRIS et al., 1994).

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Nos métodos diretos é utilizado material biológico para a detecção e identificação do agente etiológico e os métodos indiretos, pesquisam uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente, que pode ser humoral (produção de anticorpos circulantes) ou celular (mediada por linfócitos e macrófagos). A tuberculinização é

medida da imunidade celular contra *M. bovis* por uma reação de hipersensibilidade retardada (BRASIL, 2006)

A prova da tuberculinização tem sido mais utilizada para o diagnóstico do agente da tuberculose bovina, esta baseia-se na resposta do animal a inoculação de tuberculina, cuja a reação é de hipersensibilidade tardia com reação inflamatória intensa, edema discreto, infiltração de grande quantidade de células mononucleares no tecido e que atinge sua máxima intensidade somente no terceiro dia após a inoculação (MONAGHAN et al., 1994).

No caso da prova intradérmica simples, a reação à tuberculina bovina caracteriza-se pela presença de um endurecimento ou inchaço da pele no local demarcado (EMPRAPA, 2004).

Na Tuberculinização cervical comparativa, as injeções de tuberculina aviária e bovina são feitas no terço médio do pescoço, antecedidas, por uma primeira mensuração da espessura da pele, em milímetros e após 72 horas, a leitura do resultado é feito novamente com a mensuração da pele para verificar a presença de endurecimento (MONAGHAN et al., 1994).

Durante o ECO, acompanhei teste de tuberculose realizado em machos reprodutores e em fêmeas com a idade superior a 6 semana. Nos bovinos destinados para abate não era realizado o exame. Animais das raça Holandesa, Jersey, Gir, Girolando e mestiços de Jersey com holandês, eram os principais encontrados para a produção de leite nas propriedades de realização do teste.

O teste de eleição utilizado pelo médico veterinário Alexandre, é o teste cervical comparado. Para a realização do exame, auxiliava na tricotomia de dois pontos distintos na região escapular do animal, na distância de aproximadamente 20 centímetros entres os pontos. O veterinário, realizava a mensuração da dobra da pele do animal nos dois pontos demarcados, sendo anotado os valores em uma ficha de dados. O ponto demarcado cranialmente era inoculada a 0,1 mL de tuberculina aviária e 0,1mL de tuberculina bovina inoculada no ponto caudalmente do animal.

Após 72 horas da inoculação era realizada novamente novas medidas da dobra da pele, no local de inoculação das tuberculinas aviária e bovina. Para leitura do teste, era necessário calcular a reação obtida nas medidas da dobra da pele. Primeiramente subtraía-se a medida da pele obtida em 72 horas com a medida da dobra da pele antes da inoculação da tuberculina aviária e bovina, conforme a equação abaixo:

- Tuberculina aviária após 72h (A_{72}) – Tuberculina aviária inicial (A_0) = ΔA
- Tuberculina bovina após 72h (B_{72}) – Tuberculina bovina inicial (B_0) = ΔB

Posteriormente, era subtraído o valor da diferença do aumento da dobra da pele provocada pela inoculação da tuberculina bovina com a diferença da inoculação da tuberculina aviária, conforme a equação a baixo:

- $\Delta B - \Delta A$

Os resultados obtidos no teste cervical comparativo eram interpretados, conforme a tabela 5:

Tabela 5. Interpretação do TCC da tuberculose bovina. Adaptada: BRASIL, 2006.

	$\Delta B - \Delta A(\text{mm})$	Interpretação
$\Delta B < 2,0$	--	Negativo
$\Delta B < \Delta A$	< 0	Negativo
$\Delta B > \text{ou} = \Delta A$	0,0 – 1,9	Negativo
$\Delta B > \Delta A$	2,0 – 3,9	Inconclusivo
$\Delta B > \Delta A$	> ou = 4,0	Positivo

O total de testes realizados para tuberculose foram de 404 animais, sendo nenhum teste considerado positivo, apenas em uma propriedade houve 3 animais inconclusivos, corresponde a uma prevalência de 0,75 % de animais inconclusivos, durante o período de ECO.

Segundo o relato do proprietário, ele adquiriu esses animais inconclusivos de outra propriedade à mais de 6 meses e antes da chegada dos animais, foram realizados os testes sanitários conforme a legislação do PNCEBT (BRASIL, 2001), porém por outro médico veterinário, o qual havia atestado que os animais eram negativos para brucelose e tuberculose.

Conforme o PNCEBT, animais inconclusivos ao teste diagnóstico de tuberculose deverão ser isolados do rebanho e retestados com TCC, entre 60 a 90 dias após o teste anterior, caso, o resultado novamente for inconclusivo ou positivo os animais deverão ser sacrificado. Em primeiro lugar, os animais deverão ser isolados e

realizado marcação com ferro candecente com um P (positivo) no lado direito do animal, sendo que no prazo máximo de 30 dias deverão ser abatido em estabelecimento de inspeção sanitária oficial ou destruído na própria propriedade, desde que acompanhado do serviço oficial de defesa sanitária animal (BRASIL, 2006).

Pode - se concluir a importância da realização dos testes de tuberculose, não só por obrigatoriedade do PNCEBT, mais devidos aos impactos econômicos e prejuízos, tanto na saúde animal, quanto na saúde humana.

3.2. BRUCELOSE BOVINA

A Brucelose é uma doença infecto – contagiosa de caráter crônico, causada por bactéria do gênero *Brucella*, sendo que a mais importante para os bovinos é a *Brucella abortus*, caracterizada por abortos nas fêmeas e, nos machos, por orquite e infertilidade (DOMINGUES E LANGONI, 2001). A *brucella abortus* foi reconhecida pela primeira vez por Bang em 1897 (CARTER, 1988).

A brucelose é uma zoonose de distribuição universal, acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos, sendo que as principais manifestações da doença, como abortos, nascimentos prematuros, esterilidade e redução na produção de leite, contribuem para uma considerável baixa na produção de alimento (BRASIL, 2006).

Antes das medidas de erradicação, alcançou, nos anos de 1930 à 1945, sua máxima extensão, pôs em perigo as criações de bovinos, sobretudo nas regiões de criações leiteiras intensivas da Europa, Estados Unidos e em outros países, causando grande perdas econômicas. Informações da época, mostram que alguns países estavam infectados até 40 à 60 % das criações bovinas (BEER, 1988).

Conforme o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006), a brucelose é responsável em diminuição de 25% na produção de leite e de carne e, pela redução de 15% na produção de bezerros, sendo que cada cinco vacas infectadas, uma aborta ou se torna permanentemente estéril.

A principal via de penetração é a digestiva, sendo através da água e de alimentos contaminados, pode ocorrer pela via genital, por machos, que estão infectados, ou mesmo na inseminação artificial, com sêmen contaminado. A bactéria também pode penetrar pelas mucosas e por feridas na pele, produzindo a doença (MILLEN, 1975).

Nos principais sintomas da doença, sobressaí o aborto, que ocorre no terço final da gestação, com retenção de placenta nas vacas e nos touros, pode ocorrer orquite, que é inflamação dos testículos e também das articulações, como artrite (DOMINGUES E LANGONI, 2001).

Segundo Beer (1988), o reconhecimento tardio da doença num determinado animal pode acarreta a disseminação, geralmente rápida, da brucelose no rebanho. A principal fonte de entrada do agente em uma propriedade é a introdução de animais infectados (BRASIL, 2006). Um animal doente ou uma vaca prenha infectada que aborta produz a disseminação da doença em todo o rebanho, após o abortamento, grande quantidade da bactéria está presente no feto, nas membranas fetais, na placenta, nos corrimentos vaginais, durante uma a duas semanas (MILLEN, 1975).

O diagnóstico é feito pelos exames bacteriológicos e sorológicos, sendo o teste de soro aglutinação, considerado o método clássico de diagnóstico da brucelose bovina (DOMINGUES E LANGONI, 2001).

No Brasil, o PNCEBT definiu como testes oficiais, o teste de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Anel do Leite (TAL) como testes de triagem e, 2- Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC) como confirmatórios (BRASIL, 2006).

Atualmente as empresas de laticínios e cooperativas, exigem do produtor exames anuais conforme as legislações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo que algumas empresas, exigem os exames sanitários de tuberculose e brucelose a cada 6 meses para a venda e comercialização do leite.

Durante o estágio, fomos solicitados para realizar 352 exames de brucelose em animais acima de 2 anos idade, principalmente das raças holandês, Jersey, Gir, Girolando e mestiço de Jersey com Holandês. Animais de descarte ou abate não era realizado o exame.

No estágio, realizava a coleta de sangue dos animais através da veia coccígea, em tubos de tampa vermelha (Figura 1), apropriados para coagulação do sangue e obtenção do soro sanguíneo. Esses tubos eram identificados com o nome do animal e separados em estantes, conforme a propriedade de coleta e levados para o laboratório da empresa em temperatura ambiente. Os tubos eram dispostos verticalmente e estabilizados até o fracionamento do soro.



Figura 1. Tubos para coleta de sangue no exame de brucelose. Fonte: Arquivo pessoal.

Durante a rotina do laboratório, acompanhei o médico veterinário na avaliação e no procedimento do exame de brucelose. O antígeno é armazenado em temperatura de 4°C e para o teste, era colocado em temperatura ambiente meia hora antes de iniciar a prova do AAT. Em uma placa de vidro quadriculada (placa de Huddleson), pipetava – se no centro de cada quadrado, 30 µL de soro e 30 µL do antígeno acidificado tamponado. Misturava - se com um bastão de vidro para formar um círculo, posteriormente era realizados movimentos manuais com a placa de vidro durante 5 minutos, permitindo que a mistura do soro – antígeno fluí – se lentamente dentro do círculo e realizava - se a leitura.

Para melhor visualização, colocava – se a placa de vidro em cima de uma caixa com luz direta (Figura 2). Os resultados eram verificados conforme a reação do soro com o antígeno. Na presença de grumos indicava resultados positivos e a ausência dos grumos, resultava em teste negativo. Observou -se que nenhuma das amostras teve a presença de grumos.

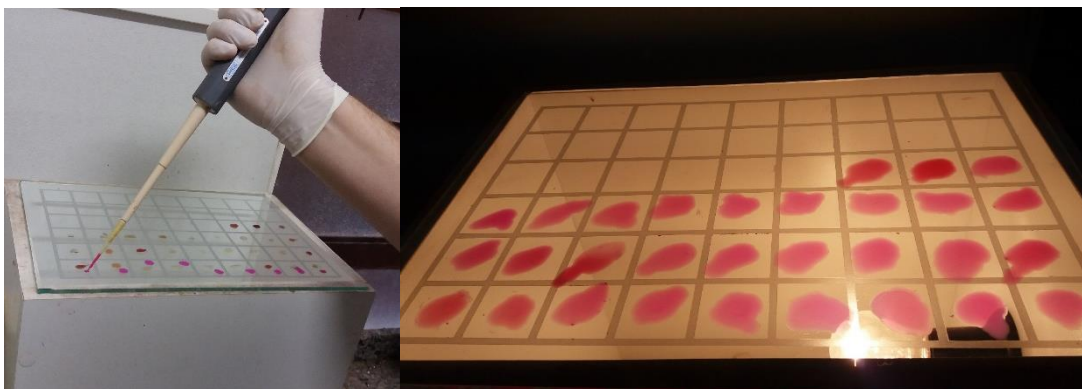


Figura 2. Realização e leitura do teste AAT de brucelose. Fonte: Arquivo pessoal.

O método que utiliza o antígeno acidificado tamponado, chamado também de teste rosa – de – bengala, é um método rápido e prático. O antígeno é uma suspensão de *B. abortus* amostra 1119-3 inativada, corada pelo rosa – de - bengala e diluída a 8% em solução – tampão de pH 3,65. Produz resultados satisfatórios como o método diferencial de soros de animais não vacinados, em decorrência de seu pH ácido, que inibe algumas aglutininas inespecíficas. O método consiste na aglutinação direta do anticorpo com o antígeno da doença, resultando na formação de complexos insolúveis. A aglutinação das partículas indica a presença de anticorpo específicos para o antígeno (VASCONCELOS et al., 1987).

O teste de diagnóstico AAT para brucelose é realizado exclusivamente em fêmeas de idade igual ou superior a 24 meses, desde que vacinadas entre 3 e 8 meses de idade, em machos e fêmeas não vacinadas, realiza-se o teste a partir dos 8 meses de idade. Animais vacinados com a vacina B19 induz a formação de anticorpos específicos contra o LPS liso e pode interferir no diagnóstico sorológico da brucelose. A persistência desses anticorpos está relacionada com a idade de vacinação. Se as fêmeas forem vacinadas com idade superior a 8 meses, há grande probabilidade de produção de anticorpos que perdurem e interfiram no diagnóstico da doença após os 24 meses de idade (BRASIL, 2006).

Conclui – se, que das 352 amostras coletadas dos animais, nenhuma apresentou resultados positivo, sendo uma grande passo para a eliminação da doença no plantel brasileiro. É que grande importância realizar periodicamente os exames de brucelose, pois, além de ser uma doença de caráter zoonótico, também influencia em prejuízos econômicos, como a perda de animais, redução de produção, abortos, e eliminação de animais com alto valor genético.

3.2.1. Vacinação de brucelose

A brucelose bovina pode ser controlada com o programa de vacinação. A vacina utilizada no Brasil é elaborada com a amostra 19 da *B. abortus* (B19). O esquema de vacinação consiste em fêmeas entre 3 a 8 meses de idade, uma única dose geralmente confere imunidade por toda vida do animal, embora todas as fêmeas vacinadas percam seus títulos de anticorpos entre 16 a 18 meses. Por causa da interferência dos anticorpos colostrais, a vacina de animais até 4 meses não é totalmente eficiente como após os 5 meses de idade (BISHOPE et al., 1994).

Para fêmeas acima de 8 meses, o PNCEBT, autoriza a vacinação com RB51. A vacina é elaborada com uma amostra de *B. abortus* rugosa atenuada, originada da amostra lisa e virulenta, que sofreu passagens sucessivas em meio contendo concentrações de rifampicina. Ela possui características de proteção semelhantes às da B19, porém, por ser uma amostra rugosa, não induz a formação de anticorpos anti-LPS liso e não interfere no diagnóstico sorológico da doença (BRASIL, 2006).

No ECO, acompanhei o veterinário na rotina de vacinação de 33 bezerras entre 3 à 8 meses de idade, solicitado pelo proprietário. As bezerras eram contidas e vacinadas com a vacina B19, na via subcutânea, na dose de 2 mL. Posteriormente, era feito a marcação do animal, através do ferro candente com a letra V, acompanhada do algarismo final do ano da vacinação (V6) no lado esquerdo da cara (Figura 3).

A vacina era mantida em temperatura de 2°C à 8°C e protegida da luz solar. Após aplicação, caso, sobrasse doses no frasco, eram descartadas.



Figura 3. Marcação de bezerra com ferro candente
. Fonte: Arquivo pessoal.

3.3. TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA (TPB)

A tristeza parasitária bovina é um complexo de doenças de caráter febril e hemolítico, onde podem estar envolvidas as espécies de *Babesia* e de *Anaplasma*, causando grandes prejuízos econômicos em criadores de bovino (SANTOS et al., 2008).

No Brasil, a babesiose bovina é causada por protozoários da *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a anaplasmose por uma rickettsia, sendo mais importante a *Anaplasma marginale*. Os agentes parasitam as hemácias e a enfermidade que causa é devido, principalmente, à intensa destruição das hemácias do animal, provocando um quadro de anemia (FARIAS et al., 2001).

Os agentes da tristeza parasitária são transmitido pelo carrapato *Boophilus microplus* e a *Anaplasma marginale* pode, ainda, ser transmitido mecanicamente por insetos hematófagos, como moscas, mutucas e mosquitos, ou por instrumentos durante castração e vacinação (DOMINGUES E LANGONI, 2001).

Na América do Sul a babesiose é transmitida exclusivamente pelo carrapato, sendo um dos problemas sanitários de maior impacto econômico para a bovinocultura devido aos altos índices de morbidade e mortalidade. Além dos custos para combater esses parasitos, existem as perdas produtivas, pois os animais apresentam diminuição na produção de leite, carne e problemas reprodutivos, como aborto e diminuição da fertilidade (MARTINS, 2005).

No diagnóstico, devem ser considerados dados epidemiológicos, sinais clínicos e lesões observados na necropsia. Porém a confirmação só é possível pelo exame laboratorial, com a identificação do agente em hemácias parasitadas. O tratamento dos bovinos com TPB é feito com drogas de efeito babesicida (derivados da diamidina), anaplasmicida (tetraciclinas) e de dupla ação, como o imidocarb ou associações de diamidina com oxitetraciclina (DOMINGUES E LANGONI, 2001). Quando não se tem um diagnóstico confirmado, é aconselhável o uso de drogas associadas para o efeito contra as duas doenças (FARIAS, 2001).

Em animais com sintomas graves, é importante o tratamento de suporte que inclui a soroterapia, protetor hepático e transfusão de sangue. Em todos os casos é importante o cuidado de manter os animais o mais calmos possível, com água e comida à sua disposição, pois esta doença leva a um quadro de anemia muito grave, o que compromete a oxigenação dos tecidos fazendo com que os animais, se submetidos a estresse ou movimentos bruscos e de esforço, entrem em choque cardiorrespiratório com morte súbita (SACCO, 2002).

Recomenda – se o controle de carrapatos no rebanho para impossibilitar a transmissão dos hemoparasitas, porém, deve -se manter uma população mínima de carrapato, pois isso é capaz de imunizar de forma natural o rebanho. Em bezerros,

também devem ser expostos a essa infecção, com o objetivo de adquirir essa imunidade natural (DOMINGUES E LANGONI, 2001).

Durante o ECO, houve o acompanhamento de um caso com tristeza parasitária bovina. O proprietário solicitou o serviço veterinário, relatando que havia uma animal doente em sua propriedade, incluindo os sinais de falta de apetite, diminuição de leite, perda de peso, animal apático, depressivo, com aumento de temperatura e evolução rápida dos sinais clínicos. Havia administrado antibiótico à base de enrofloxacina e diclofenaco para o controle de temperatura, porém não houve melhora no animal, permanecendo nesse estado há 3 dias. Animal da raça holandês com idade de 28 meses, ido para a segunda cria com aproximadamente 4 meses de gestação e produzia em média de 16 litros de leite antes de adoecer.

Na chegada da propriedade, observamos que o animal estava separado do rebanho, depressivo, magro e com presença de carrapato. No exame clínico percebeu o aumento da frequência cardíaca (85 bpm), mucosas oculares e vaginal ictéricas (Figura 4), febre de 41,2 °C e hipomotilidade ruminal.



Figura 4. Animal apático, magro e com mucosa vaginal ictérica. Fonte: Arquivo pessoal.

Conforme o relato do proprietário, pela presença de carrapato e sinais clínicos, diagnosticamos o animal com tristeza parasitária, porém devido a evolução rápida dos da doença (3 dias o animal já estava debilitado), concluímos que a TPB, estava sendo causada pelo protozoário da Babesiose.

Conforme Farias (2001), o período de incubação de *Babesia spp.* varia de 7 a 10 dias, enquanto que o de *Anaplasma marginale* geralmente é superior a 20 dias. Embora os sinais clínicos iniciais de *Babesia* ou *Anaplasma* sejam parecidos, com a evolução da doença, é possível estabelecer certas diferenças entre os agentes etiológicos, nos quais a babesiose, observa-se temperaturas mais elevadas (41°C até 42°C) com hemoglobinemia, hemoglobinúria e, eventualmente, icterícia (*B. bigemina*) e manifestações nervosas (*B. bovis*). Na anaplasmosose, não ocorre hemoglobinúria, os aumentos de temperatura são mais moderados (40°C até 41°C), a anemia e icterícia são mais intensas (SANTOS et al., 2008).

O tratamento foi à base de Diaceturato de diaminazeno (Virbazene®), na dose de 25 mL na via intramuscular profunda para combater a infecção causada pela *Babesia* e aplicação de um antipirético à base de flunixin meglumine (Banamine®), na dose de 20 mL na via intramuscular (IM). Foi transfundido 2 litros de sangue, devido ao animal estar debilitado e anêmico e hidratação por via enteral, com 30 litros de água contendo 500 gramas de Drench® e 200 mL de propilenoglicol.

O animal doador do sangue foi a mãe, sendo parentesco mais próximo. A coleta de sangue foi realizada dentro de bolsas de 500 mL da farmácia humana, contendo 63 mL de anticoagulante CPDA-1 (Dextrose Anidra, Citrato de Sódio, Ácido Cítrico Anidro, Fosfato de Sódio Monobásico e água destilada 100mL) para coletar 450 mL de sangue total. O sangue foi retirado da veia mamária da doadora e transfundido rapidamente para o animal através da veia jugular (Figura 5).



Figura 5. Coleta e transfusão de sangue no bovino durante o ECO.
Fonte: Arquivo pessoal.

Segundo Swarbrick (1962), recomenda que o bovino receptor deve ser a mãe, irmão ou filho do doador. O doador deve ser desse ser um animal adulto em saudável, do mesmo rebanho, para evitar a entrada de outras doenças na propriedade (SCHALM, 1970).

A quantidade de sangue retirada de um doador pode ser de até 2% de seu peso sem nenhum risco (CORREA, 1976).

Para a hidratação enteral, foi realizado a contenção do animal, inserido uma sonda nasogástrica e com uma bomba manual foi bombeado o líquido para dentro do rúmen (Figura 6). O Drench é um produto comercial, à base de suplemento mineral e energético, enriquecido com leveduras e tamponantes com a finalidade de estimular o funcionamento ruminal, reestabelecendo o equilíbrio eletrolítico. O propilenoglicol é utilizado com um precursor de fonte de energia rápida ao animal.

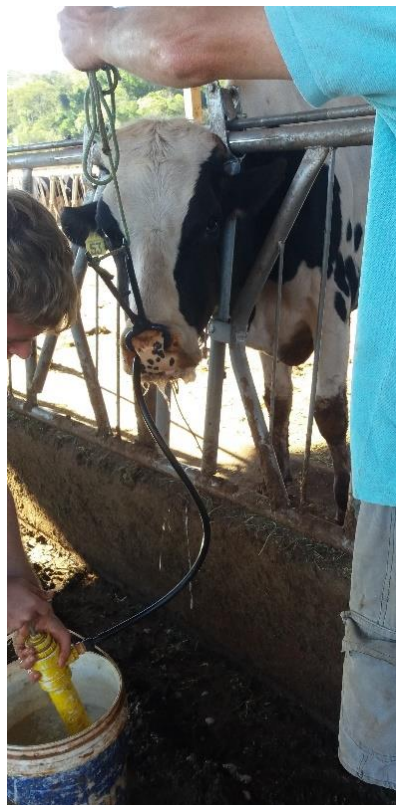


Figura 6. Administração de hidratação via enteral no bovino durante o ECO.

Fonte: Arquivo pessoal.

Orientamos ao proprietário em aplicação no dia seguinte, um dose de Virbazene[®] (25 mL; IM), aplicação de dois dias consecutivos de Banamine[®] (15 mL; IM) e deixar

o animal em repouso, com água fresca, sombra e alimentação. O prognóstico era reservado com a probabilidade de ocorrência de aborto.

No decorrer de 3 dias, o proprietário novamente contatou o serviço veterinário, informando que o animal continuava fraco, consumia pouco alimento e não produzia mais leite. No exame clínico, o animal apresentava melhoras, sendo que as mucosas oculares e vaginais estavam pálidas e levemente icterícia, movimentos ruminais normais e sem febre. Devido ao quadro anêmico grave do animal, foi novamente transfundido 1,5 litros de sangue, sendo a irmã materna doadora do sangue.

Foi aplicado dexametasona (Cortivet®) na dose de 10 mL, via intramuscular para evitar crise circulatória e reação alérgicas da transfusão e aplicação de um hepatoprotetor (Mercepton®), na dose de 30 mL, intramuscular. Orientamos ao proprietário deixar o animal em repouso.

Após 2 dias, o proprietário compareceu na empresa para efetuar o pagamento e informou que o animal estava melhorando, consumindo mais alimento e disposto.

Conclui-se que a TPB, é uma doença de caráter hemolítico, febril e de rápida evolução, podendo levar o animal em grande estado anêmico e até à morte. Podemos diferenciar o agente da infecção através dos sinais clínicos e pelo tempo de evolução, utilizando a medicação coerente para o tratamento do agente.

Essa doença gera grandes perdas econômicas, devido a diminuição de leite, perda de peso e gastos com medicação. É importante elaborar um controle de carrapatos na propriedade, porém, deixando uma mínima parcela da população para induzir e manter a imunidade da doença no rebanho.

4. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO II

4.1. ALTA GENETICS DO BRASIL LTDA

A Alta Genetics do Brasil está localizada na cidade de Uberaba–Minas Gerais, situada na BR 050 Km 164, encontra-se em todo o território nacional através de uma rede de 81 escritórios regionais. Presente em mais de 90 países, a Alta possui nove centrais de coleta no mundo, situados no Brasil, Estados Unidos, Canadá, Argentina, Holanda e China.

Teve início em Calgary, na província de Alberta no Canadá, com o nome de Alta, no ano de 1968. No Brasil, a Alta chegou em 1995, através da fusão da empresa com

o grupo Koepon Holding (maiores organizações privadas de agricultura e agronegócios do mundo), bem como a compra da multinacional Landmark Genetics, a qual lançou a marca Alta Genetics no mercado internacional. No mesmo ano a empresa começou a sua atuação comercial no Brasil, com um escritório sediado na cidade de Porto Alegre - RS como um distribuidor de sêmen importado.

Em 1996 estabeleceu parceria com a Central VR e posteriormente com a Central Bela Vista para a comercialização de sêmen nacional, produzido por estas duas centrais. Ainda em 1996, muda de endereço e estabelece um escritório na cidade de Uberaba – MG, escolhida pela localização estratégica, a capital da pecuária nacional, permitindo melhor atendimento aos clientes, além da facilidade na logística de distribuição de sêmen. Anos mais tarde em 2005, inaugura a mais moderna central de inseminação artificial as margens da BR-050.

A central de produção e tecnologia de sêmen da Alta, sede do Brasil, conta com uma área de 110 hectares. Ela foi construída em formato circular, com o laboratório e a área de coleta no centro. Este desenho faz com que o touro não tenha que deslocar distâncias maiores que 200 metros na hora de ser coletado (Figura 7). Ao todo, a central tem capacidade para alojar 279 touros, que ficam em piquetes com cerca de 1.200 metros quadrados, com baia e muita sombra natural. A dieta é servida no cocho, 100% balanceada, feita sob medida, com nutrientes que estimulam a boa produção de sêmen.

O local estratégico escolhido para a construção da central possibilita por ano, mais de 12 mil visitas, entre pecuaristas, técnicos, criadores, estudantes e pessoas relacionadas ao agronegócio. A equipe profissional é formada por médicos veterinários, zootecnistas, agrônomos, administradores, biólogos, contadores, técnicos em química e logística, e o pessoal responsável pela coleta do sêmen.

A central está estruturada com um moderno laboratório de processamento de sêmen, com área de coleta de sêmen, área comercial, unidade de estoque de sêmen, quarentenário, área de residência para os animais, dividida em unidade central, unidade especial para animais indóceis e unidade de expansão. Possui também, um área de apoio de exposição de animais, galpão de depósito de alimentos e maquinários, alojamentos, restaurante e outros afins. O funcionamento da central é das 7hs às 17hs, de segunda à sexta feira, tendo exceções de atendimento, para realizações de curso ou visitas.



Figura 7. Estrutura da empresa Alta Genetics. Fonte: Alta Genetics do Brasil Ltda.

5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA ALTA GENETICS DO BRASIL LTDA

A segunda parte do estágio curricular obrigatório (ECO), foi realizado na empresa Alta Genetics do Brasil Ltda., situada na cidade de Uberaba - MG, no período do dia 15 de setembro à 15 de novembro de 2016, sob orientação do Médico Veterinário Neimar Correa Severo, perfazendo um total de 336 horas.

A Alta Genetics é uma central que oferece serviços no ramo de tecnologia de sêmen bovino, sempre buscando atender com qualidade seus clientes e dispendo da melhor infraestrutura e tecnologia pelo mercado. Além disso, é uma empresa de alto padrão, possui ótimos profissionais e oferecer oportunidade de aprendizagem, foi o que contribui na escolha da empresa como local de realização da segunda parte do meu ECO.

Durante o ECO, foram acompanhadas as rotinas de laboratório e as rotinas de manejo com os animais. Na parte laboratorial, acompanhou-se todo o processamento que é realizado com sêmen até o envase. Realizava -se recepção do sêmen, adição de antibiótico, aferição de volume, concentração, avaliação de motilidade e vigor, análise morfológicas do ejaculado (defeitos maiores e menores), envase, teste de liberação, teste de termo resistência, avaliação pré congelamento, congelamento do sêmen, estoque, preparações de diluentes e materias de apoio.

Na parte externa, acompanhava-se as rotinas de exames sanitários, nas segundas e quintas feiras, nos animais da quarentena e renovação dos animais da residência. Nos exames sanitários, era feito a coleta de material para tricomonose, campilobacteriose, brucelose, diarreia viral bovina (BVD) e o teste de tuberculose. Realizava-se aplicações de vacinação para raiva, carbúnculo (Sintomático e

hemático), botulismo e medicação preventiva para leptospirose, à base de estreptomicina. Auxiliava na clínica de animais doentes acompanhando o veterinário João e o funcionário Cezar, realizando curativos em animais que tinham algum tipo de lesão. Problemas de casco são muito comuns devido ao peso do animal (Figura 8), alguns animais possuíam lesão na parte ventral da barbela devido a monta rotineira, no trato genital, lesão pouco comum nos animais, muitas vezes, devido ao manuseio errado das vaginas artificiais.



Figura 8. Casqueamento preventivo e lesão na sobreunha do touro, ocorrido no desembarque do animal. Fonte: Arquivo pessoal.

Foi realizado a coleta de sêmen através da vagina artificial e do eletroejaculador em alguns animais. O eletroejaculador era utilizado devido à dificuldade de manejo de animais com comportamento indócil ou por não serem acondicionados à saltar no manequim.

Acompanhou-se profissionais da área comercial, nas visitas realizadas na central, onde mostravam os touros para os visitantes, descrevendo os pontos positivos e negativos dos animais de interesse para os clientes.

Todas as atividades acompanhadas, tanto na área de clínica, quanto comercial e laboratorial, foram de grande importância para o aprendizado prático e teórico, ambas se complementaram. O detalhamento das atividades desenvolvidas no estágio foram organizado conforme cada setor e sua funcionalidade da central, desde o a recepção do animal destinado para coleta até o estoque do sêmen e saída do animal.

5.1. QUARENTENÁRIO

O quarentenário é composto por 59 piquetes com cocho de comida e bebedouros individuais, sendo 12 piquetes cobertos. Nesse local, possui tronco metálico para contenção do animal (Figura 9) e balança móvel.



Figura 9. A - Tronco de contenção e local de realização dos exames sanitários; B - Piquetes individuais do quarentenário. Fonte: Arquivo Pessoal.

Todos animais que entram na central, são recepcionados no quarentenário, através de embarcadouros controlados e troncos com balanças para a estimativa do peso e a realização do exame físico do animal. No exame físico é verificado o estado de saúde do animal, se há lesões e o escore corporal, no caso, se tiver alguma alteração é comunicado ao proprietário e muitas vezes não é desembarcado.

Os animais que desembarcam na central são encaminhados para piquetes individuais e ficam em observação no mínimo de 30 dias e durante esse período, são realizados os exames sanitários. São coletadas amostras para o exame de campilobacteriose, tricomonose, diarreia viral bovina, brucelose, realizado o teste de tuberculose, aplicação de vacinas para raiva, botulismo e carbúnculo (Sintomático e hemático), além do tratamento preventivo para leptospirose (Figura 10). Todos exames possuem uma rotina até a liberação do animal. Após a liberação, o animal está apto para coleta e comercialização de sêmen e é encaminhado para área de residência.

Conforme a Instrução Normativa 48/2003 (MAPA, 2003), considera a necessidade de estabelecer medidas sanitárias para garantir a qualidade do sêmen produzido e comercializado no Brasil, todos animais, antes de ingressarem no rebanho residente da centro de coleta e processamento de sêmen, deverão ser submetidos à quarentena por um tempo mínimo de 28 dias e, deverão ser realizados

teste diagnósticos para as doenças de brucelose, tuberculose, campilobacteriose genital bovina, tricomonose e diarreia viral bovina.

Doenças como a brucelose, campilobacteriose e tricomonose, influenciam na capacidade reprodutiva do touro, por esse motivo, deve ser realizar testes para o diagnóstico e prevenção dessas doença, no entanto, as doenças como rinotraqueite infecciosa bovina (IBR) e a diarreia viral bovina (BVD), devem ser controladas, pois a ocorrência dessas doenças durante a estação de monta prejudica o rebanho, resultando em um número de vacas com retorno de cio, abortos e nascimentos de bezerros fracos (OHI et al., 2010).

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), enfermidade infecto-contagiosa, causada por *Herpesvírus bovino-1* (BHV-1), identificado em 1958 e caracterizada pela perda de peso, ocorrência de abortos, infertilidade temporária e queda na produção de leite, podendo ser transmitida pelas vias respiratórias, digestivas, monta natural, inseminação artificial e fômites, considerada uma doença de grandes prejuízos econômicos (DOMINGUES E LANGONI, 2001).

Observa-se que IBR é uma doença caracterizada por perdas reprodutivas de grande impacto econômico, porém, por não constar obrigatoriedade pela normativa 48/2003 instituída pelo MAPA (2003), a central não realiza exames diagnósticos para essa doença, permitindo assim a disseminação através do sêmen contaminado de touros possivelmente portadores da doença.

Os animais que saem da central, voltam para o quarentenário e são refeitos os exames sanitários, para prevenir qualquer indenização ou problemas futuros com o proprietário do animal.



Figura 10. Rotina de exame sanitário. 1 – Meio de cultura de transporte utilizado para a coleta de material para campilobacteriose; 2 - Meio de cultura para coleta de material para tricomonose; 3 – Medicação utilizada para prevenção de leptospireose; 4 – Vacina para botulismo e carbúnculo (Sintomático e hemático); 5 – Vacina para raiva; 6 – tuberculina bovina e cutímetro; 7 – Tubo de coleta de sangue para brucelose; 8 – Tubo de coleta de sangue para BVD; 9 – Caneta tinteira para identificação dos materiais; 10 – Cronograma de rotina dos exames sanitários; 11 – Coleta de materiais para Genoma. Fonte: Arquivo pessoal.

5.1.1. Campilobacteriose Genital Bovina (Vibriose)

No exame de campilobacteriose, a coleta do material é realizada semanalmente, durante quatro semanas. O material é extraído do interior do prepúcio com o auxílio de uma pinça própria e um swab estéril. Primeiramente é realizada a tricotomia do óstio prepucial, a higienização do prepúcio externamente com água corrente e secado com papel toalha. O swab é acoplado na pinça e introduzido até o fundo do saco da cavidade prepucial, fazendo-se a fricção da mucosa prepucial e peniana, a fim de coletar o esmegma (Figura 11). O swab que foi embebido no muco é retirado e colocado em um tubo com meio próprio de cultura para transporte, contendo gel de agarose (Cary-Blair). O tubo é identificado com o nome do touro, refrigerado a

temperatura de 2° a 8° graus e posteriormente transportado para o instituto biológico de São Paulo, no prazo de 48 horas, para as análises. O resultado é repassado por e-mail entre 7 a 14 dias.



Figura 11. A – Inserção do swab estéril no prepúcio do touro; Raspagem do swab na mucosa prepucial; Retirado do swab com esmegma do prepúcio. Fonte: Arquivo pessoal.

A vibriose bovina é uma doença venérea contagiosa, caracterizada por infertilidade e abortamento, causada por uma bactéria *Campylobacter fetus*, anteriormente, denominada de *Vibrio fetus* (HAFEZ, 1982). Segundo Derivaux (1980), o *Vibrio fetus* foi isolado pela primeira vez em 1913 por Mc Fadyean e Stockman, a partir de abortos de vacas e ovelhas. O gênero *Campylobacter* foi proposto em 1963, em resposta para um grupo de espécies com características diferentes das bactérias conhecidas como as do gênero *Vibrio* (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

Segundo o manual OIE sobre animais terrestres (2004), o agente causador da doença campilobacteriose genital bovina é o agente *Campylobacter fetus* Subespécie *venereal*. A transmissão da doença se dá do touro para vaca por ocasião da cobertura, podendo ser pela inseminação artificial a partir de um sêmen contaminado (DERIVAUX, 1980).

Segundo Hafez (1982), o efeito clínico desta infecção é limitado ao sistema reprodutivo e a disseminação se dá apenas pelo acasalamento, é raramente observada em bovinos leiteiros porque as fontes do sêmen para inseminação artificial são praticamente livres desse agente, por outro lado, a cobertura natural ainda predomina em gado de corte, sendo que a doença prevalece em muitos rebanhos.

A transmissão indireta de um touro para touro pode se dar no caso de colheitas sucessivas de sêmen, quando não se tem a precaução de reservar uma vagina artificial para cada animal (DERIVAUX, 1980).

No touro, o agente está confinado à mucosa da glândula peniana, prepúcio e porção distal da uretra, nas vacas e novilhas, os locais de infecção pelo agente é o lúmen vaginal, cérvix, útero e oviduto (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015). O microrganismo também é encontrado no feto (líquido gástrico, rins e fígado), nas membranas e líquidos fetais e no corrimento útero-vaginal após o aborto (DERIVAUX, 1980).

A patogenia da vibriose nos touros é distinta das fêmeas, a bactéria habita o pênis e o prepúcio do touro em uma relação de simbiose que não provoca qualquer modificação física, nem afeta a qualidade do sêmen ou libido (HAFEZ, 1982).

Segundo Menegassi e Barcellos (2015), a infecção nas fêmeas pode ocorrer casos de vaginite catarral. A mucosa vaginal apresenta uma inflamação com corrimento exsudativo evidenciados durante os primeiros 9 dias, pode comprometer a fertilização, a implantação do embrião e ser origem de mortalidade embrionária (DERIVAUX, 1980). Outros sinais podem incluir endometrites, salpingites e aumento dos ciclos estrais, acima de uma mês (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015). Alguns ciclos em seguida à infecção podem ser de duração normal, mas frequentemente um ou mais ciclos são anormalmente longos porque a concepção ocorre e o embrião em desenvolvimento retarda o cio, até que ele morre e é reabsorvido (HAFEZ, 1982). Em raras ocasiões, a gestação pode atingir de 5 a 7 meses antes das lesões placentárias, que são as causas da morte fetal e expulsão do feto (aborto) (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

Conforme Derivaux (1980), em vacas e novilhas prenhas, o vibrio localiza – se principalmente ao nível dos cotilédones, que tornam–se hemorrágicos, ficam cobertos de placas esbranquiçadas, acinzentadas ou amareladas, a base espessada pela presença de um exsudato viscoso, enquanto que os espaços intercotiledonares estão edematosos e recobertos por depósitos granulosos.

Para diagnóstico da doença, são necessários procedimentos de laboratório, sendo mais seguro a demonstração do agente mediante cultura a partir de fetos e secreções vaginais ou prepuciais. (BEER, 1999) Nos Touros, o esmegma, pode ser obtido por diferentes métodos, como raspagem, aspiração e lavagem. O esmegma, é

normalmente coletado por raspagem e pode ser utilizado para o isolamento das bactérias (OIE, 2008).

Conforme a instrução Normativa nº 48/2003 (MAPA, 2003), estabelece rotinas sanitárias para centrais que processam e comercializam sêmen no Brasil e institui para o exame de campilobacteriose genital bovina, três testes negativos de cultivo de material coletado do prepúcio com intervalo mínimo de sete dias.

Para tratamento da doença, a estreptomicina foi a substância mais utilizada no controle das infecções por amostras de *C. fetus*. (DERIVAUX, 1980). Os touros podem ser tratados pela administração sistêmica de estreptomicina, aplicação local ou por ambas as combinações. (HAFEZ, 1982). Numerosas vacinas têm sido empregadas, tratam-se de vacinas vivas ou formuladas, preparadas a partir de cepas de *vibrio fetus venerialis*. A duração da imunidade seria de cerca de 15 meses. (DERIVAUX, 1980)

5.1.2 Tricomonose / Tricomoníase Genital Bovina (TGB)

O exame de tricomonose, a coleta é realizada semanalmente, sendo por 4 semanas. Para a coleta do matéria, primeiramente é feito a tricotomia do óstio prepucial, a lavagem externamente do prepúcio com água corrente e enxugado com papel toalha. Posterior à lavagem da região prepucial, utiliza-se de uma pipeta de inseminação artificial acoplada a uma tubo flexível (borracha) de aproximadamente 30 centímetro ligado a uma seringa com 50 mL de solução salina estéril a 0,9% (100 mL de água destilada com 90g de cloreto de sódio). Introduzia a pipeta até o fundo do saco da cavidade prepucial e injeta – se o volume total da solução da seringa. Retirava-se a pipeta e obstruía-se o óstio prepucial com uma das mãos e, com a outra, realizava massagem vigorosamente no prepúcio por aproximadamente um minuto. Liberava - se o óstio prepucial e recolhia o líquido no frasco (tubo cônico) contendo meio de Lactopep (Figura 12). Homogeneizava e caso precisar-se, completava - se o volume com solução salina, até obter 40 ml no frasco (2g de Lactopep / 40 mL de solução salina).

O frasco deve ser identificado com o nome do touro e mantido em temperatura ambiente, pode permanecer até 6 dias viável para análise, porém ele era encaminhado, juntamente com o exame de campilobacteriose para o Instituto biológico de São Paulo.



Figura 12. Retirada de esmegma do prepúcio do touro para exame de tricomonose. Fonte: Arquivo pessoal

A tricomonose é uma doença venérea, contagiosa, caracterizada por infertilidade, piometra e abortamento em bovinos. O agente etiológico é representado por protozoário, o *Tricomonas fetus* (HAFEZ, 1982).

O habitat é o trato genital de bovinos, sendo transmitido do macho para fêmea através da monta ou pelo uso de sêmen contaminado (PELLEGRIN E LEITE, 2003). Também pode ocorrer através de vagina artificial e instrumentos obstétricos contaminados. Foi descrita por Kunstler, na França, em 1888 e no Brasil, o primeiro diagnóstico foi em 1948, por Rubens Roehe, que identificou o protozoário no sêmen de reprodutor bovino na Central Riograndense de Inseminação Artificial (CRIA), no estado do Rio Grande do Sul (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

Na fêmea, o parasita localiza-se ao nível da vagina e do útero, é abundante no pús das piometras e nas secreções leucorréicas que acompanham os abortos (DERIVAUX, 1980). No macho, os tricomonas são encontrados na cavidade prepucial, mucosa peniana e porção inicial da uretra e, no feto, a localização mais comum é no líquido amniótico e alantoico, além do fluido do abomaso (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

A infecção da fêmea resultando em uma vaginite leve, que usualmente não é observada, posteriormente, passa para o útero dentro de 20 dias, causando

endometrite, porém o reconhecimento da doença é pela ocorrência de piometra, abortamento ou fertilidade diminuída (HAFEZ, 1982).

O tricomonas, chegando no útero, geralmente provoca inflamação de natureza catarral, de duração variável, constitui causa frequente, embora temporária de esterilidade. Os ciclos se repetem a cada 3 semanas em certos casos e de maneira irregular em outros (DERIVAUX, 1980). O que causar o encurtamento dos ciclos é a inflamação do útero, já ciclos estrais longos ocorrem quando o embrião sobrevive além de 14 dias e o ciclo estral não é interrompido, porém, mais tarde, quando o embrião morre e é expelido ou reabsorvido, os ciclos estrais recomeçam (HAFEZ, 1982).

O aborto acontece, geralmente, entre um mês e meio a quatro meses, em alguns casos, o feto não é expelido, ocorrendo a maceração fetal e piometra (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015). Se o feto fica retido no útero, produz uma piometra, está sucedendo a um período de gestação de curta duração, 30 a 60 dias ou pode persistir além do termo normal da gestação (DERIVAUX, 1980).

Nos touros, a infecção aguda é caracterizada por um processo inflamatório discreto de prepúcio (postite) e do pênis (balanite), seguido de secreção mucopurulenta, entretanto, os sinais clínicos desaparecem em duas semanas, e os portadores são, geralmente, assintomáticos (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

O diagnóstico da Tricomonose Bovina baseia-se no isolamento e identificação do *T. fetus* em material prepucial e vaginal ou em fetos abortados e suas membranas fetais (CLARK et al., 1974). Nos touros, o material de eleição é o esmegma prepucial ou lavado prepucial e, nas fêmeas, o muco vaginal (PELLEGRIN E LEITE, 2003).

O método direto é o exame microscópico de amostras recém colhidas, que são montadas entre lâmina e lamínula e observadas em objetiva de pequeno aumento, porém o método direto é menos sensível que o método de cultivo (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

O meio de cultivo que vem sendo mais largamente empregado é o Diamonds podendo no entanto ser utilizado o Lactopep (peptona, leite em pó e antibióticos) ou o Rieck (leite em pó + antibióticos). O material é depositado em tubo de ensaio (de preferência com tampa de rosca) contendo Lactato de Ringer, PBS (pH 7,4) ou solução salina (pH 7,4), ou mesmo o meio seletivo escolhido para o isolamento (PELLEGRIN E LEITE, 2003).

Conforme a instrução Normativa nº 48/2003 (MAPA, 2003), institui para os centro de coleta, processamento e comercialização de sêmen no Brasil, a realização de três testes negativos de cultivo de material coletado do prepúcio, com intervalo mínimo de sete dias para tricomonose.

A maior parte das vacas recupera-se espontaneamente e o tratamento individual é desnecessário, com exceção dos casos de piometra. A recomendação usual é de 90 dias de descanso sexual para permitir que a imunidade elimine a infecção (HAFEZ, 1982).

Tratamento com dimetridazole por via oral é altamente eficaz, porém tem um custo elevado e são necessários 5 dias de tratamento, o que é considerado elevado para animais de rebanho (SKIRROW et al., 1985). A utilização de penicilina procaína associado com ipronidazole para o tratamento da doença nos animais, por via intramuscular em dose única ou dividida em três doses, em 3 dias consecutivos, já para touros que não respondam ao tratamento recomendam ser descartados. (PELLEGRIN E LEITE, 2003).

Devido aos problemas reprodutivos e por grandes perdas econômicas que as doenças de campilobacteriose e a tricomonose fornecem ao rebanho, é relevante o atestado negativo dos touros da Central para impedir a disseminação das doenças no rebanho brasileiro.

5.2.3 Diarreia Viral Bovina (BVD)

Para o exame de BVD, é coletado o sangue do animal através da veia jugular ou coccídea em tubo de tampa azul, contendo citrato de sódio (Figura 13). O sangue coletado com anticoagulante é homogeneizado por inversão, para evitar hemólise e a coagulação do sangue. Posteriormente, a amostra é resfriada e encaminhada para o instituto biológico de São Paulo, onde é realizado as análises e repassado o laudo do teste para a empresa.



Figura 13. Coleta de sangue para exame de Diarreia Viral Bovina.
Fonte: Arquivo pessoal.

A diarreia viral bovina deprime o sistema imunológico do animal, permitindo que outras doenças virais e bactérias se estabeleçam e se disseminem, no entanto, o vírus é caracterizado por causar abortos e nascimentos de fetos defeituosos (OHI et al., 2010).

Segundo Baker (1995), o vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus, BVDV*), é uma dos principais agentes causadores de perdas econômicas significativas para a pecuária bovina em todo mundo.

O vírus está caracterizado por provocar problemas reprodutivos, entéricos e respiratórios (PERDRIZET et al., 1987). No entanto, é responsável por abortos e nascimentos de fetos defeituosos (OHI et al., 2010).

Produtos biológicos como o sêmen e embriões contribuem para fonte de transmissão do vírus, o qual é eliminado no sêmen de touros, podendo ser transmitido a vacas soronegativas durante o processo de inseminação artificial. (NOIVA, 2010).

Segundo o manual de diarreia viral bovina, da OIE (2008), relata que touros com infecção persistente geralmente têm baixa qualidade seminal e por consequência, redução na fertilidade.

Conforme o instrumento normativa 48/2003 do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária (2003), institui teste negativo para o isolamento viral e identificação do agente por imunofluorescência ou imunoperoxidase, ou teste para detecção de antígeno viral, sendo que todos os animais deverão ser testados, antes de ingressar no rebanho residente, com objetivo de descartar a possibilidade de infecção persistente para BVD. Aqueles que obtiverem resultados positivos ao primeiro teste para BVD serão submetidos a um segundo teste com intervalo mínimo de 21 dias, obtendo resultado negativo ao segundo teste, os animais estarão qualificados para ingressar na central.

Portanto, conclui-se que é de grande importância o monitoramento sistemático da doença em touros de centrais de coleta de sêmen, devido à disseminação do vírus pelo sêmen e danos ao sistema reprodutivos do animal.

5.1.4 Brucelose Bovina

O exame de brucelose é realizado no laboratório credenciado, conforme Programa Nacional de controle e erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) e também, encaminhado uma amostra de soro para o instituto biológico de São Paulo.

É realizado a coleta de sangue em tubos para obtenção de soro (Figura 14). Os tubos sem anticoagulante para que ocorra o processo de coagulação, portanto, a coleta deve ser feita no tubo de tampa vermelha sem gel ou em tubo de tampa amarela com gel. Esses tubos contêm ativador de coágulo e deve – se manter em repouso na posição vertical para separação do soro. O teste de brucelose é realizado pelo método indireto de soro aglutinação, com o antígeno acidificado tamponado.

O agente etiológico da brucelose é a *Brucella abortus*, disseminada pelas vacas infectadas que eliminam os agentes em grande quantidade após o aborto ou após partos normais pelos líquidos loquias e o leite (HEIDRICH et al., 1980).

As consequências da doença bovina são perdas de bezerros devido ao aborto com 6 meses ou posterior (por volta de um terço dos animais infectados abortam), esterilidade ou infertilidade do macho e da fêmea (CARTER, 1988).

Segundo o PNCEBT (BRASIL, 2006), nos machos existe uma fase inflamatória aguda, seguida de cronificação, frequentemente assintomática.

Os touros saudáveis geralmente não se infectam através da cobertura de uma vaca doente, mas touros doentes infectam as vacas (CARTER, 1988). A bactéria pode

se instalar nos testículos, epidídimos e vesículas seminais, sendo que um dos possíveis sinais é a orquite uni ou bilateral, transitória ou permanente, com aumento ou diminuição do volume testicular, em outros casos, o testículo pode apresentar um aspecto amolecido e cheio de pús (BRASIL, 2006).

O controle da bactéria é através dos testes de sangue (teste de aglutinação) de todo o rebanho com a remoção dos animais positivos e para que o gado fique menos suscetível, é recomendada a vacinação dos bezerros (CARTER, 1988).

Em touros de centrais é recomendado repetir periodicamente as provas sorológicas, a fim de descobrir, o mais rápido possível a doença (DERIVAUX, 1980).

Conforme o instrumento normativa 48/2003 do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária (2003), o animal precisa estar atestado negativamente para à brucelose, através dos testes de antígeno acidificado tamponado, pelo teste do 2-mercaptoetanol ou pelo teste de Fixação de Complemento, antes do animal ingressar para a área de residência.

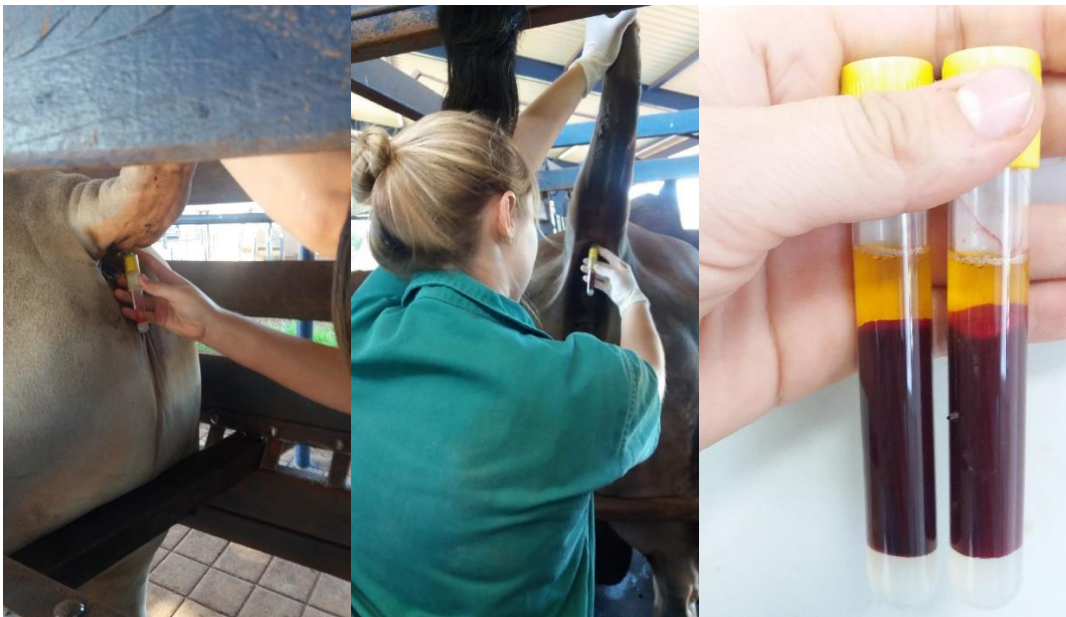


Figura 14. Coleta de sangue para exame de brucelose. Fonte: Arquivo pessoal.

5.1.5 Tuberculose Bovina

Nos exame de tuberculose, é realizado o teste cervical comparativo (TCC) nos animais que estão no quarentenário e para os animais que estão na área de residência é realizado a renovação do exame a cada 6 meses, através do teste cervical simples (TCS), de acordo com os procedimentos da PNCEBT. No TCC, realizava - se a

tricotomia em dois pontos distintos na região cervical do animal, com um cutímetro, realizava a leitura da espessura da pele e aplicação intradérmica da tuberculina bovina em um ponto e no outro a aplicação intradérmica da tuberculina aviária. Após 72 horas, era realizada a leitura. No teste simples, aplicava - se apenas a tuberculina bovina.

A tuberculose causada pelo *Mycobacterium bovis* é uma zoonose de evolução crônica que acomete principalmente bovinos e bubalinos. A doença destaca -se por problemas de saúde animal e de saúde pública no Brasil, sendo caracterizada pelo desenvolvimento progressivo de lesões nodulares denominadas tubérculos, que podem localizar-se em qualquer órgão ou tecido (BRASIL, 2006).

Pelo instrumento normativa 48/2003 do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária (2003), os testes de eleição para touros de centras de coleta de sêmen, devem ser através do teste de tuberculinização intradérmica simples ou comparada com tuberculina bovina e tuberculina aviária.

Conclui – se a importância da realização de exames nos touros das centrais, para impedir a disseminação da doença nos animais, através do sêmen e também, devido ao caráter zoonótico.

5.1.6 Profilaxia

Os animais também recebem vacinação com Raivacel Multi® para profilaxia da raiva, aplicando 2 mL na via subcutânea (Figura 15), Excell 10® (Prevenção do carbúnculo sintomático e hemático, gangrena gasosa, enterotoxemia, morte súbita, edema maligno, tétano e botulismo, na dose de 5 mL por animal na via subcutânea).

Com intuito de tratar Leptospirose, é administrado antibiótico a base de penicilina (Dihidroestreptomicina), na dose de 1 mL para cada 10kg de peso vivo em dose única (não é realizados exames para confirmação da doença, apenas para tratamento preventivo). É administrado Dectomax® (parasiticida injetável de amplo espectro, dose de 1 mL para cada 50 kg de peso na via subcutânea), sendo aplicada 2 vezes no animal, na entrada e saída do quarentenário.

Após todo o procedimento de rotina do quarentenário, sendo que todos exames constarem negativos conforme o instrumento normativa 48/2003 do MAPA, realizadas todas profilaxias e o animal apresentar fisicamente sadio, está apto para coleta e comercialização do sêmen, e assim, encaminhado para a área de residência.

Nos animais da residência, a renovação dos exames sanitários são realizados a cada 6 mês após a saída do quarentenário, com o objetivo de garantir a saúde do animal, a qualidade do sêmen e a confiabilidade do animal não ser portador dos agentes infecciosos.

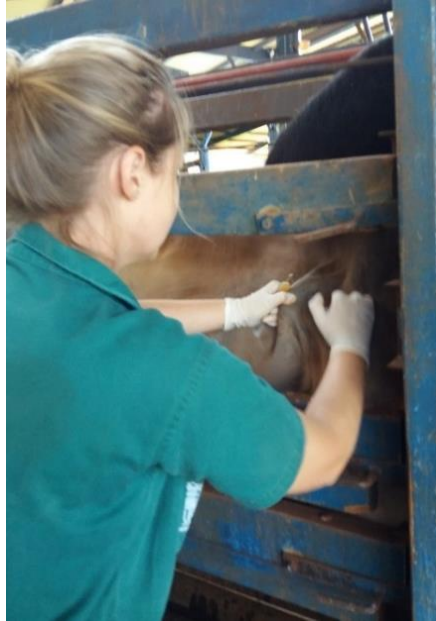


Figura 15. Aplicação de vacina para raiva, botulismo e carbúnculo.
Fonte: Arquivo pessoal.

Vacinação da febre aftosa, também é aplicada nos animais conforme o calendário nacional de vacinação dos bovinos e bubalinos contra a febre aftosa. O estado de Minas Gerais tem a obrigatoriedade de vacinar contra febre aftosa todos os animais abaixo de 24 meses de idade, durante o mês de novembro de 2016. (MAPA, 2016). Portanto, no período que realizei do meu ECO, acompanhei e vacinei os animais contra a doença conforme o calendário (Figura 16).

Calendário nacional de vacinação dos bovinos e bubalinos contra a febre aftosa 2016'

UF	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
ACRE ⁽⁴⁾					3						1	
ALAGOAS					1						1	
AMAPÁ ⁽⁴⁾									4	4	4	
AMAZONAS ⁽⁴⁾			1	1	1			1	1		1	
BAHIA					1						3	
CEARÁ					1						1	
DISTRITO FEDERAL					1						3	
ESPIRITO SANTO					3						1	
GOIÁS					1						3	
MARANHÃO					1						1	
MATO GROSSO ⁽⁴⁾					3						1	4
MATO GROSSO DO SUL ⁽⁴⁾					1	4					1	4
MINAS GERAIS					1						3	
PARÁ					1				4	4	1	
PARAÍBA					1						1	
PARANÁ					3						1	
PERNAMBUCO					1						1	
PIAUI					1						1	
RIO DE JANEIRO					1						3	
RIO GRANDE DO NORTE					1						1	
RIO GRANDE DO SUL					1						3	
RONDÔNIA ⁽⁴⁾					3						1	
RORAIMA ⁽⁴⁾					1	1					1	1
SÃO PAULO					3						1	
SERGIPE					1						3	
TOCANTINS ⁽⁴⁾					1				4	4		3

- 1 = vacinação de todo o rebanho bovino e bubalino.
 2 = vacinação de animais com menos de 12 meses (não aplicada).
 3 = vacinação de animais com idade até 24 meses.
 4 = vacinação anual de todo o rebanho bovino e bubalino.

Figura 16. Calendário nacional de vacinação dos bovinos e bubalinos contra febre aftosa 2016. Fonte: MAPA, 2006.

6 ÁREA DE RESIDÊNCIA DOS ANIMAIS

Essa área é dividida conforme o comportamento do animal. Touros dóceis (Unidade central), indóceis (Unidade especial de manejo de animais indóceis) e animais que tenham dificuldade em saltar nos manequins (Unidade de expansão).

6.1 UNIDADE CENTRAL

A unidade central está situada na principal área de coleta da central (Figura 17), onde encontra-se os touros dóceis e a coleta é realizada através do salto em manequins (Figura 18). Essa unidade está estruturada com 178 piquetes de 1.200 metros quadrados, área coberta, cochos para trato, saleiro e bebedouros individuais.



Figura 17. Manequim vivo e tronco de contenção.
Fonte: Arquivo pessoal



Figura 18. Unidade central – Estrutura direcionada para a coleta de sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.

6.2 UNIDADE ESPECIAL DE MANEJO DE ANIMAIS INDÓCEIS

Contem 11 piquetes disposto em forma circular, que dão acesso direto a uma estrutura central equipada com currais metálicos e tronco de contenção. Nesse local estão os animais de comportamento indócil de difícil manipulação para o coletador e devido a isso, essa estrutura foi projetada para realizar o manejo desses animais sem oferecer risco aos trabalhadores, sendo que a coleta que sêmen é realizado no tronco de contenção, por eletroejaculação.

6.3 UNIDADE DE EXPANSÃO

Essa unidade está repartida por 60 piquetes em forma circular, ao redor de uma unidade de manejo de coleta de sêmen por eletroejaculação, onde encontra-se touros com difícil manejo ou com dificuldade de monta em manequins. Esse local está

equipado com uma estrutura coberta, contendo tronco de contenção e sala para preparo de vagina artificial.

Para o procedimento de eletroejaculação, o animal é contido no tronco de contenção, realiza -se a limpeza da região do prepúcio internamente e externamente, com solução de sabão em pó, água corrente, solução desinfetante com Dosatron (115 g de cloreto de sódio e 5 L de água pura) e secagem com papel toalha. Posteriormente, era retirado o material fecal do reto, através da palpação retal, para não interferir nos impulsos elétricos. Era inserido a ampola do eletroejaculador no reto, com os três eletrodos posicionados ventralmente (Figura 19).

Os estímulos elétricos iniciavam se em baixas frequências, mantendo-se em torno de 7 a 10 segundo e voltava-se para o ponto inicial, repetia-se o procedimento por várias vezes, porém aumentando gradativamente a voltagem do estímulo. No estímulo inicial, em baixa voltagem, as vesículas seminais eram sensibilizadas e liberava o líquido seminais, de aparência clara e translúcido, o qual não era coleta. Com o aumento dos estímulos elétricos, o líquido se tornava mais esbranquiçado, indicando a presença de espermatozóides, sendo coletado através de um funil de plástico ligado ao um tubo de coleta que permanecia dentro de um pote com água na temperatura aproximada de 37° C (Figura 20). Percebia-se que através da eletroejaculação obtia-se maior volume de ejaculado comparado com a coleta através da vagina artificial, porém, na inspeção visual, verificava-se que o sêmen era menos concentrado e no laboratório muitos sêmen por eletroejacução eram reprovados pelo espectrofotômetro por baixa concentração de espermatozóides.

Quando o sêmen muito diluído e com baixa concentração, porém tinha valores de motilidade e vigor altos, eram submetidos na centrifuga, separando uma parte mais concentrada do ejaculado para o aproveitamento e processamento de doses.

A eletroejaculação era realizada uma vez por semana nos animais, variando de 30 a 40 touros coletados, sendo principalmente das raças Nelore, Gir, Guzerá e Tabapuã, considerada as raças de comportamento indócil.

A estimulação elétrica é o método preferido apenas quando os reprodutores não podem ser treinados ou recusam servir na vagina artificial, por estarem machucados ou com alguma enfermidades (HAFEZ, 1982).

O eletroejaculador é uma aparelho composto de um transdutor que é colocado no reto do animal, esse transdutor possui três eletrodos longitudinais que devem ser

inseridos no reto do animal posicionados ventralmente, para produzir estímulos elétricos sobre as terminações nervosas locais (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

O excesso de material fecal deve ser removido do reto e inserindo o eletrodo lubrificado. (HAFEZ, 1982). É importante verificar a posição do eletrodo no reto do animal, pois se os eletrodos forem colocados na posição dorsal, os estímulos elétricos podem produzir queda do animal (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

No eletroejaculador, realiza-se uma serie de estímulos elétricos de aproximadamente 100 miliampères cada 2 a 3 segundos, a excitação é repetida cerca de vinte vezes, aumentando progressivamente e ligeiramente de acordo com as reações do animal, observando a contração do cremaste e a subida dos testículos, depois de 15 a 30 excitações em média, as secreções acessórias começam a fluir, sendo recolhidas separadamente, então se eleva os estímulos elétricos para 800 a 1500 miliampères (5 a 6 volts) e a duração de passagem da corrente mantida durante 5 a 6 segundos, os quais, a ejaculação ocorre em cada excitação e o sêmen pode ser coletado (DERIVAUX, 1980).

Segundo Hafez (1982), as amostras de sêmen obtidas com eletroejaculação geralmente são de maior volume com menor concentração de espermatozóides, porém a fertilidade e o número total de espermatozóides são equivalente às amostras obtidas com vagina artificial.



Figura 19. Execução do eletroejaculador. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 20. Coleta do ejaculado através do eletroejaculador.
Fonte: Arquivo pessoal.

7 COLETA DE SÊMEN

7.1 PREPARO DOS MANEQUINS

Os manequins utilizados para a coleta de sêmen são manequins vivos, 12 vacas e um macho castrado, possui manequim artificial, porém não é utilizado devido ao difícil manejo (Figura 21). Antes da coleta de sêmen é realizado a limpeza e desinfecção dos manequins. Lava-se a região posterior do manequim com água abundante, através de uma lavadora de alta pressão e desinfetada com CB – 30TA® (Cloreto de alquil–dimetil–benzil amônio 0,3%), na proporção de 1:3000 (10 mL do desinfetante para 30 litros de água), esse procedimento se repetia antes de cada coleta ou quando o animal defeca.

Todos os manequins vivos que entravam na central, permaneciam na quarentena para a realização dos exames sanitários e depois de atestado negativo para as doenças eram liberados para a manejo de coleta, porém a cada 6 meses os exames são renovados.

Manequins vivos podem compreender fêmeas estimuladoras, outros machos ou machos castrados, é a técnicas de maior sucesso para a coleta de sêmen rotineira. (HAFEZ et al., 2004).

Manequins mecânicos possuem vantagem em relação a manequins vivos no sentido de proporcionar estabilidade e por permitir o controle de doenças, já os

manequins vivos devem ser contidos para diminuir a movimentação e facilitar acesso para a coleta do sêmen (HAFEZ, 1982).



Figura 21. Utilização de manequins vivos para coleta de sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.

7.2 PREPARO DOS TOUROS

É realizada a lavagem da região prepucial externa e internamente com água em abundância. A região externa é esfregada com solução de sabão em pó e enxaguada com água corrente (Figura 22).

A região interna do prepúcio é desinfetada com solução de Kiolol-L® 1:250 (1 mL do produto em 250 mL de água potável), enxaguado com solução fisiológica 0,9% em abundância e enxugado com papel toalha. Esse procedimento garante uma mínima contaminação do ejaculado.

Na central, a prevalência das raças zebuínas é de maior escala, sendo animais da raça Gir, Nelore, Nelore Mocho, Guzerá e Tabapuã. As raças taurinas como Holandês, Angus, Senepol, Charolês, Hereford e raça sintética como o Girolando, eram em menor proporção. Observa-se, que as raças taurinas, haviam maior facilidade de coleta através da vagina artificial, devido a maior excitação e

comportamento mais dócil, no sêmen, apresentava em sua maioria, vigor entre 4 e 5 e motilidade acima de 70%, índices maiores comparado com alguns animais da raça zebuína.



Figura 22. Lavagem externamente do prepúcio.
Fonte: Arquivo pessoal.

7.3 VAGINA ARTIFICIAL

A vagina artificial é composta por um tubo rígido – cilíndrico (PVC) revestido de borracha, com as duas extremidades abertas e uma válvula na lateral, utilizada para colocação de água e ar (pressão). Além do tubo rígido, a vagina também apresenta uma mucosa de borracha internamente, que é fixada nas duas extremidades abertas do tubo. Em umas das extremidades do tubo é acoplado um funil de silicone e o tubo de coleta, sendo que todo esse conjunto permanecia na estufa à temperatura de 50 °C (Figura 23). A vagina é preenchida com água de 55° C a 60° C, pressão de ar pela válvula e lubrificada na parte interna com gel não espermicida ReproJelly®. A temperatura interna a vagina para a coleta deve estar na faixa de 39 a 42° C. Na utilização da vagina, deve ser colocado uma capa protetora no tudo e aconselhável uma capa protetora em todo o conjunto vagina, para bloquear os raios solares. Segundo Hafez e Hafez (2004), os espermatozoides são sensíveis à ação dos raios ultravioletas.

A Vagina artificial é utilizada apenas uma vez em um animal, para evitar contaminação ou transmissão de doença, após a coleta, ela é desmontada e lavada.

O coletador usa luva descartável de polietileno na sua mão esquerda para realizar o desvio do pênis durante o processo de excitação do touro e na coleta o sêmen.



Figura 23. Vagina artificial desmontada e estufa de armazenamento (50°C). Fonte: arquivo pessoal.

A coleta é realizada duas vezes por semana em cada touro e algumas vezes duas coletas por dia. Após a limpeza do manequim e do touro, um profissional realiza a contenção do manequim para a mínima movimentação e outro manuseia e coleta.

Nas primeiras montas, era realizado o desvio do pênis (Figura 24), isso para excitar mais o touro e também permitir que os líquidos das glândulas acessórias secretassem, com o objetivo de limpar o canal da uretra de agentes contaminantes.

Na maioria era realizado de 2 a 3 desvio. Posterior, o profissional, retirava uma vagina artificial da estufa e realizava a coleta (Figura 25). O touro, em contato com um canal quente e úmido, liberava o ejaculado. As doses, variam de 6 a 10 mL em média.



Figura 24. Desvio do pênis do touro.
Fonte: Arquivo pessoal.

Na primeira tentativa de monta, é recomendado que o operador desvie o pênis do macho, com o objetivo de proporcionar algum estímulo extra ao comportamento reprodutivo, na segunda monta, novamente é realizado o desvio, mais direcionado o pênis para o interior da vagina artificial, ocorrendo a ejaculação. O sêmen deve ser levado imediatamente para o laboratório e imerso em banho-maria, para que se proceda a sua avaliação (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).



Figura 25. Coleta de sêmen através da vagina artificial. Fonte: Arquivo pessoal.

7.4 TRANSPORTE DO SÊMEN

Após a coleta do sêmen, o tubo com o ejaculado é protegido da luz com a capa protetora (Figura 26) e transportado rapidamente ao laboratório de preparo de vaginas, o qual recebe a identificação através de uma etiqueta, constando o nome do touro, registro, nome do coletor e o horário de entrega no laboratório e é repassado

pela janela dupla, para dentro do laboratório. Esse processo deve ser rápido para não perder a temperatura do ejaculado, podendo deixar assim, os espermatozoides inviáveis.



Figura 26. Capa protetora para o tudo de sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.

8. LABORATÓRIO

O laboratório é composto por vestuários com duchas, banheiros, antessala, sala de preparo de soluções, sala de estoque temporário de botijões, sala para processamento de sêmen (Figura 27), sala de controle de qualidade, sala de lavagem e esterilização de materias. Adjacente ao laboratório, está a sala de vagina artificial (Figura 28).



Figura 27. Laboratório – Sala de processamento de sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 28. Sala de vagina artificial. Fonte: Arquivo pessoal.

9. ROTINA DO LABORATÓRIO DE SÊMEN

Assim que o sêmen chegava ao laboratório, passava pelos seguintes processamentos, como mostra a figura 29:



Figura 29. Rotina do laboratório de sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.

Imediatamente, após a coleta do sêmen, o tubo identificado é colocado através da janela dupla do laboratório, num banho maria de 37°C (Figura 30), com o objetivo de manter a temperatura do ejaculado e não sofrer danos com choque térmico. Recebido o sêmen no laboratório, ele deve ser processado o quanto antes, para não perder a integridade da célula espermática.



Figura 30. Banho maria com amostra de sêmen.
Fonte: Arquivo pessoal.

Pelo sistema operacional da Alta (*AltaTwo*), é registrado o nome do touro, o nome do coletador e a hora de recepção do ejaculado.

O sêmen é retirado do banho maria e é realizado uma avaliação visual, com o intuito de observar algumas anormalidades, como a presença de sangue, pús, impurezas, urina ou outros contaminantes (Figura 31).

A avaliação do aspecto é feita visualmente, levando em consideração a cor e a aparência do sêmen, enquanto que as amostras podem ser classificadas como esbranquiçadas, branca, marfim ou amareladas (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015). As colorações avermelhadas, marrom e cinza escuro são indicativos de, respectivamente, sangue vivo, sangue hemolisado e sujeira (CBRA, 1998).

Amostras não devem conter pêlos, poeira e outros contaminantes, assim como o aspecto coalhado ou granuloso, não devem ser processadas (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

A aparência poderá ser cremosa, leitosa, opalescente, serosa ou aquosa, correspondendo, aproximadamente, a uma determinada concentração espermática (CBRA, 1998).

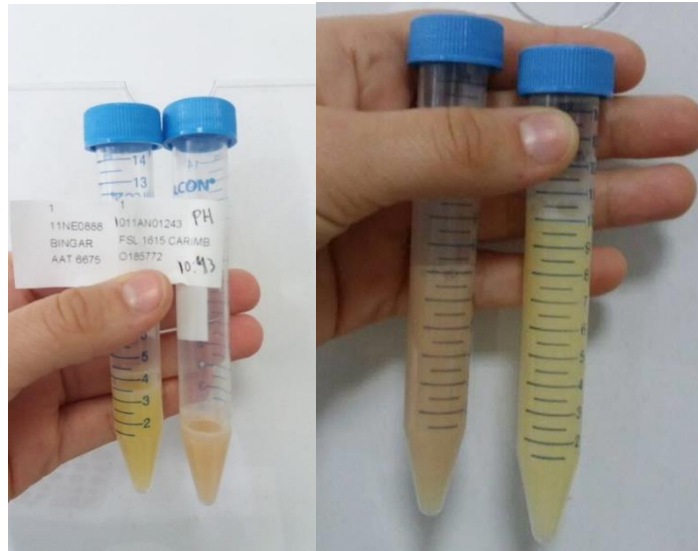


Figura 31. Sêmen contendo terra e sangue, respectivamente.
Fonte: Arquivo pessoal.

Posteriormente a inspeção visual é aferido o volume (Figura 32). O volume é estimado em mililitros através da pesagem em balança semi – analítica calibrada com um tubo de peso igual da coleta de sêmen.

O Volume é expresso em mililitros, pode ser relativo ao método de coleta do sêmen, sendo que a coleta através da vagina artificial proporciona volume mais próximos do fisiológico (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

Não existe um limite mínimo ou máximo para o volume ejaculado, pois ele varia dependendo da espécie e cada espécie tem a variação entre animais, podendo ser devido ao método de coleta, ao regime de serviço prévio à coleta, ao tempo de excitação, entre outros (CBRA, 1998).

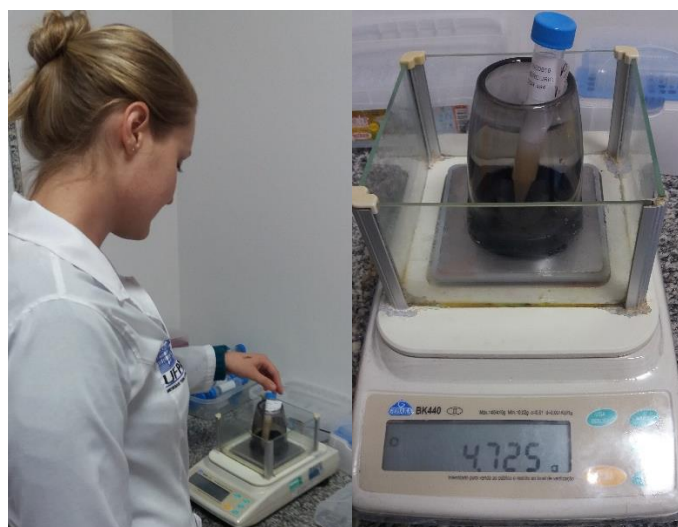


Figura 32. Aferição do volume do ejaculado.
Fonte: Arquivo pessoal.

Através do volume do ejaculado é adicionado 0,02mL de solução de antibióticos combinados para cada mililitros de sêmen (Figura 33). A solução de antibióticos combinados para o sêmen é feita com 3 mL de Gentamicina, 3 mL de Linco – Spectin e 4 mL de solução de tilosina (1 mL de Tilosina + 9 mL de água destilada) (Figura 34). O antibiótico permanece no banho - maria de 37° C, para não gerar efeitos térmicos no sêmen. A adição da combinação de antibiótico, tem o objetivo de reduzir a contaminação bacteriana, inibindo o crescimento e formação de colônias.



Figura 33. Adição de antibiótico.
Fonte: Arquivo pessoal.

Conforme o instrumento normativa 48/2003 (MAPA, 2003), é obrigatório a adição de antibióticos ao processamento do sêmen. Deverão incluir misturas de antibióticos com atividade bactericida para cada mililitros de sêmen congelado, conforme as combinações fornecidas de gentamicina (250 µg), tilosina (50 µg), lincomicina (150µg), espectinomicina (300 µg) ou de penicilina (500 UI), estreptomomicina (500 UI), lincomicina (150µg), espectinomicina (300 µg), ou outras combinações de antibióticos mediante autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e comprovada a sua eficiência.



Figura 34. Associação de antibióticos pro sêmen.
Fonte: Arquivo pessoal.

A concentração espermática é determinada por um aparelho, chamado de espectrofotômetro (Genesys 20[®] ou accucell[®]).

Em cubetas de plástico de 10 mL, pipetava – se o volume de 7 mL de solução formolizada à 1% e 50 microlitros de sêmen, homogeneizava–se a amostra e colocava–se na máquina para leitura (Figura 35). A máquina era previamente calibrada com uma cubeta contendo apenas 7mL de solução formolizada a 1%. Lançava – se o nome do touro no sistema e em 30 segundos o aparelho mensurava a concentração. A solução formolizada à 1% era feita no laboratório, com 1 litro de água destilada e 26 g de citrato de sódio, essa solução era colocada no autoclave para a estabilização, posterior era retirado 100 mL dessa solução e colocado 4 mL de formol puro para a solução final.

A concentração indicava a quantidade de espermatozóides presentes na amostra. Era necessário conter no mínimo 600 mil de espermatozóides por mililitros de sêmen, caso contrário, o ejaculado era descartado por baixa concentração.

O espectofotometro é o método preferível para a determinação da concentração espermática (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

A avaliação da concentração pelo espectrofotômetro, permite medir a quantidade de um feixe luminoso que passa por um volume padronizado de sêmen diluído em uma proporção estabelecida (CBRA, 1998). A luz que passa através da solução é bloqueada pela presença de células espermáticas, sendo que as amostras mais concentradas de células absorvem mais luz, enquanto amostras menos concentradas permitem uma maior passagem de luz (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).



Figura 35. Aferição da concentração espermática.
Fonte: Arquivo pessoal.

A avaliação de motilidade e vigor é uma análise sugestiva pelo microscópio óptico (Figura 36) na objetiva de aumento 20x, mediante a avaliação da amostra da diluição de 8 microlitros de sêmen em 1mL de diluente. Para o sêmen ser aprovado, a motilidade deve ser no mínimo 55% (0 – 100%) e o vigor acima de 3 (0 – 5). Valores abaixo disso, o sêmen é descartado. Também, era tirada uma amostra para realização de morfologia espermática, em um eppendorf colocava –se o nome do touro, adicionava –se 400 microlitros de formol salino e 20 microlitros de sêmen. Para a produção de formol salino era utilizado 100 mL de solução de citrato de sódio (29g de Citrato de sódio + 1 L. de água destilado) e 4 mL Formol puro.

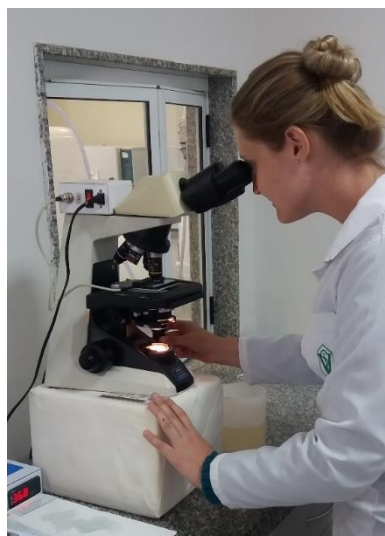


Figura 36. Avaliação de vigor e motilidade do sêmen.
Fonte: Arquivo pessoal.

A determinação da motilidade envolve estimativas subjetivas da viabilidade dos espermatozoides e da qualidade da motilidade, as avaliações são realizadas com sêmen fresco e diluído entre lamina e lamínula no microscópio óptico, sendo a técnica mais utilizadas para realizar essas análises (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

Expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozoides que apresentam motilidade (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998).

O vigor representa a força do movimento que é influenciada pela velocidade dos espermatozoides e a classificação é numa escala de zero a cinco (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998). A avaliação é através de um escore subjetivo, no qual zero representa a ausência de movimentos progressivos e cinco representa um movimento progressivo, vigoroso e veloz (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

O sistema software, *Alta – two*, auxilia durante o processamento e serve como banco de dados. São lançados os valores de volume, concentração, motilidade e vigor, gerando assim, automaticamente o volume de diluente (segunda diluição) a ser acrescentado no sêmen e o número de doses a serem produzidas.

A primeira diluição, denominada de pré – diluição é realizada através de um padrão definido em uma tabela, utilizando o valor da concentração, conforme mostra a tabela 6:

Tabela 6. Valor adicional da primeira diluição conforme a concentração espermática.

Milhões de espermatozoides	Volume adicional de diluente
0,6 – 1,5 milhões	15 mL
1,5 – 2,5 milhões	25 mL
Acima de 2,5 milhões	35 mL

Na pré – diluição (Figura 37), o diluente era colocado em tubos cônicos e aquecidos no banho maria na mesma temperatura do ejaculado, sendo de 37 ° C, para não haver variações e danos de choque térmico, posteriormente era acrescentado o sêmen. Os tubos com a diluição do ejaculado eram levados para a bancada de refrigeração em temperatura de 4 °C, sendo colocados em banho maria, dentro de pote contendo água à 37°C e permaneciam durante 2 horas na banca de refrigeração. Obtendo assim, uma diluição uniforme durante a refrigeração com queda de temperatura progressiva e constante.

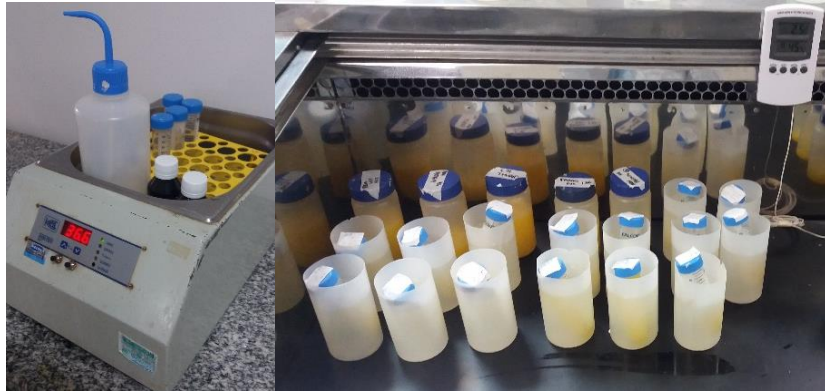


Figura 37. Primeira diluição do sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.

O diluidor deve interagir com o sêmen, proporcionando proteção aos diferentes compartimentos celulares durante o resfriamento, congelação e descongelação e por isso, sua constituição deve garantir nutrição, proteção, balanço eletrolítico (pH e osmolaridade) e inibição bacteriana. Os constituintes básicos dos diluentes são substâncias energéticas, crioprotetores, soluções tampões e antibióticos (HOLT, 2000).

Para um meio diluente ser completo e eficiente, algumas substâncias são fundamentais na sua composição, como substâncias iônicas e aniônicas que tem a funcionalidade de manter a osmolaridade e tamponar o meio, fontes lipoproteínas ou material de alto peso molecular que previnam o choque térmico, como a gema de ovo ou leite, já o glicerol, propanodiol ou dimetilsulfóxido (DMSO), são utilizados como agentes crioprotetores, a glicose ou frutose como fonte de energia e outros aditivos como enzimas antioxidantes e antibióticos (VISHWANATH E SHANNON, 2000).

Para preparação do diluente no Laboratório da Alta é utilizado 250 mL gema de ovo como protetor de choque térmico, 750mL de água destilada como substância que mantém a osmolaridade e 250 mL de Triladyl®, esse produto é comercial, a base de glicerina (Crioprotetor celular), frutose (Fonte de energia) e antibiótico para inibição de crescimento bacteriano no diluente (Figura 38).



Figura 38. Preparação do diluente. Fonte: Arquivo pessoal.

Em alguns ejaculados, era necessário realizar uma segunda diluição, isso devido ao grande volume de sêmen ou pela alta concentração de espermatozoides. Essa segunda diluição era fornecida pelo sistema *Alta Two*. Dentro de potes, devidamente identificados, era pesado o volume (Figura 39) necessário e colocados na bancada de refrigeração de 4 ° C, permanecendo duas horas juntamente com o sêmen da primeira diluição.



Figura 39. Pesagem da segunda diluição e conservação. Fonte: Arquivo pessoal.

Durante o período de espera de refrigeração, realizava – se as análises morfológicas do ejaculado, através da amostra retirada anteriormente no eppendorf com solução de formol salina tamponada a 1%. Era fixada uma gota da amostra entre lamina e lamínula e realizava- se uma leve compressão com papel toalha para que o excesso de líquido fosse absorvido. Na observação da lamina, através do microscópio óptico em objetiva de 1000x, visualizava - se 100 células espermáticas, contabilizando manualmente os espermatozóides normais e defeituosos, sendo uma análise

subjetiva. Os defeitos mais encontrados eram cabeça solta, cauda enrolada ou dobrada (Figura 40), teratogênias (Figura 41) gota citoplasmática proximal ou distal (Figura 42) e defeito de acrossoma (Figura 43).

A contabilização desses defeitos não podia ultrapassar de 30%, caso contrário, o sêmen era retirado da bancada de refrigeração e descartado, por ser considerado infértil. Os dados eram lançado em uma ficha de informação do touro para controle interno (Figura 44), classificados entre defeitos menores e maiores. Defeitos maiores são exemplo de cabeça solta, teratogênia e defeitos de acrossoma. Os defeitos menores, são considerado gota citoplasmática distal e cauda enrolada ou dobrada.

Segundo Hafez e Hafez (2004), toda a amostra de sêmen contém algumas células espermáticas anormais, sendo que essas anormalidades morfológicas podem apresentar relação com a fertilidade do rebanho.

Para avaliação morfológica no laboratório, era utilizado o método da lâmina úmida. Esse método pode ser usado em amostras de sêmen diluídas em solução de formol salino tamponada a 1%, coloca –se uma gota do sêmen diluído sobre uma lâmina, que deve ser coberta com uma lamínula, posteriormente, deve –se fazer uma leve pressão sobre a lamínula com um papel absorvente para que o excesso de líquido seja absorvido, após a secagem a observação deve ser feita em microscópio de contraste de fases, com lente de imersão e aumento 1000X (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

Existem vários critérios para a avaliação e classificação do sêmen dos diferentes tipos de patologia. Atualmente é recomendada de acordo com a região da célula espermática ou de acordo com algumas patologias específicas, como, defeito de cabeça, defeitos de peça intermediária, defeito de cauda, defeito de acrossoma, gota citoplasmática proximal e cabeça isolada normais (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

Conforme o Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), a ordenação das anormalidades baseando – se em outros tipos de classificação, como por exemplo a sugerida por Blom (1973), como defeitos maiores e defeitos menores. Os defeitos maiores seriam aqueles associados com a subfertilidade, enquanto os defeitos menores não seriam associados com anormalidades testiculares, sendo resultado de oscilação fisiológica (MENEGASSI E BARCELLOS, 2015).

O estresse térmico provoca alta incidência de espermatozoides deformados, no qual períodos de alta temperatura ambiente combinados com alta umidade podem manter um macho estéril por até 6 semanas (HAFEZ E HAFEZ, 2004).

Os padrões seminais desejáveis para efeito de seleção de touros, são no mínimo 70% de motilidade progressiva, vigor em 3, total de espermatozoides anormais menor que 30 % (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998).



Figura 40. Avaliação morfologia espermática – Espermatozoides com cauda dobrada e enrolada. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 41. Avaliação morfologia espermática – Espermatozoide teratogênia. Fonte: Arquivo pessoal.

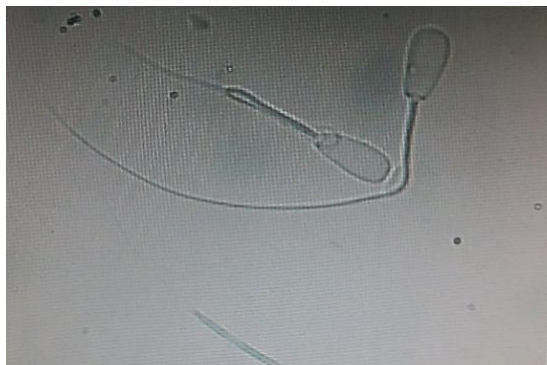


Figura 42. Avaliação morfologia espermática – Espermatozoides com cauda dobrada e gota citoplasmática distal. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 45. Bancada de refrigeração com diluição final do sêmen.
Fonte: Arquivo pessoal.

Durante esse período, envasava – se 1 amostra de sêmen e congelava – se em nitrogênio líquido a - 145 °C, durante 20 minutos, para realização do teste de pré congelamento (Figura 46). Nesse teste, a amostra era descongelada em banho maria de 36°C durante 30 segundos e analisava – se a motilidade e vigor entre lamina e lamínula, no microscópio com a objetiva de aumento 20x, sendo permitido o mínimo de 3 para vigor e 35% de motilidade. Se o sêmen possuir valores fora do padrão é descartado, caso contrário é realizado a impressão das palhetas e envase.



Figura 46. Procedimentos para a realização do teste de pré congelamento.
Fonte: Arquivo pessoal.

A impressão das palhetas era realizado em uma máquina específica de impressão (Figura 47), contendo o nome, raça, partida e registro genealógico do touro, data de envase e nome da empresa. As palhetas impressas são refrigeradas a 4°C antes do envase.

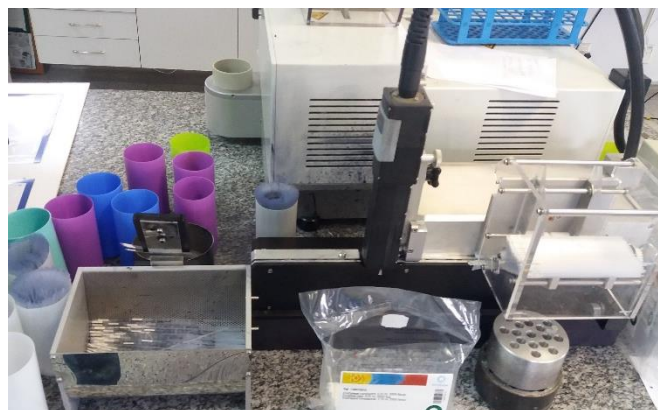


Figura 47. Máquina de impressão de palhetas.
Fonte: Arquivo pessoal.

A seguir, era realizado o envase do sêmen diluído. O sêmen passa pela máquina de envase da marca IMV®, que se encontra dentro de um balcão de refrigeração em temperatura de 6°C (Figura 48) e pelo sucção à vácuo era envasado o sêmen na palheta.



Figura 48. Máquina de envase de sêmen.
Fonte: Arquivo pessoal.

As palhetas eram levadas para a bancada de refrigeração (4°C) para a contagem e congelamento, sendo dispostas em rampas metálicas, dentro da bancada e realizava - se a contagem, cada rampa, suportava 175 palheta de sêmen. Posterior, as rampas eram colocadas na cuba de congelamento, a qual é ligada a uma cilindro de nitrogênio líquido e uma software. É Injetado nitrogênio na cuba até atingir uma temperatura de - 145°C, sendo o tempo necessário para o congelamento era de 8 minutos (Figura 49).



Figura 49. Contagem e cuba de congelamento de sêmen.
Fonte: Arquivo pessoal.

Depois de congeladas, as palhetas são transferidas para potes de plásticos dentro de nitrogênio líquido a -196°C , separadas por touros. Esses potes eram colocados dentro das canetas dos botijões de nitrogênio para o armazenando. De cada touro, retira – se 3 palhetas de para realizar o controle de qualidade final.

No controle de qualidade final é realizado o teste de liberação e Teste de Termo Resistência Lenta (TTRL). Para o teste de liberação era destinado duas amostras, colocadas em banho maria de 36°C durante 30 segundos e analisado a motilidade e vigor entre lamina e lamínula, no microscópio com a objetiva de aumento 20x, sendo permitido o mínimo de 3 para vigor e 35% de motilidade. No TTRL, era destinado uma amostra, colocava –se em banho maria de 36°C , durante três horas, avaliava – se o vigor e motilidade no microscópio de objetiva 20x, sendo o permitido o mínimo de 2 de vigor e 20% de motilidade. No caso, o sêmen não passar nos testes de qualidade, as palhetas são descartado, caso contrário é liberado para comercialização. Depois de todo esse procedimento, os botijões são levados para a sala de estoque (Figura 50).

Segundo Severo (2009), foram criados vários tipos de teste de incubação, sendo os mais conhecidos o Teste de Termo resistência Rápido (30 minutos à 46°C), o Teste de Termo resistência Lento (5 horas à 38°C) e um teste de incubação intermediário (3 horas à 36°C) que é o mais utilizado. O fundamento do teste de incubação é avaliar a resistência das células ao meio diluidor, à temperatura da água e ao tempo de exposição. Porém, muitas variáveis influenciam o resultado do teste, como o tipo de diluidor, o tipo de palheta (volume), a concentração por dose, o tempo de exposição (3 ou 5 horas), a temperatura (38°C x 46°C), incubação da amostra na palheta ou fora dela. Graças às muitas variáveis, a incubação deixa de ser um teste objetivo, aumentando a subjetividade da interpretação do resultado final. A validade do teste de incubação é para avaliar a capacidade de resistência dos espermatozoides ao meio diluidor, medindo se o processo de produção está bem feito. Para Jondet e Rabadeux (1977) amostras incubadas no banho e que apresentavam motilidade de 20% ou mais eram consideradas aptas para o uso na inseminação artificial.



Figura 50. Armazenamento das doses de sêmen e estoque. Fonte: Arquivo pessoal.

10. ESTOQUE DE SÊMEN

A construção destinada ao estoque de sêmen é uma sala de 360 metros quadrados (12 x 30m), localizada no bloco principal da construção frontal da central. Tem uma acesso único controlado.

O estoque está equipado com 25 bancos de nitrogênio líquido para armazenagem do sêmen, os bancos menores (7), têm a capacidade média de armazenagem de 10 mil doses cada um. Os bancos grandes (18) com capacidade de 320 mil doses raqueadas ou 900 mil doses a granel cada. O estoque possui duas

máquinas automáticas de raqueamento de sêmen, instalado em uma sala isolada para controle de temperatura e fluxo de pessoas.

Dos botijões que chegam do laboratório, são retiradas as palhetas e destinadas para o raqueamento pela máquina automática, a qual contabiliza 10 palhetas e logo insere dentro dos globetes. Os globetes são retirados da máquina e realizado contagem manual para conferência do número de palhetas (Figura 51). Posteriormente, eles são inseridos no rack, identificados com o nome do touro, raça, registo e data de envase e cada rack suporta dois globetes. Esse raques voltam para as canecas de metais e através de suportes de metais contendo nitrogênio líquido, são transportados até os bancos de nitrogênio onde ficam estocados. Esses bancos de nitrogênio são identificado conforme a raça dos animais para melhor manejo. A partir disso, estão prontos para a comercialização. Todo o processo de estoque das palhetas de sêmen é realizado sempre dentro ou próximo ao nitrogênio líquido, para não perder a qualidade, mantendo sempre próximo à -140 grau.

Quando a comercialização de sêmen é baixa e há grande produção dele, o sêmen que chega ao estoque é apenas colocado nos bancos de nitrogênio, através dos próprios tubos de plásticos, considerando assim, armazenagem de sêmen a granel e assim que precisar do sêmen é realizado a contagem manual, colocados no globete, nos rack e expedido o pedido.

A comercialização, é expedido por uma empresa terceirizada responsável em levar o sêmen, através de botijões até a empresa ou cliente solicitante, garantindo sempre a qualidade do produto.

No estoque de sêmen, acompanhei a rotina das máquinas de raqueamento, auxiliei na conferência manual, separação e o armazenamento do sêmen conforme a solicitação do pedido de compra do cliente (Figura 52).

Na área externa ao estoque possuí um tanque de nitrogênio líquido com capacidade de 15 mil litros para o abastecimento do botijões e dos bancos de armazenamento. O nitrogênio é fornecido por uma empresa de São Paulo – SP e é reabastecido a cada dois dias.

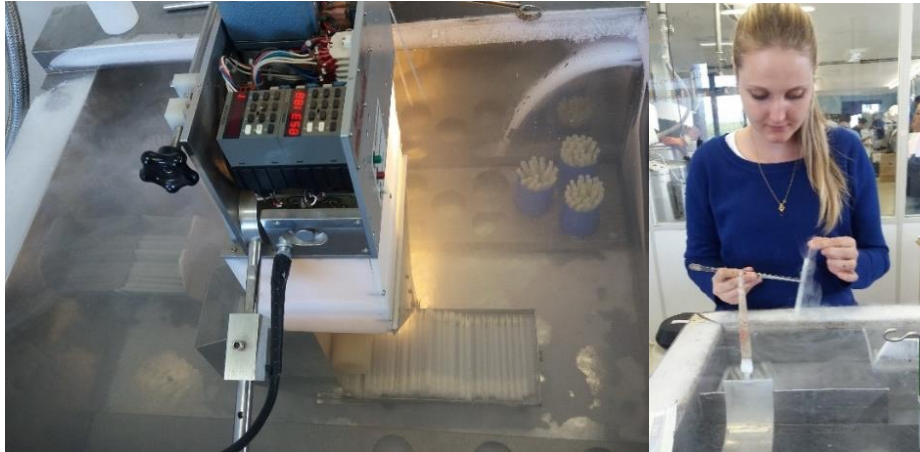


Figura 51. Máquina de raqueamento e contagem manual de palhetas de sêmen nos globetes. Fonte: Arquivo pessoal



Figura 52. Estrutura do estoque e bancos de nitrogênio líquido. Fonte: Arquivo pessoal.

11. CONCLUSÃO

O estágio curricular obrigatório foi de extrema importância para a graduação e formação acadêmica, permitindo o acompanhamento de diversos casos na área clínica e cirúrgica de bovinos, mostrando o dia-dia e as dificuldades enfrentadas pelos médicos veterinários. Possibilitou adquirir o conhecimento das etapas do processamento de sêmen utilizado na inseminação artificial de bovinos, mostrando o quanto é importante certos cuidados e manejos sanitários para uma boa qualidade do produto final e eficiência nos índices reprodutivos.

Foi possível perceber que a realidade do profissional à campo é completamente diferente da realidade presencial durante a formação na faculdade. No campo, muitas vezes não temos os mesmos recursos disponibilizados durante a faculdade.

O estágio também foi importante para o desenvolvimento da comunicação, sendo um público bastante diversificado, com diferentes níveis culturais e econômicos, possibilitando aprender como lidar em cada situação. Permitiu acompanhar as dificuldades e os desafios diários encontrados pelos produtores rurais, conhecendo a fundo suas necessidades e principalmente as expectativas.

Pode-se afirmar que a formação acadêmica da UFPR Setor Palotina foi satisfatória, porém, inúmeras situações presenciadas a campo não foram sequer vistas durante a graduação, mas a base técnica disponibilizada pela universidade foi essencial para a compreensão e resolução dos casos.

Enfim, a experiência vivida durante o estágio é imensurável, pois além do aprimoramento técnico, foi possível conhecer diversas pessoas, estabelecendo inúmeros contatos e obtendo mais confiança para ingressar no mercado de trabalho.

12. REFERÊNCIAS

BAKER, J. C. **The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection.** Vet. Clin. North Am. p. 425-445, 1995.

BATTISTON, W. C. **Gado leiteiro: Manejo, alimentação e tratamento.** Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, p.400, 1977.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos.** 1 ed. São Paulo: Roca, p. 380, 1988.

BISHOPE, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. **Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa - Bovine brucellosis.** Cape town: oxford University Press, v.1, p 1054 – 1066, 1994.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e tuberculose (PNCEBT).** Brasília: MAPA/SDA/DAS, p. 188, 2006. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=996587608>. Acesso em 17 novembro 2016.

CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária.** 1 ed. São Paulo: Roca, p. 249, 1988.

CLARK, B. L.; PARSONSON, I. M.; WHITE, B. L. **Control of trichomoniasis in a large herd of beef cattle.** Australian Veterinary. Journal, Victoria, v.50, p.424-426, 1974.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2 ed, Belo Horizonte: CBRA, p.49, 1998.

CORRE, W.M. **Babesioses e anaplasmoses bovina.** Noticioso Rhodia Mérieux, São Paulo, ed. 5, p. 7 – 13, 1976.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Zaragoza: Acríbia, p.466, 1980.

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. **Manejo Sanitário Animal**. 1 ed. Rio de Janeiro: EPUB, p. 210, 2001.

EMPRAPA. **Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico**. 1 ed. Brasília, Distrito Federal: Embrapa Informação Tecnológica, p.96, 2004.

FARIAS N.A.; CORREA, F.R.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; MÉNDEZ, M.C. **Doenças de Ruminantes e Equinos - Tristeza parasitária bovina**. São Paulo: Varela Editora, p.35-42, 2001.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed. Barueri, SP: Manole, p. 513, 2004.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 4 ed. São Paulo, SP: Editora Manole limitada, p.720, 1982.

HEIDRICH, H.D.; GRUNER, J.; VASKE, T.R. **Manual de patologia bovina**. São Paulo: Varela, p.251, 1980.

HOLT, W.V. **Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences**. Theriogenology, v. 53, p. 47-58, 2000.

JONDET, R.; RABADEAUX, Y. **Utilização do teste de termo resistência na avaliação do valor do esperma bovino congelado**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.8, 1977.

MARTINS, J.R. **Tristeza parasitária bovina**. In: Carrapatos: problemas e soluções. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, p. 39-49, 2005.

MENEGASSI, S.R.O.; BARCELLOS, J.O.J. **Aspectos reprodutivos do touro: teoria e prático**. Guaíba: Agrolivros, p. 280, 2015.

MILLEN, E. **Zootecnia e Veterinária: teoria e prática gerais**. 2 ed. Campinas: Instituto campineiro de Ensino Agrícola, p.361, 1975.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECÚARIA E ABASTECIMENTO. **Calendário de vacinação dos bovinos e bubalinos contra febre aftosa 2016**. Secretária de Defesa Agropecuária, Departamento de Defesa Agropecuário, 2016. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Calend%C3%A1rio%20de%20Vacina%C3%A7%C3%A3o_mar_2016.pdf. Acesso em 24 novembro 2016.

MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECÚARIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa 48/2003 – Requisitos sanitários para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no país**. Art. 15, inciso II, DECRETO N° 4.629, 2003. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=996587608>. Acesso em: 27 outubro 2016.

MODA, G.; DABORN, C.J.; GRANGE, J. M.; COSIVI, O. **The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. Tubercle and Lung Disease**. Edinburg, p. 103 – 108, 1996.

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. **The tuberculin test. Veterinary Microbiology**. Amsterdam, p. 111-124, 1994.

MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. **The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections**. Veterinary microbiology. Amsterdam, p.153 – 177, 1995.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D. B; HANNA, J. **Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cathe. Veterinary Microbiology**. Amsterdam, p. 41 – 52, 1995.

NOIVA, R. M. G. **Utilização de imunohistoquímica e Ag ELISA para detecção de portadores do vírus da diarreia viral bovina em bovinos de engorda.** Dissertação de mestrado. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, p. 108, 2010.

OHI, M.; KNOPKI, A.C.G.; BERNARSKI, F.; NASCIMENTO, L.V.; SILVA, L.B. **Princípios básicos para produção de leite bovino.** Curitiba: Imprensa da UFPR, p. 144, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SANIEDADE ANIMAL. **Código sanitários para os animais terrestre.** 17 ed. Paris, França: Copyright p. 15, 2008. Disponível em http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.04.08.%20Diarrea%20viral%20obovina.pdf. Acesso em 28 outubro 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SANIEDADE ANIMAL. **Código sanitários para os animais terrestre.** 13 ed. Paris, França: Copyright, 2004. Disponível em https://translate.google.com.br/translate?hl=ptBR&sl=es&u=http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.02_Campilobacteriosis_genital_bovina_NUEVO.pdf&prev=search. Acesso em 28 outubro 2016.

PELLEGRIN, A.O. LEITE, R.C. **Atualização sobre tricomonose genital bovina.** Corumbá: Embrapa Pantanal, p. 18, 2003. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC54.pdf>. Acesso em 14 novembro 2016.

PERDRIZET, J. A.; REBHUN, W. C.; DUBOVI, E. J. **Bovine viral diarrhoea: Clinical syndromes in dairy herds.** Cornell Veterinarian, Ithaca, v. 77, p. 46-74, 1987.

SACCO, A.M.S. **Controle de surtos de tristeza parasitária bovina.** Circular Técnico. Bagé, RS: Embrapa Pecuária Sul, p.4,2002. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/55746/1/CR26-02.pdf>. Acesso em 25 novembro 2016.

SANTOS, G. T.; UHLIG, L.; BRANCO, A.F.; JOBIM, C.C.; DAMASCENO, J.C.; CECATO, U. **Bovinocultura de leite: Inovação tecnológica e sustentabilidade**. Maringá: Edum, p.310, 2008.

SANTOS, G.T.; MASSUDA, E. M.; KAZAMA, D.C.S.; JOBIM, C.C.; BRANCO, A.F. **Bovinocultura leiteira: base zootécnicas, fisiológicas e de produção**. Maringá: Eduem, p. 381, 2010.

SCHALM, O.W.; GIBBO, W.J. **Bovine medicine and surgery - Blood and bloodforming organs**. Wheaton: American Vet Publications, p. 519, 1970.

SEVERO, N.C. **Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade**. Revista: A Hora Veterinária n.167, p. 36 – 39, 2009. Disponível em: <http://revivah.com.br/site/wp-content/uploads/2015/04/Bovinos-Qualidade-doS%C3%AAsen-Congelado-Fertilidade-2009.pdf>. Acesso em 24 novembro 2016.

SKIRROW, S.; BONDURANT, R. H.; FARLEY, J. et al. **Efficacy of ipronidazole against trichomoniasis in beef bulls**. Journal of the American Veterinary Medical Association, Chicago, v.187, p.405- 407, 1985.

SWARBRICK, O. **Blood and serum transfusion in cathe: a simple technique and ist clinical use**. Vet. Rec., London, v.74, p.206, 1962.

VASCONCELOS, S.A.; ITO, F. H.; CORTES, J.A. **Bases para prevenção da brucelose bovina**. Comunicações Científicas da Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. v. 11, p. 25 – 36, 1987.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. **Storage of bovine semen in liquid and frozen state**. Anim. Reprod. **Sci.**, v. 62, n.1-3, p. 23-53, 2000.