

## COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE COLETA DE MUCO VAGINAL PARA DIAGNÓSTICO DE TRICOMONOSE BOVINA

### RESUMO

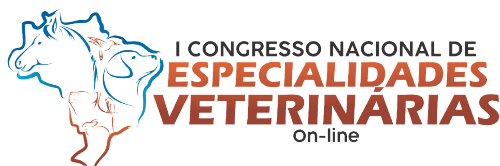
O objetivo do presente estudo foi comparar duas técnicas de coleta de muco vaginal em fêmeas bovinas para o diagnóstico da Tricomonose bovina assim como descrever o perfil sanitário de uma fazenda comercial de gado de corte. Trinta fêmeas da raça Nelore em idade reprodutiva foram selecionadas de forma aleatória e tiveram a região genital previamente higienizada com papel toalha. A coleta do muco vaginal foi realizada de duas formas: empregando *swab* estéril descartável com auxílio de vaginoscópio tubular (técnica 1) ou escova ginecológica estéril descartável (técnica 2). Nas duas técnicas, o *swab* e a escova ginecológica foram acopladas à pipeta de inseminação a qual foi introduzida no fundo do saco vaginal da fêmea. Ao chegar no fundo do saco vaginal, foram realizados movimentos circulares a fim de se conseguir maior quantidade de material. Para cada animal amostrado foram coletadas duas amostras de muco vaginal, uma com cada técnica. O muco vaginal foi avaliado quanto a quantidade de material e viscosidade e posteriormente conservado em meio de cultivo Lactopep para transporte até o laboratório. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente até a chegada ao laboratório ( $\pm 6$  horas após a coleta). Após a chegada ao laboratório, as amostras foram avaliadas e colocadas em cultivo. Para análise estatística foi utilizado o Teste de Wilcoxon para amostras pareadas com nível de significância de 5%. Conclui-se que o uso da técnica 2 para coleta de muco vaginal se provou melhor, uma vez que pelo uso de escova ginecológica foi possível coletar maior quantidade de muco vaginal e ainda, identificar protozoários flagelados em 20% das amostras coletadas.

**Palavras-chave:** Diagnóstico reprodutivo; Muco cervicovaginal; Tricomoníase genital bovina; Gado de corte; Avaliação microscópica.

### 1 INTRODUÇÃO

O correto diagnóstico da tricomonose genital bovina, assim como de outras doenças sexualmente transmissíveis em bovinos só é possível por um conjunto de ações padronizadas com o objetivo de garantir segurança, confiabilidade e qualidade dos resultados das análises. Apesar deste artigo se tratar especificamente sobre coleta de muco vaginal, é imprescindível que o médico veterinário esteja apto a coletar qualquer tipo de material biológico de forma adequada. O conhecimento sobre a patogenia da doença suspeita é muito importante para orientar quais materiais serão obtidos (DEL FAVA et al., 2021). Nesse contexto, a coleta do muco vaginal de fêmeas bovinas é o material de eleição na pesquisa de agentes sexualmente transmissíveis, uma vez que esses agentes têm a capacidade de se adaptar ao ambiente vaginal.

A cultura é o método mais comumente utilizado para a identificação dos tricomonídeos. Apesar de ser considerada uma técnica simples, tem como limitação a baixa sensibilidade e especificidade além de requerer tempo. O diagnóstico por cultivo pode ser laborioso em especial quando às amostras a serem analisadas estiverem muito contaminadas ou ainda, quando a quantidade de parasitos da amostra for pequena. Por conta dessas limitações a



escolha da técnica de coleta de muco cervicovaginal é fator primordial para garantir quantidade e qualidade de material para diagnóstico.

Atualmente, a maioria dos manuais ou guias de procedimentos de coleta de materiais biológicos disponíveis online para auxiliar o médico veterinário na coleta de material a campo recomenda o uso de *swab* vaginal para obtenção de muco vaginal. Desde a década de 80 diversos estudos comparando a utilização de escova ginecológica e *swab* foram realizados, principalmente com mulheres, sendo que esses estudos em sua maioria concluíram que a utilização da escova ginecológica melhorou a qualidade de esfregaços vaginais e por consequência o diagnóstico de alterações de forma mais eficiente e precoce, uma vez que a utilização da escova ginecológica permite que mais células epiteliais sejam coletadas (DOTTERS et al., 1988; HARRISON et al., 1993; ALTERMATT et al., 1997). Adicionalmente, a coleta com utilização de escova pode ser realizada também em seios nasais ou citologias retais (FERRIS et al., 2019; MASSEY et al., 2020).

Com base na bem-sucedida experiência humana com o uso da escova ginecológica, o presente capítulo descreveu a utilização da técnica de coleta com escova ginecológica na rotina de coleta de material biológico em bovinos, em especial o muco vaginal. Tendo esse capítulo o objetivo de descrever e comparar a utilização da escova ginecológica versus o *swab* na coleta de muco vaginal de fêmeas bovinas para o diagnóstico da Tricomonose assim como descrever o perfil sanitário de uma fazenda comercial de gado de corte.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

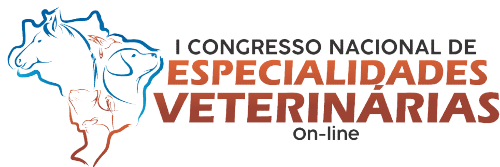
O presente experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) sob o processo nº 0130-10-2021.

### Animais e amostras

Todos os animais utilizados no experimento pertenciam a mesma propriedade, eram mantidos em regime extensivo de produção, criados a pasto de *Brachiaria distachya* com água e sal mineral *ad libitum*. Foram utilizadas 30 fêmeas bovinas de corte em idade reprodutiva, e coletado amostras pareadas totalizando 60 amostras de muco vaginal. Foram excluídos do experimento todos os animais que tivessem sido submetidos a tratamento com antibióticos nos 15 dias que antecederam as coletas de amostras.

### Coleta de muco vaginal

Todos os animais tiveram a região genital previamente higienizada com papel toalha. A coleta do muco vaginal foi realizada com auxílio de vaginoscópio tubular, dessa forma o *swab* estéril descartável (técnica 1) e a escova ginecológica estéril descartável (técnica 2) foram acopladas à pipeta de inseminação e introduzida no fundo do saco vaginal da fêmea. Ao atingir o fundo do saco vaginal, foram realizados movimentos circulares a fim de se coletar maior quantidade de material. Para cada animal, foram coletadas duas amostras de muco vaginal, uma com cada técnica. Os primeiros 15 animais tiveram as amostras coletadas primeiro pela técnica 1 em seguida pela técnica 2, os últimos 15 animais tiveram as amostras coletadas primeiro pela técnica 2 e seguida pela técnica 1. O muco vaginal foi conservado em meio de cultivo Lactopep para transporte até o laboratório (LOPES et al., 1996). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente até a chegada ao laboratório ( $\pm 6$  horas após a coleta).



### Avaliação do muco vaginal

O material coletado foi avaliado em relação à quantidade e à viscosidade. Por se tratar de uma análise qualitativa, as avaliações foram realizadas pelo uso de escore de cruces e sempre por um mesmo técnico, sendo uma cruz (+) pouca ou nenhuma quantidade de material biológico ou muco vaginal com baixa viscosidade; duas cruces (++) quantidade média de material biológico e muco vaginal com viscosidade maior e três cruces (+++) grande quantidade de material coletado ou presença de marcada viscosidade apresentando grande aderência a escova e/ou *swab*.

### Deteção de *Pentatrichomonas hominis* pela microscopia ótica

As amostras do muco vaginal foram avaliadas em microscopia ótica, em objetiva de 10x, para detecção de trofozoítos móveis assim que chegaram ao laboratório. O material coletado foi centrifugado a 400xg por 10 minutos e uma amostra do pellet foi utilizada para avaliação microscópica.

### Análise estatística

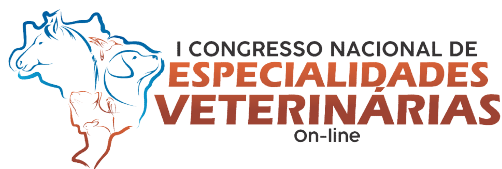
Os dados referentes à avaliação qualitativa do muco vaginal foram analisados pelo teste de Wilcoxon para amostras pareada com nível de significância de 5%. Foi utilizado o teste de McNemar com nível de significância de 5% para avaliar se existe diferença significativa entre as técnicas utilizadas na coleta de muco vaginal em relação a avaliação microscópica.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo referente a análise qualitativa do material biológico estão apresentados na Tab. 1. Foi observada diferença estatística entre as técnicas de coleta em relação à quantidade de material biológico recuperado. A quantidade de material coletado na técnica 2 (escova ginecológica) foi maior ( $p < 0.0003$ ) do que a obtida na técnica 1 (*swab*).

**Tabela 1:** Análise individual da quantidade de material biológico coletado em cada amostra em função da técnica utilizada para coleta (*Swab* citológico *versus* Escova ginecológica).

Amostras	Quantidade <i>Swab</i> citológico <sup>a</sup>	Escova ginecológica <sup>b</sup>
1	+	++
2	+	++
3	+	+
4	+	++
5	+	++
6	+	++
7	++	+
8	+	+



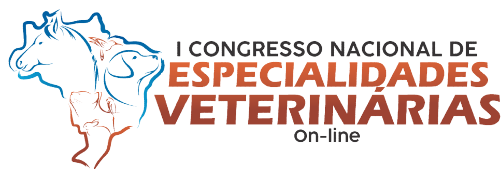
9	+	+++
10	+	+++
11	+	+
12	++	++
13	+	++
14	+	+++
15	+	+
16	+	+
17	++	++
18	+	++
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	++
23	+	++
24	+	++
25	+	++
26	+++	+++
27	+	++
28	+	++
29	+	+++
30	++	+++
Valor de p	< 0.0003	

<sup>ab</sup>letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que a análise é diferente entre si (p<0,05). \*Os dados estão apresentados em forma de escore (+; ++ ou +++).

Os resultados referentes à viscosidade do material em função da técnica de coleta estão apresentados na Tab. 2 Não foi observada diferença estatística entre as técnicas.

**Tabela 2:** Análise individual da viscosidade do material biológico coletado em cada amostra em função da técnica utilizada para coleta (Swab citológico versus Escova ginecológica).

Amostras	Viscosidade	
	Swab citológico <sup>a</sup>	Escova ginecológica <sup>a</sup>
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	++
5	++	+++
6	+	+
7	++	++
8	+	+
9	++	++
10	++	++
11	+	+
12	+	+



13	+	+
14	+	+
15	++	+
16	+	+
17	++	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	++
22	+	++
23	+	+
24	+	++
25	+	++
26	++	++
27	+	++
28	+	+
29	+	++
30	+	+++
Valor de p	0,15	

<sup>a</sup>letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que a análise não é diferente entre si ( $p>0,05$ ).

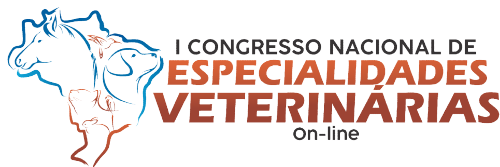
\*Os dados estão apresentados em forma de escore (+; ++ ou +++).

Nenhuma amostra coletada pela técnica 1 (*swab* citológico) apresentou estruturas móveis durante a análise. Já nas amostras coletadas com a técnica 2 (escova ginecológica), foi possível observar estruturas móveis em 6 das 30 amostras coletadas (20%), sendo estatisticamente diferente ( $p=0.03$ ) em relação a técnica 1.

O sucesso e confiabilidade das análises laboratoriais dependem da eficácia na obtenção das amostras coletadas, independente se após a coleta elas serão submetidas à citologia, cultura e/ou avaliação histopatológica. O uso da escova ginecológica para avaliações citológicas já está bem consolidado e amplamente discutido em literatura. Diversos autores, desde a década de 80, já apontavam que a coleta de células endometriais fazendo uso da escova ginecológica para avaliação da presença de neutrófilos dentro do epitélio uterino melhora o desempenho diagnóstico (BROOK, 1985; LEBLANC et al., 2007; KOZDROWSKI et al., 2015), em especial, devido a quantidade de material coletado.

Cocchia et al. (2012) realizaram um estudo em éguas com histórico de infertilidade crônica e compararam os resultados de citologia endometrial com escova ginecológica, *swab* uterino e lavado uterino de baixo volume. Os resultados revelaram que as lâminas com maior celularidade foram obtidas pela técnica da escova ginecológica. Em bovinos, Kasimanickam et al. (2005) enfatizaram que a citologia endometrial por meio da escova ginecológica também pode ser utilizada, mostrando-se superior à técnica de lavado uterino de baixo volume, em relação à praticidade, integridade celular e detecção de polimorfonucleares (PMNs) em especial os neutrófilos, que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores.

Em estudos realizados em mulheres, também foi possível constatar que a escova ginecológica foi capaz de coletar maior quantidade de material (50mg- *swab* vs 1560mg-



escova) possibilitando realizar mais análises com uma única coleta, não se fazendo necessário o retorno da paciente (MITRA et al., 2017).

A obtenção de maior quantidade de muco vaginal é particularmente importante no diagnóstico de tricomoníase genital bovina, uma vez que esses protozoários apresentam motilidade e podem estar em baixa concentração, dificultando sua visualização e diagnóstico.

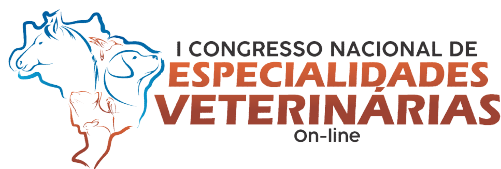
A identificação microscópica do parasito deve ser realizada assim que chega ao laboratório, mesmo sendo de baixa sensibilidade, uma vez que essa primeira constatação da presença de organismos móveis será base para avaliações posteriores durante o cultivo. Embora essa primeira análise tenha baixa sensibilidade ela será um parâmetro para dar sequência ao cultivo.

O cultivo é uma das formas diagnósticas que pode ser utilizada para se obter maior sensibilidade, assim como outras técnicas, ele apresenta limitações ou desvantagens uma vez que nem sempre os protozoários se adaptam adequadamente ao meio de cultivo, a contaminação das amostras muitas vezes pode comprometer a viabilidade celular, ou mesmo a concentração baixa na amostra pode gerar animais falso negativos.

A contaminação das amostras por materiais biológicos compromete também análises moleculares como pode ser observado no estudo de Clothier e colaboradores (2019), que observaram que a presença de urina nas amostras, pode afetar o limiar de detecção do organismo em análises moleculares.

#### **4 CONCLUSÃO**

Conclui-se que o uso da técnica 2 para coleta de muco vaginal se provou melhor, uma vez que pelo uso de escova ginecológica foi possível coletar maior quantidade de muco vaginal e ainda, identificar protozoários flagelados em 20% das amostras coletadas.



## REFERÊNCIAS

- ALTERMATT, H.J. et al. Zervix-Zytologie: Cervex-Brush versus konventioneller Watteträger [Cervix cytology: Cervex Brush versus conventional cotton swab. **Praxis.** 11;86(24):1029-33, 1997.
- BROOK, D. Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. **J Equine Vet Sci**, 5 (1): 16–22, 1985.
- CLOTHIER, K. et al. Effects of Biological Materials and Collection Media on PCR Detection of *Tritrichomonas foetus*. **Open J Anim Scie**, 9(1): 121-128, 2019.
- COCCHIA, N. et al. Comparison of the cytobrush, cotton *swab*, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenol**, 77 (1): 89–98, 2012.
- DEL FAVA, et al. Colheita e envio de amostras para diagnóstico laboratorial de doenças de ruminantes. **Rev Bras Buíat.** 4(2), 2021.
- DOTTERS, D.J.; CARNEY, C.N. e DROEGEMUELLER, W. Nylon brush improves collection of cervical cytologic specimens. **Am J Obstet Gynecol.** 159(4):814-9, 1988.
- HARRISON, D.D.; HERNANDEZ, E. e DUNTON, C.J. Endocervical brush versus cotton *swab* for obtaining cervical smears at a clinic. A cost comparison. **J Reprod Med.** 38(4):285-8, 1993.
- KASIMANICKAM, R. et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. **Can Vet J**, 46: 255-259, 2005.
- KOZDROWSKI, R. et al. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. **Anim Reprod Sci**, 154:56– 62, 2015.
- LEBLANC, M.M.; MAGSIG, J. e STROMBERG, A.J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenol**, 68:403–12, 2007.
- LOPES, L. M. S. et al. Um novo meio de transporte e cultivo para *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928). V. Lactopep como meio de cultivo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 3(1), 1996.
- MITRA, A. et al. Comparison of vaginal microbiota sampling techniques: cytobrush versus *swab* . **Sci Rep**, 7(1), 1-10, 2017.