

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA DETECÇÃO
MOLECULAR DE *Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM SÊMEN
BOVINO COMERCIAL**

Renata Benício Neves Fuverki

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA DETECÇÃO
MOLECULAR DE *Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM SÊMEN
BOVINO COMERCIAL**

Renata Benício Neves Fuverki

Orientador: Prof. Dr. Raul José Silva Gírio

Coorientadora: Dra. Fernanda Senter Magajevski

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Junho de 2010

F949p Fuverki, Renata Benício Neves
Padronização de um protocolo para detecção molecular de
Leptospira spp. e *Brucella* spp. em sêmen bovino comercial / Renata
Benício Neves Fuverki. – – Jaboticabal, 2010
viii, 39 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Raul José Silva Gírio
Banca examinadora: Luis Antonio Mathias, Vera Cláudia L. M.
Cursi
Bibliografia

1. Bovino-sêmen. 2. *Leptospira* spp. 3. *Brucella* spp. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619: 616.986.7:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

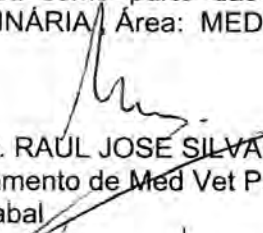
TÍTULO: PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA DETECÇÃO MOLECULAR DE
Leptospira spp. E *Brucella* spp. EM SÊMEN BOVINO COMERCIAL.

AUTORA: RENATA BENÍCIO NEVES FUVERKI

ORIENTADOR: Prof. Dr. RAUL JOSE SILVA GIRIO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. FERNANDA SENTER MAGAJEVSKI

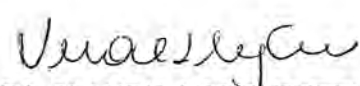
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. RAUL JOSE SILVA GIRIO

Departamento de Med Vet Prev e Repr Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. LUIS ANTONIO MATHIAS

Departamento de Med Vet Prev e Repr Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. VERA CLAUDIA LORENZETTI MAGALHÃES CURCI

Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegocios

Data da realização: 30 de junho de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RENATA BENÍCIO NEVES FUVERKI – Natural de Ji-Paraná, Rondônia, nascida em 15 de abril de 1985. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – UFPR em 2003 e graduou-se no ano de 2007 após estágio curricular realizado no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA / CERNAGEN). Atuou em projetos de iniciação científica e pesquisa utilizando técnicas de análise de DNA voltadas à sanidade animal entre os anos de 2005 e 2008. Em 2008, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, concluindo o curso de Mestrado em 30 de junho de 2010.

*“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

Aos meus pais, Zélia e Renato, por quem
toda esta jornada valeu a pena.

Aos amigos que acompanharam de perto
esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a força infindável que esteve sempre ao meu lado, guiando meus passos, protegendo-me e provando que a batalha de cada dia traz uma recompensa indescritivelmente boa.

À minha mãe, Zélia, e ao meu pai, Renato. Exemplos de dignidade, caráter, superação, força, determinação, apoio e amor. Cada lição aprendida e cada sentimento compartilhado foram lembrados em todos os dias de esforço e distância. Entregar essa conquista a vocês é de longe a melhor parte de tudo!

Aos meus irmãos, Renato e Isabela, que, com sua graça e leveza, me trouxeram tanta alegria, mesmo de longe, e despertaram em mim a vontade de ser um exemplo a seguir.

Aos meus avós, Berenice, Iracema e Antônio, que sempre desejaram o melhor para mim e encheram de carinho todos os momentos. E ao vô Abel que, mesmo distante de nós, com muito amor e saudade, ainda nos desperta esta sede pelo conhecimento.

Aos meus tios, Carlos e Zélia, que me acolheram em seus corações e em sua casa e me deram toda a atenção e todo o carinho desde o estágio supervisionado da faculdade até o ingresso na pós-graduação. Vocês fizeram toda a diferença!

Ao Professor Raul Gírio e à Unesp de Jaboticabal, pela oportunidade e pela orientação das pesquisas que resultaram neste trabalho.

Às empresas de comercialização de sêmen bovino que colaboraram com o fornecimento de amostras para esta pesquisa.

Ao amigo e Professor Alexander Biondo, pela amizade e pela empolgação, praticamente o grande responsável pelo meu ingresso na pesquisa e na pós-graduação.

À amiga e Professora Fernanda Magajevski, pelo acolhimento, pela ajuda, pela orientação e pela confiança.

Aos amigos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Unesp de Jaboticabal, Assis, Felipe Silva e Poliana Melo, pelos ensinamentos, pela ajuda e pelos momentos de companheirismo.

Aos professores Ângela Carvalho e Luis Antonio Mathias, pela participação, pelas correções e pelas sugestões no exame de qualificação.

Aos grandes amigos que conquistei em Jaboticabal, Giovanni Vargas, companheiro de estudos, conversas, troca de ideias, filosofias e fábulas a qualquer hora; Andréa Calado, sempre por perto me animando, dando forças e compartilhando momentos felizes que fizeram toda a diferença, e Vânia Galdino, sempre com palavras de conforto e alegria. Ainda, Kelly Caselani, Denise Melo, Manuela Vieira, Andréa Melo, Juliana Evangelista e todas as outras pessoas que fizeram com que a estada em Jaboticabal fosse a mais agradável possível.

À querida Patrícia Montaña, pelo apoio e incentivo ao início desta ideia e em grande parte dela, bem como pelos exemplos de dedicação e amor à profissão.

À Ana Paula Silva, pela força e pelo suporte nos momentos de saudade e por me fazer acreditar que eu era capaz de realizar tudo o que sonhei.

Aos amigos e colegas de Ji-Paraná, que mesmo de longe colaboraram, cada um à sua maneira, com a realização deste trabalho: Viviany Cuadal, Carina Albino, Marina Shigueko, Maryela Menacho, Fábio Grochevski, Pablo Canuto, Cleverson Esteves, que amenizaram a saudade de casa e de todos e me incentivaram em várias etapas.

À querida Laiane Almeida, pelo companheirismo, pela empolgação e por estar ao meu lado neste momento, e por me fazer perceber o valor que esta conquista tem por mais que às vezes nem eu acredite!

À minha grande amiga Beatriz Moretti, que compartilhou comigo o início desta jornada e os planos para ela, e que agora, de alguma forma especial, está sempre por perto acompanhando a realização de tudo.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, de perto ou de longe, colaboraram, cada um da sua forma, para que eu alcançasse este objetivo, muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Panorama da produção e comércio de sêmen bovino.....	3
2.2 Riscos sanitários relativos ao comércio de sêmen bovino.....	5
2.3 Leptospirose	6
2.4 Brucelose.....	10
2.5 Controle sanitário de <i>Leptospira</i> spp. e <i>Brucella</i> spp. em centrais de coleta e processamento de sêmen bovino	12
III. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivos Gerais.....	14
3.2 Objetivos Específicos	14
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Amostras de sêmen.....	16

4.2 Padronização do kit comercial para extração de DNA bacteriano a partir de sêmen bovino	18
4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	19
4.3.1 Protocolo de extração do DNA.....	19
4.3.2 Avaliação do DNA extraído	23
4.3.3 Amplificação do DNA bacteriano	23
4.3.3.1 Oligonucleotídeos iniciadores	23
4.3.3.2 Protocolo de amplificação.....	24
4.3.3.3 Condições de amplificação.....	24
4.3.4 Análise do produto amplificado	25
V. RESULTADOS	26
5.1 Padronização do kit comercial para uso em amostras de sêmen	26
5.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	28
VI. DISCUSSÃO	28
VII . CONCLUSÕES	32
VIII. REFERÊNCIAS	33

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
et al.	e colaboradores
HCl	Cloreto de hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
MgCl_2	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pM	Picomolar
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris – Borato – EDTA
U	Unidade
UV	Ultravioleta
V	Volts

LISTA DE QUADROS**Página**

Quadro 1. Dados relacionados à evolução da inseminação artificial no Brasil, em termos de volume de doses comercializadas, de acordo com os dados da ABIA (2008)	4
--	---

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição e identificação das amostras de sêmen de acordo com o estado e a central de comercialização e origem.....	16
Tabela 2. Distribuição do número de amostras de sêmen bovino estudadas de acordo com a raça.....	17
Tabela 3. Sequência de bases que compõem os primers selecionados para a reação em cadeia da polimerase para amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp. e <i>Brucella</i> spp.....	24

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fluxograma do protocolo de extração de DNA a partir de amostras de sêmen bovino.....	21
Figura 2. Resultado da extração de DNA em amostras de sêmen sem contaminação experimental por cultura pura de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Pomona. M) Padrão de peso molecular em escala ascendente de 100 pb; 1) Amostra 22LabRep; 2) Amostra 31LabRep; 3) Amostra 37LabRep; 4) Controle negativo.....	27
Figura 3. Resultado da extração de DNA em amostras de cultura pura de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Pomona e de amostras de sêmen contaminadas experimentalmente com <i>Leptospira</i> spp. M) Padrão de peso molecular em escala ascendente de 100 pb; 1) Amostra de cultura pura de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Pomona; 2) Sêmen contaminado experimentalmente com 10 µL de cultura pura de <i>Leptospira</i> ; 3) Sêmen contaminado experimentalmente com 1 µL de cultura pura de <i>Leptospira</i> ; 4) Controle negativo.....	27

PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA DETECÇÃO MOLECULAR DE *LEPTOSPIRA* SPP. E *BRUCELLA* SPP. EM SÊMEN BOVINO COMERCIAL.

RESUMO - Com a crescente disponibilidade das biotécnicas de reprodução animal, o comércio dos produtos envolvidos com essas práticas também está em expansão, oferecendo a possibilidade de melhoria dos índices zootécnicos às produções de bovinos. Porém deve-se levar em consideração que há riscos sanitários em práticas como a inseminação artificial caso não se realize o controle do material biológico utilizado. Dentre os agentes infecciosos que podem estar presentes no sêmen e passíveis de serem transmitidos por esse estão a leptospirose e a brucelose, enfermidades responsáveis por grandes perdas reprodutivas e econômicas na bovinocultura mundial. Este projeto teve como objetivos detectar molecularmente esses patógenos em amostras de sêmen bovino provenientes de centrais de comercialização brasileiras, utilizando um kit comercial para extração de DNA ("RTP Bacteria DNA Mini Kit" (Invitex®)), aperfeiçoá-lo para a extração de DNA bacteriano a partir de sêmen e avaliar sua aplicabilidade à rotina laboratorial. O DNA bacteriano foi extraído e quantificado por eletroforese em gel de agarose. Pretendeu-se também realizar reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os "primers" B4 e B5 para amplificação do DNA de *Brucella* spp. e os "primers" Lep 1 e Lep 2 para *Leptospira* spp. O kit de extração foi otimizado com sucesso, e todas as 96 amostras examinadas foram negativas para qualquer DNA bacteriano. Os resultados podem ser úteis para estabelecer alternativas de controle sanitário em touros doadores de sêmen e permitir o fornecimento de material genético livre de patógenos, aumentando o "status" sanitário da reprodução de bovinos no Brasil.

Palavras - chave: *Brucella*, Bovino, DNA, *Leptospira*, PCR, Sêmen

**PADRONIZATION OF A PROTOCOL FOR MOLECULAR DETECTION OF
LEPTOSPIRA SPP. AND *BRUCELLA* SPP. IN BOVINE COMERCIAL SEMEN.**

SUMMARY – With the increasing disponibility of animal reproduction biotechniques, trading of products involved with these activities is also in expansion offering improving possibilities in zootecnic indexes of bovine herds. However, considerations should be taken about sanitary risks in practices like artificial insemination if any control is applied to this biological material. Among infectious agents that could be present and transmitted by semen are leptospirosis and brucellosis, diseases that are responsible for numerous reproductive and economic losses in world's cattle culture. The goals of this project were to molecularly detect these pathogens in bovine semen samples from Brazilian artificial insemination centers using a commercial kit for DNA extraction (RTP Bacteria DNA Mini Kit (Invitex®)), to improve it for extracting bacterial DNA from semen and to analyze its applicability in laboratory routine. Bacterial DNA was extracted and quantified by agarose gel electrophoresis. We also intended to realize polymerase chain reaction (PCR) using primers B4 and B5 for amplification of *Brucella* spp. DNA and primers Lep 1 e Lep 2 for *Leptospira* spp. DNA. The extraction kit was successfully optimized and all of 96 examined samples were negative for any bacterial DNA. Results could be useful to establish alternative measures of sanitary control in semen donors and to allow the supplying of genetic material free of pathogens, increasing sanitary status of bovine reproduction in Brazil.

Keywords: *Brucella*, Bovine, DNA, *Leptospira*, PCR, Semen

I. INTRODUÇÃO

Na criação de bovinos, o desempenho econômico da atividade está diretamente relacionado aos índices reprodutivos do rebanho. As atuais biotécnicas da reprodução disponíveis devem buscar constantemente a melhoria desses índices, bem como identificar parâmetros cada vez mais eficientes que possibilitem a seleção de animais de melhor aptidão reprodutiva. A utilização de tecnologias como a inseminação artificial (IA), a fertilização *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões (TE) tem possibilitado a obtenção de resultados interessantes quanto à produtividade e à melhoria genética do rebanho. Porém há vários aspectos ligados ao animal e à produção que comprometem as taxas reprodutivas, como a fisiologia do indivíduo e distúrbios relacionados a essa, a genética do rebanho, a nutrição e o manejo zootécnico e sanitário (RUMPF et al., 2000; JUNQUEIRA et al., 2006).

Um dos principais fatores que interferem diretamente nos índices reprodutivos de um rebanho é a sanidade, principalmente relacionada às infecções que afetam direta ou indiretamente o trato reprodutivo do animal, bem como comprometem o embrião ou o feto. Diversos são os microrganismos que podem infectar o touro e serem transmitidos pelo sêmen até a fêmea receptora e então se disseminarem pelo rebanho. Assim, a disponibilidade das tecnologias da reprodução não garante por si só a qualidade do sêmen disponibilizado para essas atividades. É necessário que a essas tecnologias sejam aliados programas de monitoramento da sanidade e da qualidade do sêmen para garantir a eficiência do processo. Os centros de inseminação artificial devem monitorar seus animais quanto às principais doenças transmissíveis pelo sêmen, pois a existência de enfermidades endêmicas constitui um sério risco de que esses agentes etiológicos sejam introduzidos nas centrais por diferentes vias de acesso. A transmissão de patógenos pelo sêmen é um risco que deve ser evitado, pois o material biológico utilizado para a inseminação artificial deve ser livre de agentes infecciosos.

A leptospirose e a brucelose estão entre as doenças bacterianas de maior risco de transmissão pelo sêmen e maiores efeitos nos índices reprodutivos do rebanho. Ambas as enfermidades têm sido relatadas em nível nacional e são de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), devido ao impacto que podem causar à saúde animal e humana.

Diante do exposto, este trabalho justifica-se pela necessidade de monitoramento do sêmen bovino para a presença de dois dos principais agentes que podem estar presentes nesse material, evitando dessa forma a transmissão por monta natural ou inseminação artificial. O uso de sêmen contaminado representa um grande risco para o rebanho e passa a ser um grande fator de perdas econômicas para as produções envolvidas. Adicionalmente às perdas reprodutivas, a presença do patógeno leva à formação de barreiras de importação dos produtos passíveis de contaminação, gerando enormes prejuízos econômicos. Além de colaborar com a saúde animal, o controle destas enfermidades também privilegia a saúde pública, devido ao potencial risco zoonótico da leptospirose e da brucelose, principalmente de caráter ocupacional. O uso de técnicas moleculares como a PCR aliado à disponibilidade de kits comerciais de análise de DNA passíveis de adaptação para a utilização em sêmen bovino têm se mostrado de grande valia no diagnóstico de patógenos presentes no sêmen e podem ser eficientes ferramentas no controle sanitário em centrais de inseminação artificial. Esta prática colaboraria com o estabelecimento do perfil epidemiológico da leptospirose e brucelose em bovinos no país, permitindo ações mais pontuais e eficazes dos órgãos de defesa sanitária animal. Ainda, possibilitaria garantir o fornecimento de material genético de qualidade e livre de microrganismos patogênicos, elevando o “status” sanitário e produtivo da reprodução de bovinos no Brasil.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da produção e comércio de sêmen bovino no Brasil

De acordo com o Relatório Estatístico de Produção, Importação e Comercialização de Sêmen da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), em 2008 o total de vendas de sêmen no Brasil chegou a aproximadamente 8,2 milhões de doses. Desse total, cerca de 4,8 milhões de palhetas são de origem nacional, produzidas e comercializadas por centrais de produção e processamento de sêmen bovino brasileiras, o que corresponde a uma participação de 59,19% nas vendas de sêmen no país. Considerando-se um período de 20 anos (1989-2008), foi registrado um aumento de 113% nas vendas de sêmen bovino de origem nacional (Tabela 1). Apesar de uma leve queda nesses valores, notada nos anos 2005 e 2006, já se observa uma evolução crescente nas vendas deste material a partir do ano de 2007 (ASBIA, 2008).

Quadro 1. Dados relacionados à evolução da inseminação artificial no Brasil, em termos de volume de doses comercializadas, de acordo com os dados da ASBIA (2008).

VENDAS			
Ano	Nacional	Importado	Total
1989	2.280.054	361.019	2.641.073
1990	1.906.231	442.800	2.349.031
1991	2 080 086	517 582	2 597 668
1992	2.108.245	509.036	2.617.281
1993	2.597.933	723.597	3.321.530
1994	2.566.457	1.077.431	3.643.888
1995	2.797.063	1.383.908	4.180.971
1996	2.288.672	1.834.770	4.123.442
1997	2.779.413	2.371.013	5.150.426
1998	3.079.066	2.813.309	5.892.375
1999	2.980.091	2.588.103	5.568.194
2000	3.293.910	2.475.438	5.769.348
2001	4.568.962	2.301.128	6.870.090
2002	4.568.962	1.915.120	7.076.561
2003	5.713.543	1.759.716	7.473.259
2004	5.790.315	1.690.234	7.480.549
2005	5.210.566	1.817.742	7.028.308
2006	4.519.743	2.215.731	6.735.204
2007	4.635.426	2.860.898	7.496.324
2008	4.856.587	3.348.196	8.204.783

Atualmente estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA 24 estabelecimentos produtores (CCPS's) e mais de 190 estabelecimentos que comercializam sêmen bovino. São Paulo (SP) é o estado que lidera o número de empresas dessa categoria, seguido pelo Rio Grande do Sul (RS) e por Minas Gerais (MG)*.

* LACERDA, D. P. (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Comunicação pessoal, 2010.

Apesar de apenas cerca de 6% do total de fêmeas bovinas em reprodução serem inseminadas atualmente no Brasil (BARBOSA e MACHADO, 2008), nota-se, de acordo com o Quadro 1, que um grande volume de material biológico é comercializado anualmente entre várias regiões do País e por diferentes empresas.

O registro desses Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) junto ao MAPA está ligado à Instrução Normativa SDA Nº 48, de 17 de junho de 2003, que estabelece os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no País (MAPA, 2003). Tais exigências devem-se à necessidade de manter o objetivo de prevenir a transmissão de doenças por meio deste material genético (BIELANSKI, 2007), um dos principais pilares que justificam o uso da inseminação artificial. Para tanto, a resolução estabelece exigências para o touro doador quanto à pré-quarentena e à quarenta de ingresso no CCPS, o controle do rebanho residente e a adição de antibióticos ao processamento do sêmen (MAPA, 2003), visando garantir a produção de sêmen de qualidade e livre de patógenos.

2.2 Riscos sanitários relativos ao comércio de sêmen bovino

A prática da inseminação artificial permite o intercâmbio de material genético em nível nacional e internacional, promovendo a melhor produção de leite e carne por meio do uso de sêmen de melhor qualidade. Ao mesmo tempo, a possibilidade de que o sêmen seja contaminado por patógenos e esses disseminados por meio do mesmo torna-se uma das principais preocupações para criadores e autoridades sanitárias dos países que empregam essa tecnologia. Deve ser dada a devida importância às doenças infecciosas que podem impedir a fecundação, causar abortos ou produzir bezerros com peso inferior à média ou defeituosos (BARCELOS et al., 2009).

Vários são os microrganismos que podem estar presentes no sêmen bovino determinando distúrbios reprodutivos. Dentre as doenças infectocontagiosas, destacam-se a campilobacteriose, a tricomonose, a micoplasmose, a brucelose, a

leptospirose, a neosporose, a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e a diarreia viral bovina (BVD) (WENTINK et al., 2000; JUNQUEIRA e ALFIERI, 2006). Entre as doenças bacterianas, a leptospirose e a brucelose possuem importante papel quanto aos riscos frente à saúde animal e saúde pública.

2.3 Leptospirose

Causada por bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira*, a leptospirose tem grande importância em procedimentos de inseminação artificial devido à sua capacidade de resistir às temperaturas de congelamento do sêmen e provocar infecção (EAGLESOME e GARCIA, 1992).

As leptospiros pertencem à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* (NOGUCHI, 1918). O gênero *Leptospira* foi inicialmente dividido nas espécies *Leptospira interrogans*, compreendendo cepas patogênicas do microrganismo, e *Leptospira biflexa*, composta por cepas saprofíticas isoladas do ambiente. Cada espécie apresentava vários sorovares, e os que eram antigenicamente relacionados foram reunidos em sorogrupos, úteis à compreensão epidemiológica da doença. Entretanto, a classificação fenotípica vem recentemente sendo substituída pela classificação genotípica da bactéria. Estudos por meio de métodos baseados em DNA levaram à reclassificação das leptospiros em genomoespécies, entre as quais existe a ocorrência de sorovares comuns por incluírem sorovares de ambas *L. interrogans* e *L. biflexa*. Assim, até o momento são descritas 16 genomoespécies de *Leptospira*, entre as quais estão: *L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. biflexa*, *L. borgpeterseni*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. kirschneri*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. parva*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. wolbachii*, sendo a espécie *L. interrogans* a que apresenta maior número de sorovares descritos. As genomoespécies de *Leptospira* não correspondem às espécies da classificação sorológica, e sorovares patogênicos e não patogênicos ocorrem dentro da mesma espécie (HEINEMANN et al., 2000; LEVETT, 2004).

Recentemente, na reunião do Subcomitê de Taxonomia da Leptospiraceae realizada no Equador, em 2007, *L. interrogans* foi reclassificada em 13 espécies patogênicas de *Leptospiras*: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffii*, distribuídas em mais de 260 sorovariedades agrupadas em 23 sorogrupos (ADLER & MOCTEZUM, 2010).

As *Leptospiras* são espiroquetas firmemente enroladas, com tamanho aproximado de 0,1 – 6 µm a 0,1 - 20 µm. A amplitude helicoidal é de aproximadamente 0,1 a 0,15 µm e o comprimento de onda é de cerca de 0,5 µm. As células possuem extremidades afiladas, com uma ou ambas apresentando forma de gancho. Dois filamentos axiais (flagelos periplasmáticos) com inserções polares estão localizados no espaço periplasmático. Morfologicamente todas as leptospiras são indistinguíveis, mas a morfologia de isolados individuais pode variar com a subcultura *in vitro*. Estas bactérias possuem uma típica estrutura de dupla membrana comum a outras espiroquetas, na qual a membrana citoplasmática e a parede de peptidoglicanos estão estreitamente associadas. O lipopolissacarídeo da leptospira possui composição similar à de outras bactérias Gram-negativas, apesar de apresentar menor atividade endotóxica. São bactérias aeróbias obrigatórias com crescimento ótimo à temperatura de 28 a 30°C e são produtoras de catalase e oxidase. Crescem em meios simples enriquecidos com vitaminas, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônia. O meio mais amplamente utilizado para crescimento é o EMJH, que contém “Tween 80” e albumina sérica bovina (LEVETT, 2004).

As leptospiras são filogeneticamente relacionadas a outras espiroquetas. Seu genoma possui um tamanho de aproximadamente 5.000 kb, apesar de estimativas menores terem sido reportadas. O genoma é composto por duas seções: um cromossomo de 4.400 kb e um menor de 350 kb. Possuem dois conjuntos de genes 16S e 23S rRNA, mas apenas um gene 5S rRNA (LEVETT, 2004).

Além da importância como zoonose mundialmente distribuída e por sua capacidade de acometer várias espécies animais domésticas e selvagens, a leptospirose está relacionada a enormes prejuízos em rebanhos bovinos devido ao seu

potencial patogênico nesses animais, principalmente de caráter reprodutivo. As leptospiros são bastante conhecidas por causar abortos no final do segundo trimestre e no início do terceiro trimestre de gestação. Porém estudos recentes têm demonstrado a capacidade desse microrganismo de desenvolver também falhas mais precoces (BONDURANT, 2007). Consequências comuns da infecção por *Leptospira* spp. em vacas gestantes são morte embrionária precoce, bem como abortos, natimortos e infertilidade decorrentes da infecção fetal (RABASSA et al., 2005; BONFIM e KOURY, 2006). Pesquisas de JUNQUEIRA et al. (2006) demonstraram a presença desse patógeno em até 78,8% das fêmeas de rebanhos avaliados no sudeste do Brasil, causando principalmente abortamentos e repetições de cio.

Sabe-se que os sorovares Hardjo, Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae são os principais agentes capazes de provocar a infecção em bovinos (ELLIS, 1994). No entanto, a *Leptospira* sorovar Hardjo é reconhecida mundialmente como a principal sorovarietade patogênica para esses animais, causando infecção persistente, além de tornar o animal uma fonte de infecção (GERRITSEN et al., 1994; GIVENS, 2006). A transmissão do patógeno pelo sêmen é possível, podendo esse também ser excretado em abortamentos e na urina de animais infectados. A disseminação da bactéria no ambiente também possibilita a transmissão por água e solo contaminados com o agente (WENTINK et al., 2000).

A *Leptospira* tem acesso ao organismo do hospedeiro através de membranas mucosas, como as que compõem o aparelho reprodutivo dos animais. Após a bacteremia desencadeada pela infecção, o microrganismo persiste primariamente no trato urogenital, levando às falhas reprodutivas em vacas e touros. Vários medicamentos estão disponíveis para o tratamento dos animais doentes, porém essa prática encontra barreiras à sua realização devido ao risco de gerar resíduos químicos em leite e carne (BONDURANT, 2007). Assim, a melhor atitude é desenvolver o controle sanitário para evitar a entrada do patógeno em centrais de inseminação e nos rebanhos.

A avaliação do sêmen para a presença de *Leptospira* spp. justifica-se pelo fato de testes sorológicos, como ELISA e soroaglutinação microscópica (SAM), não

diferenciar animais infectados daqueles vacinados, e também porque a resposta sorológica do animal nem sempre está relacionada com a capacidade de transmissão da bactéria por esse material (ELLIS, 1986; GALE e KINGSCOTE, 1989). Ainda, sabe-se que muitos animais carregam o microrganismo e são soronegativos (LEVETT, 2004). Assim, a possibilidade de um animal infectado não apresentar sorologia positiva faz da detecção direta em sêmen uma forma prática e segura de garantir que o material utilizado para inseminação artificial não irá transmitir a leptospirose. Da mesma forma, possibilita o uso de sêmen de touros de alto valor genético que, mesmo infectados, não estão disseminando a bactéria por essa via (MASRI et al., 1997).

Vários métodos estão disponíveis para a detecção direta de *Leptospira* spp. em sêmen bovino, entre eles, cultura bacteriana, sondas de RNA e DNA e anticorpos marcados com corantes fluorescentes. A viabilidade de aplicação desses métodos é questionável, devido ao longo tempo demandado, dificuldades de manutenção do microrganismo *in vitro*, variações de sensibilidade e especificidade e limitações de aplicação em ambiente laboratorial (MASRI et al., 1997; HEINEMANN et al., 2000). Diante disso, a reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta-se como uma interessante alternativa, devido à sua capacidade de analisar um número considerável de amostras em curto espaço de tempo, apresentando boa eficiência em sensibilidade e especificidade.

O primeiro protocolo de PCR para detecção de leptospiros em sêmen bovino foi desenvolvido em 1997 por MASRI et al., utilizando primers para a detecção de *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjobovis. Nesse experimento, a PCR teve sensibilidade suficiente para detectar leptospiros em 100 µL de sêmen e mostrou-se uma técnica eficaz para a utilização em rotina diagnóstica. Resultados de HEINEMANN et al. (1999) confirmam a viabilidade do uso da PCR para a detecção de *Leptospira* spp. em amostras de sêmen bovino em centros de inseminação artificial, com taxa de detecção de 80% no sêmen, contra apenas 45% utilizando-se a sorologia. Descrições da detecção de importantes genomoespécies de *Leptospira* utilizando primers para a região do gene 16S rRNA, com amplo espectro de identificação de leptospiros tanto patogênicas quanto saprofíticas em sêmen bovino, também afirmam a eficiência da

PCR para esse fim (HEINEMANN et al., 2000). A viabilidade da técnica tem sido ainda testada em sêmen de outras espécies animais, como cães, apresentando resultados satisfatórios de detecção do patógeno (KIM et al., 2006).

2.4 Brucelose

A brucelose, outra doença de possível transmissão pelo sêmen, apresenta ampla distribuição e importante impacto econômico em humanos e animais. É causada por cocobastonetes Gram-negativos do gênero *Brucella* (ACHA e SZYFRES, 2001), os quais são capazes de invadir as células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro (PAULIN, 2003). Esse microrganismo, assim como a *Leptospira*, é capaz de desencadear falhas reprodutivas em bovinos, como aborto, nascimento de bezerros inviáveis e retenção de placenta. A ocorrência dos abortos é geralmente descrita no terço final da gestação (AMIN et al., 2001; GIVENS, 2006; JUNQUEIRA e ALFIERI, 2006). Além dos distúrbios gerados na fêmea, a doença está relacionada a lesões nos órgãos genitais de touros, como testículos, vesículas seminais e epidídimo (AMIN et al., 2001).

O gênero *Brucella* é composto por espécies como: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* (ACHA e SZYFRES, 2001). Apesar de não haver especificidade de hospedeiros, existe determinada predileção de acordo com as espécies, sendo a *B. abortus* a espécie que mais comumente acomete os bovinos. A disseminação das bactérias pode ocorrer por descargas uterinas, leite, sêmen e fezes, contaminando pastagens, alimentos e água. Em bovinos, a principal porta de entrada para a infecção é a mucosa orofaríngea. Entretanto, também estão descritas infecções através das mucosas dos tratores digestivo, nasal, genital e conjuntiva ocular (PAULIN, 2003).

Após penetrar no organismo do hospedeiro, as brucelas podem permanecer de semanas a meses multiplicando-se em linfonodos regionais. Posteriormente, desencadeia-se a bacteremia, com acometimento e alteração anatomopatológica de vários órgãos do animal afetado. Na fêmea gestante, a maior ocorrência de abortos no

último terço da gestação deve-se ao aumento das concentrações de eritritol no útero gravídico, substância útil ao metabolismo da bactéria. Assim, a intensa multiplicação da *Brucella* leva à produção exagerada de sua toxina, a qual é responsável por distúrbios na estrutura da placenta e na circulação materno-fetal, levando ao aborto. Como também há concentrações consideráveis de eritritol no aparelho reprodutor do macho, esse é afetado com intensa reação inflamatória nas vesículas seminais, no testículo e no epidídimo, bem como atrofia testicular, podendo o animal tornar-se infértil (PAULIN, 2003).

A transmissão de *Brucella* pela inseminação artificial possui papel mais importante na disseminação da doença, de machos infectados para fêmeas suscetíveis, do que a monta natural. A *Brucella* está presente no fluido seminal, e é transmitida à fêmea por meio da inseminação intrauterina. A infecção pela monta natural raramente ocorre, mesmo que haja no sêmen do touro infectado carga bacteriana inicialmente suficiente para desencadear a infecção, pois esta é reduzida por atividade bactericida dos fluidos vaginais antes de atingir o útero (CAMPERO et al., 1990; AMIN et al., 2001). Devido ao quadro intensamente patogênico e à possibilidade de infecção de outras espécies animais presentes nas propriedades rurais, a utilização de sêmen certificadamente livre desse patógeno constitui uma medida fundamental para a manutenção da sanidade do rebanho.

Os sintomas da brucelose não são patognomônicos e o diagnóstico baseia-se geralmente em testes laboratoriais (LEYLA et al., 2003). Existem vários métodos sorológicos e bacteriológicos disponíveis para o diagnóstico desta doença. Apesar de sua ampla utilização, as culturas bacterianas são geralmente demoradas para determinar o diagnóstico e apresentam risco devido à necessidade de manipulação do organismo vivo. A sorologia está sujeita a reações cruzadas e resultados falso-negativos (AMIN et al., 2001), e em locais onde a vacina RB-51 ainda não está disponível, a sorologia tem sua eficácia comprometida quando aplicada a animais vacinados com a vacina B-19, pois não é possível diferenciar anticorpos induzidos pela cepa vacinal de anticorpos induzidos por cepas de campo (GIVENS, 2006).

A PCR vem sendo empregada com sucesso para a detecção de *Brucella* em várias amostras biológicas, como sangue (NAVARRO et al., 2002), tecidos (LEYLA et al., 2003), secreções vaginais (KEID, 2001) e sêmen (KEID, 2001; MANTEROLA et al., 2003). KEID (2006) determinou cerca de 80% de sensibilidade na detecção de *Brucella* spp. em amostras sanguíneas de cães, mostrando a viabilidade da técnica como um método relativamente sensível. AMIN et al. (2001) também avaliaram a PCR para o diagnóstico de *Brucella melitensis* no sêmen de bovinos e ovinos, obtendo resultados que comprovaram que este método é mais rápido e mais sensível na detecção do agente do que os métodos tradicionais de cultura. O'LEARY et al. (2006) utilizaram a PCR com sucesso para a amplificação e detecção de regiões do genoma de *Brucella* spp. em amostras de sangue, leite e linfonodos de vacas naturalmente infectadas. OCAMPO-SOSA et al. (2005) também obtiveram sucesso ao empregar a PCR utilizando o par de primers ERY1 e ERY2, que permitiu identificar brucelas e detectar inclusive biovars de *Brucella abortus* em bovinos na Espanha. WHATMORE et al. (2005) utilizaram a PCR seletiva para a amplificação de fragmentos de restrição no genoma de *Brucella* spp., evidenciando o potencial da técnica em discriminar as espécies desse microrganismo.

2.5 Controle sanitário de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em centrais de coleta e processamento de sêmen bovino

De acordo com os requisitos sanitários para a produção e comercialização de sêmen bovino estabelecidos pelo MAPA, a obrigatoriedade de controle permanente estende-se apenas à brucelose. No período de pré-quarentena, exige-se que o animal seja negativo para esta doença, apresentando os testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), ou teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) ou teste de fixação de complemento, realizado nos últimos 60 dias antes da entrada do animal no CCPS. Antes de ingressarem no rebanho residente, ocorre uma nova quarentena de 28 dias,

exigindo-se resultados negativos para os mesmos exames. Esse procedimento deve ser repetido pelo menos uma vez ao ano a partir do momento em que o animal passa a fazer parte do rebanho residente (MAPA, 2001). Caso algum animal apresente-se positivo em algum dos testes, todo o sêmen presente na central de produção deve ser eliminado e o doador é submetido às medidas de defesa sanitária.

Apesar de a leptospirose não estar incluída como doença de controle obrigatório pelo MAPA, a ASBIA recomenda que durante a quarentena de ingresso na central de coleta de sêmen se faça o exame de soroaglutinação microscópica a partir de soro sanguíneo (ASBIA, 2008).

O uso de técnicas sorológicas para diagnóstico desses patógenos é realizado, porém apenas em raras situações a sorologia é considerada o diagnóstico definitivo. Geralmente, o diagnóstico conclusivo só pode ser realizado por testes capazes de identificar os microrganismos ou então de detectar componentes de suas estruturas, como proteínas e ácidos nucleicos (JUNQUEIRA et al., 2006). Diante desse panorama, técnicas moleculares como a PCR apresentam-se como uma boa opção para complementar o diagnóstico, fornecendo vantagens como menor tempo de realização e maior sensibilidade de detecção dos agentes de importância (AMIN et al., 2001).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O presente projeto objetivou colaborar com o fornecimento de alternativas de ferramentas diagnósticas no campo da reprodução de bovinos, sobretudo no que diz respeito ao controle de agentes patogênicos no sêmen bovino comercial, testando um protocolo para extração e amplificação de DNA de bactérias que possam estar presentes nesse material.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Padronizar um kit comercial (“RTP Bacteria DNA Mini Kit” (Invitex®) para extração de DNA de bactérias Gram-negativas em amostras de sêmen bovino;
- b) Avaliar a aplicabilidade do kit comercial à rotina laboratorial do Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, FCAV/UNESP – Jaboticabal;
- c) Analisar amostras de sêmen bovino provenientes de Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) do País para a presença ou ausência de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp., utilizando o kit comercial padronizado;
- d) Aplicar o protocolo de amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) proposto por RICHTZENHAIN et al. (2002) em caso de

presença de material genético de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nas amostras de sêmen.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de sêmen

O trabalho foi realizado com 96 amostras de sêmen de touros (*Bos taurus* e *Bos indicus*) provenientes de centrais de reprodução de bovinos que realizam produção / comercialização deste material para inseminação artificial, localizadas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. Não foram coletados dados quanto à situação sorológica dos animais doadores de sêmen envolvidos no estudo para as enfermidades em questão, partindo-se do pressuposto de que as empresas obedecem rigorosamente aos requisitos sanitários impostos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (MAPA, 2003).

Tabela 1. Distribuição e identificação das amostras de sêmen de acordo com o estado e a central de comercialização de origem.

Amostras	Estado de origem	Central de comercialização
01 - 10	Paraná	A
11 - 20	Paraná	B
21 - 29	Santa Catarina	C
30 - 59	Minas Gerais	D
60 - 80	São Paulo	E
81 - 96	São Paulo	F

A seleção e a análise do sêmen foram feitas de forma independente de raça (Tabela 2), aptidão produtiva e idade do animal doador, estabelecendo-se apenas

como critério obrigatório de seleção o fato de a coleta e o processamento do sêmen ocorrerem em centros de reprodução de bovinos no Brasil.

As amostras foram enviadas pelas empresas via serviço da Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos (ECT), por meio de “sedex” e mantidas em congelador a - 20°C até o momento das análises. Cada uma delas cor respondeu a um touro diferente e foi identificada de acordo com o reprodutor. Os dados de impressão obrigatória na palheta, tais como: nome do animal, identificação da central produtora e número da partida, foram registrados e mantidos sob sigilo.

Tabela 2. Distribuição do número de amostras de sêmen bovino estudadas de acordo com a raça.

RAÇA	QUANTIDADE DE AMOSTRAS
Brahman (BR)	1
Blonde D'Aquitane (BD)	1
Caracu (CR)	1
Gir Leiteiro (GL)	6
Girolando (GO)	1
Guzerá (GZ)	3
Holandês (HO)	3
Jersey (JE)	5
Limousin (LM)	10
Nelore (NE)	55
Nelore Mocho (NM)	2
Normando (NO)	3
Pardo-Suíço (BS)	2
Simental (SM)	1
Tabapuã (TB)	2
TOTAL	96

4.2 Padronização do kit comercial para extração de DNA bacteriano a partir de sêmen bovino

Em função da ausência de um protocolo específico para a obtenção de material genético bacteriano em amostras de sêmen no kit em questão, foram extrapolados valores de quantidades de reagentes a partir das recomendações determinadas pelo fabricante para a extração de DNA bacteriano em amostras de urina.

Para certificar a capacidade do kit comercial testado em extrair DNA exclusivamente de bactérias, sem envolver o material genético das células espermáticas, o protocolo de extração foi aplicado a três amostras de sêmen bovino sabidamente livres de patógenos, provenientes do Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal – FCAV/UNESP, Jaboticabal. Essas amostras foram identificadas como 22LabRep, 31LabRep e 37LabRep.

Visando avaliar a capacidade de extração de DNA bacteriano de microrganismos Gram-negativos diretamente em sêmen, sem diluição ou separação das frações seminais e sem a interferência de fatores inibitórios da reação presentes neste material, duas amostras de sêmen sabidamente livre de patógenos foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL estéreis e contaminadas experimentalmente com 1 µL e 10 µL de cultura pura de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, respectivamente. Estes foram mantidos em estufa bacteriológica (B.O.D.) a uma temperatura de 28°C por 48 horas para crescimento bacteriano, com posterior visualização das bactérias por microscopia de campo escuro.

Ainda, durante o mesmo período e sob as mesmas condições de temperatura, foi incubado um tubo eppendorf contendo uma amostra de 1,5 mL de cultura pura de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, mantida em meio líquido “Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris” (EMJH) enriquecido com soro sanguíneo de coelho, na proporção de 10%, para compor o controle positivo para bactérias Gram-negativas.

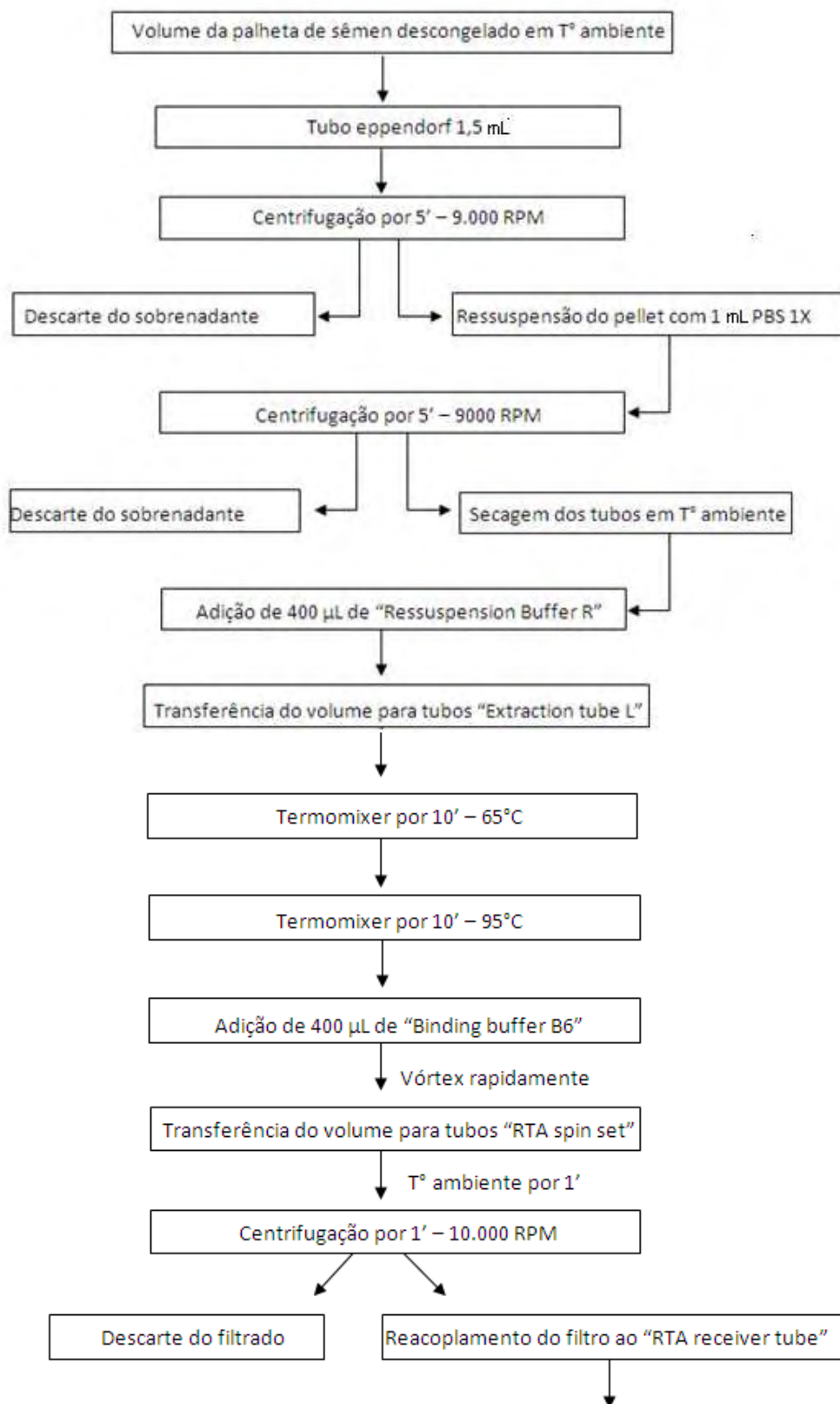
4.3 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.3.1 – Protocolo de extração do DNA

As amostras de sêmen obtidas em centrais de inseminação artificial foram submetidas à extração de DNA com o reagente comercial “RTP Bacteria DNA Mini Kit (Invitex®)”, adaptado do protocolo para isolamento de DNA bacteriano a partir de amostras de urina, de acordo com as recomendações do fabricante. O protocolo, ilustrado na Figura 1, foi otimizado como se segue:

- 1- O volume da palheta de sêmen foi transferido para um eppendorf de 1,5 mL e centrifugado por 5 minutos a 9.000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado no fundo do tubo foi ressuspensionado com 1 mL de PBS 1x. Realizou-se nova centrifugação por 5 minutos a 9.000 RPM, o sobrenadante foi novamente descartado e os tubos foram invertidos em papel toalha para secarem em temperatura ambiente;
- 2- Acrescentaram-se 400 µL de “Ressuspension Buffer R”, contido no kit de extração, ao pellet, com homogeneização por pipetagem. O conteúdo formado foi transferido para tubos do tipo “Extraction Tube L” previamente identificados de acordo com as amostras analisadas. Esses tubos foram incubados em termomixer por 10 minutos a 65° C e por 10 minutos a 95° C. Acrescentaram-se 400 µL de “Binding Buffer B6” à amostra e o tubo foi agitado em vórtex rapidamente;
- 3- O conteúdo foi transferido para tubos do tipo “RTA Spin Set”, previamente identificados de acordo com as amostras, e este permaneceu em temperatura ambiente por 1 minuto, com posterior centrifugação por 1 minuto a 10.000 RPM. O filtrado foi descartado e o filtro novamente acoplado ao “RTA Receiver Tube”;

- 4- Adicionaram-se 500 μ L de “Wash Buffer I”, com posterior centrifugação por 1 minuto a 10.000 RPM. O conteúdo filtrado foi descartado juntamente com o “RTA Receiver Tube” e o filtro foi acoplado a novos tubos deste tipo, adicionando-se 600 μ L de “Wash Buffer II” ao conjunto;
- 5- O conjunto foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 RPM. O filtrado foi descartado e o filtro novamente acoplado ao tubo para nova centrifugação por 3 minutos a 13.000 RPM. O filtro foi então encaixado em um “1,5 mL Receiver Tube” com posterior adição de 100 μ L de “Elution Buffer D” e incubação em temperatura ambiente por 1 minuto;
- 6- O conjunto foi centrifugado por 1 minuto a 8.000 RPM, o filtro descartado e o material resultante do processo foi identificado e armazenado a -20° C.



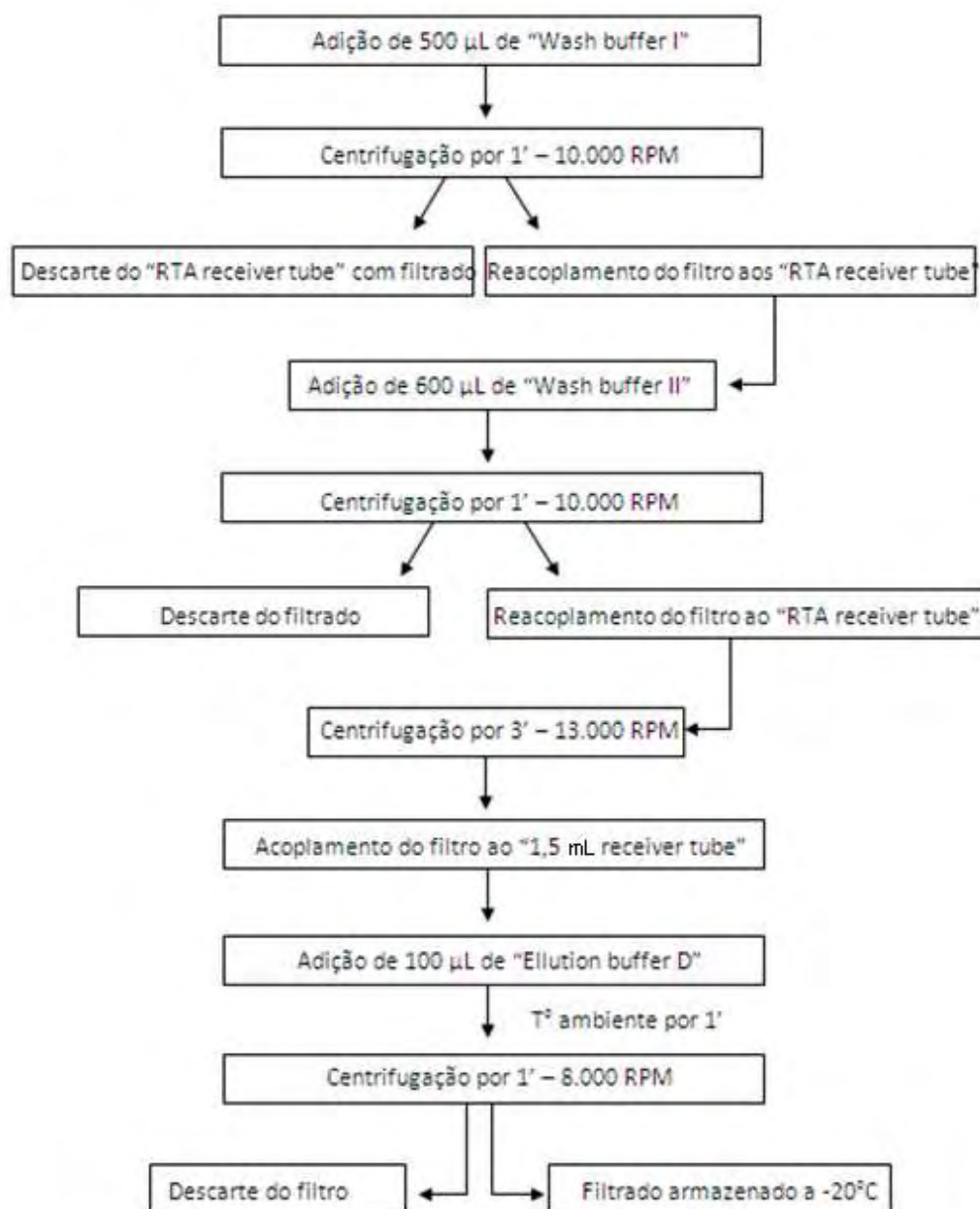


Figura 1. Fluxograma do protocolo de extração de DNA a partir de amostras de sêmen bovino.

4.3.2 – Avaliação do DNA extraído

Após a extração, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% (2,0 g de agarose + 100 mL de TBE 1X) para avaliação de presença ou ausência de DNA bacteriano no volume final da extração. Para tanto, 10µL de cada amostra foram misturados e homogeneizados por pipetagem com 2µL de corante (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%) e dispostos nos poços do gel de agarose contendo 10 µL de brometo de etídeo, substância evidenciadora de DNA. Como parâmetro de tamanho molecular, utilizaram-se 2,5 µL de marcador molecular de 100 pb. O gel foi submetido a uma voltagem de 65 V por 60 minutos e posteriormente visualizado em transiluminador de luz ultravioleta para a análise da presença ou ausência de DNA bacteriano.

4.3.3 – Amplificação do DNA bacteriano

4.3.3.1- Oligonucleotídeos iniciadores

Para amplificação de DNA de *Leptospira* spp. foram propostos os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos Lep 1 e Lep 2 (331pb), descritos por MÉRIEN et al. (1992), e para *Brucella* spp., os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos B4 e B5 (223 pb), descritos por BAILY et al. (1992).

Tabela 3. Sequência de bases que compõem os primers selecionados para a reação em cadeia da polimerase para amplificação de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp.

Primers	Sequência
Lep 1	5' GGC GGC GCG TCT TAA AÇA TG 3'
Lep 2	3' TTA GAA CGA GTT ACC CCC CTT 5'
B4	5' TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA 3'
B5	3' CGC GCT TGC CTT TCA AGG TCT G 5'

4.3.3.2 Protocolo de amplificação

Propôs-se que as reações fossem realizadas em microtubos de 500 µL. O mix para a reação contém 15 µL de água MilliQ, 5 µL de tampão de reação 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0), 8 µL de conjunto de dNTP's contendo 200 mM de cada (A, G, C, T), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,5 µL de cada primer (B4, B5, Lep1 e Lep2 a 10 pM/ml), 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/ml) e 10 µL do DNA extraído (RICHTZENHAIN et al., 2002).

4.3.3.3 Condições de amplificação

O programa proposto para amplificação em termociclador consiste das seguintes etapas: 94°C por 3 minutos para desnaturaçã o inicial do DNA, 35 ciclos de desnaturaçã o do DNA a 94°C por 60 segundos, anelamento dos “primers” a 60°C por 60 segundos e extensã o do DNA a 72°C por 90 segundos, seguidos de uma etapa de extensã o final a 72°C por 10 minutos.

4.3.4 Análise do produto amplificado

De acordo com RICHTZENHAIN et al. (2002), os produtos da amplificação pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, com posterior visualização das bandas em transiluminador de luz ultravioleta, utilizando o brometo de etídeo como corante evidenciador do DNA. Um marcador molecular de 100 pb foi utilizado como parâmetro de avaliação do tamanho das bandas geradas. Neste trabalho, esperaram-se fragmentos de 223pb para a identificação de *Brucella* spp., e de 331pb para a identificação de *Leptospira* spp.

Em cada uma das cavidades do gel foram colocados 10µL de uma mistura contendo 8µL de produto amplificado e 2µL de corante (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%). O gel foi submetido a uma voltagem constante de 6-7 V por centímetro de distância entre os eletrodos em cuba horizontal, contendo tampão de corrida TBE 1X.

Para visualização das bandas, utilizou-se um sistema de fotodocumentação (Biorad), analisado juntamente com o software Quantity One 1-D Analysis.

V. RESULTADOS

5.1 Padronização do kit comercial para uso em amostras de sêmen

A partir do protocolo recomendando pelo fabricante para extração de DNA bacteriano em amostras de urina, as alterações realizadas para o uso em sêmen restringiram-se ao tempo e à rotação de centrifugação da amostra inicial e ao volume utilizado de PBS 1X. As demais etapas foram mantidas conforme preconizadas no manual do produto.

O kit comercial para extração de DNA bacteriano foi capaz de separar tal material genético a partir da amostra de cultura pura de *Leptospira* spp. e das amostras de sêmen contaminadas experimentalmente com este meio. Não foi isolado DNA genômico quando o kit foi utilizado em amostras de sêmen sem contaminação experimental, demonstrando a especificidade deste protocolo de extração por material genético bacteriano. A constatação de que houve extração de DNA deu-se por eletroforese em gel de agarose, como já descrito.

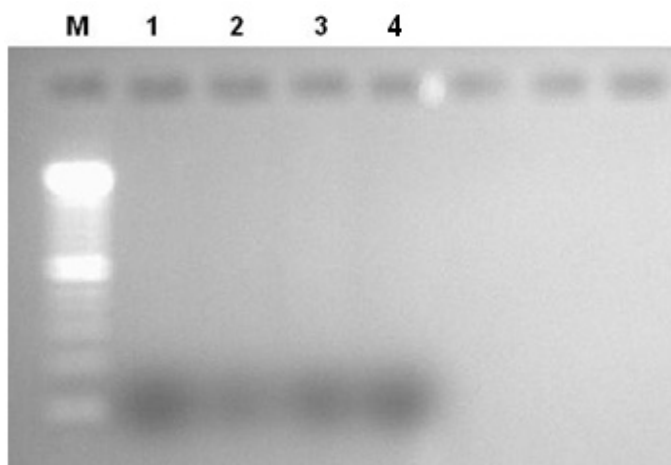


Figura 2. Resultado da extração de DNA em amostras de sêmen sem contaminação experimental por cultura pura de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. M) Padrão de peso molecular em escala ascendente de 100 pb; 1) Amostra 22LabRep; 2) Amostra 31LabRep; 3) Amostra 37LabRep; 4) Controle negativo.

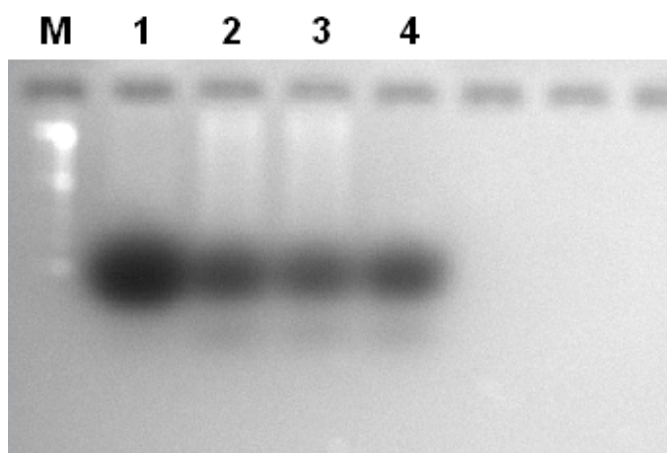


Figura 3. Resultado da extração de DNA em amostras de cultura pura de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e de amostras de sêmen contaminadas experimentalmente com *Leptospira* spp. M) Padrão de peso molecular em escala ascendente de 100 pb; 1) Amostra de cultura pura de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona; 2) Sêmen contaminado experimentalmente com 10 μ L de cultura pura de *Leptospira*; 3) Sêmen contaminado experimentalmente com 1 μ L de cultura pura de *Leptospira*; 4) Controle negativo.

Todas (100%) as amostras de sêmen provenientes de centrais de reprodução de bovinos testadas foram negativas para a extração de DNA bacteriano, conforme avaliação por meio de eletroforese em gel de agarose, apresentando em sua totalidade o padrão de imagem mostrado na Figura 2.

5.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Visto que todas as amostras de sêmen analisadas foram negativas para a presença de DNA de bactérias Gram-negativas, não se obteve material genético disponível para a realização da PCR. A ausência de DNA impossibilitou a tentativa de amplificação deste material utilizando o protocolo estabelecido e utilizado por RICHTZENHAIN et al. (2002).

VI. DISCUSSÃO

A introdução da inseminação artificial como uma biotécnica da reprodução aplicável à produção de bovinos pode alterar a epidemiologia de enfermidades infecciosas. A utilização desta técnica previne a transmissão de doenças por contato direto entre machos e fêmeas, permitindo o controle de muitas doenças. No entanto, o sêmen contaminado com agentes patogênicos pode levar à ampla disseminação de doenças (DUS SANTOS et al., 2007), pela possibilidade de atingir numerosos rebanhos, no País ou mesmo em países diferentes, em curto espaço de tempo.

As exigências sanitárias impostas pelo MAPA (2003) quanto à produção e comercialização de material genético no País, como o sêmen bovino, são reflexo da necessidade de monitoramento destes produtos com o intuito de garantir o fornecimento de sêmen de qualidade e livre de patógenos, mantendo um dos

propósitos da inseminação artificial que é a prevenção da transmissão de doenças infecciosas pelas atividades de reprodução assistida utilizadas nesta espécie animal.

O uso de técnicas de biologia molecular para detectar patógenos no sêmen, especificamente a PCR, pode facilitar a certificação do material genético como livre de agentes infecciosos. Este trabalho teve como principal objetivo padronizar e testar um kit comercial para extração de DNA bacteriano em amostras de sêmen bovino e amplificação deste material, quando presente.

Para tanto, preferiu-se utilizar os oligonucleotídeos iniciadores Lep 1 e Lep 2, sintetizados por MÉRIEN et al. (1992) a partir da sequência do gene 16 S rRNA de *Leptospira interrogans* sorovar *canicola*, devido ao fato de esses “primers” serem gênero-específicos e permitirem a amplificação do DNA de vários sorovares de leptospiros apatogênicas e patogênicas, e também por esses oligonucleotídeos iniciadores serem de fácil comercialização no Brasil.

Outros “primers” também podem ser utilizados para a amplificação do material genético de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. VINODH et al. (2007) utilizaram com sucesso os primers Lig1/Lig2, que amplificam uma região dos genes LigA e LigB de leptospiros patogênicas. Para *Brucella* spp., os primers F e R foram produzidos para amplificar o elemento IS 711.

O procedimento de extração do DNA do material que se deseja avaliar e o “primer” utilizado podem propiciar diferentes resultados à técnica de PCR. MASRI et al. (1997) testaram três métodos diferentes para extração de DNA de leptospira em sêmen experimentalmente contaminado, conseguindo sucesso apenas em um, a extração com fenol-clorofórmio e bromocetiltrimetilamônio (CTAB) 1%.

A tentativa de padronização de um kit comercial para extração de DNA baseou-se na experiência de vários autores que têm seguido uma tendência de utilização de kits para otimizar protocolos de detecção de patógenos em sêmen. Não foi possível encontrar trabalhos que tenham testado o “RTP Bacteria DNA Mini Kit (Invitex®)” para análises em sêmen. No entanto, utilizando outro kit comercial, DUS SANTOS et al. (2007) obtiveram sucesso utilizando um kit para extração de DNA de patógenos em

sêmen para desenvolver um protocolo de amplificação do genoma do vírus da leucose bovina.

VINODH et al. (2007) justificam o uso de kits de extração por determinar maior sensibilidade analítica para detecção de microrganismos e explicam que isso pode ser devido à remoção inadequada que os outros métodos proporcionam para os inibidores da PCR presentes no sêmen. A remoção de inibidores da PCR requer procedimentos de purificação de DNA mais eficientes, como os presentes nos kits comerciais.

Embora existam vários relatos de sucesso na detecção de *Leptospira* spp. pela PCR em sêmen (MASRI et al., 1997; HEINEMANN et al., 1999; HEINEMANN et al., 2000), neste trabalho nenhuma das amostras de sêmen foi submetida a essa análise devido à ausência de DNA bacteriano após o procedimento de extração.

São escassos os trabalhos utilizando técnicas moleculares para detecção de patógenos em sêmen bovino comercial. A maioria das pesquisas trabalha com amostras experimentalmente contaminadas com o patógeno de interesse. MARQUES et al. (2009) estudaram o mesmo grupo de interesse deste trabalho e puderam detectar *Ureaplasma diversum* em palhetas de sêmen bovino processadas para inseminação artificial. VINODH et al. (2007) analisaram 40 amostras na Índia para a presença de genoma de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp., utilizando três diferentes métodos de extração de DNA, e obtiveram resultados 100% negativos.

A probabilidade de encontrar agentes patogênicos no sêmen congelado é menor do que no sêmen fresco, em função das etapas de diluição e adição de inibidores obrigatórios por lei (MAPA, 2003). ORTEGA-MORA et al. (2003), comparando uma técnica de PCR para detecção de *Neospora caninum* no sêmen de touros, obtiveram 50% menos detecção desse patógeno no sêmen congelado do que no sêmen fresco. É provável que, por serem congeladas e provenientes de centrais de coleta e processamento de sêmen que seguem as exigências de produção, as amostras deste trabalho tenham sido 100% negativas para a presença dos patógenos pesquisados.

Antes de aceitar a PCR como procedimento de rotina, os resultados precisam ser validados com os métodos sorológicos existentes. Deve-se também garantir que não há falso-negativos devido à inibição da PCR pelo volume de sêmen utilizado. No entanto,

quando otimizada, a PCR negativa para a detecção de patógenos no sêmen pode ser associada à ausência de transmissão do microrganismo, permitindo que a amostra de sêmen seja usada para a inseminação artificial (DUS SANTOS et al., 2007). Um touro certificado que possua infecção latente deixa de ser condenado pelo medo de disseminar o agente infeccioso, já que um método muito sensível está disponível para triagem.

O método utilizado neste trabalho foi otimizado utilizando-se sêmen inoculado artificialmente, o que pode ser um bom modelo para a simulação de condições encontradas no sêmen de touros naturalmente infectados. O crescente comércio de sêmen, inclusive internacional, enfatiza a necessidade de testes diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos para a certificação de que o sêmen é livre de patógenos. A reação em cadeia da polimerase mostra-se vantajosa sobre outras técnicas devido à sua habilidade de amplificar em poucas horas uma sequência específica do patógeno, mesmo que este esteja presente em baixas concentrações no sêmen.

Como a PCR detecta o ácido nucleico de microrganismos independentemente de sua capacidade de causar infecção, esta técnica tem a vantagem de detectar possíveis patógenos ou infecções persistentes por vírus e bactérias. A detecção de agentes infecciosos no sêmen com um teste sensível como a PCR evitaria o uso de animais infectados como doadores de sêmen, garantindo assim a saúde reprodutiva das vacas inseminadas.

VII . CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e analisados, nas condições em que foi realizado o presente estudo, segundo a metodologia empregada, possibilitaram as seguintes conclusões:

1. Foi possível padronizar o uso de um kit comercial de extração de DNA de bactérias Gram-negativas a partir de amostras de sêmen bovino;
2. Foi possível extrair DNA bacteriano a partir de amostras de sêmen experimentalmente contaminadas sem interferência dos agentes inibidores presentes neste material;
3. Não foi possível detectar DNA de *Leptospira* spp. nas amostras de sêmen bovino provenientes de centros de produção e processamento de sêmen envolvidas no estudo;
4. Não foi possível detectar DNA de *Brucella* spp. nas amostras de sêmen bovino provenientes de centros de produção e processamento de sêmen envolvidas no estudo;
5. Há necessidade de maiores estudos sobre a detecção de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em sêmen, testando-se diferentes técnicas de extração de DNA e outros oligonucleotídeos iniciadores.

VIII. REFERÊNCIAS

ACHA, P.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3ª edição. Washington, 2001. 398p.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 287 – 296, 2010.

AMIN, A. S.; HAMDY, M. E. R.; IBRAHIM, A. K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 37-44, 2001.

ASBIA. **Relatório de comercialização de sêmen do ano 2008**. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/download/mercado/relatorio2008.pdf>>. Acesso em : 12 jan. 2010.

BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; SOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 271–275, 1992.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. Panorama da inseminação artificial em bovinos. In: **Documentos – Embrapa Pecuária Sudeste**. 1ª edição. São Carlos, 2008. 28 p.

BARCELOS, V. B.; BECKER, R. C.; ARAUJO, I. S. B.; MADEIRA, E. M.; SCHWEGLER, E.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M. N. Agentes infecciosos no sêmen de touro. **Grupo Cultivar**, 2009. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=918> . Acesso em: 2 jan 2010.

BIELANSKI, A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. **Theriogenology**, v. 68, p. 1 – 22, 2007.

BONDURANT, R. H. Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. **Theriogenology**, v. 68, p. 461-473, 2007.

BONFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C. Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira* spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 118, p. 278-288, 2006.

CAMPERO, C. M.; LADDS, P. W.; HOFFMANN, D.; DUFFIELD, B.; WATSON, D; FORDYCE, G. Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection in the genitalia of bulls. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 24, p. 235-246, 1990.

DUS SANTOS, M. J.; TRONO, K.; LAGER, I.; WIGDOROVITZ, A. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 10 - 18, 2007.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Bulletin**, v.62, n.8, p. 743-775, 1992.

ELLIS, W. A. Effects of leptospirosis on bovine reproduction. In: **Current Therapy in Theriogenology**. 3th edition. Philadelphia. 1986, p. 267-271.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, p. 463-478, 1994.

GALE, S. P.; KINGSCOTE, B. F. Failure of a seropositive bull to transmit *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection to heifers. **Canadian Veterinary Journal**, v.30, p. 65-67, 1989.

GERRITSEN, M. J.; KOOPMANS, M. J.; DEKKER, T. C. E. M.; DEJONG, M. C. M.; MOERMAN, A.; OLYHOEK, T. Effective treatment with dihydroestreptomycin of naturally infected cows shedding *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* subtype *hardjobovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 3, p. 18-23, 1994.

GIVENS, M. D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, 66, p. 648-654, 2006.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; MORAIS, Z. M.; GREGORI, F.; CORTEZ, A.; VASCONCELLOS, S. A.; VISINTIN, J. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of leptospire in bovine semen by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v.77, n.1, p. 32-34, 1999.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v.73, p. 261-267, 2000.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. Falhas na reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.2, p. 289-298, 2006.

JUNQUEIRA, J. R. C.; FREITAS, J. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o

BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n. 3, p. 471-480, 2006.

KEID, L. B. **Diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis*. Correlação entre exames clínicos e laboratoriais: imunodifusão em gel de ágar, imunodifusão em gel de ágar com emprego do 2-mercaptoetanol, cultivo e reação em cadeia pela polimerase**. Dissertação de Mestrado em Reprodução Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2001. 96f.

KEID, L. B. **Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados**. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006. 134f.

KIM, S.; LEE, D.S.; SUZIKI, H.; WATARAI, M. Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by multiplex nested PCR. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 6, p. 615-618, 2006.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 435 – 448, 2004.

LEYLA, G.; KADRI, G.; UMRAN, O.K. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n.1, p. 53-61, 2003.

MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCES, A.; FICAPAL, A.; SHOPAYEVA, G.; BLASCO, J. M.; MARIN, C. M.; LOPEZ-GONI, I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. **Veterinary Microbiology**, v.92, n. 1-2, p. 65-72, 2003.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT, 2001.**

Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 20 ago 2007.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa SDA Nº 48, 2003.** Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso

em: 2 jan 2010.

MARQUES, L. M.; BUZINHANI, M.; NETO, R. L.; OLIVEIRA, R. C.; YAMAGUTI, M.; GUIMARÃES, A. M.; TIMENETSKY, J. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. **Veterinary Records**, v. 165, n. 19, p. 572 – 573, 2009.

MASRI, S. A.; NGUYEN, P. T.; GALE, S. P.; HOWARD, C. J.; JUNG, S. C. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. **Canadian Veterinary Journal**, v. 61, p. 15-20, 1997.

MÉRIEN, F. ; AMOURIAUX, P. ; PEROLAT, P. ; BARANTON, G. ; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2219–2224, 1992.

NAVARRO, E.; ESCRIBANO, J.; FERNÁNDEZ, J. A.; SOLERA, J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 147-151, 2002.

NOGUCHI, H. The survival of *Leptospira* (Spirochaeta) *icterohaemorrhagiae* in nature: Observations concerning microchemical reactions and intermediary hosts. **Journal of Experimental Medicine**, v. 27, p. 609 – 625, 1918.

OCAMPO-SOSA, A. A.; AGUERO-BALBÍN, J.; GARCÍA-LOBO, J. M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. **Veterinary Microbiology**, v.110, p. 41-52, 2005.

O'LEARY, S. O.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. **Research in Veterinary Science**, v.81, p. 170-176, 2006.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; FERNÁNDEZ, E. C.; CERRILLO, J. R.; GARAGALZA, C. U.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 301-308, 2003.

PAULIN, L. M. Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 2, p. 239-249, 2003.

RABASSA, V. R.; SCHNEIDER, A.; CORRÊA, M. N.; KRAHL, M.; DUVAL, E. H.; DUVAL, E. J. **Influência da titulação sorológica de doenças da reprodução sobre a taxa de concepção e prenhez em vacas de corte**. Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas. 2005.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 139 – 147, 2002.

RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; FELICIANO SILVA, A. E. D. **Avanços na biotecnologia da reprodução nos bovinos**. Anais do III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal., p. 248-253, 2000.

VINODH, R.; RAJ, G. D.; GOVINDARAJAN, R.; THIAGARAJAN, V. Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. **Tropical Animal Health and Production**, v. 40, p. 323 – 329, 2007.

WENTINK, G. H.; FRANKENA, K.; BOSCH, J. C.; VANDEHOCK, J. E. D.; VAN DER BERG, TH. Prevention of disease transmission by semen in cattle. **Livestock Production Science**, v. 62, p. 207-220, 2000.

WHATMORE, A. M.; MURPHY, T. J.; SHANKSTER, S.; YOUNG, E.; CUTLER, S. J.; MACMILLAN, A. P. Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 761-769, 2005.