

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MARIANE PACHECO DOS SANTOS LOURENCETTI

DETECÇÃO MOLECULAR DE DNA DE *Brucella abortus* EM SÊMEN BOVINO *in natura*.

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL

2014

MARIANE PACHECO DOS SANTOS LOURENCETTI

DETECÇÃO MOLECULAR DE DNA DE *Brucella abortus* EM SÊMEN BOVINO *in natura*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal.

Orientadora: Professora Dra. Anna Monteiro Correia Lima.

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L892d Lourencetti, Mariane Pacheco dos Santos, 1984-
2014 Detecção molecular de DNA de *Brucella abortus* em sêmen
bovino *in natura* / Mariane Pacheco dos Santos Lourencetti. – 2014.
66 f. : il.

Orientador: Anna Monteiro Correia Lima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Brucella os Aspectos moleculares -
Teses. 3. Sêmen - Teses. 4. Brucelose - Teses. I. Lima, Anna
Monteiro Correia. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Aos meus pais e irmãs, sempre
presentes nos melhores momentos e
nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me guiaram no caminho do estudo, da pesquisa e da vida.

Às minhas irmãs Jandra e Candice, únicas e especiais. Não consigo imaginar minha vida sem elas.

Aos meus cunhados Álvaro e Matt que sempre me incentivaram e aplaudiram.

À minha sobrinha Sofia, raio de sol que em certas ocasiões me fez interromper os estudos e soltar uma sonora gargalhada.

Ao meu esposo Fábio, cujo carinho, compreensão e estímulo foram os verdadeiros combustíveis nessa jornada.

Aos animais, aqui representados pela cadela Vida, razão primeira de minha escolha profissional.

À minha competente orientadora, Dra. Anna Lima, pela confiança, orientação, ensinamento constantes e, sobretudo, pela amizade.

Ao meu primo Lucas, pela grande ajuda nas ilustrações desta dissertação.

À Érica, Janise e Patrícia Brettas, grandes amigas da época da graduação e, ainda hoje, tão queridas e presentes em minha vida.

Às amigas Dayane, Gabriela, Muriell, Pollyanna, Tatiane, cuja efetiva ajuda durante o experimento tornou a caminhada menos árdua.

À querida amiga Mariana Assunção, cuja ajuda durante o processo de pesquisa fez com que eu superasse inseguranças e seguisse sempre em frente.

Aos amigos do laboratório Andréia, Sílvia, João Helder, Beletim, Nádia e Danilo pelas boas horas de convívio e pela ajuda na pesquisa.

Aos técnicos do laboratório de doenças Infectocontagiosas da FAMEV-UFU, pela colaboração. Em especial à Marília, pela amizade.

À médica veterinária do Instituto Biológico Simone Miyashiro, pelo auxílio na técnica de PCR.

À CAPES, CNPq (nº 64/2008) e FAPEMIG, pela concessão do apoio financeiro.

Aos familiares, amigos, professores e técnicos da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, OBRIGADA.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de DNA de *Brucella abortus* em amostras de sêmen bovino provenientes de centrais de coleta e processamento de sêmen (CCPS), e de fazendas. O sêmen bovino foi analisado pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e foram realizados os testes sorológicos Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o Sêmen Plasma Aglutinação (SPA) no soro sanguíneo e plasma seminal, respectivamente. Foi realizada a diferenciação entre linhagem de campo e cepa vacinal B19, com a utilização da técnica de PCR. Foram utilizados amostras de sêmen *in natura*, soro sanguíneo e plasma seminal de 100 touros. Das 100 amostras analisadas com a PCR para a presença de DNA de *Brucella abortus* 68 (68%) estavam positivas. Em todas as 68 amostras de sêmen positivas quando foi realizada a diferenciação com a técnica de PCR entre linhagem de campo e cepa vacinal B19, foram positivas para *Brucella abortus* cepa vacinal B19. Todos os animais apresentaram resultado negativo no AAT e 11 (11%) apresentaram aglutinação na SPA. Nenhum touro foi positivo nos três testes simultaneamente. Conclui-se que mesmo touros soronegativos para brucelose podem eliminar a bactéria no sêmen.

Palavras-chave: PCR, Sêmen, Brucelose, Touros.

ABSTRACT

The objective of this study was to identify the presence of *Brucella abortus* in bovine semen specimens from central collection and processing sites and farms. The bovine semen was analyzed by polymerase chain reaction (PCR), serum blood samples and seminal plasma were analyzed and by serological tests Rose Bengal test (RBT) and semen plasma agglutination (SPA), respectively. In *Brucella abortus* positive bulls, the use of PCR differentiated between field and vaccine strain B19. Semen samples in nature, blood serum and seminal plasma of 100 bulls were used. Of the 100 samples analyzed by PCR for the presence of *Brucella abortus* DNA, 68% were positive. Of the 68% positive, all were shown to be from the B19 vaccine. In serological testing of the bovines, all were negative by RBT testing, and 11% showed positive agglutination in SPA. The testing showed that none of the bovine specimens were positive for all three tests used. Therefore, we conclude that even bulls testing seronegative for *Brucella abortus* can eliminate the bacteria in the semen.

Key words: PCR, Semen, Brucellosis, Bulls.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	=	micrograma
µg/mL	=	micrograma por mililitro
µL	=	microlitro
cm	=	centímetros
dATP	=	desoxi-adenosina trifosfato
dCTP	=	desoxi-citosina trifosfato
dGTP	=	desoxi-guanosina trifosfato
DNA	=	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	=	desoxirribonucleotídeos
dTTP	=	desoxi-timidina trifosfato
EDTA	=	ácido etileno-diamino-tetracético
et al.	=	e colaboradores
g	=	gramas
HCl	=	ácido clorídrico
KDa	=	kilodalton
L	=	litro
LPS	=	lipopolissacarídeos
M	=	molar
mg	=	miligrama
MgCl ₂	=	cloreto de magnésio
mL	=	mililitro
mM	=	milimolar
NaCl	=	cloreto de sódio
Nº	=	número

°C	=	Celsius
p/v	=	peso/volume
pb	=	pares de base
PCR	=	reação em cadeia pela polimerase
pH	=	potencial hidrogeniônico
PK	=	proteínase K
pmol	=	picomoles
RNA	=	ácido ribonucléico
rpm	=	rotações por minuto
SDS	=	dodecil sulfato de sódio
Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	=	Tris-Borato-EDTA
TE	=	tampão TRIS-EDTA
TRIS	=	Tris (hidroximetil) aminometano
UI	=	unidade internacional
V	=	volts
x g	=	múltiplos da gravidade terrestre (9,81 m/s ²)
X	=	vezes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura - 1	Representação da hibridização dos “primers” específicos para <i>Brucella abortus</i> biovars 1, 2 e 4 e tamanho do fragmento amplificado.....	34
Figura - 2	Representação da hibridização dos “primers” <i>eri</i> e <i>eri</i> 2 no genoma de <i>Brucella</i> spp., destacando-se a deleção genética existente na B19, e o tamanho dos produtos amplificados.....	37
Figura - 3	Representação da hibridização dos “primers” utilizados na hemi-nested PCR nas cepas de <i>Brucella</i> spp., exceto cepa vacinal B19, e tamanho do produto amplificado.....	37
Figura - 4	Representação da hibridização do “primers” <i>eri</i> 1 na hemi-nested PCR em cepa vacinal B19, e o tamanho do produto amplificado.....	38
Figura - 5	Comprovação da especificidade dos “primers” BAB/IS711, Uberlândia, 2014.....	40
Figura - 6	Detecção de DNA de <i>Brucella abortus</i> em amostras de sêmen bovino, com os “primers” BAB e IS711, Uberlândia, 2014.....	41
Figura – 7	Técnica de PCR com os “primers” <i>eri</i> 1 e <i>eri</i> 2, Uberlândia, 2014	42
Figura - 8	Detecção de DNA de <i>B. abortus</i> cepa vacinal B19 em sêmen bovino, Uberlândia, 2014.....	43
Figura - 9	Possíveis mecanismos de transmissão de <i>B. abortus</i> cepa vacinal B19 para touros e manutenção no ambiente.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1	Situação epidemiológica da brucelose bovina em 14 estados brasileiros.....	18
Tabela - 2	Sequência dos “primers” utilizados na PCR para identificação de <i>B. abortus</i>	34
Tabela - 3	Ciclo de temperaturas para amplificação do fragmento de DNA de <i>B. abortus</i> , para 40 ciclos.....	35
Tabela - 4	Sequência dos “primers” utilizados para diferenciação da cepa de <i>B. abortus</i> em campo ou vacinal (B19).....	35
Tabela - 5	Ciclo de temperaturas para amplificação do fragmento de DNA de <i>B. abortus</i> , na diferenciação de cepa de campo e cepa vacinal (B19), “primers” <i>eri 1/eri 2</i> , para 35 ciclos.....	36
Tabela - 6	Ciclo de temperaturas para amplificação do fragmento de DNA de <i>B. abortus</i> , na diferenciação de cepa de campo e cepa vacinal (B-19), “primers” <i>eri 1/eri 3</i> hemi-nested PCR, para 30 ciclos.....	36
Tabela - 7	Resultados do AAT, SPA, técnica de PCR para determinação da espécie <i>B. abortus</i> e hemi-nested PCR (<i>eri 1</i> e <i>eri 3</i>) para diferenciação da origem da cepa em campo ou vacinal (B19) de touros positivos na PCR, Uberlândia, 2014.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CARACTERÍSTICAS DO AGENTE	16
2.2	PREVALÊNCIA	17
2.3	EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA	19
2.4	BRUCELOSE EM TOUROS	20
2.5	COLETA E PROCESSAMENTO DE SÊMEN BOVINO (Código Sanitário dos Animais Terrestres, OIE 2013)	22
2.6	DIAGNÓSTICO	23
2.6.1	Diagnóstico direto	23
2.6.2	Diagnóstico indireto	25
2.7	PREVENÇÃO E CONTROLE	26
2.8	VACINA B19	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	COMITÊ DE ÉTICA DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	30
3.2	AMOSTRAS DE SÊMEN E SORO SANGUÍNEO	30
3.3	TESTES DE DIAGNÓSTICO	31
3.3.1	Diagnóstico sorológico	31
3.3.1.1	Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)	31
3.3.1.2	Sêmen Plasma Aglutinação (SPA)	31
3.3.2	Diagnóstico Molecular	32
3.3.2.1	Extração do DNA	32
3.3.2.2	Quantificação do DNA	33
3.3.2.3	Amostra do DNA de <i>Brucella abortus</i>	33
3.3.2.4	Amostra da cepa vacinal B19 e RB51	33
3.3.2.5	Amostras de DNA de <i>Ochrobactrum intermedium</i> e <i>Ochrobactrum anthropi</i>	34
3.4	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	34
3.4.1	Primers utilizados para detecção de DNA de <i>Brucella abortus</i>	34
3.4.2	Primers utilizados para diferenciação da cepa de <i>Brucella abortus</i> em campo ou vacinal (B19)	35

3.5	ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	38
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4	RESULTADOS.....	40
5	DISCUSSÃO.....	46
6	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO.....	66

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Relatório Estatístico de Produção, Importação e Comercialização de Sêmen da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), em 2012 o Brasil comercializou aproximadamente 12,3 milhões de doses de sêmen. Desse total, cerca de 53,29% são de origem nacional, e o estado de Minas Gerais teve a participação das vendas em 26,51% (gado de leite) e 7,89% (gado de corte). Mesmo com todo esse volume de material genético comercializado, estimativas mostram que apenas 10% do total de fêmeas bovinas em reprodução são inseminadas anualmente no Brasil (ASBIA,2012).

A Instrução Normativa SDA Nº 8, de 10 de março de 2006, estabelece que somente poderá ser distribuído no Brasil o sêmen bovino e bubalino coletado em Centros de Coleta e Processamento de Sêmen – CCPS, registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, que cumprem os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no país. Essa resolução estabelece exigências para o touro doador quanto à pré-quarentena e a quarentena para ingresso no CCPS, controle do rebanho residente e a adição de antibióticos ao processamento de sêmen (MAPA, 2006).

Brucelose, Tuberculose, Campilobacteriose Genital Bovina, Tricomomose e Diarreia Viral Bovina (BVD) são doenças para as quais os animais devem ter resultados dos exames considerados oficiais negativos, sendo que para as quatro primeiras os exames são repetidos anualmente de acordo com recomendação da Normativa 08/2006 (MAPA, 2006), visando garantir a produção e comercialização de sêmen livre de patógenos.

Em busca de maior competitividade, técnicas como inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embrião (TE) e fertilização *in vitro* (FIV) são utilizadas com maior frequência para propiciar aumento da produtividade e, conseqüentemente, garantir maior retorno econômico ao produtor rural.

Com a utilização da inseminação artificial o intercâmbio de material genético tornou-se possível, promovendo a melhor produção de leite e carne pelo uso de sêmen de melhor qualidade. Assim, a possibilidade de que o sêmen contaminado dissemine patógenos na monta natural ou por biotécnicas da reprodução, representa uma das principais preocupações para criadores e autoridades sanitárias dos países

que empregam essa tecnologia (AFSHAR; EAGLESOME, 1990; BARCELOS et al., 2009).

A Organização Internacional de Saúde Animal (OIE) classifica a brucelose como uma importante doença nos bovinos, com impacto sócio-econômico para a saúde pública e com consequências significativas no comércio internacional de animais e seus produtos (OIE, 2011).

A contaminação bacteriana maciça do sêmen congelado pode afetar sobremaneira a fertilidade, pois quando micro-organismos patogênicos são veiculados pela inseminação artificial, não necessitam atravessar a mucosa vaginal ou cervical, que agem como barreiras para bactérias, visto que são introduzidos diretamente no útero (FLATSCHE; HOLZMANN, 1981).

O diagnóstico da brucelose baseia-se em exames laboratoriais, com a utilização de métodos indiretos através da detecção de anticorpos ou por métodos diretos, pela identificação do agente. No Brasil, de acordo com o Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), em bovinos e búfalos, os testes de triagem são o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Anel em Leite (TAL) e os testes confirmatórios 2- Mercaptoetanol (2-ME) juntamente com soro aglutinação em tubos (SAT), Fixação de Complemento (FC) e Polarização Fluorescente (PF) (BRASIL, 2006).

Em busca de exames mais práticos, rápidos e específicos, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) vem sendo amplamente empregada em estudos moleculares, em razão da facilidade com que é possível ampliar, *in vitro*, regiões específicas do genoma de qualquer organismo. A PCR possibilita a amplificação de sequências de DNA (ácido desoxirribonucleico) que estejam presentes em misturas complexas e permite estudos de naturezas variadas (OLIVEIRA et al., 2007).

A brucelose é uma doença de caráter zoonótico, com impacto importante na produção de carne e leite, o que torna a prevenção e profilaxia fundamentais para tal setor agropecuário. A utilização de técnicas moleculares como a PCR é de grande valia para o diagnóstico de patógenos presentes no sêmen bovino e, pode também, ser eficiente para o controle sanitário de centrais de coleta e processamento de sêmen, e de fazendas. Assim, o diagnóstico desse patógeno no sêmen bovino, por meio da PCR, é uma prática desejável, pois os exames sorológicos de rotina podem apresentar um resultado falso-negativo e os machos podem ficar assintomáticos e levar à contaminação de todo um rebanho.

Dessa maneira, o presente trabalho apresenta como objetivos:

Geral:

-Detectar a presença de DNA de *B. abortus* no sêmen “in natura” de touros do estado de Minas Gerais.

Específicos:

- Avaliar a prova de AAT no soro sanguíneo de touros.
- Avaliar a prova de SPA no plasma seminal de touros.
- Detectar DNA de *B. abortus* na técnica de PCR no sêmen de touros.
- Diferenciar as amostras positivas para *B. abortus* em linhagem de campo e cepa vacinal (B19), pela técnica de PCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO BRUCELLA

As bactérias quem compõem o gênero *Brucella* são cocobacilos Gram-negativos e imóveis, não flagelados, desprovidos de cápsula e não formadores de esporos. São bactérias aeróbias ou microaerófilas. O seu metabolismo é oxidativo e a energia é produzida pela utilização de vários substratos de aminoácidos e carboidratos (METCALF et al., 1994).

O gênero *Brucella* é composto de dez espécies independentes, cada uma apresenta um hospedeiro preferencial mesmo não sendo espécie-específica: *B. abortus* (bovinos); *B. melitensis* (caprinos); *B. ovis* (ovinos), *B. suis* (suínos); *B. canis* (cães); *B. neotomae* (ratos do deserto); *B. ceti* (golfinhos e baleias); *B. pinnipedialis* (focas e leões marinhos), *B. microti* (roedor *Microtus arvalis*) e *B. inopinata* em humanos (FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008a; SCHOLZ et al., 2010).

As brucelas podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e as rugosas (*B. ovis* e *B. canis*) (METCALF et al., 1994).

A morfologia da colônia está relacionada com a composição do lipopolissacarídeo (LPS) na membrana celular externa. As colônias lisas possuem o lipídeo A (LA), núcleo oligossacarídeo e cadeia O (CO), enquanto as rugosas possuem apenas lipídeo A e parte do núcleo oligossacarídeo (PAULIN, 2003; BRASIL, 2006). A cadeia O é o sítio imunodominante da bactéria e a responsável pelo desencadeamento da maior parte da resposta imune humoral, tanto na infecção natural, quanto na desenvolvida após a vacinação com a B19 (SCHURIG, 2002).

A capacidade de sobrevivência da brucela é grande quando comparada a outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo em ambiente úmido contendo matéria orgânica, ao abrigo da luz solar direta e pH neutro (OMS, 1986). No solo, com luz solar direta, o tempo de sobrevivência da bactéria é de cerca de quatro horas, porém à sombra este tempo pode ser de até sete meses. Nas secreções uterinas pode sobreviver até 200 dias, ou mais, e no feto abortado até oito meses, dependendo das condições ambientais. Na urina de bovinos sobrevive até quatro dias. No leite pasteurizado ou fervido ocorre a inativação da bactéria. Já no leite *in natura*, se mantido a 15 °C, a bactéria sobrevive até 38 dias (PAULIN;

FERREIRA-NETO 2003). São escassos os relatos de tempo de sobrevivência dessa bactéria no sêmen de animais infectados.

2.2 PREVALÊNCIA

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), em bovinos e búfalos, com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional. Assim, a vacinação obrigatória de fêmeas bovinas e bufalinas entre 3 e 8 meses de idade contra a brucelose bovina e bufalina em todo o território nacional foi introduzida pelo PNCEBT, que definiu, ainda, uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas (BRASIL, 2006).

A brucelose é uma doença mundial e endêmica em várias regiões, e está presente na maioria dos países. Mesmo nas regiões livres da doença, o risco da reintrodução de animais infectados e/ou a existência de hospedeiros silvestres da *B. abortus*, significam custos consideráveis nos programas de controle (MCGIVEN, 2013). *B. abortus* ocorre principalmente nos países em desenvolvimento como a África, América do Sul, Oriente Médio e Ásia (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

No Brasil, a doença é endêmica, e a sua ocorrência registrada em todo o território brasileiro (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Em 1975, foi feito um levantamento da situação da brucelose bovina no Brasil, tendo sido estimada a porcentagem de animais soropositivos em 4% na Região Sul, 7,5% na Região Sudeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 2,5% na Região Nordeste e 4,1% na Região Norte (BRASIL, 1977). Recentemente, o MAPA encomendou novo estudo da situação da doença, cuja prevalência em 14 estados brasileiros estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Situação epidemiológica da brucelose bovina em 14 estados brasileiros.

Estado	Prevalência %	Número de amostrados animais	Referência
Bahia	0,66	10.816	(ALVES et al., 2009)
Distrito Federal	0,16	2.019	(GONÇALVES et al., 2009a)
Espírito Santo	3,5	5.351	(AZEVEDO et al., 2009)
Goiás	1,4	10.744	(ROCHA et al., 2009)
Minas Gerais	1,1	20.643	(GONÇALVESb et al., 2009b)
Mato Grosso do Sul	7,6	9.466	(CHATE et al., 2009)
Mato Grosso	10,2	13.684	(NEGREIROS et al., 2009)
Paraná	1,7	14.857	(DIAS et al., 2009)
Rio de Janeiro	4,1	8.239	(KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009)
Rondônia	6,2	9.717	(VILLAR et al., 2009)
Rio Grande do Sul	1,0	16.072	(MARVULO et al., 2009)
Santa Catarina	0,06	7.801	(SIKUSAWA et al., 2009)
Sergipe	3,4	4.757	(SILVA et al., 2009)
São Paulo	3,8	8.761	(DIAS et al., 2009)
Tocantins	4,4	20.908	(OGATA et al., 2009)

No Estado de Minas Gerais, Gonçalves et al. (2009b) constataram que a prevalência de animais soropositivos para brucelose foi de 1,1%, e as regiões com maior ocorrência foram o Triângulo Mineiro com 1,7% e a região Central com 1,5%.

Para a brucelose bovina, as estratégias de combate são bastante conhecidas e podem ser resumidas em vacinação, certificação de propriedades livres por rotinas de testes indiretos, controle da movimentação de animais e sistema de vigilância específico. Os resultados alcançados pelos países variam muito, segundo os programas de controle, pois há registros de sucessos e fracassos citados na literatura especializada. Os programas bem sucedidos atingem bons índices de controle, com redução significativa da prevalência, depois de aproximadamente 20 anos de trabalho (POESTER et al., 2009).

2.3 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA

A principal via de infecção de *B. abortus* no bovino é a oral, e ocasionalmente por via aerógena. Grande quantidade de *B. abortus* é eliminada durante o abortamento e parto de animais infectados. Estes animais continuam eliminando a bactéria nas secreções uterinas por aproximadamente 30 dias (CRAWFORD et al., 1990). A difusão da doença é favorecida pelo hábito dos bovinos de cheirar e lambem animais recém-nascidos, ou mesmo fetos abortados (NICOLETTI, 1980; SILVA et al., 2005).

Entre os ruminantes, a principal fonte de transmissão é o alimento e a água contaminados, mas ocorre também pelo contato direto com o animal infectado ou sêmen contaminado (ACHA; SZYFRES, 2003). A infecção por *B. abortus* se dá pelo contato do agente com qualquer mucosa do animal susceptível, principalmente a mucosa oral (THOEN et al., 1993). Após a invasão do organismo, há um curto período de bacteremia, e as bactérias vão se alojar em diversos órgãos, principalmente do sistema linfóide (EAGLESOME; GARCIA, 1992; THOEN et al., 1993).

A capacidade de sobreviver dentro de macrófagos facilita a disseminação e a permanência de *B. abortus* no organismo. Desta forma, *B. abortus* multiplica-se dentro da célula sem alterar suas funções básicas com a capacidade de persistir por período prolongado, muitas vezes de forma silenciosa, sem desencadear resposta imune inata ou adquirida efetora no hospedeiro (GORVEL; MORENO, 2002).

A transmissão de *Brucella* spp. pela inseminação artificial possui papel mais importante na disseminação da doença, de machos infectados para fêmeas suscetíveis, do que a monta natural. *Brucella* está presente no fluido seminal e é transmitida à fêmea pela 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).

Os bovinos e bubalinos são os hospedeiros preferências de *B. abortus*, e a manifestação clínica nestas espécies é caracterizada por abortamento de fetos prematuros, ocorrendo geralmente no sétimo mês de gestação. O abortamento

quase sempre acontece na primeira gestação após a infecção e, em decorrência do desenvolvimento da imunidade celular, torna-se menos frequente na segunda gestação e muito raro nas subsequentes. Após o primeiro abortamento, são mais frequentes a presença de natimortos, o nascimento de bezerros fracos e retenção de placenta (BRASIL, 2006).

Na brucelose, o período de incubação pode ser de poucas semanas e até mesmo de meses ou anos. Considerando-se o momento em que ocorre a infecção, o período de incubação é inversamente proporcional ao tempo de gestação, ou seja, quanto mais adiantada a gestação, menor será o período de incubação (BRASIL, 2006).

2.4 BRUCELOSE EM TOUROS

O papel do touro na epidemiologia da brucelose é pouco descrito, visto que a maioria das pesquisas está concentrada em fêmeas bovinas. Todavia, os touros possuem importância na transmissão da doença, pois eliminam a bactéria pelo sêmen (OMS, 1986). Na monta natural, com touros infectados, a contaminação venérea é em torno de 2%. Em contraste, na inseminação artificial, a transmissão ocorre com maior frequência se o doador estiver infectado (LANGENEGGER, 1992; POESTER, 1997).

Na monta natural, o sêmen é depositado na vagina, onde existem defesas inespecíficas (muco vaginal, pH vaginal, células fagocíticas, epitélio) que podem eliminar o agente, dificultando o processo de infecção. Entretanto, na inseminação artificial, o sêmen é depositado diretamente no útero, permitindo infecção da fêmea com pequena quantidade do agente, representando importante via de transmissão e eficiente forma de difusão da doença nos plantéis (LANGENEGGER, 1993; BRASIL, 2006).

Países como Nova Zelândia, Austrália e Irlanda permitem a distribuição de sêmen na forma líquida, utilizando sêmen a fresco na inseminação artificial. Tal prática tem como vantagem a utilização de um baixo número de espermatozoides por inseminação, alta utilização de um único touro e baixo custo, mas apresenta a desvantagem de ter uma vida útil do ejaculado menor em relação ao sêmen congelado (AL NAIB et al., 2011). Outra técnica bastante utilizada é a mistura de sêmen de diferentes touros, chamado de sêmen heterospérmico (AZMAL et al.,

2004). Esta mistura do sêmen de diferentes machos tem sido demonstrada como muito vantajosa em diferentes espécies (STEWART et al., 1974). Essas técnicas, porém, quando utilizadas em fazendas que não realizam o controle sanitário adequado do rebanho, favorecem a disseminação de patógenos transmitidos pelo sêmen, notadamente no caso da brucelose.

Nos touros, o gênero *Brucella* pode localizar-se nos testículos e nas glândulas genitais anexas e, quando a enfermidade se manifesta clinicamente, os testículos podem aumentar de volume, com diminuição da libido e infertilidade (ACHA e SZYFRES, 2003). Observa-se artrite no tarso e metatarso ou poliartrite, bursites, abscessos cutâneos, e manifestações nos órgãos reprodutivos como orquite e epididimite, com aumento uni ou bilateral dos testículos (GRASSO; CARDOSO 1998; CAMPANÃ et al., 2003).

Brucella spp. se instala principalmente nos órgãos acessórios do sistema reprodutivo, particularmente na vesícula seminal e próstata, podendo ser eliminada pelo sêmen (SUTHERLAND, 1980). No aparelho reprodutivo masculino, a bactéria pode levar à reação inflamatória, do tipo necrosante, nas vesículas seminais, testículos e epidídimos, provocando subfertilidade ou infertilidade. Como sequela pode determinar atrofia do testículo e órgãos acessórios (OMS, 1986).

Touros com brucelose podem apresentar intensa reação inflamatória nos testículos, levando à degeneração dos túbulos seminíferos, epididimite com infiltração de linfócitos, neutrófilos e células gigantes com espermatozóides mortos, vesiculite com inflamação unilateral ou bilateral das vesículas seminais e glândulas aumentadas e fibrosadas (HAFEZ; HAFEZ 2004; RADOSTITS; GAY; BLOOD; HINCHCLIFF, 2007).

A infecção por bactérias do gênero *Brucella* em machos induz resposta imune do tipo celular e humoral. A resposta humoral frente à infecção natural pelo micro-organismo se notabiliza pela elevação quase simultânea dos níveis de imunoglobulinas (Ig) das classes IgM e IgG. Nestes animais, as Ig da classe IgM tendem ao desaparecimento algumas semanas após a infecção. Ao contrário, a classe IgG, se estabelece e persiste nos animais cronicamente infectados (SUTHERLAND, 1980).

A localização preferencial da bactéria nas glândulas acessórias e testículos pode induzir a presença de baixos títulos ou mesmo a ausência de títulos séricos de imunoglobulinas em touros infectados. Isso pode dificultar o diagnóstico da

brucelose nos machos bovinos, com base em métodos sorológicos convencionais (AGUIAR et al., 2001; RADOSTITS et al., 2007).

Campos et al. (2003) estudaram a prevalência de reprodutores bovinos soro-reagentes para *B. abortus* na microrregião de Goiânia. Dos 139 reprodutores avaliados, dois foram suspeitos na prova de soroaglutinação rápida em placa. Nessas duas amostras foi realizada a prova de AAT e ambos foram negativos. Um dos touros suspeitos era oriundo de uma propriedade com histórico de abortamento.

2.5 COLETA E PROCESSAMENTO DE SÊMEN BOVINO (Código Sanitário dos Animais Terrestres, OIE 2013a)

A Instrução Normativa SDA Nº 8, de 10 de março de 2006, estabelece que o sêmen precisa ser coletado e processado de acordo com o estabelecido no Código Sanitário dos Animais Terrestres da World Organisation Animal Health (OIE, 2013a).

Os objetivos desse código sanitário para a produção de sêmen são: manter a saúde dos animais de centros de inseminação artificial em nível que permita a distribuição internacional de sêmen com menor risco de infecção de outros animais, ou humanos, com patógenos transmitidos por essa fonte; garantir que esse sêmen seja higienicamente coletado, processado e armazenado.

Os touros devem estar em estado satisfatório de limpeza, devem ser mantidos em condições de higiene, seja no pasto ou no estábulo. Quando da coleta de sêmen, as instalações devem ser de fácil limpeza e desinfecção. O animal manequim deve ter exames negativos das mesmas doenças exigidas para os touros e deve ser cuidadosamente limpo antes de cada sessão de coleta. A vagina artificial deve ser completamente limpa após cada coleta. Os tubos coletores devem ser estéreis ou descartáveis, e devem ser mantidos lacrados para prevenir a exposição ao ambiente, enquanto não estiverem sendo utilizados.

Após a coleta de sêmen, o tubo deve ser mantido anexado ao cone e dentro da capa protetora, até ser removido da sala de coleta para transferência para o laboratório.

Para manipulação e preparo das amostras de sêmen em laboratório são necessários recipientes esterilizados e os diluentes devem ser preparados com água estéril. Em cada mL de sêmen congelado deve ser incluída uma mistura de antibióticos com atividade bactericida no mínimo equivalente às seguintes misturas:

gentamicina (250 µg), tilosina (50 µg), lincomicina-espectinomicina (150/300 µg) ou penicilina (500 UI), estreptomicina (500 µg).

Sempre que se utilizar leite, gema de ovo ou qualquer proteína de origem animal na preparação de diluente para sêmen, o produto deve estar livre de patógenos ou deve ser esterilizado. Recomenda-se o uso de ovos originários de plantéis SPF, quando possível. O exame dos ejaculados, a diluição e congelamento do sêmen devem ser realizados em laboratórios com padrões higiênicos determinados pelos médicos veterinários.

2.6 DIAGNÓSTICO

2.6.1 Diagnóstico direto

O teste de referência “gold standard” para o diagnóstico da brucelose é o isolamento bacteriano por meio da cultura bacteriana. No entanto, o isolamento das bactérias do gênero *Brucella* requer laboratório com nível 3 de biossegurança, recursos, tempo e técnicos altamente qualificados para a manipulação de isolados viáveis de brucela visando a identificação e biotipagem. O manuseio dessas bactérias vivas envolve riscos de contaminação, infecção e rigorosas regras de biossegurança. Métodos baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) estão se tornando úteis com resultados recentes promissores, com elevada sensibilidade e especificidade, relativa facilidade de execução e redução de custos, se tornando uma opção para o diagnóstico direto (YU; NIELSEN, 2010).

A utilização do diagnóstico direto muitas vezes ocorre nos animais triados pelo diagnóstico indireto e encaminhados para o sacrifício e, também, nos casos de abortamento, tendo papel importante na confirmação bacteriológica de foco da doença e caracterização da estirpe (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A detecção do DNA bacteriano pela PCR apresenta rapidez, significativa sensibilidade e especificidade e pode ser realizada em amostras clínicas contaminadas. Tem também a vantagem de detectar pequenas quantidades de DNA dos micro-organismos em diversos substratos, sem a necessidade de estarem viáveis, ao contrário da cultura bacteriológica (ERLICH et al., 1991; FEKETE et al., 1992). As amostras de DNA para a PCR podem ser extraídas de tecidos de

neonatos ou fetos abortados, do leite, do sangue total, do soro sanguíneo, do sêmen e de alimentos como o queijo (ROMERO; LOPEZ- GONI, 1999).

Na PCR são utilizados genes alvos, como os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenhados a partir de uma sequência codificante de uma proteína de 31 KDa (B4/B5) de *B. abortus* (BAILY et al., 1992). Bricker e Halling (1994) descreveram uma técnica de PCR chamada de AMOS PCR, que identifica e diferencia a maioria das espécies de *Brucella* e biotipos encontrados nos Estados Unidos. Essa técnica é baseada nas observações de que o elemento genético repetitivo IS 711 é único no gênero *Brucella* e, para a maioria das espécies, pelo menos uma cópia deste elemento ocorre num “lôcus” cromossomal espécie ou biótipo-específico único. Ewalt e Bricker (2000) validaram a AMOS PCR para a diferenciação de *B. abortus* em estirpe de campo ou vacinal.

Os “primers” B4 e B5 (BAILY et al., 1992) apesar de sua ampla utilização e elevada sensibilidade diagnóstica, foram capazes de amplificar DNA provenientes da bactéria *Ochrobactrum* spp., o que pode gerar resultados falso-positivos (CASANAS et al., 2001). Os gêneros *Ochrobactrum* e *Brucella* apresentam elevada similaridade de sequências gênicas (VELASCO et al., 1998). Na literatura consultada foi encontrada referência de *Ochrobactrum* sp. provocando infecções oportunistas em humanos. Scholz et al. (2008b) desenvolveram um PCR multiplex capaz de diferenciar estirpes de *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* e *Brucella* spp. provenientes de cultura pura.

A utilização de métodos moleculares revelou a existência de potenciais novas espécies de *Brucella*. Estes micro-organismos foram isolados de humanos e de animais variados, incluindo novos hospedeiros (SCHOLZ; VERGNAUD, 2013). A PCR tem se mostrado como boa opção para o diagnóstico da brucelose. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados com isolados de campo para empregar a reação como uma ferramenta de diagnóstico (LEYLA et al., 2003).

Estudos com a utilização da PCR com amostras de sêmen bovino e ovino para o diagnóstico da brucelose. Tem revelado bons resultados na utilização da técnica (AMIN et al., 2001; MANTEROLA et al., 2003; VINODH et al., 2008; JUNQUEIRA JUNIOR et al., 2013). O diagnóstico da brucelose em amostras de sêmen ovino e bovino já foi descrito, apresentando maior sensibilidade em relação ao cultivo microbiológico (AMIN et al., 2001).

Amin et al. (2001) trabalharam com 65 touros positivos na sorologia para brucelose (*B. melitensis*) e Junqueira Júnior et al. (2013) trabalharam com 88 touros negativos na sorologia para brucelose (*B. abortus*). Esses pesquisadores conseguiram isolar DNA de *Brucella* spp., usando a técnica de PCR em amostras de sêmen de alguns desses animais.

2.6.2 Diagnóstico indireto

Os métodos indiretos ou sorológicos para diagnóstico da brucelose visam demonstrar a presença de anticorpos específicos contra *Brucella* spp., no soro sanguíneo e nos fluídos corporais. Esses métodos são os mais utilizados quando se trabalha com rebanhos, pois são rápidos, de fácil execução e baixo custo. Além disso, apresentam boa sensibilidade e especificidade e são a base na busca do controle e erradicação da brucelose, por permitirem tanto o monitoramento de propriedades como de regiões inteiras (BRASIL, 2006).

Existem vários testes sorológicos para o diagnóstico da brucelose bovina. Assim, cada país deve escolher os que melhor se adaptem à estratégia de combate à doença. Os principais testes são: Soroaglutinação Lenta em Tubos (SLT), Soroaglutinação Rápida em Placa (SRP), Teste do Antígeno Acidificado Tamponado ou Teste Rosa Bengala (AAT ou TRB), Reação de Fixação de Complemento (FC), Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME), Testes Imunoenzimáticos (ELISA), Teste da Polarização da Fluorescência, Teste do Anel em Leite (TAL) e Sêmen Plasma Aglutinação (SPA) (BRASIL, 2006; RADOSTITIS et al., 2007; MATHIAS et al., 2010; OIE, 2013b). São aceitos pela OIE a reação de FC para confirmação diagnóstica e o AAT como teste de triagem, como referência para o comércio internacional de animais (OIE, 2013a).

Os testes oficiais do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) do Brasil são o AAT, TAL, 2-ME e FC, sendo os dois primeiros de triagem e os dois últimos confirmatórios. Os exames devem ser realizados em fêmeas de idade igual ou superior a 24 meses, desde que vacinadas entre 3 e 8 meses com a B19; nos machos e fêmeas não vacinadas a partir dos 8 meses de idade. Excluem-se desses, os animais castrados (BRASIL, 2006). Embora a legislação não exija exame sorológico de animais castrados, esses animais, se estiverem infectados, apesar de não disseminarem a doença através da reprodução,

poderão se tornar uma fonte de infecção ao eliminarem a bactéria pela urina, contaminando assim o ambiente.

Os testes sorológicos não apresentam sensibilidade e especificidade absoluta, havendo a necessidade de associação entre técnicas em busca de melhores resultados na detecção de animais soropositivos, sobretudo na fase inicial da infecção e em infecções crônicas (COSTA, 2001; OLIVEIRA, 2003). Nesses testes podem ocorrer reações inespecíficas decorrentes do compartilhamento de epítomos com outros gêneros bacterianos ou até mesmo envolvendo imunoglobulinas da classe IgM, provenientes da vacinação contra brucelose, gerando resultados falso-positivos (COSTA, 2001; MINHARRO, 2009).

Há várias evidências de reações imunológicas cruzadas entre as cepas lisas de brucela com outros micro-organismos. Já foi descrito que as bactérias *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Francisella tularensis* e *Vibrio cholerae* podem reagir nos testes sorológicos na detecção da brucelose bovina (NIELSEN et al., 2004). Naves et al. (2012) demonstraram que bovinos recém vacinados para leptospirose podem reagir positivamente nos testes sorológicos oficiais de brucelose, por um período de até 96 dias pós-vacinação.

2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE

A brucelose, por causar prejuízos à pecuária e ser transmitida dos animais aos humanos, vem sendo, desde o início do século XX, alvo de medidas de controle e erradicação na população animal, em vários países (POESTER et al., 2009). De acordo com as necessidades do controle da doença, a implementação de programas bem sucedidos de erradicação tem sido necessária. Porém esses programas muitas vezes são de alto custo, de difícil execução e de médio a longo prazo. A maior dificuldade é em relação à política de gestão nas propriedades com criação extensiva, deslocamento dos animais e existência de várias espécies de animais (GODFROID et al., 2011).

As estratégias de controle da brucelose têm como base a redução constante do número de focos da doença, além do controle do trânsito de animais de reprodução e a certificação de propriedades livres da enfermidade com base no diagnóstico, sacrifício dos animais positivos e a adoção de medidas ambientais (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

As vacinas atenuadas são utilizadas nos programas de controle da brucelose, com o propósito de reduzir a prevalência da doença a baixos custos. Duas delas, recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) são empregadas em programas de controle da brucelose em vários países, inclusive no Brasil: a amostra B19 e a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes amostra RB51 (BRASIL, 2006; OIE, 2013b).

A vacina B19 é uma amostra lisa de *B. abortus* e é utilizada somente em bezerras de 3 a 8 meses de idade em dose única via subcutânea (BRASIL, 2006). A vacinação de fêmeas com *B. abortus* cepa 19 tem sido utilizada no mundo inteiro para prevenir a doença em bovinos, apresentando níveis variáveis de proteção, dependendo da prevalência da doença (NICOLETTI, 1990).

Diante da necessidade de obter uma vacina que não provocasse a indução de anticorpos vacinais, que interferissem nos exames sorológicos, foi desenvolvida na década de 90, a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes, a RB51. Esta amostra, praticamente isenta de cadeia O, foi obtida por passagens sucessivas da cepa 2308 de *B. abortus* em meios de cultura contendo rifampicina, originando uma mutante permanentemente rugosa, reduzindo assim, a virulência (POESTER et al., 2005; AMAKU et al., 2009).

A cepa vacinal RB51 possui características de proteção semelhantes à B19. Porém, por ser rugosa, não induz a formação de anticorpos reagentes nos testes sorológicos de rotina, não interferindo, portanto, no diagnóstico sorológico da brucelose por testes convencionais (POESTER, 2006; LAGE et al., 2008). Em alguns países, como México, Chile e Estados Unidos, esta vacina é empregada oficialmente nos programas de controle de brucelose. Porém, no Brasil, a utilização da RB51 está praticamente restrita à vacinação estratégica de fêmeas adultas, que não foram vacinadas quando bezerras (3 a 8 meses de idade), com a vacina B19 (BRASIL, 2006).

Com a redução da prevalência da brucelose, a vacinação em massa se torna desnecessária e as estratégias de controle são alteradas para medidas de erradicação, cujo objetivo consiste na eliminação de todos os focos. A identificação destes focos tem como base: (1) a detecção de anticorpos no leite, (2) a aplicação de testes sorológicos em animais de reprodução sob trânsito e animais de reprodução descartados em abatedouros, (3) busca por produtores informais, (4) a investigação de propriedades que apresentam relação epidemiológica com focos, (5)

a investigação de abortamentos em bovinos e, principalmente, em casos de brucelose humana (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008).

2.8 VACINA B19

Na década de 1930, Dr. John Buck pesquisando sobre a imunidade gerada com vacinação de fêmeas contra *B. abortus*, conhecida na época como *Bacterium abortus*, isolou um micro-organismo a partir do leite de uma vaca de raça jérsei infectada. Ao deixar a cultura em temperatura ambiente por aproximadamente um ano e meio, descobriu que a cultura tinha se tornado atenuada e estável, capaz de conferir imunidade duradoura e não provocava mais doença nos bovinos. Essa amostra foi chamada de 19, pois era a 19ª cultura utilizada na pesquisa (BUCK, 1930).

A vacina B19 é produzida segundo rígidas normas internacionais com estirpe viva (que possui maior capacidade em ativar macrófagos) de *B. abortus* cepa B19 (PAULIN, 2003). Fêmeas vacinadas com a vacina B19 na idade correta estarão protegidas por cerca de sete anos após a vacinação (BATHKE, 1988).

A cepa B19 é uma vacina atenuada, que apresenta morfologia colonial lisa e incapacidade de alterar a virulência por passagens sucessivas em animais e não é isolada na presença de eritritol (ALTON et al., 1988). O metabolismo do eritritol é a diferença mais conhecida e mais importante entre a cepa B19 e as demais cepas virulentas de *B. abortus* (SANGARI et al., 2000).

O eritritol é um poli-álcool composto de quatro carbonos que serve como fonte de energia para *B. abortus* (SPERRY; ROBERTSON, 1975). E está presente nos tecidos osteoarticulares, mamários e órgãos reprodutores de fêmeas e machos, atingindo grandes concentrações no útero gravídico, principalmente nos líquidos fetais, nos placentomas e no tecido córion-alantoideano (CARTER; CHENGAPPA, 1991).

O uso preferencial do eritritol é característica do gênero *Brucella*. Foi reportada a ausência, na B19, de D-eritrose-1-fosfato de desidrogenase, uma enzima crítica no mecanismo catabólico do eritritol, causando o acúmulo do produto tóxico intermediário a D-eritrose 1-fosfato e uma depleção dos níveis de ATP, inibindo a multiplicação bacteriana (SANGARI et al., 2000).

Na cepa vacinal, o gene *ery*, de 702 pares de base (pb), apresenta-se deletado e esta seria a explicação para a sensibilidade ao eritritol (CORBEL, 1997). Porém, algumas estirpes de B19 são tolerantes ao eritritol e acredita-se que esta seja uma das causas do desenvolvimento de infecções persistentes pela mesma, e, subsequente abortamento (SANGARI et al., 1998).

A vacina B19 é indicada para fêmeas bovinas até 8 meses idade e pode ser prejudicial para machos e outras espécies animais incluindo humanos, devido à virulência residual. Os machos vacinados permanecem com títulos de anticorpos vacinais por toda vida, além de haver a possibilidade de desenvolverem vesiculite, prostatite e, ocasionalmente, orquite. Portanto, não é recomendado à vacinação de machos (OMS, 1986; MAPA, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo nº 088/12 (Anexo 1).

3.2 AMOSTRAS DE SÊMEN E SORO SANGUÍNEO

Para a determinação do tamanho da amostra (n), admitiu-se uma prevalência esperada de 1% (GONÇALVES et al., 2009b), nível de confiança de 95% e variação de 2%. A fórmula utilizada, segundo Thrusfield (2004), foi:

$$n = \frac{1,96^2 P_{\text{esp}} (1 - P_{\text{esp}})}{d^2}$$

Nesta fórmula:

n = tamanho da amostra baseado em uma população infinita

P_{esp} = prevalência esperada

d = precisão absoluta desejada

Substituindo os valores nas fórmulas:

$$n = \frac{1,96^2 0,01 (1 - 0,01)}{0,02^2}$$

n = 95 amostras

Foram analisadas 100 amostras de sêmen *in natura* e soro sanguíneo de touros (*Bos taurus* e *Bos indicus*) provenientes de centrais de coleta de sêmen (64 amostras) e fazendas produtoras de touros para comercialização (36 amostras) do estado de Minas Gerais. Dados quanto à situação epidemiológica dos doadores de sêmen envolvidos neste estudo não foram coletados, já que os estabelecimentos obedecem rigorosamente os requisitos sanitários impostos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2006).

A análise do sêmen e soro sanguíneo foi realizada independente de raça, aptidão reprodutiva e idade do animal, embora todos os animais estivessem com mais de 20 meses de idade.

As amostras de sêmen *in natura* (1-2 mL) e soro sanguíneo (1 mL) foram fornecidas pelos estabelecimentos doadores devidamente identificadas. Essas amostras foram coletas por colaboradores das fazendas e centrais de coleta e processamento de sêmen de acordo com suas práticas rotineiras e seguindo as normas preconizadas no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Tanto as amostras de sêmen como as de soro sanguíneo foram transportadas em refrigeração (4 – 8 °C), em recipientes térmicos até o Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-FAMEV-UFU), Minas Gêrias, aonde foram registradas e devidamente acondicionadas (-20°C) para posterior análise sorológica e molecular.

Cada amostra foi identificada de acordo com o reprodutor e dados como identificação da central produtora, ou fazenda e número de registro dos touros foram mantidos em sigilo, pois este trabalho não apresenta conflito de interesse.

3.3 TESTES DE DIAGNÓSTICO

3.3.1 Diagnóstico sorológico

3.3.1.1 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) foi procedido e interpretados respeitando a metodologia contida no PNCEBT (BRASIL, 2006).

3.3.1.2 Sêmen Plasma Aglutinação (SPA)

Após descongelamento o sêmen total foi centrifugado e daí retirado o plasma seminal, que foi submetido à prova de AAT (PAULIN, 2003), sem o tratamento com azida sódica 1%.

3.3.2 Diagnóstico Molecular

3.3.2.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA de *B. abortus* foi utilizado o protocolo por lise enzimática com Proteinase K e purificação com fenol clorofórmio (adaptado de BIASE et al., 2002).

Inicialmente foram transferidos 400 µL de cada amostra de sêmen total para novos microtubos de plásticos (2,0 mL) e foram acrescentados a este material 800µL de tampão de extração [Tris-HCl 20mM pH 8.0, EDTA 100mM pH 8.0, NaCl 100mM; SDS 1% (p/v)]. As amostras foram agitadas em agitador de tubos do tipo vórtex e mantidas em banho-seco a 65°C por 60 minutos, sendo invertidas gentilmente a cada 10 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 15 µL de Proteinase k (10mg/mL) em cada amostra e deixadas por 60 minutos a 37°C em banho-maria.

Após, adicionou-se 400µL de acetato de potássio 5M à solução. Nesta etapa, as amostras foram mantidas no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 13.400 x g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi transferido para microtubos novos, sendo acrescentado a estes 700 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram misturadas por inversão durante três minutos, e posteriormente centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e em seguida foram acrescentados 700 uL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Em seguida, as soluções foram misturadas por inversão durante três minutos e centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 4°C. A fase superior foi transferida para microtubos novos, tomando-se cuidado para não tocar na interface orgânica. Acrescentou-se 1000µL de etanol absoluto gelado, que após ser misturada gentilmente foi mantida em freezer -20°C “overnight”.

Após a precipitação do DNA em etanol, os microtubos foram centrifugados a 13.400 x g por 15 minutos a 4°C. A fase líquida foi descartada e o “pellet” foi lavado com 1000µL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o “pellet” foi colocado para secar em temperatura ambiente $\pm 25^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 30µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH

8,0) por 24 horas a 4°C. Após esse período as amostras foram estocadas a – 20 °C até a sua utilização. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo Sybr safe gel stain 10x (Invitrogen) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) para verificação da qualidade e quantidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em fotodocumentador Alpha Digi Doc (Alpha Innotech).

3.3.2.2 Quantificação do DNA

Alíquotas do DNA obtido da extração do sêmen total foram diluídas 1:1000 em água ultrapura obtida em aparelho Milli-Q-Millipore. Em seguida, foram submetidas à leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, em espectrofotômetro BIOMATE 3S (Thermo Scientific). A quantificação foi realizada para avaliar a qualidade e a concentração de DNA (AZEVEDO et al., 2003).

3.3.2.3 DNA de *Brucella abortus*

O DNA puro da cepa padrão 2308 de *Brucella abortus* utilizado como controle positivo foi doado pelo Prof. Dr. Luis Antônio Mathias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (Preventiva), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus Jaboticabal, São Paulo.

3.3.2.4 Cepas vacinais B19 e RB51

As amostras de DNA de *B. abortus* cepa vacinal B19 (Brucelina-B19, laboratório Vallé) e RB51 (laboratório Schering-Plough) foram obtidas pela extração com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit da Promega, de acordo com recomendações do fabricante. Essas amostras foram utilizadas para controle positivo das respectivas cepas vacinais.

3.3.2.5 DNA de *Ochrobactrum intermedium* e *Ochrobactrum anthropi*

O DNA das bactérias *O. intermedium* e *O. anthropi*, foram cedidos pelo Dr. Renato de Lima Santos do Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Essas amostras foram utilizadas para demonstrar a especificidade dos “primers”.

3.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Com o DNA extraído das amostras foram realizadas as reações de PCR.

3.4.1 “Primers” utilizados para detecção de DNA de *B. abortus*

Para amplificação do fragmento de DNA de *B. abortus* foram utilizados os “primers” BAB e IS 711 (Tabela 2), descritos por Bricker e Halling (1994), que amplificam fragmentos de 498 pares de base (pb). Na Figura 1 está representado a hibridização dos “primers” BAB e IS711 no genoma da *B. abortus* biovars 1,2 e 4.

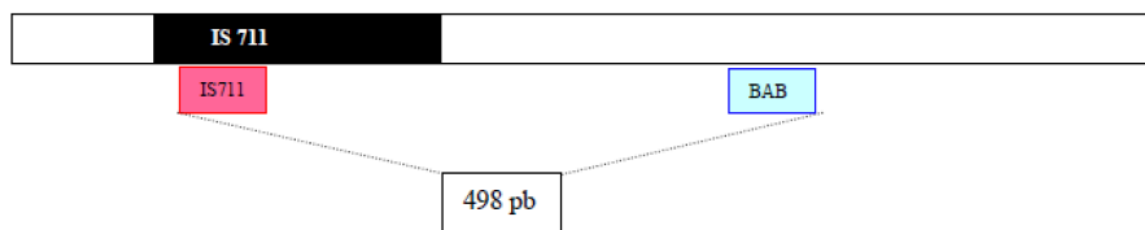
Todos os “primers” utilizados no experimento foram sintetizados pelo laboratório Invitrogen™.

Tabela 2 - Sequência dos “primers” utilizados na PCR para identificação de *B. abortus*.

“Primers”	Sequência
BAB	5' GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC 3'
IS 711	5' TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT 3'

FONTE: BRICKER; HALLING (1994).

Figura 1 – Representação da hibridização dos “primers” específicos para *B. abortus* biovars 1, 2 e 4 e tamanho do fragmento amplificado.



FONTE: MIYASHIRO (2004).

O procedimento de amplificação foi realizado em um volume final de 20 µL. Cada reação contendo 2 µL de tampão de reação 10X (1X); 0,8 µL de MgCl₂ (1.5 mM); 0,4 µL de dNTPs (10mM); 1 µL dos *primers* BAB/IS711 (5 pmol/µL); 0,2 µL de *Taq* DNA-polimerase (5 U/µL); 6 µL (50ng/ µL) do DNA total a ser testado; 9,6 µL de água MilliQ. Foi utilizado como controle negativo da reação um mix sem DNA.

O ciclo de temperaturas utilizado no aparelho termociclador Select Cycler (BioProducts) para amplificação do fragmento de DNA de *B. abortus* foi realizado conforme descrição de Miyashiro et al. (2007) (Tabela 3).

Tabela 3 – Ciclo de temperaturas para amplificação do fragmento de DNA de *B. abortus*, para 40 ciclos.

Etapas da PCR	Tempo	Temperatura
Desnaturação inicial	5 minutos	94°C
Desnaturação do DNA	60 segundos	94°C
Hibridação	60 segundos	55°C
Extensão da cadeia de DNA	45 segundos	72°C
Extensão final	10 minutos	72°C

FONTE: MIYASHIRO et al. (2007).

3.4.2 “Primers” utilizados para diferenciação da cepa de *B. abortus* em campo ou vacinal (B19)

Para diferenciação da origem da cepa foi realizada a técnica de PCR a partir do DNA extraído das amostras positivas na PCR para *B. abortus*, utilizando-se os “primers” *eri* 1 e *eri* 2 descritos por Sangari, García-Lobo e Aguero (1994). Foi empregado também o “primer” *eri* 3 , descrito por Bricker e Halling (1995) - junto com o *eri* 1 em uma reação de hemi-nested PCR para aumentar a sensibilidade da reação, caso a primeira não permitisse a visualização de banda para diferenciar entre cepa de campo e cepa vacinal B-19. Os “primers” estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequência dos *primers* utilizados para diferenciação da cepa de *B. abortus* de campo ou vacinal (B19).

“Primers”	Sequência
<i>eri</i> 1	5'TTG GCG GCA AGT CCG TCG GT 3'
<i>eri</i> 2	5'CCC AGA AGC GAG ACG AAA CG 3'
<i>eri</i> 3	5'CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA 3'

FONTE: SANGARI, GARCÍA-LOBO; AGUERO (1994); BRICKER; HALLING (1995).

O procedimento de amplificação foi realizado em um volume final de 20 µL. Cada reação contendo 2 µL de tampão de reação 10X (1X); 0,8 µL de MgCl₂ (1.5 mM); 0,4 µL de dNTPs (10mM); 1 µL dos “primers” *eri 1/eri 2* (5 pmol/µL); 0,2 µL de *Taq* DNA-polimerase (5 U/µL); 6 µL do DNA total a ser testado (50 µg/µL); 9,6 µL de água MilliQ.

Na hemi-nested PCR foi utilizado o mesmo protocolo de amplificação com a substituição dos “primers” por *eri 1/eri 3* a 10pmol, e o DNA molde era o da amplificação anterior. O volume final da solução para a amplificação foi de 20 µL, sendo 6 µL de amostra e 14 µL de mix, nas duas reações.

O ciclo de temperatura utilizado no aparelho termociclador Select Cycler (BioProducts) para amplificação do fragmento de DNA de *B. abortus*, na diferenciação da cepa de campo e cepa vacinal B19 foi realizado conforme descrição de Miyashiro et al. (2007), (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Ciclo de temperaturas para amplificação do fragmento de DNA de *B. abortus*, na diferenciação de cepa de campo e cepa vacinal (B19), utilizando “primers” *eri 1/eri 2*, para 35 ciclos.

Etapas da PCR	Tempo	Temperatura °C
Desnaturação inicial	10 minutos	94°C
Desnaturação do DNA	60 segundos	94°C
Hibridação	120 segundos	57°C
Extensão da cadeia de DNA	120 segundos	72°C
Extensão final	10 minutos	72°C

FONTE: MIYASHIRO et al. (2007).

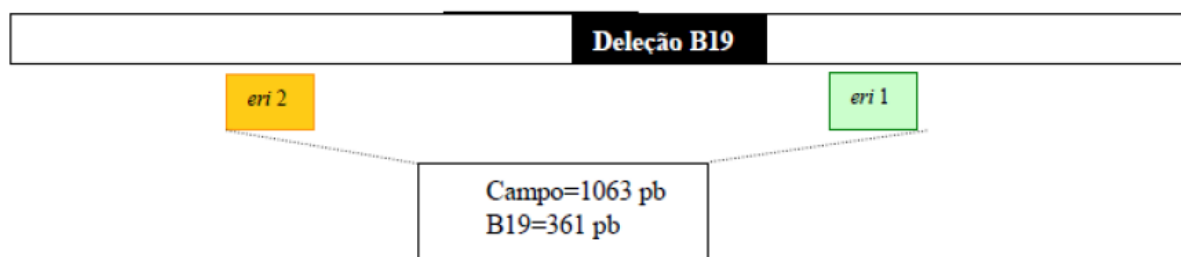
Tabela 6 - Ciclo de temperaturas para amplificação do fragmento de DNA de *B. abortus*, na diferenciação de cepa de campo e cepa vacinal (B19), utilizando “primers” *eri 1/eri 3* hemi-nested PCR, para 30 ciclos.

Etapas da PCR	Tempo	Temperatura °C
Desnaturação inicial	10 minutos	94°C
Desnaturação do DNA	60 segundos	94°C
Hibridação	60 segundos	59°C
Extensão da cadeia de DNA	45 segundos	72°C
Extensão final	10 minutos	72°C

FONTE: MIYASHIRO et al. (2007).

Está representando na Figura 2 a hibridização dos “primers” *eri 1* e *eri 2* com o genoma de cepa do gênero *Brucella*, destacando-se a deleção genética de 702 pares de base (pb) existentes na cepa vacinal B19, e o tamanho dos produtos amplificados.

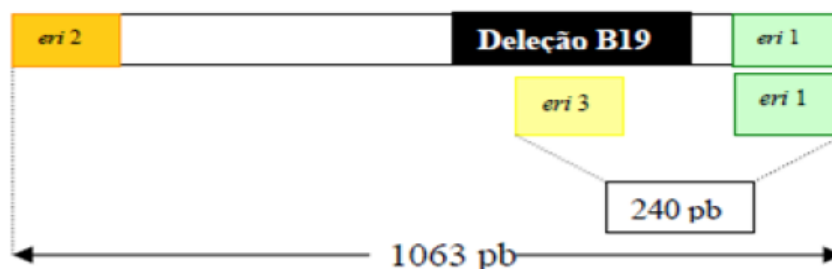
Figura 2 – Representação da hibridização dos “primers” *eri 1* e *eri 2* no genoma do gênero *Brucella*, destacando-se a deleção genética existente na B19, e o tamanho dos produtos amplificados.



FONTE: MIYASHIRO (2004).

Nas amostras que não revelaram banda na reação com *eri 1* e *eri 2*, foi realizada a reação de hemi-nested PCR. Para as amostras de *Brucella* spp. exceto a cepa vacinal B19, na hemi-nested PCR, a fita de DNA alvo é o fragmento de 1063 pb amplificado na primeira PCR, cujo sinal não foi possível de ser visualizado. Na Figura 3 está representado a hibridização dos “primers” da hemi-nested PCR para cepas de *Brucella* spp., exceto a B19 (MIYASHIRO, 2004).

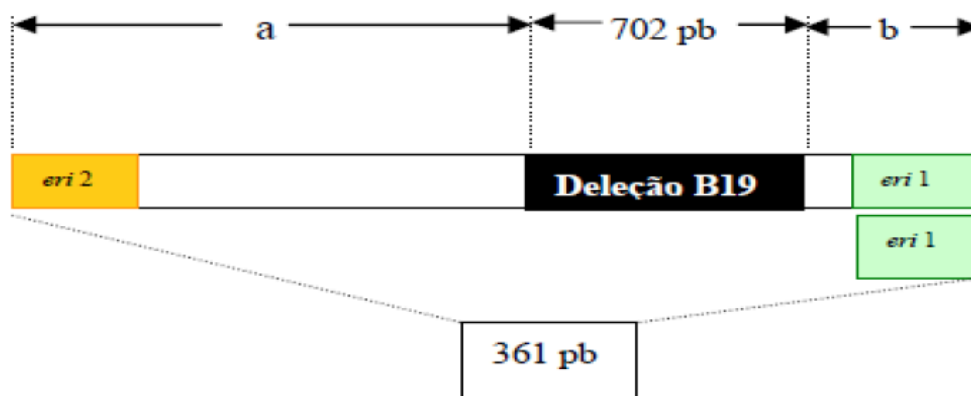
Figura 3 – Representação da hibridização dos “primers” utilizados na hemi-nested PCR nas cepas de *Brucella* spp., exceto cepa vacinal B19, e tamanho do produto amplificado.



FONTE: MIYASHIRO (2004).

Para as amostras vacinais B19, na hemi-nested PCR, a fita de DNA alvo é o fragmento de 361 pb amplificado na primeira PCR. Devido à deleção genética da B19, o “primer” *eri 3* não se hibridiza em nenhum lócus da fita alvo. Porém, como esta fita tem uma pequena extensão, e o “primer” *eri 1* se hibridiza à fita, a *Taq* DNA polimerase consegue estender todo o fragmento, podendo revelar o fragmento não visualizado na primeira reação, como demonstrado na Figura 4 (MIYASHIRO, 2004).

Figura – 4 Representação da hibridização do “primer” *eri 1* na hemi-nested PCR em cepa vacinal B19, e o tamanho do produto amplificado.



$$a + b = 361 \text{ pb}$$

FONTE: MIYASHIRO (2004).

3.5 ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

A visualização do produto amplificado (8µL) + 2 µL de tampão de amostra (TBE 10X 50%, Glicerol 50% e Azul de Bromofenol 0,1%) foi realizada pela técnica de eletroforese em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,04 M Tris-borato e 1 mM EDTA, pH 8,0), em gel de agarose 1,0 % (p/v). Foi adicionado o corante Sybr® Safe Gel Stain 10.000X – Invitrogen, 0,5uL/10mL. O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm e a visualização das bandas realizada em transluminador ultravioleta (SAMBROOK et al., 1989).

As bandas que apareceram foram comparadas com padrão de peso molecular (Invitrogen™), com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases dispostos

no gel juntamente com as amostras analisadas. Os géis foram analisados sob luz UV em fotodocumentor Alpha Digi Doc (Alpha Innotech).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise descritiva dos resultados, com cálculo de percentual simples (SIEGEL; CASTELLAN JUNIOR, 2006).

4 RESULTADOS

Das 100 amostras de soro sanguíneo, nenhuma foi reagente na soroaglutinação para o AAT. Das 100 amostras de plasma seminal, 11 (11%) foram reagentes.

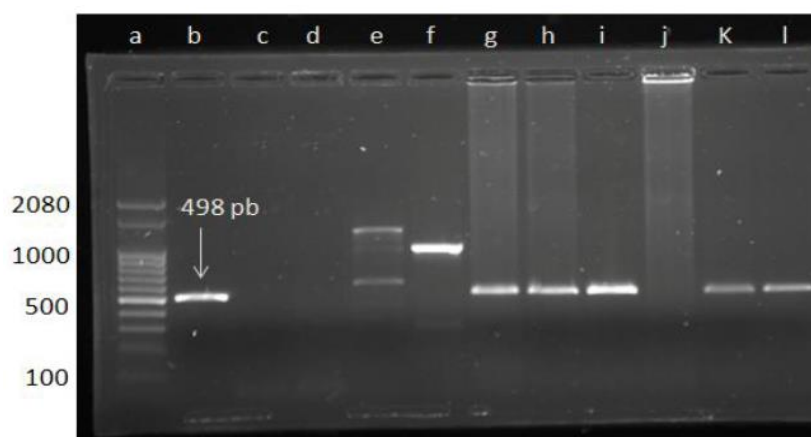
Das 68 amostras de sêmen positivas na PCR oito amostras de plasma seminal também estavam positivas na SPA. Das 68 amostras positivas para *B. abortus*, 100% das amostras estavam positivas para a cepa de vacinal B19 (Tabela 7).

Das 32 amostras negativas tanto no AAT como na PCR, somente três foram positivas para o SPA.

Nenhuma das amostras foi positiva nos três testes.

Na Figura 5 estão os resultados da comprovação da espécie especificidade dos “primers” descritos por Bricker e Halling (1994), com a amplificação de 498 pb de *B. abortus* cepa 2308. Nessa figura também aparecem bandas inespecíficas quando se utiliza DNA das bactérias *Ochrobactrum intermedium* e *Ochrobactrum anthropi*. Demonstrando também cinco touros positivos e um negativo.

Figura 5 – Comprovação da especificidade dos “primers” BAB/IS711, Uberlândia, 2014.



(a): marcador de tamanho de fragmento de DNA (100 pb); (b): *B. abortus* cepa 2308; (c,d): controle negativo com água; (e): DNA de *Ochrobactrum intermedium*; (f): DNA de *Ochrobactrum anthropi*; (g,h,i,k,l): produto de PCR originado de sêmen total; (j): touro negativo.

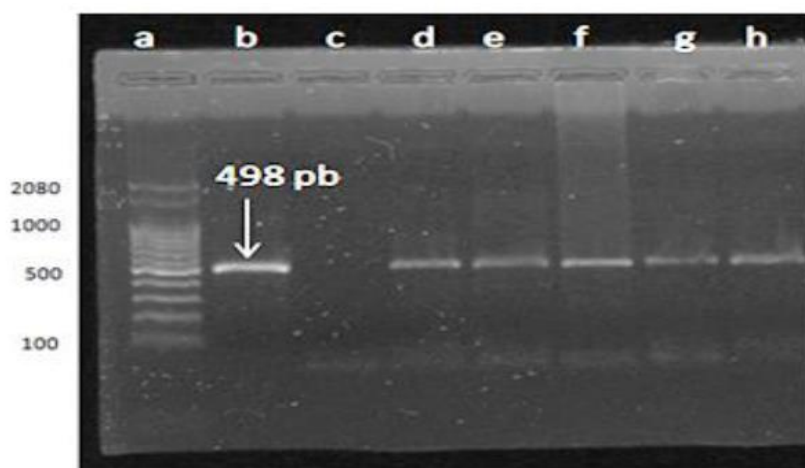
FONTE: LOURENCETTI (2014).

Na Figura 6 estão os resultados da comprovação da espécie especificidade dos “primers” descritos por Bricker e Halling (1994), com a amplificação de 498 pb em todas as espécies do gênero *Brucella* testadas como controle positivo (*B. abortus* cepa 2308, *B. abortus* cepa B19 e *B. abortus* cepa RB51). Demonstrando também a presença de três touros positivos.

Das 100 amostras de DNA extraídos de sêmen total quando testadas para a detecção de DNA de *B. abortus*, 68 amostras (68%) foram positivas.

Das 68 (100%) amostras positivas, 46 (67,6%) eram de CCPS e 22 (32,5%) eram de fazendas.

Figura 6 - Detecção de DNA de *B. abortus* em amostras de sêmen bovino, com os “primers” BAB e IS711, Uberlândia, 2014.

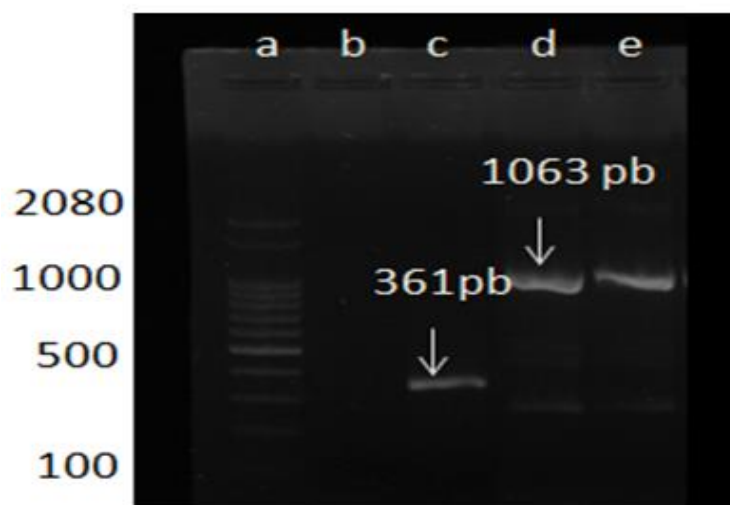


(a): marcador de tamanho de fragmento de DNA (100 pb); (b): *B. abortus* cepa 2308; (c): controle negativo; (d): *B. abortus* cepa vacinal B19; (e): *B. abortus* cepa vacinal RB51; (f,g,h): produto da PCR originado de sêmen total.

FONTE: LOURENCETTI, 2014.

A Figura 7 foi utilizado DNA de (*B. abortus* cepa 2308, *B. abortus* cepa B19 e *B. abortus* cepa RB51) para demonstrar a especificidade dos “primers” descritos por Sangari, García-Lobo e Aguero (1994) visando a diferenciação de cepas de campo e vacinal B19, que amplificaram 1063 pb quando DNA era de *B. abortus* cepa 2308 e *B. abortus* cepa RB51 e 361 pb para o DNA de *B. abortus* cepa B19.

Figura 7 - Comprovação da especificidade dos “primers” *eri 1* e *eri 2* , Uberlândia, 2014.

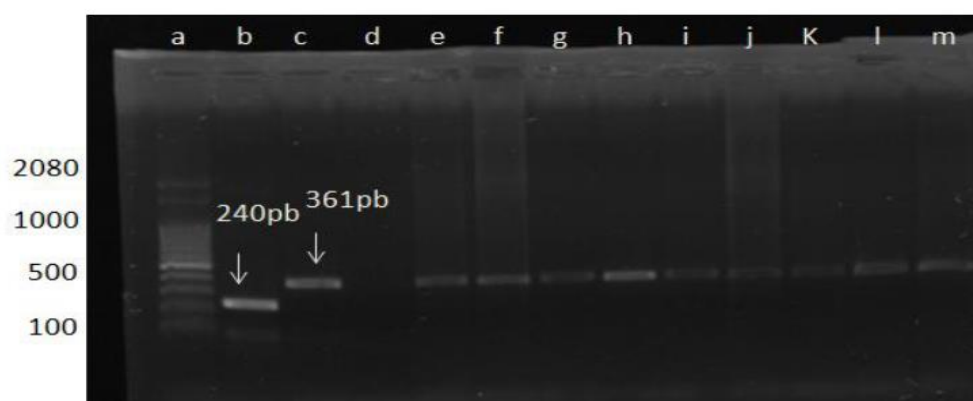


(a): marcador de tamanho de fragmento de DNA (100 pb); (b): controle negativo; (c): *B. abortus* cepa vacinal B19; (d): *B. abortus* cepa 2308; (e): *B. abortus* cepa vacinal RB51.

FONTE: LOURENCETTI (2014).

Na Figura 8 estão apresentados os resultados da técnica de hemi-nested PCR com os “primers” *eri 1* descritos por Sangari, García-Lobo e Aguero (1994) e *eri 3* descrito por Bricker e Halling (1995), que amplificam 240 pb em isolados de *B. abortus* cepa de campo e 361 pb na cepa vacinal B19, utilizado na diferenciação de isolados de campo e vacinal. Todas as 68 amostras (100%) positivas para *B. abortus*, foram determinadas como sendo de origem vacinal (B19). Na Tabela 7 estão apresentadas as amostras positivas para *B. abortus*, e os resultados da reação de PCR com “primers” para diferenciação da origem da cepa.

Figura 8 – Detecção de DNA de *B. abortus* cepa vacinal B19 em sêmen bovino, Uberlândia, 2014.



(a): marcador de tamanho de fragmento de DNA (100 pb); (b): *B. abortus* cepa 2308; (c): *B. abortus* cepa vacinal B19; (d): controle negativo; (e,f,g,h,i,j,k,l,m): produto da PCR originado de sêmen total (*B. abortus* cepa vacinal B19).

FONTE: LOURENCETTI (2014).

Tabela 7 - Resultados do AAT, SPA, técnica de PCR para determinação da espécie *B. abortus* e hemi-nested PCR (*eri 1* e *eri 3*) para diferenciação da origem da cepa em campo ou vacinal (B19) de touros positivos na PCR, Uberlândia, 2014.

Amostra	AAT	SPA	PCR			Origem
			<i>B.abortus</i>	<i>eri 1 e 2</i>	<i>eri 1 e 3</i>	
1	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
3	negativo	Positivo	positivo	361 pb	-----	B19
4	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
5	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
6	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
7	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
8	negativo	Positivo	positivo	-----	361 pb	B19
9	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
11	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
12	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
14	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
15	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
16	negativo	Positivo	positivo	-----	361 pb	B19
17	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
20	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
21	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
24	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
25	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
27	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
30	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
31	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
33	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
37	negativo	Positivo	positivo	361 pb	-----	B19
38	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
40	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
41	negativo	negativo	positivo	-----	361 pb	B19
42	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
43	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
45	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
47	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
49	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
50	negativo	Positivo	positivo	361 pb	-----	B19
52	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
53	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
54	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19

Tabela 7 - Resultados do AAT, SPA, técnica de PCR para determinação da espécie *B. abortus* e hemi-nested PCR (*eri 1* e *eri 3*) para diferenciação da origem da cepa em campo ou vacinal (B19) de touros positivos na PCR, Uberlândia, 2014. **(continuação)**

Amostra	AAT	SPA	PCR			Origem
			<i>B.abortus</i>	<i>eri 1 e 2</i>	<i>eri 1 e 3</i>	
55	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
56	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
57	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
58	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
59	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
60	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
61	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
62	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
63	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
64	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
66	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
67	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
69	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
70	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
71	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
72	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
73	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
74	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
75	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
77	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
78	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
79	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
80	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
82	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
83	negativo	positivo	positivo	361 pb	-----	B19
84	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
86	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
87	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
90	negativo	positivo	positivo	361 pb	-----	B19
91	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
94	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
95	negativo	negativo	positivo	361 pb	-----	B19
96	negativo	positivo	positivo	361 pb	-----	B19

FONTE: LOURENCETTI (2014).

5 DISCUSSÃO

No monitoramento sorológico dos touros não foi encontrado nenhum reagente ao teste do AAT e somente 11 touros (11%) foram positivos no SPA. Aguiar et al. (2001) avaliando a ocorrência de aglutininas anti-*Brucella abortus* em touros encontraram resultados diferentes no exame de SPA: dos 191 bovinos avaliados, nenhum reagiu nas provas de AAT, 2-ME e SPA. Em contraste, Campos et al. (2003) pesquisando a prevalência da brucelose em touros na microrregião de Goiânia encontraram resultado sorológico semelhante ao da presente pesquisa, visto que nenhum dos 139 animais foram reagentes ao teste do AAT, embora um dos touros negativos era oriundo de uma propriedade com histórico de abortamento.

A ausência de animais positivos no AAT desta pesquisa pode ser justificada pela localização preferencial do agente no testículo e glândulas acessórias nos machos bovinos, podendo induzir a formação de baixos títulos séricos de imunoglobulinas, dificultando o diagnóstico por métodos sorológicos de triagem (RADOSTITIS et al., 2007).

A ocorrência de oito touros positivos no SPA, negativos no AAT e positivos na PCR pode ser justificada pelo fato da técnica de SPA ser fundamentada na detecção de IgG e IgA no sêmen, decorrentes da reação inflamatória testicular frente ao agente (GRASSO; CARDOSO, 1998; RADOSTITIS et al., 2007). Desta forma, esses oito touros poderiam estar apresentando forte resposta imunológica local. Os três touros reagentes no SPA, negativos no AAT e na PCR poderiam estar com a bactéria presente órgão reprodutivo, mas devido à eliminação intermitente da *B. abortus* no sêmen não foi possível detectar a presença do DNA bacteriano pela PCR nessas amostras.

Em razão das dificuldades encontradas em relação ao diagnóstico sorológico da brucelose nos touros, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem se mostrado uma boa ferramenta para auxílio no diagnóstico dessa doença, ajudando na certificação de material genético livre de patógenos. São poucos os trabalhos encontrados utilizando sêmen bovino comercial, visto que a maioria das pesquisas trabalha com amostras experimentalmente contaminadas.

A PCR vem sendo utilizada com vantagens na detecção de vários agentes nas diferentes espécimes clínicas de origem animal, por ser uma técnica sensível, específica e rápida. Está particularmente indicada na detecção de agentes de difícil

cultivo, permitindo o diagnóstico em amostras deterioradas ou contaminadas e principalmente no monitoramento da eliminação de agentes infecciosos (PACHECO, 2007).

A extração de DNA bacteriano do sêmen total utilizando o protocolo por lise enzimática com Proteinase K e purificação com fenol clorofórmio (adaptado de BIASE et al., 2002), mostrou-se eficiente, pois das 100 amostras foi detectado DNA de *B. abortus* em 68% . Amin et al. (2001), avaliando a detecção de DNA de *B. melitensis* em sêmen bovino e ovino, obtiveram detecção de DNA apenas em amostras de fluido seminal livres de células. Nas amostras de sêmen total ou contendo apenas células espermáticas houve inibição da reação de polimerização, diferente do que ocorreu no presente estudo.

Manterola et al. (2003) pesquisando *B. ovis* em ovinos naturalmente e experimentalmente infectados, detectaram maior número de positivos no cultivo microbiológico de sêmen do que na PCR. As amostras de sêmen foram colhidas diretamente do prepúcio após eletro-ejaculação, utilizando swab estéril.

Vinodh et al. (2008) testaram quatro protocolos de extração de DNA em amostras de sêmen contaminadas com *B. abortus* cepa vacinal B19 e *Leptospira* spp. separadamente. Dos quatro métodos testados, fervura, fenol clorofórmio, DNAzol e “Kit” AuPrep (Invitrogen, USA) o último método foi o que mais removeu os inibidores de PCR presentes no sêmen. Ao analisarem 40 amostras de palhetas de sêmen congeladas não foi encontrada nenhuma positiva para *Leptospira* spp. e somente 3 positivas para *B. abortus*. No mesmo estudo foi utilizado o par de primers” específico para *B. abortus* descritos por Bricker e Halling (1994), que amplificam um fragmento de 498 pb. No presente estudo, foi utilizado o mesmo par de “primer”, mas a detecção de amostras de sêmen positivas para *B. abortus* foi diferente: 68/100 positivos. A diferença de resultados pode ser explicada devido ao uso de amostras de sêmen total que não passam pelo mesmo processo das palhetas utilizadas para inseminação artificial.

Nas Figuras 6, 7 e 8 estão demonstrados que os “primers” utilizados BAB e IS711 amplificaram fragmento de 498 pb nas espécies de *B. abortus* cepa 2308 e nas cepas vacinais B19 e RB51 (BRICKER; HALLING, 1994), enquanto *eri 1* e *eri 2* amplificaram fragmento de 1063 pb na cepa de campo e vacinal RB51 e fragmento de 361 pb na B19 (SANGARI et al., 1994); *eri 3* amplificaram fragmento de 240 pb na hemi-nested PCR na cepa de campo, e de 361 pb na cepa vacinal B19.

Devido à similaridade genética entre as bactérias dos gêneros *Ochrobactrum* e *Brucella* (VELASCO et al., 1998), optou por aplicar o mesmo protocolo adotado para amplificação de DNA de *B. abortus*, com os “primers” BAB e IS711 em bactérias do gênero *Ochrobactrum*. Não foi observada a presença de bandas específicas relacionadas a este gênero, confirmando-se desta forma, que o “primers” foi específico para detecção dos 498 pb da *B. abortus*.

Em consequência do elevado número de amostras de sêmen (68%) com DNA de *B. abortus*, e por esses touros serem sorologicamente negativos nos testes oficiais recomendados pelo PNCEBT, foi aplicado a PCR para diferenciação entre cepa de campo e a cepa vacinal (B19), mesmo sabendo-se da proibição da vacinação dos machos. Várias pesquisas com diversos produtos de origem animal foram desenvolvidas para diferenciação, com a PCR, entre cepa de campo de *B. abortus* e cepa vacinal B19. Todos esses estudos demonstraram a diferenciação da cepa vacinal B19 e cepa de campo.

Louzan (2012) trabalhou com 257 amostras de sangue e soro para o diagnóstico de brucelose em bovinos não vacinados na idade adulta e 66 (25,6%) foram positivos ao exame sorológico. Nas extrações de DNA do sangue total foram encontrados 22 (8,5%) positivos para *Brucella* spp. “primer” bcps31. Quando se utilizou o “primer” BruAb_0168 foram encontradas 235 (91,4%) amostras positivas para *B. abortus*; quando foi utilizado o par de “primers” descritos por Sangari et al. (2000) para diferenciação entre cepa de campo e cepa vacinal B19, foram encontradas 145 (56,4%) amostras positivas para cepa vacinal B19, 3 (1,1%) amostras positivas para cepa de campo e 109 (42,4%) negativas.

Pacheco (2007) extraiu DNA da urina e do leite de 14 vacas de diferentes faixas etárias (3 a 9 anos) vacinadas na idade correta contra brucelose com a vacina B19, durante um ciclo reprodutivo completo (sincronização do cio e fecundação, até 30 dias após o parto). Das 420 amostras analisadas de leite e urina, 86 (20%) foram positivas para *Brucella* spp.. Das 210 amostras de leite (5,7%) foram positivas para cepa vacinal B19 e das 210 amostras de urina (35,2%) foram positivas para cepa vacinal B19. A excreção intermitente da B19 pela urina e pelo leite durante um ciclo reprodutivo completo, com persistência em vacas de nove anos de idade, confirmou a multiplicação das brucelas no organismo de fêmeas bovinas que haviam sido vacinadas entre três a oito meses de idade, sugere que pode ser continuada por toda a vida do animal.

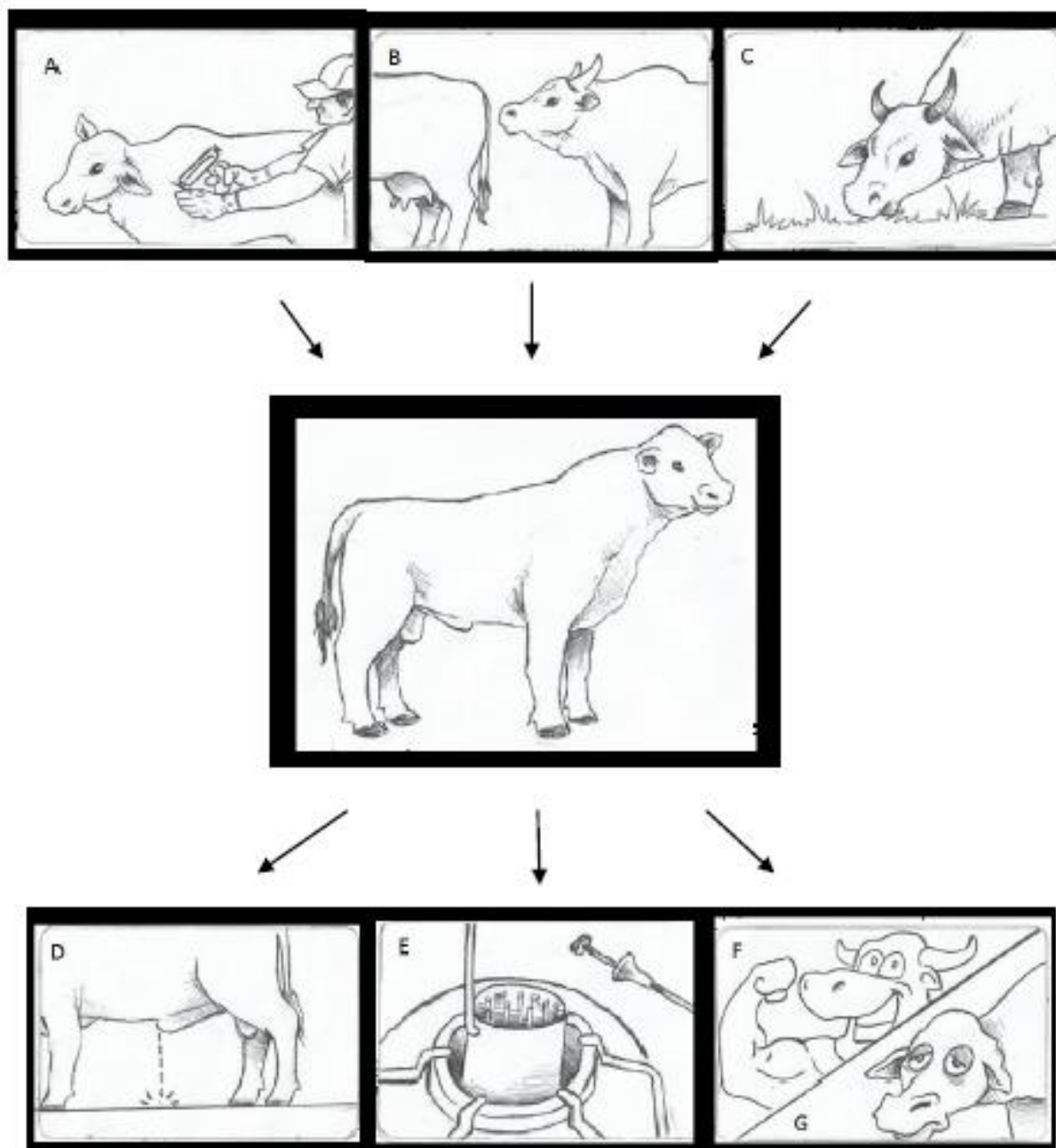
Miyashiro et al. (2007) trabalharam com detecção de DNA de *B. abortus* e diferenciação entre cepa de campo e cepa vacinal em amostras de queijos clandestinos de diferentes regiões do estado de São Paulo e Minas Gerais. Das 192 amostras analisadas foi encontrado DNA de *Brucella* spp. em 37 (19,2%). Deste total positivo, 100% foram diagnosticadas como *Brucella abortus*. Destas, 30 foram diferenciadas como cepa vacinal (B19) e sete como cepa de campo, o que demonstra ocorrência de cepa vacinal B19 sendo excretada pelo leite.

Nesta pesquisa, das 68 amostras positivas para DNA de *B. abortus* todas (100%) estavam positivas para cepa vacinal B19, como demonstrado na Figura 9. No presente estudo foi detectado DNA da bactéria por PCR em amostras de sêmen de touros sorologicamente negativos. Sugere-se que a estirpe B19 manteve-se viável e capaz de se multiplicar, provavelmente localizada no baço, linfonodos e, principalmente, nos testículos. Mesmo mantendo-se viável a bactéria não seria capaz de induzir títulos de anticorpos detectáveis nos exames sorológicos de triagem AAT, mas induzir a produção de imunoglobulinas locais capazes de reagir na prova de sêmen plasma aglutinação, como ocorreu com 11 touros desta pesquisa.

Nos 60 touros negativos no AAT, negativos no SPA e positivos na PCR com a cepa vacinal B19, pode-se aventar a possibilidade desses animais estarem infectados com a cepa vacinal, desenvolvendo resposta imunológica protetora contra a brucelose e não desenvolvendo a doença. Não foi encontrado relatos da imunização com a cepa B19 em machos bovinos. No entanto, em cervídeos Cook et al. (2000) demonstraram que seis machos adultos de cervo norte-americano (*Cervus elaphus nelsoni*) quando receberam dose da vacina RB51 por via oral não desenvolveram doença, e nem ocorreu a presença da cepa vacinal RB51 na cultura de sêmen. Já 10 cervos mais jovens que foram inoculados com a vacina RB51 injetável desenvolveram bacteremia e as glândulas sexuais permaneceram infectadas por um período prolongado. Essa bacteremia desapareceu de três cervos, que foi constatada após a cultura bacteriana de tecidos.

A ingestão oral da cepa B19 eliminada por fêmeas vacinadas poderia estar contaminando o ambiente e infectando os touros do presente estudo. Outra alternativa seria a vacinação inadvertida de machos junto com fêmeas bovinas entre 3 e 8 meses de idade, que resultaria em infecção persistente na vesícula seminal e próstata, com eliminação da bactéria pelo sêmen (Figura 9).

Figura 9 - Possíveis mecanismos de transmissão da *B. abortus* cepa vacinal B19 para touros e manutenção no ambiente.



Possíveis mecanismos de transmissão e manutenção da cepa vacinal B19 em touros. **A:** Vacinação equivocada dos machos bovinos; **B:** Eliminação da cepa B19 na urina de fêmeas bovinas infectando os touros; **C:** Cepa B19 contaminando ambiente e ingerida junto com o alimento; **D:** Machos infectados eliminando B19 na urina e contaminando o ambiente; **E:** Sêmen bovino contaminado com a cepa B19 com possibilidade de transmissão para as fêmeas durante a inseminação artificial; **F:** Touro adquire imunidade ao entrar em contato com a cepa B19 via oral; **G:** Touro infectado com a cepa B19 apresentando sinais clínicos.

FONTE: LOURENCETTI (2014).

Embora o mecanismo de infecção por *B. abortus* cepa vacinal B19 seja semelhante ao da cepa de campo, não está totalmente esclarecido quais substâncias favorecem a multiplicação no organismo hospedeiro (PACHECO, 2007). Algumas cepas de B19 podem ser tolerantes ao eritritol e essa seja uma das causas do desenvolvimento de infecção persistente (SANGARI et al., 1998).

Os touros de centrais também entram em contato com fêmeas adultas no momento da coleta do sêmen. Essas fêmeas servem como manequins e na maioria das vezes urinam quando estão juntas com os machos. Foi demonstrado no trabalho de Pacheco (2007) que fêmeas adultas vacinadas na idade correta podem eliminar a cepa vacinal B19 na urina. Dessa forma, esses animais possam ser uma possível fonte de infecção.

Dos 68 (100%) touros com DNA de *B. abortus* cepa vacinal B19 detectado no sêmen, 46 (67,6%) são touros de centrais de coleta e processamento de sêmen. A presença do DNA da cepa vacinal (B19) sendo eliminado no sêmen desses animais é preocupante no que diz respeito à saúde pública. Pois esses animais estão em contato frequente com funcionários das centrais para coleta de sêmen e exames da rotina das centrais, podendo significar risco de infecção, já que a vacina B19 é patogênica para humanos.

Diante dos resultados desta pesquisa aumenta-se a preocupação com uma prática de mistura do ejaculado de vários touros em uma mesma dose inseminante. Atualmente essa prática é fiscalizada pelo MAPA que aprovou a regulação para a produção e comercialização de sêmen heterospérmico de ruminantes, de acordo com a Instrução Normativa (IN), nº. 32, de 23 de agosto de 2007. Esta IN autoriza a mistura de ejaculados de diferentes animais para a produção de doses de sêmen, com finalidade comercial. Até o momento, todo sêmen comercializado no Brasil provém de central de inseminação artificial estrangeira, sendo uma tecnologia patenteada (PECPLAN, 2009).

Tanto a utilização de sêmen a fresco (AL NAIB et al., 2011) quanto a utilização de sêmen heterospérmico (AZMAL et al., 2004). São técnicas usadas visando melhorar a fertilidade na inseminação artificial. A primeira é de uso mais restrito devido à viabilidade reduzida dos espermatozóides por um curto tempo, mas não isenta de risco de transmissão da brucelose. Já a utilização de sêmen heterospérmico, se ocorrer em um ambiente sem o controle sanitário adequado

representa risco, pois será a mistura de vários ejaculados de bovinos que podem ser possíveis veiculadores de doenças, como por exemplo, *B. abortus* cepa de campo. Por isso, se faz necessário o uso de técnicas que viabilizam o diagnóstico mais correto de bactérias veiculadas pelo sêmen.

Fuverki (2010), trabalhando com 96 amostras de palhetas de sêmen bovino, provenientes de centrais de coleta e processamento de sêmen dos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo e Paraná, utilizou “kit” comercial para extração de DNA de *Brucella* spp. e *Leptospira* spp., e todas as 96 amostras foram negativas para qualquer DNA bacteriano.

Já Junqueira Junior et al. (2013) aplicaram a técnica de PCR para a detecção de DNA de *Brucella* spp. em 88 amostras de plasma seminal de touros de centrais de coleta e processamento de sêmen, e de fazendas de produção de bovinos com sorologia negativa para brucelose do estado de Minas Gerias. Das 88 amostras analisadas, 27 (30,6%) foram consideradas positivas para DNA de *Brucella* spp. Neste estudo não foi realizada a diferenciação entre cepa vacinal B19 e cepa de campo.

Amin et al. (2001) aplicaram a técnica de PCR no sêmen de 65 touros com sorologia positiva para brucelose, no Egito. Das amostras analisadas, sete foram consideradas positivas para DNA de *B. melitensis*. Uma das possíveis explicações para tal resultado, segundo os autores, deve-se ao fato de que as amostras foram coletadas de animais em estágios crônicos da infecção. Nesses casos, alguns animais param a eliminação da bactéria. Outra possibilidade a ser considerada, é que alguns desses animais possam ter apresentado resultado falso-positivo no exame sorológico. Isto poderia ter ocorrido devido à infecção cruzada com outros micro-organismos Gram-negativos, como, *Yersinia enterocolitica*.

Estudos recentes em javalis na costa atlântica da Carolina do Sul, EUA, demonstraram a presença de *B. abortus*, cepa de campo e as cepas vacinais B19 e RB51 em uma propriedade onde a criação de gado não existe desde 1970. Esse é um dos primeiros relatos de caso de um reservatório da vida selvagem nos EUA fora do parque de Yellowstone, onde cervos e bisões são reservatórios de *B. abortus* (STOFFREGEN et al., 2007; GODFROID et al., 2013), levantando a possibilidade da cepa vacinal B19 infectar reservatórios silvestres.

Com os dados encontrados no presente estudo, recomenda-se aliar técnicas moleculares aos exames realizados na rotina de estabelecimentos que

comercializam tal material genético, mesmo de touros negativos nos testes sorológicos considerados oficiais. A presença do DNA da cepa vacinal B19 encontrada no sêmen dos touros deve ser investigada, para determinar qual a importância epidemiológica dessa cepa nesses animais, e as prováveis causas de infecção, apesar da ausência de estado de doença nestes animais.

Desta forma acredita-se que essa cepa vacinal B19 pode ter sido adquirida pelos touros via indireta pelo convívio com fêmeas vacinadas, seria capaz de induzir resposta imune protetora nesses animais contra *B. abortus*, e não provocando o desenvolvimento de doença. Vale a salientar que a vacinação em machos de qualquer idade, com B19 ou RB51, está proibida no Brasil, e não deve ser realizada em nenhuma hipótese, pois ainda não se tem comprovação científica necessária que assegure imunidade nos machos sem efeitos adversos.

6 CONCLUSÃO

- A presença de 11 touros positivos na SPA, negativos no AAT, indica infecção das glândulas acessórias dos animais, em detrimento de baixo estímulo imune sérico;
- A ocorrência de três touros positivos na SPA e negativos no AAT e PCR poderia ser justificada pela eliminação intermitente de *B. abortus* pelo sêmen em animais infectados;
- A detecção de 68 touros eliminando cepa vacinal B19 de *B. abortus* detectada pela PCR, alerta para a possibilidade de vacinação equivocada de machos com a B19 ou mesmo a infecção dos touros pelo contato direto com a cepa vacinal eliminada por fêmeas, sugerindo maior rigor no uso da B19, e a adoção de técnicas moleculares juntamente com os métodos sorológicos convencionais no diagnóstico da brucelose em touros.

REFERÊNCIAS

- Pecuária Planejada (ABS PECPLAN), 2009. Disponível em: <<http://www.abspecplan.com.br/?pages=fertility>>, Acesso 18 jan. 2014.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Volumen I: bacteriosis y micosis. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2003, p. 28-56. (Publicación Científica, 580).
- AFSHAR, A.; EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. **Veterinary Bulletin**, Dublin, v.60, p.689-697, 1990.
- AGUIAR, D. M. et al. Soroaglutinação, sêmen plasma aglutinação e exame andrológico no diagnóstico da brucelose em machos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 103-105, 2001.
- AL NAIB, A. et al. Effect of duration of storage at ambient temperature on fertilizing ability and mucus penetration ability of fresh bovine sperm. **Theriogenology**, Kidlington, v. 76, p. 1070-1075, 2011.
- ALTON, G. G. et al. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988, 545p.
- ALVES, A. J. S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 6-13, Nov. 2009.
- AMAKU, M. et al. Modelagem matemática do controle de brucelose bovina por vacinação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 135-141, 2009.
- AMIN, A. S.; HANDY, M. E.; IBRAHIM, A. K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**, Oxford, v. 83, p. 37-44, 2001.
- ASBIA. **Relatório de comercialização de sêmen do ano 2012**. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>> Acesso em: 18 ago. 2013.

AZEVEDO, M. O. et al. **Técnicas básicas em biologia molecular**. UnB, Brasília, 2003.

AZEVEDO, S. S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 19-26, Nov. 2009.

AZMAL, S. A. et al. Relative merits of Homo and Heterospermic bull semen in respect of fertility. **Pakistan Journal Biological Science**, Faisalabad, v. 7, n. 11, p. 1912-1917, 2004.

BAILY, G.G. et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cairo, v. 95, n. 4, p. 271–275, 1992.

BARCELOS, V.B. et al. Agentes infecciosos no sêmen de touro. **Grupo Cultivar**, 2009. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=918>>. Acesso em: 18 jul. 2011.

BATHKE, W. **Brucellosis**, In: BEER, J. (Ed.). Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose. São Paulo: Roca, 1988. v. 2, p. 144-160.

BIASE, F.H. et al. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, [S.l.], v.25, n.3, p.313-315, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Diagnóstico de saúde animal**, Brasília, 1977. 735p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. Brasília, 2006.188 p.

BRICKER, B. J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1,2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, 1994.

BRICKER, B. J.; HALLING, S.M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 6, p. 1640-1642, 1995.

BUCK, J. M. Studies of vaccination during calthood to prevent bovine infectious abortion. **Journal of Agricultural Research**, Washington DC, v. 41, n. 9, 1930.

CAMPANÃ, R. N. et al. **Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina**. Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, São Paulo. 2003. 20p.

CAMPERO, C.M. Brucelosis en toros: una revisión. **Veterinary Medicine**, [S.l.], v.74, p. 8-14, 1993.

CAMPOS, A. C. P. et al. Brucelose bovina: prevalência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em reprodutores bovinos na microrregião de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 125-129, 2003.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. *Brucella*, In:_____ CARTER, G.R. e CHENGAPPA, (Eds.). **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4.ed. Philadelphia: London, 1991. p. 196- 201.

CASANAS, M. C. et al. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases**, Berlin, v. 20, p. 127-131, 2001.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed. – Belo Horizonte: CBRA, 1998.

CHATE, S. C. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 46-55, Nov. 2009.

COOK, W. E. et al. Safety of *Brucella abortus* strain RB51 in bull elk. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 36, n. 3, p. 484-488, 2000.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 2, p. 213-221, 1997.

CORTEZ, A. et al. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v.7, n. 79, p.500-501. 2001.

COSTA, M. Brucelose bovina e equina. In: CORREA, F. R.; SCHAILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C. **Doença de ruminantes e equinos**. 2.ed. São Paulo. Varela, 2001. v. 1, p. 187-197.

CRAWFORD, R. P.; HUBER, J. D.; ADAMS, B. S. Epidemiology and surveillance. In: _____ Nielsen K, Duncan JR (Ed.). **Animal Brucellosis**, Boca Raton: CRC Press, 1990. p.131-151.

DIAS, J. A. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 66-76, Nov. 2009.

DIAS, R. A. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 118-125, Nov. 2009.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M.; STEWART, R. B. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II. *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma* spp., *Chlamydia*; Pathogens and semen contaminants: treatment of bull semen with antimicrobial agents. **Veterinary Bulletin**, Oxfordshire, v. 62, p. 887-910, 1992.

ERLICH, H. A. et al. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science Classic**, Washington DC, v. 21, n. 252, p. 1643-1651, 1991.

EWALT, D. R.; BRICKER, B. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB 51. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 38, n. 8, p. 3085-3086, 2000.

FEKETE, A. et al. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 4, n. 1, p. 79-83, 1992.

FLATSCHER, J.; HOLMANN, A. Genital diseases in bulls: importance for artificial insemination – control measures. In: CONFERENCE OF THE REGIONAL COMMISSION FOR EUROPE, 11, 1981, **Vienna Proceedings**. Vienna: Office International des Épizooties, 1981. p.393-403.

FUVERKI, R. B. N. **Padronização de um protocolo para detecção molecular de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em sêmen bovino comercial**. 2010. 39 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária

Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

GODFROID, J. et al. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 102, p. 118-131, 2011.

GONÇALVES, V. S. P. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 35-45, Nov. 2009b.

GONÇALVES, V. S. P.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 14-18, Nov. 2009a.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 281-297, 2002.

GRASSO, L. M. P. S.; CARDOSO, M. V. **Brucelose Bovina**. Biológico, São Paulo, v.60, n.1, p.71-79, 1998.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 8 ed. São Paulo, 2004, 583p.

JARDIM, S.N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase** [recurso eletrônico]. São Carlos: Embrapa Pecuária de Sudeste, 2007. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao gratuita/e-books/LVFundDNA.pdf>>. Acesso em: 06 abril 2011.

JUNQUEIRA JUNIOR, D. G. et al. Detection of *Brucella* spp. DNA in the semen of seronegative bulls by polymerase chain reaction. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 60, n. 4, p. 376-377, 2013.

KLEIN-GUNNEWIEK, M. F. C. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 77-84, Nov. 2009.

LAGE, A. P. et al. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, p. 202-212, 2008.

LANGENEGGER, J. Brucelose. In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: Embrapa – CNPGL, 1992. p. 83-96.

LANGENEGGER, J. **Discussões sobre brucelose** In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. Discussões do fórum de atualização em doenças dos bovinos de leite. . Coronel Pacheco: Embrapa – CNPGL, 1993. p. 6-12.

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**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 53-61, 2003.

LOUZAN, A. L. R. M. **Diagnóstico Molecular Ante Mortem de *Brucella* spp. em Bovinos**. 2012. 37p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

MANTEROLA, L. et al. Evaluation of PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. **Veterinary Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 1-2, p. 65-72, 2003.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa DAS (Secretária de Defesa Agropecuária) Nº 8, 2006**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2011.

MARVULO, M. F. V. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 93-102, Nov. 2009.

MATHIAS, L. A. et al. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2135-2140, 2010.

McGIVEN, J. A. New developments in the immunodiagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. In: Brucellosis: recent developments towards 'One Health' Scientific and Technical Review 32, **Review Scientific and Technical of the Office International Epizooties**, Paris, v.32, n.1, p.163-176, 2013.

METCALF, H. E.; LUCHSINGER, D. W.; RAY, W.C. **Brucellosis. Handbook series in Zoonoses**. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial and mycotic. 2 ed. Raton: CRC Press, 1994. p. 9-39.

MINHARRO, S. **Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil**. 2009. 77 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

MIYASHIRO, S. et al. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by

means of polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 17-22, 2007.

MIYASHIRO, S. **Presença de DNA de *Brucella abortus* em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR)**. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada aas Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.

NAVES, J. H. F. F. et al. Interference in diagnostic tests for brucellosis in cattle recently vaccinated against leptospirosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 24, n. 2, p. 283-287, 2012.

NEGREIROS, R. L. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 56-65, Nov. 2009.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary Science & Comparative Medicine**, New York, v. 24, p. 69-98, 1980.

NIELSEN, K. et al. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 100, n. 1-2, p. 25-30, 2004.

OGATA, R. A. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 126-134, Nov. 2009.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Enfermedades de la Lista de la OIE**, 2011. Disponível em: <<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2011/>> Acesso em: 10 jan. 2012.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Terrestrial Animal Health Code**, Volume 1. OIE, 2013a. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>>. Acesso: 17 de janeiro de 2014.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals**, OIE, 2013b. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso: 18 jan. 2014.

OLIVEIRA, J. P. **Estudo das lesões sugestivas de brucelose em bovinos e bubalinos abatidos para consumo**. 2003. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade do Pará, 2003.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Comité Mixto FAO/ OMS de expertos en brucelosis**. Ginebra, OMS, 1986, 149 p.(Série de informes técnicos 740).

PACHECO, W. A. **Excreção de Brucella abortus, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo**. 2007. 70f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2007.

PAULIN, L. M. Artigo de revisão: Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p.239-249, Abr./Jun. 2003.

PAULIN, L.M.; FERREIRA-NETO, J.S. **O combate à brucelose bovina: Situação brasileira**. Jaboticabal: Funep, 2003. 154p.

POESTER, F. P. **Eficácia da vacina RB51 em novilhas**. 2006. 52 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

POESTER, F. P. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, supl. 1, p. 1-5, 2009.

POESTER, F. P. O risco da brucelose. **Gado Holandês**, São Paulo, SP: Verte Editora, v.63, n. 467, out, 1997.

POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; LAGE, A. P. Diagnóstico da brucelose bovina. **Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 47, p. 13-29, 2005.

POESTER, F.; GONÇALVES, V.S.P; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Microbiology**, [S.l], v.90, p.55-62, 2002.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007. 1737 p.

ROCHA, W. V. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 27-34, Nov. 2009.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 65, n. 8, p. 37-35-37-37, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 957p.

SANGARI, F. J. et al. The defect in the metabolism of erythritol of the *Brucella abortus* B19 vaccine strains is unrelated with its attenuated virulence un mice. **Vaccine**, Amsterdam, v. 16, n. 17, p. 1640-1645, 1998.

SANGARI, F. J. et al. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. **Microbiology**, [S.l.], v. 146, p. 487-495, 2000.

SANGARI, F. J.; GARCIA-LOBO, J. M.; AGUERO, J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 121, p. 337-342, 1994.

SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 58, p. 375-382, 2008a.

SCHOLZ, H. C. et al. Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by multi-primer PCR that targets the recA gene. **Journal of Medical Microbiology**, Irvine, v. 57, p. 64-71, 2008b.

SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 60, p.801-808, 2010.

SCHOLZ, H. C.; VERGNAUD, G. Molecular characterization of *Brucella* species, In: Brucellosis: recent developments towards 'One Health' Scientific and Technical Review 32, **Review Scientific and Technical of the Office International Epizooties**, Paris, v.32, n.1, p.149-162, 2013.

SCHURIG, G. G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M. J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Veterinary Microbiology**, Blacksburg, v. 90, p. 479-496, 2002.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JUNIOR, N. J. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. 2. ed. Penso, 2006. 448p.

SIKUSAWA, S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 103-108, Nov. 2009.

SILVA, F. L. et al. Brucelose Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 47, p. 1-12, 2005.

SILVA, V. G. S. O. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 109-117, Nov. 2009.

SPERRY, J. F.; ROBERTSON, D. C. Inhibition of growth by erythritol catabolism in *Brucella abortus*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 124, n. 1, p. 391-397, 1975.

STEWART, D. L. et al. A second experiment with heterospermic insemination in cattle. **Journal Reproduction and Fertility**, Tehran, v. 36, p. 107-116, 1974.

SUTHERLAND, S. S. Immunology of bovine brucellosis. **Veterinary Bulletin**, Oxfordshire v. 50, p. 359-368, 1980.

STOFFREGEN, W. C. et al. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 19, n. 3, p. 227-237, 2007.

THOEN, C.O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F. *Brucella*. In: ____ GYLES, C.L.; THOE N, C.O. (Eds.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. p. 236-247.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004. 572 p.

VEJARANO RUIBAL, M. D. P. **Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de diferentes tecidos de vacas infectadas experimentalmente com cepa 2308**, 2009. 79 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.

VELASCO, J. et al. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 48, p. 759-768, 1998.

VILLAR, K. S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p. 85-92, Nov. 2009.

VINODH, R. et al. Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. **Tropical Animal Health Production**, Boston, v. 40, p. 323-329, 2008.

YU, W. L.; NIELSEN, K. Review of detection of *Brucella* sp. by polymerase chain reaction. **Croatian Medical Journal**, Zagreb, v. 51, n. 4, p. 306-313, 2010.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 125/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 088/12

Projeto Pesquisa: "Pesquisa de anticorpos anti-Brucella abortus em soro bovino e identificação do DNA de Brucella abortus em sêmen pela técnica de PCR".

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima-Ribeiro

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 31 de outubro de 2012

Profa. Dra. Ana Elizabeth Iannini Custódio
Vice Coordenadora *Pro tempore* da CEUA/UFU

