

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MURIELL RIBEIRO GANDA

**UTILIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE *Leptospira* spp. EM
SÊMEN E TESTÍCULO BOVINO**

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2014

MURIELL RIBEIRO GANDA

**UTILIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE *Leptospira* spp. EM
SÊMEN E TESTÍCULO BOVINO**

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: Prof^a. Dr^a. Anna Monteiro
Correia Lima.

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G195u Ganda, Muriell Ribeiro, 1984-
2014 Utilização da PCR para detecção de DNA de *Leptospira* spp : em
sêmen e testículo bovino / Muriell Ribeiro Ganda. – 2014.
51 f. : il.

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

1. Veterinária - Teses. 2. Leptospirose em animais. - Teses. 3. Reação
em cadeia de polimerase - Teses. I. Silva, Paulo Lourenço. II. Universi-
dade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

À minha família querida, que me dá
confiança para enfrentar todos os
desafios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais pelo amor e por me ensinarem o valor dos estudos me incentivando a seguir por esse caminho.

À minha linda filha Bia companheira de todas as horas, cujo amor me impulsiona.

Aos meus irmãos queridos Jéssica e Yuri, e em especial minha irmã mais velha Dani, por ter sido sempre um exemplo, ao meu sobrinho Vitinho por ajudar a titia durante várias tardes.

Ao meu querido marido Márcio, por seu apoio incondicional e amor.

Às amigas: Andreia Zago, Dayane Olímpia, Gabriela Bim, Mariana Assunção, Mariane Pacheco, Pollyana Mafra, Tatiane Cristina Fernandes, pela amizade e apoio, trabalhar com vocês é gratificante.

Aos amigos do laboratório, Beletim, Nádia, Sílvia, João Helder, pelo companheirismo.

À minha orientadora, Professora Dra. Anna Lima; pelo apoio, confiança e por me ensinar o valor do trabalho em equipe.

Aos técnicos do laboratório de doenças Infectocontagiosas da FAMEV-UFU, especialmente à Marília.

À Professora Dra. Alessandra Medeiros pela compreensão e apoio na etapa inicial desta jornada.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O objetivo geral dessa pesquisa foi detectar o DNA de *Leptospira* spp. em sêmen e testículos de bovinos por meio da PCR. Com o intuito de avaliar a menor concentração de DNA bacteriano que a técnica pode detectar realizou-se, inicialmente, uma contaminação experimental de sêmen e testículo. O limiar de detecção obtido foi de 10^3 bactérias por ml de sêmen e de 10^5 leptospiras por ml de solução de testículo macerado. Em amostras de sêmen de 146 touros provenientes de centrais de coleta, processamento e comercialização de sêmen e de fazendas foi realizada a pesquisa de DNA de Leptospiras e não se detectou o material genético da bactéria em nenhuma amostra, no entanto detectou-se aglutininas anti-*Leptospira* spp., utilizando a SAM, no soro sanguíneo de 23,97% dos animais, com títulos variando entre 1/100 e 1/800. Fragmentos de 32 testículos de bovinos abatidos em matadouro frigorífico foram analisados, por meio da PCR, e em nenhuma amostra foi detectado o DNA de *Leptospira* spp. Esses animais foram sorologicamente negativos. Conclui-se que há a possibilidade das leptospiras não serem eliminadas via sêmen, ou não estarem sendo eliminadas no momento da coleta das amostras, podendo não trazer riscos de transmissão venérea da doença.

Palavras-chave: Leptospirose, PCR, Touros, Sêmen, Testículo.

ABSTRACT

The general objective of this research was to detect the DNA of *Leptospira* spp. in cattle's semen and testicles by PCR. In order to evaluate the lowest concentration of bacterial DNA that the technique can detect, was held, initially, an experimental infection of semen and testicles. The detection limit obtained was 10^3 bacteria per ml of semen and 10^5 leptospires per ml of macerated testicle. In semen samples from 146 bulls from farms and semen's collection, processing and marketing centrals was performed the DNA research. It was not detect the bacteria's genetic material in any sample. However, using the SAM, it were detected agglutinins anti-*Leptospira* spp. in the serum of 23.97 % of animals with levels ranging between 1/100 and 1/800. Fragments of 32 testicles of cattles slaughtered in a slaughterhouse were analyzed by PCR, and it was not detect *Leptospira* spp. DNA in any sample. These animals were serologically negative. It was concluded that there is the possibility of the leptospires are not eliminated through semen, or are not being eliminated at the time of sample collection, which could not bring risks of disease's venereal transmission.

Keywords: PCR, Leptospirosis, Bulls, Semen, Testicle.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Fluxograma de coleta e processamento de amostras de sêmen e testículo bovino. | 25 |
| Figura 2. | Fluxograma do protocolo de extração de DNA de amostras de sêmen e testículo bovino. | 30 |
| Figura 3. | Detecção do DNA de <i>Leptospira</i> spp. extraído de sêmen bovino contaminado, por meio de PCR. | 33 |
| Figura 4. | Detecção do DNA de <i>Leptospira</i> spp. extraído de testículo bovino contaminado, por meio de PCR. | 35 |
| Figura 5. | DNA total extraído de amostras de sêmen e testículo de bovinos | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Sorovares de <i>Leptospira interrogans</i> , utilizadas na SAM, de acordo com o sorogrupo pertencente. | 28 |
| Tabela 2. | Sequência dos <i>primers</i> utilizados na PCR para identificação de <i>Leptospira</i> spp. | 31 |
| Tabela 3. | Ciclo de temperatura utilizado para amplificação do fragmento de DNA extraído de <i>Leptospira</i> spp. | 32 |
| Tabela 4. | Frequência de bovinos reagentes aos sorovares de <i>Leptospira</i> spp. encontrada na SAM, de acordo o título sorológico. | 36 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | | |
|------------------|---|-----------------------------------|
| μg | = | micrograma |
| $\mu\text{g/mL}$ | = | 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 |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 | ETIOLOGIA..... | 15 |
| 2.2 | EPIDEMIOLOGIA..... | 16 |
| 2.3 | PATOGENIA..... | 18 |
| 2.4 | SINAIS CLÍNICOS..... | 19 |
| 2.5 | DIAGNÓSTICO..... | 20 |
| 2.6 | PROFILAXIA E CONTROLE..... | 22 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 | COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAL..... | 24 |
| 3.2 | CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL..... | 24 |
| 3.3 | LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS..... | 25 |
| 3.4 | COLETA DAS AMOSTRAS..... | 25 |
| 3.4.1 | Amostras de sangue..... | 25 |
| 3.4.2 | Amostras de sêmen..... | 26 |
| 3.4.3 | Amostras de testículo..... | 27 |
| 3.5 | TESTES DE DIAGNÓSTICO..... | 27 |
| 3.5.1 | Diagnóstico sorológico..... | 27 |
| 3.5.2 | Diagnóstico molecular..... | 28 |
| 3.5.2.1 | Extração de DNA..... | 28 |
| 3.5.2.2 | Quantificação e Qualidade do DNA..... | 31 |
| 3.5.2.3 | Reação em cadeia pela polimerase (PCR)..... | 31 |
| 3.5.2.4 | Análise do produto amplificado..... | 32 |
| 3.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 32 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 4.1 | CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL..... | 33 |
| 4.2 | DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO..... | 36 |
| 4.3 | DIAGNÓSTICO MOLECULAR..... | 38 |
| 5 | CONCLUSÕES | 41 |

| | |
|---|----|
| REFERÊNCIAS | 42 |
| ANEXO A. Protocolo de aprovação de pesquisa..... | 49 |
| ANEXO B. Protocolo de aprovação de pesquisa..... | 50 |

1 INTRODUÇÃO

Na pecuária, técnicas como inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE) e fertilização *in vitro* (FIV) estão sendo amplamente difundidas com o propósito de se aumentar a competitividade por meio do aumento da produtividade e, conseqüentemente, com maior retorno econômico ao produtor rural (GALLI et al., 2003).

A inseminação artificial possibilita o intercâmbio de material genético, promovendo a melhor produção de leite e carne por meio do uso de sêmen de melhor qualidade. No entanto, a ocorrência de patógenos no fluido, que possam ser disseminados, torna-se uma das principais preocupações para criadores e autoridades sanitárias dos países que empregam essa tecnologia (BARCELOS et al., 2009). As doenças sexualmente transmissíveis, de maior ocorrência em bovinos, não causam manifestações clínicas da doença no animal, porém seus reflexos se apresentam de forma indireta, como nas infecções por *Leptospira* spp. (BONDURANT, 2005).

As bactérias do gênero *Leptospira* spp. causam uma doença mundialmente distribuída denominada de leptospirose capaz de acometer mamíferos domésticos e selvagens causando distúrbios diversos. No aparelho reprodutivo a enfermidade causa muitos prejuízos nas criações comerciais. Nos bovinos machos problemas como inibição dos reflexos sexuais e perda na qualidade do sêmen, com queda na concentração e na motilidade dos espermatozoides, diminuição do volume do ejaculado e necrospermia já foram observados, além da presença de orquite e inflamação de glândulas anexas (KIKTENKO et al., 1976).

Em bovinos, pequenos ruminantes, suínos e equinos já foram identificadas as leptospirosas em sêmen o que evidencia a permanência das bactérias no aparelho reprodutor desses mamíferos (MASRI et al., 1997; LILENBAUM et al., 2008; ALTHOUSE, ROSSOW, 2011; HAMOND et al., 2013). Já em 1976, Kiktenko et al. isolaram leptospirosas em sêmen de bovinos infectados naturalmente e detectaram a presença de aglutininas anti-leptospirosas no fluido, o que revelou a ocorrência de eliminação das bactérias por meio dessa secreção.

Para o diagnóstico sorológico da doença o teste mais utilizado é a SAM (soroaglutinação microscópica), aferida como padrão ouro pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE, 2010). Embora sensível e específica na detecção de

anticorpos anti-leptospiras, a SAM muitas vezes não estabelece diagnóstico conclusivo e definitivo (BRASIL, 1995; LEVETT, 2004), pois não reconhece a presença da bactéria, mas sim a resposta imunológica do hospedeiro infectado (KEE et al., 1994).

Com o intuito de se obter diagnósticos mais precisos, outros testes estão sendo pesquisados. Merien et al. (1992) utilizaram a PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) para a confirmação do diagnóstico de leptospirose em material humano (urina, sangue e líquido cefalorraquidiano) superando, em termos de sensibilidade de detecção, a técnica de cultivo do microrganismo, pois é capaz de detectar leptospiras independente da quantidade.

Masri et al. (1997) concluíram que a SAM não seria bom indicador de infecção por leptospiras, pois os animais infectados experimentalmente não tiveram títulos consideráveis de anticorpos, o que poderia até mesmo ser confundido com títulos vacinais. No mesmo estudo, os resultados apontaram ser a PCR em sêmen mais eficiente que a SAM e até mesmo a PCR em urina, detectando infecção no 7^o dia pós-contaminação enquanto que na sorologia essa detecção foi observada no 14^o dia.

Tendo em vista a possibilidade de permanência de leptospiras em testículo e sêmen de bovinos, o objetivo geral do presente trabalho foi: Utilizar a PCR para detecção de DNA de *Leptospira* spp. em sêmen e testículo bovino. Os objetivos específicos foram: a) Verificar a eficiência da técnica de extração de DNA de *Leptospira* spp. em sêmen e em testículo, ambos experimentalmente contaminados com várias diluições de bactérias, como também da PCR; b) Realizar exame sorológico, SAM, testando 14 sorovares e titulação dos animais reagentes e c) Realizar pesquisa de DNA de *Leptospira* spp em sêmen *in natura* e em testículos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

A leptospirose é uma doença infecto contagiosa causada por bactérias do gênero *Leptospira* spp. Essas bactérias têm forma de espiroquetas com comprimento de 6 a 20µm por 0,1 µm de diâmetro, possuem dois filamentos axiais e flagelo periplasmático o que as tornam móveis. A temperatura ótima para seu crescimento está entre 28 a 30 °C e o pH entre 7,2 e 7,4, com tempo de geração de aproximadamente 12h. Elas crescem em meios enriquecidos com vitaminas (principalmente B2 e B12), com ácidos graxos de cadeia longa (utilizados como fonte de carbono e metabolizados por β -oxidação) e sais de amônia e com a presença de oxigênio, o que é fundamental para seu desenvolvimento (FAINE, 1982; FAINE et al., 1999).

As leptospiras são mais bem visualizadas em microscópio de campo escuro devido ao seu tamanho reduzido, no qual sua motilidade também pode ser observada (LEVETT, 2010). Elas possuem membrana dupla típica das espiroquetas, constituída por peptidoglicano, que estão proximamente associadas e são envolvidas pela membrana externa. Os lipopolissacarídeos presentes na membrana externa têm a composição similar a de outras bactérias gram negativas, porém possuem pouca atividade endotóxica (FAINE, 1982).

Até o final da década de 80, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies: *L. interrogans*, na qual estavam todas as cepas patogênicas; e *L. biflexa*, onde se encontravam as cepas saprófitas isoladas do ambiente. Nas duas espécies vários sorovares são identificados e classificados de acordo com anticorpos aglutinantes. A especificidade do sorovar é conferida pela composição e distribuição dos lipopolissacarídeo (LPS) da membrana, uma das partículas responsáveis pela antigenicidade. Sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos por conveniência dos testes sorológicos (FAINE, 1982; LEVETT, 2001; ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

Mais recentemente, estudos de características genéticas têm classificado o gênero em várias espécies, de acordo com seu genoma, sendo as 13 patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomoespécie 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L.*

terpstrae (genomoespécie 3), *L. weilii*, *L. wolffii*, com mais de 260 serovares e 6 não patogênicas: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomoespécie 5), *L. kmetyi*, *L. vanthielii* (genomoespécie 4), e *L. wolbachii* com mais de 60 sorovares. (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

A classificação molecular ainda é problemática para a microbiologia clínica, pois é claramente incompatível com o sistema de sorogrupos, no qual se baseia o teste padrão (SAM), que há anos tem servido a clínicos e epidemiologistas (LEVETT 2001).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O contágio ocorre mais frequentemente pelo modo indireto, pelo contato com água ou solo contaminados, sendo o contaminante de maior relevância é a urina, e a porta de entrada das bactérias no hospedeiro são as mucosas ou pele lesionada. O contato direto com secreções e tecidos de animais infectados é importante na transmissão da doença em rebanhos (FAINE, 1982; FAINE, 1999) e também para os profissionais que lidam com animais, como por exemplo, os médicos veterinários, trabalhadores de salas de ordenha em fazendas leiteiras, trabalhadores de matadouros e açougues, caçadores e tratadores de animais em geral (LEVETT, 2010). A transmissão depende de muitos fatores, incluindo o clima, a densidade populacional e o grau de contato entre animais portadores e suas secreções (LEVETT, 2001).

A transmissão venérea da leptospirose em bovinos já foi mundialmente confirmada (KIKTENKO et al. 1976 ; MASRI et al. 1997) podendo se disseminar por meio da distribuição de sêmen contaminado. A transmissão transplacentária também é descrita entre os animais (BRASIL, 1995). Dessa forma, a via venérea, transplacentária e mamária ou até o hábito de limpeza da genitália, escroto e tetas entre os animais podem constituir em rotas importantes de transmissão do agente (GUIMARÃES et al., 1982).

Com a difusão da técnica de inseminação artificial o sêmen contaminado se tornou importante via de transmissão de doenças uma vez que um único touro infectado é capaz de produzir inúmeras doses de sêmen contaminadas. A disseminação da leptospirose por meio da monta natural também acontece, porém na monta natural ocorre a inativação do agente infeccioso devido ao sêmen sofrer

ação dos anticorpos inespecíficos da mucosa vaginal da fêmea. Já na inseminação artificial, o sêmen é colocado na cérvix ou na mucosa uterina, nesses locais as defesas são menos eficientes, com mais chances de ocorrer infecção (LANGENEGGER, 1993). No Canadá não comercializam o material de animais que apresentem título igual ou maior a 1/100 na sorologia, com o intuito de evitar propagação da doença (MASRI, 1997).

Epidemiologicamente os ratos se destacam como reservatórios naturais e vetores de importância da leptospirose em meios urbanos. Já no meio rural o rato apesar de ter sua importância como fonte de infecção para o rebanho e o homem, não é o principal, visto que dentro de uma propriedade de criação de bovinos são os próprios animais infectados que disseminam a bactéria por meio de secreções, sendo os principais reservatórios da doença nesses locais (VASCONCELLOS et al., 1997; FAINE, 1999).

Os diferentes sorovares de *Leptospira* spp. podem infectar qualquer espécie animal. Entretanto, cada sorovar possui a tendência de se manter em um hospedeiro específico como ocorre nas associações estabelecidas entre o cão doméstico e o sorovar Canicola, o suíno e o sorovar Pomona, o bovino e o sorovar Hardjo, o eqüino e o sorovar Icterohaemorrhagiae (FAINE, 1999). O sorovar Hardjo, adaptado aos bovinos é observado em rebanhos ao redor do mundo e contempla dois subtipos: Hardjobovis e Hardjoprajitno pertencentes as espécies *Leptospira borgpetersenii* e *Leptospira interrogans* (FAINE, 1999; ELLIS, 1994).

O hospedeiro infectado por um sorovar adaptado (hospedeiro natural), não desenvolve ou apresenta forma discreta da doença, mas torna-se portador renal por longo período de tempo. Já os animais infectados por um sorovar não adaptado (hospedeiros acidentais) podem apresentar sintomas graves, embora a fase de portador renal, na convalescência, ocorra por período curto (VANASCO et al., 2003).

Os animais infectados podem eliminar leptospirosas por meio da urina durante meses e até anos tornando-se portadores e transmissores da doença no rebanho, fase essa denominada de leptospiúria (ELLIS, 1994). A prevalência da leptospirose em todo o país é alta, de acordo com os resultados do estudo realizado por Favero et al. (2001) os percentuais de animais reativos para pelo menos uma variante sorológica de *Leptospira* spp. no Brasil é, em média; 37,94%.

A pesquisa de Favero et al. (2001) abrangeu 1920 propriedades pertencentes a 540 municípios de 21 estados brasileiros. Nesse estudo, as amostras de soro dos

animais foram analisadas por meio da SAM. Em todos os locais investigados foram encontrados animais sororreagentes com variações na faixa de 25, 2 a 38, 3 % nos estados de SC, CE, PR, DF, SP e PA; de 40,7 a 58,4% nos estados de PB, TO, RJ, MG, GO, RO, RN, PI, MA e AL e superior a 61,0% nos estados da BA, ES, MS e MT. Em 94,18% dos municípios foram observados animais reagentes a SAM, abrangendo todos os estados brasileiros pesquisados. Do total de propriedades investigadas, em 84,1% havia pelo menos um animal reagente.

Araújo et al. (2005) constataram que a leptospirose é uma doença endêmica entre bovinos de Minas Gerais e que o sorovar Hardjo é o de maior importância no estado. O conhecimento dos sorovares prevalentes e seus hospedeiros de manutenção é essencial para compreender a epidemiologia da doença, em qualquer região onde ela ocorra (LEVETT, 2001).

2.3 PATOGENIA

Assim que as leptospirosas penetram no corpo através da pele ou mucosas, elas circulam pela corrente sanguínea se multiplicando e atingindo os órgãos alvo. Para sua interação com o hospedeiro as bactérias utilizam lipopolissacarídeos (LPS) e suas proteínas de membrana externa (OMPs), que conferem a elas a imunidade. Essa fase é denominada de bacteremia com duração de até 7 dias (FAINE, 1982; FAINE et al., 1999; TUNG et al., 2009).

Durante esse período ocorrem danos no endotélio de pequenos vasos sanguíneos que podem sofrer severa vasculite com danos endoteliais, resultando em injúrias dos capilares, edema tissular, hemorragia e coagulação intravascular disseminada (CID). Geralmente, ocorre granulocitose leve, a icterícia ocorre principalmente em decorrência desses danos ao sistema circulatório (FAINE et al., 1999; TUNG et al., 2009).

Insuficiência renal ou distúrbios renais são consequências da colonização e replicação dos organismos nas células do epitélio renal. Deficiência aguda da função renal também pode causar decréscimo da filtração glomerular e hipóxia causado pela diminuição da perfusão nos rins. Miocardite, pericardite e disritmia são disfunções bem documentadas e podem ser resultado da hipoperfusão (FAINE, 1999; TUNG et al., 2009; LEVETT, 2010).

Manifestações hepáticas, do sistema nervoso central, ocular e genital também podem ocorrer. A replicação das bactérias nestes locais danificam variavelmente os tecidos acarretando diversas manifestações clínico-patológicas, desde um processo inaparente até formas mais graves. Ressalta-se que essas manifestações também dependem do sorovar infectante e da suscetibilidade do hospedeiro (FAINE, 1999; TUNG et al., 2009; LEVETT, 2010).

Os filamentos axiais e flagelo periplasmático conferem motilidade às bactérias, fator de virulência, que ajudam as leptospiras a alcançarem os órgãos de predileção (FAINE, 1999). Os lipopolissacarídeo e as proteínas de membrana externa (OMPs) são prováveis responsáveis pela interação das bactérias com o hospedeiro. Por meio das OMPs as leptospiras reconhecem a matriz extracelular dos mamíferos (ECM) ligando-se ao tecido do hospedeiro e assim escapando da resposta imune e invadindo os sistemas dos infectados (TUNG et al., 2009).

Os mecanismos pelos quais as leptospiras provocam a doença ainda não são bem entendidos, visto que são vários os fatores de virulência sugeridos. Assim os papéis que esses fatores exercem na patogênese ainda continuam incompreensíveis (LEVETT, 2001).

2.4 SINAIS CLÍNICOS

Os animais com leptospirose não apresentam sintomas característicos. Na fase aguda pode ocorrer febre, prostração, anorexia, icterícia. Esses sintomas progridem na medida em que vários sistemas vão sendo acometidos. Nessa etapa é comum a ocorrência de abortamentos, nascimento de bezerros debilitados e natimortos, além de mastite (FAINE, 1982; FAINE et al., 1999).

Na fase crônica a infecção se localiza nos rins podendo também estar no sistema reprodutor. Durante esse período os sintomas da doença podem não ser observados nos animais infectados dificultando o controle nos rebanhos (FAINE, 1982). Os machos podem apresentar inibição dos reflexos sexuais, perda na qualidade do sêmen, orquite e inflamação de glândulas anexas (KIKTENKO et al., 1976), no entanto é difícil a ocorrência desses sintomas.

2.5 DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico da leptospirose o exame mais utilizado é a SAM (soroaglutinação microscópica em campo escuro), sendo recomendado como padrão pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE, 2010). O teste consiste em detectar a presença de anticorpos específicos anti-leptospira por meio da reação de aglutinação entre o anticorpo e o antígeno (BRASIL, 1995).

Na fase precoce, as leptospiras podem ser visualizadas no sangue por meio de exame direto, de cultura em meios apropriados, inoculação em animais de laboratório ou detecção do DNA do microrganismo, pela técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR). A cultura somente se conclui (positiva ou negativa) após algumas semanas, garantindo apenas o diagnóstico retrospectivo (FAINE, 1999).

Na fase tardia, as leptospiras podem ser encontradas na urina, cultivadas ou inoculadas. Pelas dificuldades inerentes à realização dos exames anteriormente citados, os métodos sorológicos são consagradamente eleitos para o diagnóstico da leptospirose (FAINE, 1982; BRASIL, 1995; FAINE, 1999).

A SAM é amplamente utilizada em todo o mundo, porém seus inconvenientes podem ser apontados: como a necessidade de uma coleção de sorovares cultivados, pois a resposta imune é específica a cada sorovar; a manutenção dos sorovares e utilização das bactérias vivas para a realização do exame e ainda a dificuldade em se obter resultados concordantes entre os diferentes laboratórios por tratar-se de um teste com resultados subjetivos (WHO, 2008).

Além da SAM o ensaio imunoenzimático (ELISA) pode ser utilizado na detecção de anticorpos anti-leptospiras, utilizando principalmente os lipopolissacarídeos de leptospiras como antígenos, por serem os componentes mais presentes na membrana externa bacteriana. Numerosos ensaios têm sido desenvolvidos e são utilizados principalmente para a detecção de infecções recentes, no entanto animais que foram vacinados podem ser positivos em alguns ELISAs. Para realizar o ensaio imunoenzimático não é necessária a utilização de bactérias vivas, não trazendo riscos de infecção por manipulação, como ocorre na SAM (LEVETT, 2001; WHO, 2008).

A cultura e isolamento da *Leptospira* spp. confirmam o diagnóstico sorológico, entretanto o crescimento bacteriano é demorado e exige condições rigorosas (FAINE, 1999; LEVETT, 2001; LEVETT, 2010).

A PCR é um método direto de diagnóstico que consiste na detecção de um fragmento específico do DNA bacteriano, sendo de alta sensibilidade e especificidade. Pode ser realizada em diversas amostras clínicas contaminadas e é capaz de detectar pequenas quantidades de DNA e, diferentemente da cultura bacteriológica, não é necessário que as bactérias estejam viáveis além de ser mais sensível que a cultura. Muitos procedimentos de PCR para detecção de *Leptospira* spp. estão disponíveis, com pequenas diferenças entre eles, cada laboratório executa o que melhor se adapte as suas práticas rotineiras. Geralmente o teste da PCR na urina é mais confiável que o teste realizado em tecidos, uma vez que o processamento de amostras de tecido são mais difíceis e o material pode conter inibidores que inviabilizem a reação de amplificação e conseqüentemente possam produzir resultados falsos negativos (ERLICH et al., 1991; BOLIN e ALT, 1999; LEVETT, 2004).

Merien et al. em 1992 usaram um par de primers, Lep 1 e Lep 2, capaz de amplificar um fragmento de 331pb do DNA de *Leptospira* spp. conseguindo detectar o DNA da bactéria em diferentes fluidos corporais (urina, sangue e líquido cefalorraquidiano) contaminados experimentalmente e não contaminados. Os primers descritos por Merien et al. (1992) foram utilizados para amplificar fragmentos de *Leptospira* spp. em amostras diferentes das testadas pelos autores.

Vários autores a fim de detectar a presença do DNA das bactérias em amostras de sêmen bovino, testaram diferentes protocolos de extração, no material experimentalmente contaminado. O DNA de *Leptospira* spp. foi amplificado utilizando os primers Lep 1 e Lep 2 (HEINEMANN et al. 2000; DIAS et al. 2006; MAGAJEVISK e GIRIO, 2008).

A detecção de *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjobovis em sêmen foi realizada por MASRI et al. em 1997, na ocasião os autores desenvolveram pela primeira vez um protocolo de PCR para detecção da bactéria em sêmen bovino, utilizando primers inéditos descrito por MASRI.

2.6 CONTROLE E PROFILAXIA

Existem muitas medidas de prevenção e controle da leptospirose, sendo a vacinação a alternativa mais eficaz para controlar ou erradicar a doença em bovinos (ROLIM et al., 2012). É importante frisar a eficácia superior de se usar vacina elaborada com a sorovariedade específica prevalente na propriedade, no entanto no Brasil a maioria das vacinas disponíveis para comercialização não atendem a esse pré-requisito (ARAÚJO et al., 2005).

As diferentes vacinas existentes no mercado variam de eficácia e podem falhar. Em geral, a vacinação anual em rebanhos fechados ou área de baixa incidência, ou vacinação semestral em rebanhos abertos ou área de alta incidência, com bacterinas apropriadas, é a abordagem mais eficaz de controle, porém a imunização contra o sorovar Hardjo ainda se mostra deficiente (BOLIN e ALT, 1999).

Segundo Bolin e Alt (1999) a vacina monovalente para o sorovar Hardjo, obtém bons resultados na imunização dos animais e alivia os sinais clínicos, principalmente os ligados aos sistemas renal e reprodutivo, associados à doença. Os animais vacinados com esse tipo de vacina mostram reação imunológica mais eficiente que os não vacinados, impedindo a manifestação crônica da doença, que acarreta a permanência das bactérias nos tratos urinário e genital causando a eliminação do sorovar Hardjo (BOLIN e ATL, 1999; RODRIGUES et al. 2011.)

Além da imunização vacinal, outras medidas sanitárias podem ser adotadas para minimizar a propagação da leptospirose bovina, levando-se em consideração o manejo do gado. Os animais devem ser mantidos em quarentena antes de serem introduzidos nos plantéis e os doentes também devem ser isolados dos demais. A localização dos bebedouros é de grande importância para se evitar o contato do gado com água de lagoas ou tanques contaminados. Deve ser evitada a aglomeração de animais e ocupação de áreas habitadas por animais silvestres. O controle de roedores também deve ser realizado, principalmente nos locais de permanência dos animais. A realização de testes sorológicos regulares também é importante, assim como a higiene dos locais em que os grupos de risco permanecem (FAINE, 1982; FAINE et al., 1999).

A sanidade dos touros em uma propriedade deve ser assegurada uma vez que um reprodutor portador de *Leptospira* spp. pode eliminar as bactéria em seu sêmen, contaminando várias fêmeas em um rebanho. Em sêmen comercializado a

legislação brasileira preconiza o tratamento com antibióticos, pois as bactérias se mantêm viáveis mesmo no produto congelado (MAPA, 2006).

A leptospirose bovina não é uma doença de notificação compulsória no Brasil, e apesar de sua importância não há programas de controle organizados por órgãos e entidades públicas e nem privadas para se assegurar a sanidade animal. Dessa forma ocorre um desencontro de informações que distância a estimativa real de infecções no país (ARAÚJO et al., 2005). A conscientização a respeito dos prejuízos causados pela leptospirose é do interesse de todos, pois envolve não somente a economia, mas também a saúde animal e pública.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA da Universidade Federal de Uberlândia sob os protocolos nº 054/12 e 089/12.

3.2 CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL

Amostras de sêmen e testículo, de bovinos negativos sorologicamente para leptospirose, do acervo do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-FAMEV-UFU), foram disponibilizadas para que a contaminação experimental fosse realizada, com o intuito de avaliar a menor concentração de DNA bacteriano que a PCR pudesse detectar em sêmen e testículo e conseqüentemente certificar a eficiência da técnica.

Para a contaminação experimental utilizou-se o sorovar Hardjo, baseado-se em sua maior prevalência nos rebanhos do Estado de Minas Gerais (ARAUJO et al. 2005). As bactérias cresceram em meio de cultura EMJH (ELLINGHAUSEN e MCCULLOUGH, 1965) em estufa no LADOC-FAMEV-UFU e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer (FAINE, 1982) em microscópio de campo escuro (Axio Scope A.1 Carl Zeiss) em aumento de 100 vezes. Para melhor visualização das bactérias diluiu-se o meio de cultura a concentração final de 10^{-2} e as bactérias não foram inativadas para simular a contaminação natural.

O sêmen foi contaminado com as quantidades de 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 leptospiras por 1 mL de sêmen. Para contaminação do testículo utilizou-se fragmento de 2,5 gramas do material que foi macerado em solução fisiológica. Na solução macerada e distribuída em microtubos adicionou-se bactérias nas quantidades 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 por 1 mL de solução.

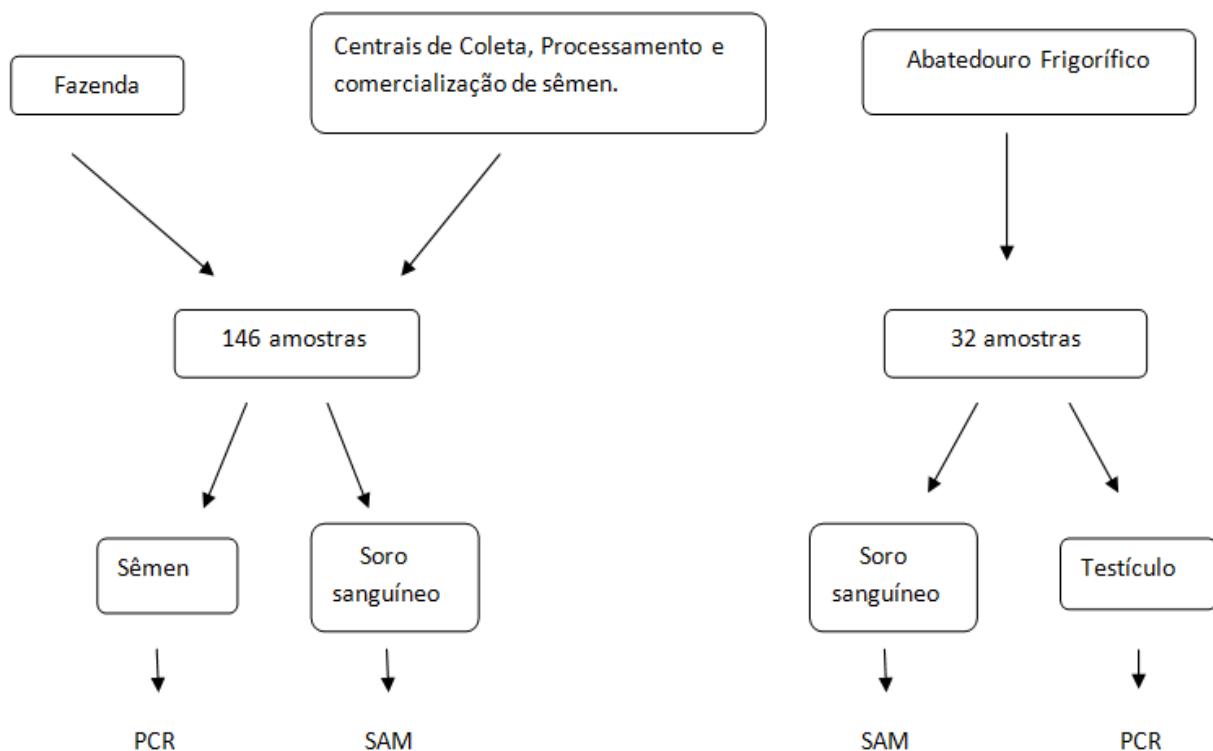
3.3 LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de sêmen bovino foram coletadas em fazendas de criação de touros e centrais de coleta, processamento e comercialização de sêmen. Amostras de testículos foram coletadas em Frigorífico exportador do Estado de Minas Gerais.

3.4 COLETA DAS AMOSTRAS

Para realização da pesquisa foram coletadas amostras de: a) 32 fragmentos de testículo de bovinos abatidos em frigorífico; b) sêmen de 146 touros residentes em centrais de coleta, processamento e comercialização de sêmen e em fazendas; e c) sangue dos respectivos animais, ilustrados na figura 1.

Figura 1 – Fluxograma de coleta e processamento de amostras de sêmen e testículo bovino.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As amostras foram identificadas de acordo com o reprodutor e local de origem. 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. As coletas de sêmen, testículo e sangue foram realizadas pelos locais citados de acordo com suas práticas rotineiras, independente de raça, aptidão reprodutiva. Embora a idade dos animais não fosse um critério de seleção, todos tinham mais de 20 meses de idade.

As amostras foram transportadas refrigeradas (de 2°C a 8°C) em recipientes esterilizados ao (LADOC-FAMEV-UFU), onde foram acondicionadas de acordo com o tipo de material.

3.4.1 Amostras de sangue

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular ou veia caudal dos animais das fazendas e das centrais de coleta, processamento e comercialização de sêmen. Nos animais provenientes do frigorífico o sangue foi coletado durante a sangria.

Todas as amostras foram coletadas em tubos esterilizados sem anticoagulante. Após a formação do coágulo o material foi centrifugado a 3.000 x g por 5 minutos para retirada do soro. Em seguida, as amostras de soro foram acondicionadas em microtubos e congeladas a -20°C até a realização dos exames.

3.4.2 Amostras de sêmen

As amostras de sêmen foram obtidas de acordo com as práticas rotineiras dos locais doadores, seguindo as normas preconizadas pelo Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal: CBRA (1998).

O material fresco foi acondicionado em microtubos e armazenado a -80°C em ultrafreezer até o momento de análise. O número de amostras foi determinado, admitindo-se a prevalência de 41,3% no Estado de Minas Gerais (FAVERO et al., 2001) e considerando 92% de confiança, com base na estimativa da proporção populacional (THRUSFIELD, 2004):

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

$$n = \frac{1,96^2 \cdot 0,413 \cdot 0,587}{0,08^2}$$

n= 146 amostras

Onde:

n = tamanho da amostra baseado em uma população infinita.

P_{esp} = prevalência esperada.

d = precisão absoluta desejada.

3.4.3 Amostras de testículo

Os testículos foram coletados de animais abatidos, em matadouro frigorífico com serviço de inspeção federal de acordo com normas estabelecidas pelo MAPA. Durante a retirada do couro na linha de abate dos bovinos, fragmentos de aproximadamente 3,0 cm³ de 32 testículos foram retirados e armazenados congelados (-80°C) em ultrafreezer até a realização dos exames. As amostras foram coletadas sem alterar a rotina do frigorífico, assim a quantidade foi estabelecida pelo local.

3.5 TESTES DE DIAGNÓSTICO

3.5.1 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico realizado foi a soroaglutinação microscópica em campo escuro (SAM), seguindo orientações de Brasil (1995) com leitura em microscópio (Axio Scope A.1 Carl Zeiss) depois da incubação de 1 hora a 28 °C. Utilizou-se coleção de 14 sorovares (tabela 1) de *Leptospira* spp. cultivadas no LADOC-FAMEV-UFU.

Tabela 1 – Sorovares de *Leptospira interrogans*, utilizadas na SAM, de acordo com o sorogrupo pertencente.

| Sorogrupos | Sorovares |
|----------------------------|----------------------------------|
| <i>Australis</i> | Australis, Bratilava |
| <i>Autumnalis</i> | Autumnalis |
| <i>Bataviae</i> | Bataviae |
| <i>Canicola</i> | Canicola |
| <i>Grippotyphosa</i> | Grippotyphosa |
| <i>Hebdomadis</i> | Hebdomadis |
| <i>Icterohaemorrhagiae</i> | Copenhageni, Icterohaemorrhagiae |
| <i>Pomona</i> | Pomona |
| <i>Pyrogenes</i> | Pyrogenes |
| <i>Sejroe</i> | Hardjo, Wolffi |
| <i>Tarassovi</i> | Tarassovi |

3.5.2 Diagnóstico Molecular

3.5.2.1 Extração do DNA

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

Inicialmente transferiu-se 400 µL de cada amostra (sêmen total ou tecido macerado com solução fisiológica) para novos microtubos de plásticos (2,0 mL), onde foram acrescentados 800µL de tampão de extração [Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 25mM pH 8.0, NaCl 400mM; SDS 0,5% (p/v)]. As amostras foram agitadas em vórtex e mantidas em banho-seco a 65°C por 60 minutos, sendo agitadas suavemente a cada 10 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 15 µL de Proteinase k (10mg/mL) gelada em cada amostra permanecendo aquecidas por mais 60 minutos a 37°C em banho-maria.

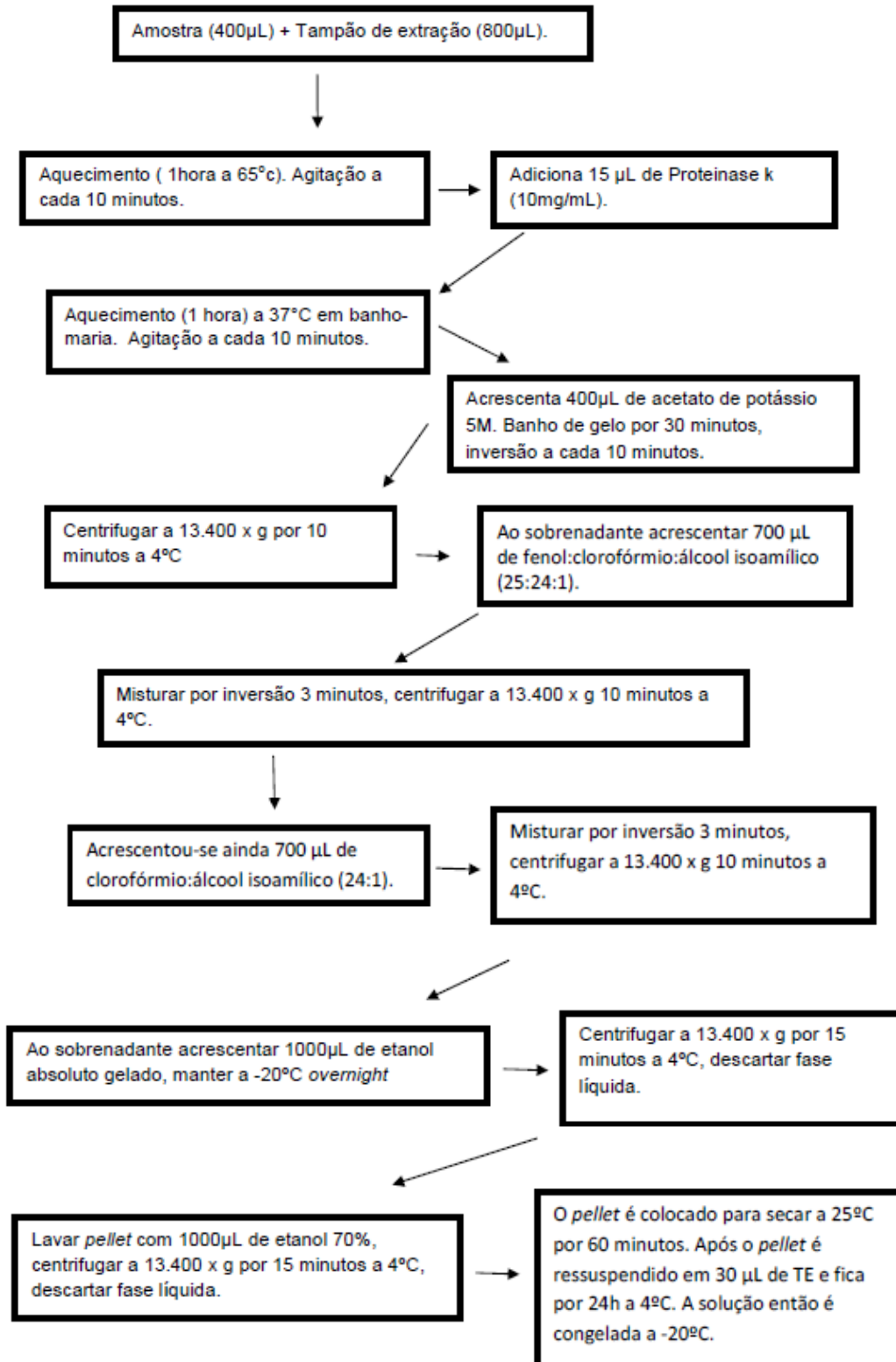
Adicionou-se 400µL de acetato de potássio 5M à solução que foi misturada por inversão. Nesta etapa, as amostras foram mantidas no gelo por 30 minutos,

invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos 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.

Acrescentou-se ainda 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após, as soluções foram misturadas por inversão durante três minutos e centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, a fase superior foi transferida para tubos 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 tubos 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. 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).

Figura 2 – Fluxograma do protocolo de extração de DNA de amostras de sêmen e testículo bovino.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5.2.2 Quantificação e Qualidade do DNA

Alíquotas da solução de DNA obtidas das amostras de sêmen e testículo, foram diluídas 1:1000 em água ultrapura obtida em aparelho Milli-Q-Millipore e submetidas à leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, em espectrofotômetro BIOMATE 3S (Thermo Scientific). A quantificação foi realizada para avaliar a concentração de DNA.

3.5.2.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para amplificação do fragmento de DNA de *Leptospira* spp. foram utilizados os *primers* Lep1 e Lep2 (Tabela 2), descritos por Merien et al. (1992),

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados na PCR para identificação de *Leptospira* spp.

| Primers | Sequência |
|----------------|---------------------------------|
| Lep1 | 5'GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG3' |
| Lep2 | 5'TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT3' |

O procedimento de amplificação foi realizado conforme o seguinte protocolo: tampão de reação 1X [200mM Tris-HCl pH 8.4; 500mM KCl;] 0,2mM de dNTPs [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]; MgCl₂ 2mM; primers Lep1/Lep2 5 pmol/μL; Taq DNA polimerase 5 U/μL; DNA total 6 μL; água MilliQ q.s.p. 20 μL. O volume final da solução para a amplificação foi de 20 μL, sendo 6 μL de amostra e 14 μL de mix. O programa utilizado no aparelho termociclador Select Cyclor (BioProducts) para amplificação do fragmento de DNA de *leptospira* spp. foi realizado conforme Tabela 3 (MERIEN et al., 1992).

Tabela 3 – Ciclo de temperatura utilizado para amplificação do fragmento de DNA extraído de *Leptospira* spp.

| Etapas da PCR | Tempo | Temperatura °C |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Desnaturação inicial | 3 minutos | 94°C |
| Desnaturação do DNA | 1 minuto – 29 x | 94°C |
| Hibridação | 1 minuto e 30 segundos – 29 x | 63°C |
| Extensão da cadeia de DNA | 2 minutos – 29 x | 72°C |
| Extensão final | 10 minutos | 72°C |

3.5.2.4 Análise do produto amplificado

A visualização do produto amplificado (8µL) foi realizada por meio da técnica de eletroforese em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,04 M Trisborato 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, 0,5µL/10mL. O gel foi submetido a voltagem constante de 6-7 V/cm e a visualização das bandas realizada em transluminador ultravioleta (SAMBROK et al., 2001).

As bandas foram comparadas com padrão de peso molecular (Invitrogen) com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases disposto 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 E DISCUSSÃO

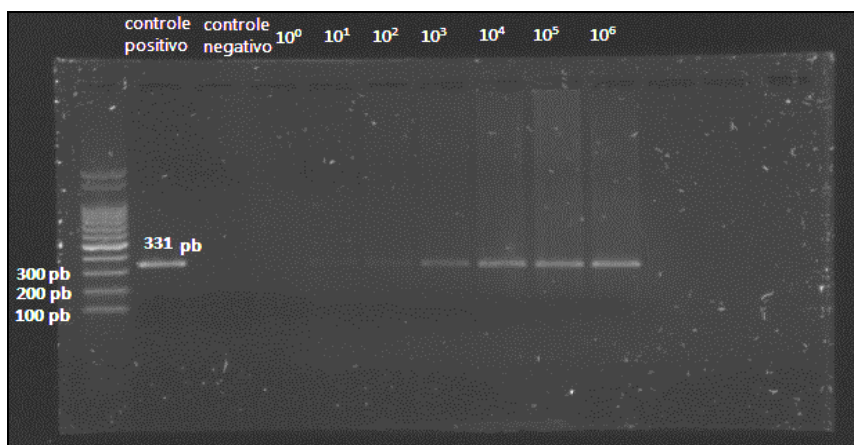
4.1 CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL

Na contagem do número de bactérias em câmara de Neubauer encontrou-se em média 1×10^7 leptospiros por mL de meio de cultura número encontrado também por Vinodh et al. (2008) em contagem em câmara de Petroff Hausser. Marinho et al. (2003) utilizando também a câmara de Neubauer para contagem, obtiveram a quantidade de 1×10^6 leptospiros por mL de meio de cultura e Veloso (1999) encontrou $1,14 \times 10^{10}$ leptospiros por mL. Lafetá (2006) obteve uma média de 1×10^9 bactéria por mL em contagem em câmara de Petroff Hausser.

Em condições favoráveis, o crescimento bacteriano é aproximadamente $1-5 \times 10^8$ leptospiros por mL de cultura, em 3 a 10 dias de incubação, inicialmente se tem uma densidade de 10^6 a 10^7 bactérias por mL em laboratórios convencionais (FAINE, 1982). Assim a cultura utilizada nessa pesquisa para a contaminação experimental de sêmen e testículo está entre os valores descritos.

A PCR demonstrou que a quantidade mínima de bactérias que a técnica pode detectar é de 10^3 em 1 mL de sêmen, mostrado na figura 3.

Figura 3 – Detecção do DNA de *Leptospira* ssp. extraído de sêmen bovino contaminado, por meio da PCR.



Fonte: Elaborada pelo autor. Coluna1: marcador de tamanho de fragmento de DNA (100pb); Coluna 2: controle positivo; Coluna 3: Controle negativo (mix sem DNA) ; Coluna 4: sêmen contaminado com 10^0 leptospiros por mL; Coluna 5: sêmen contaminado com 10^1 leptospiros por mL; Coluna 6: sêmen contaminado com 10^2 leptospiros por mL; Coluna 7: sêmen contaminado com 10^3 leptospiros por mL; Coluna 8: sêmen contaminado com 10^4 leptospiros por mL; Coluna 9: sêmen contaminado com 10^5 leptospiros por mL; Coluna 10: sêmen contaminado com 10^6 leptospiros por mL.

A quantidade de bactérias detectadas nesse estudo foi semelhante ao encontrado por Magajevski e Gírio (2008). Na pesquisa Magajevski e Gírio (2008) além de determinar o limiar de detecção do DNA de *Leptospira* spp. eles testaram quatro diferentes técnicas de extração de DNA: lise enzimática com proteinase K, terra diatomácea, lise por fervura-fenol e DNAzol e concluíram que o menor limiar de detecção era dado pela técnica de lise enzimática com proteinase K, mesmo método que foi utilizado na presente pesquisa.

Diferentes técnicas de extração também foram testadas por Vinodh et al. (2008) para se determinar o limiar de detecção mais apurado. Aplicou-se os métodos de extração por fervura, fenol clorofórmio, DNAzol e um Kit comercial (AuPreP) em cultura pura de leptospira, o método de extração por fervura foi o menos eficiente detectando 10^3 bactérias e os outros detectaram número menor 10^2 . Posteriormente as técnicas foram empregadas na extração em sêmen.

A extração do DNA de leptospira, em sêmen contaminado com diferentes quantidades de bactéria, só foi possível com o uso do Kit comercial (AuPreP) e detectou-se 10^3 bactérias no fluido, igual ao limiar encontrado no presente trabalho. Heinemann et al. (2000) obtiveram limiar de detecção menor, de 10^2 bactérias por mL de sêmen, e observaram ainda que o limiar de detecção obtido era menor que o limiar detectado em sêmen quando cultivado, sendo esse de 10^3 bactérias por mL de cultura.

Dias et al. (2006) assim como Heinemann et al. (2000) detectaram DNA de leptospiros em sêmen experimentalmente contaminado na concentração de 10^2 bactérias por mL, quando o DNA era visualizado por meio da eletroforese capilar fluorescente. Quando visualizado por eletroforese em gel de agarose 2% o limiar de detecção foi de 10^4 bactérias por mL de sêmen.

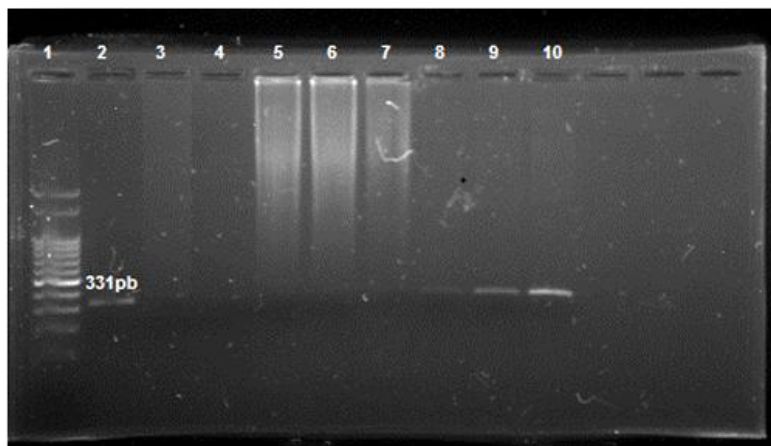
Em 2012 Dias et al. observaram a superioridade da eletroforese capilar fluorescente na visualização de DNA amplificado quando comparado a eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Na ocasião os autores testaram a PCR multiplex em sêmen bovino contaminado experimentalmente com quatro espécies bacterianas; *Campilobacter fetus*, *Haemophilus somnus*, *Leptospira interrogans* sorovar pomona e *Brucella abortus*. A PCR detectou DNA das quatro bactérias simultaneamente nas diluições de 10^0 , 10^1 e 10^2 bactérias por mL de sêmen, quando visualizada em gel de poliacrilamida 8% e de 10^0 , 10^1 , 10^2 e 10^3 bactérias por mL de sêmen quando visualizada em eletroforese capilar fluorescente.

É importante atentar-se para as técnicas adotadas para a extração do DNA como também para as técnicas da PCR e visualização do material genético, pois pode-se observar mudanças nos resultados e limiares na detecção de DNA bacteriano de acordo com as técnicas utilizadas (MASRI et al. 1997; MAGAJEVSKI e GIRIO, 2008).

Como o sêmen é um material com muitos inibidores que dificultam o processo de extração do DNA bacteriano e conseqüentemente a PCR a contaminação experimental se dá de forma essencial para se assegurar a eficiência das técnicas escolhidas. Com o resultado obtido acredita-se que a técnica é capaz de detectar o DNA de *Leptospira* spp. em sêmen puro, pois tanto a extração de DNA quanto a PCR foram eficientes.

No testículo macerado e contaminado a quantidade mínima detectada pela PCR foi de 10^5 bactérias em 1 mL de solução (figura 4). Até onde se sabe não existem estudos relatando o limiar de detecção de DNA de leptospiros, por meio da PCR, em testículos bovinos contaminação experimental com as bactérias.

Figura 4 – Detecção do DNA de *Leptospira* spp. extraído de testículo bovino contaminado, por meio da PCR.



Fonte: Elaborada pelo autor. Coluna1: marcador de tamanho de fragmento de DNA (100pb); Coluna 2: controle positivo; Coluna 3: Controle negativo (mix sem DNA) ; Coluna 4: testículo contaminado com 10^0 leptospiros por mL; Coluna 5: testículo contaminado com 10^1 leptospiros por mL; Coluna 6: testículo contaminado com 10^2 leptospiros por mL; Coluna 7: testículo contaminado com 10^3 leptospiros por mL; Coluna 8: testículo contaminado com 10^4 leptospiros por mL; Coluna 9: testículo contaminado com 10^5 leptospiros por mL; Coluna 10: testículo contaminado com 10^6 leptospiros por mL.

4.2 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Dos 146 animais, provenientes das fazendas e das centrais de coleta e processamento de sêmen, submetidos à SAM, 35 (23,97%) foram reagentes a um ou mais sorovares de *Leptospira* spp. A porcentagem encontrada ficou abaixo do esperado baseando-se na prevalência de 41,3% descrita por Favero et al. (2001) para o Estado de Minas Gerais. Os sorovares observados entre os animais sororreagentes foram: Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Grippytyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Wolffi, melhor discriminados na Tabela 4.

Tabela 4 – Frequência de bovinos reagentes aos sorovares de *Leptospira* spp. encontrada na SAM, de acordo o título sorológico.

| Sorovares | Título sorológico | | | | | Total |
|---------------------|-------------------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|
| | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 | |
| Australis | - | - | - | 2 | - | 2 |
| Autumnalis | 1 | - | 1 | - | - | 2 |
| Bataviae | - | - | 2 | - | - | 2 |
| Bratislava | 1 | - | - | - | - | 1 |
| Grippytyphosa | - | - | 3 | - | - | 3 |
| Hardjo | 5 | 13 | 5 | 2 | - | 25 |
| Hebdomadis | 6 | 1 | - | - | - | 7 |
| Icterohaemorrhagiae | - | 1 | - | - | - | 1 |
| Wolffi | 11 | 7 | 3 | - | - | 21 |
| Total | 24 | 22 | 14 | 4 | - | 64 |

A distribuição dos sorovares está próximo ao descrito na literatura, sendo o sorovar Hardjo o de maior prevalência 25 (39,06%), o sorovar Wolffi também teve uma alta prevalência 21 (32,81%). É importante considerar a possibilidade de reação cruzada devido a relação íntima entre esses dois sorovares, conferida pela distribuição dos lipopolissacarídeos (LPS) de suas membranas celulares. Das 21 amostras em que o sorovar Wolffi foi reagente, 15 delas também reagiram para o sorovar Harjo.

De acordo com Favero et al. (2001) no Brasil o sorovar Harjo é o sorovar de maior prevalência nos rebanhos bovinos com 55,5% de ocorrência seguido pelo sorovar Wolffi com 24,2%; no Estado de Minas Gerais essa prevalência é de 59,6% e 13,3% para os sorovares citados respectivamente sendo os de maior ocorrência. Araújo et al. (2005) pesquisaram aglutininas anti-leptospira em 47 % dos municípios do Estado e encontraram 19,7% de Hardjo e 13,2% de Wolffi. Demonstrando a relevância do sorovar Hardjo nas leptospiroses em bovinos em Minas Gerais.

Segundo Bolin et al. (1989) a ocorrência da infecção e transtornos reprodutivos causados pelo sorovar Hardjo podem ser diminuídos com a vacinação contra a leptospirose, mesmo o animal não apresentando níveis significativos de anticorpos aglutinantes. Assim conclui-se que a vacinação seria uma forma de controle da doença nos locais de origem das amostras uma vez que o sorovar Harjo foi o de maior ocorrência.

A prevalência dos demais sorovares encontrada na pesquisa foi de 2 (3,12%) Australis, 2 (3,12%) Autumnalis, 2 (3,12%) Bataviae, 1 (1,56%) Bratislava, 3 (4,68%) Grippytyphosa, 7 (10,93%) Hebdomadis e 1 (1,56%) Icterohaemorrhagiae. Araujo et al. (2005) detectaram em Minas Gerais menos de 1% dos sorovares Australis, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae e Grippytyphosa. O sorovar Hebdomadis foi detectado em 1,7% dos animais, os sorovares Bataviae e Bratislava 4,9% e 5,9% respectivamente.

Favero et al. (2001) detectaram o sorovar Pomona como o terceiro de maior prevalência no Estado 5,1%, diferente do que ocorreu nessa pesquisa, pois o sorovar em questão não foi detectado nas amostras testadas. Sendo os sorovares Hardjo e Wolffi de maior ocorrência observa-se a variação dos demais sorovares, porém todos eles ocorrem sem grande significação nos rebanhos brasileiros.

A titulação de maior ocorrência, 24 (37,5%), foi a de 1/100, esse título poderia ser considerado como vacinal, no entanto não havia registro de vacinação nos locais de origem das amostras. Todos os animais doadores de amostras estavam em serviço, fato que nos leva a deduzir que eles não apresentavam sintomatologia da doença.

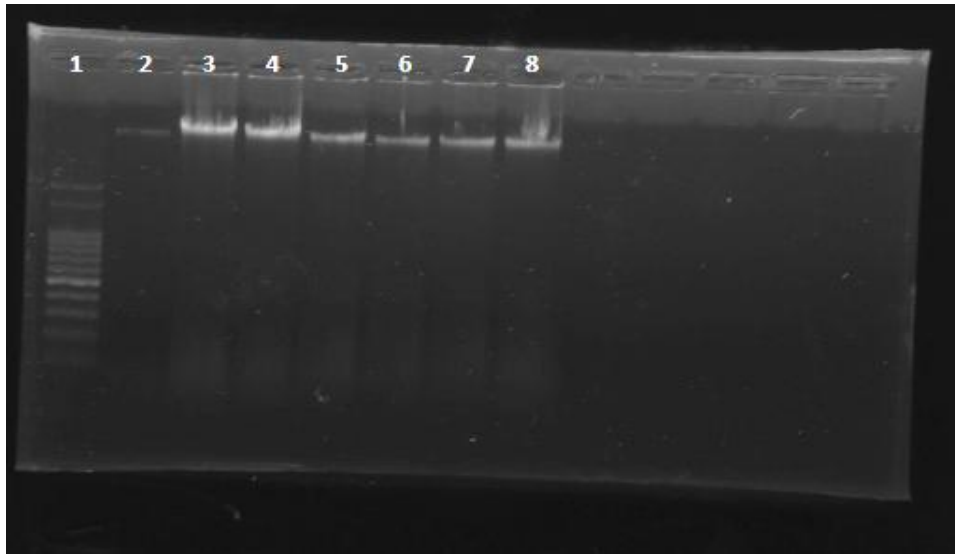
Vale levar em consideração o fato de a titulação não estar intimamente relacionada à condição de doente e nem a eliminação de *Leptospira* spp. via sêmen (ELLIS et al. 1986; MASRI, 1997; FAINE, 1999; WHO, 2008).

Das amostras de 32 animais provenientes do frigorífico nenhum foi reagente para *Leptospira* spp. na SAM.

4.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A qualidade do DNA total extraído do sêmen e testículo de bovinos pode ser visualizada na figura 5, certificando a eficiência do protocolo de extração utilizado.

Figura 5 – DNA total extraído de amostras de sêmen e testículo de bovinos.



Fonte: Elaborada pelo autor. Coluna1: marcador de tamanho de fragmento de DNA (100pb); Colunas 2, 3, 4, 5: amostras extraídas de sêmen; Colunas 6, 7, 8: amostras extraídas de testículos.

Das 146 amostras de sêmen que se realizou a PCR em nenhuma foi detectado o DNA de *Leptospira* spp. Para extração e amplificação utilizou-se o mesmo procedimento realizado no material contaminado experimentalmente, assim sugere-se que as amostras de sêmen testadas estavam livres de DNA de *Leptospira* spp. ou a quantidade de bactérias no fluido era menor que 10^3 leptospiras por mL.

Em pesquisa Magajeski et al. (2005) também não detectaram DNA de leptospira em sêmen bovino, mesmo esses animais sendo sorologicamente reagentes, com títulos superiores a 1/200. Vinodh et al. (2008) analisaram 40 amostras de sêmen, bovino provenientes de diferentes locais, e não identificaram DNA de leptospira em nenhuma delas. Fuverki (2010) também não obteve sucesso ao padronizar kit para extração de DNA em sêmen comercial, pois o DNA da leptospira não foi detectado e conseqüentemente não foi possível realizar a PCR para pesquisa de DNA desse agente no material.

A PCR apesar de amplamente utilizada para detecção de agentes infecciosos em sêmen, nem sempre aponta os resultados esperados, como ocorreu na presente pesquisa. Acredita-se que os bovinos com títulos de 1/200, 1/400 e 1/800 estão infectados, e o esperado de acordo com a literatura era a existência de leptospiras em sêmen *in natura* desses animais, porém mesmo nos animais com títulos superiores a 1/200 não foi detectado o material genético da bactéria.

Pode-se explicar o ocorrido pelo fato dos touros não eliminarem bactérias no sêmen na fase aguda da infecção por leptospiras, mesmo quando esses animais apresentam orquite (ELLIS et al., 1986). Assim há a possibilidade das bactérias, mesmo presentes no aparelho reprodutor, não serem eliminadas via sêmen dos animais testados mesmo quando esses eram sororreagentes.

A possibilidade da transmissão da leptospirose via sêmen foi analisada por Gale e Kingscote (1989), para isso os autores utilizaram sêmen de um touro sororreagente para leptospirose com títulos variando entre 1/100 e 1/800, durante o período de experimentação. O sêmen coletado foi utilizado para inseminar artificialmente vacas livres das bactérias, no entanto após os testes de cultura e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em urina, rins e trato reprodutivo (tubas uterinas, fetos de fêmeas grávidas, e os úteros das fêmeas não grávidas), observaram que nenhuma das 8 vacas foram infectadas por meio do sêmen contaminado. Em sorologia também não foram observados títulos maiores que 1/100.

Em pesquisa de DNA de leptospiras em sêmen por meio da PCR, Masri et al. (1997) detectaram a presença das bactérias no material de animais infectados experimentalmente, mesmo nos sorologicamente não reagentes, demonstrando um desencontro entre os resultados da sorologia (SAM) e da PCR. Assim a relação entre sorologia e transmissão venérea da leptospirose torna-se obscura.

Heinemann et al. (1999) analisaram amostras de 20 touros residentes em centrais de processamento e comercialização de sêmen do Estado de São Paulo e encontraram DNA de leptospira, por meio da PCR, em 16 (80 %) dessas, sendo que em 7 a SAM não detectou anticorpos anti-leptospiras. Da mesma forma que ocorreu no estudo de Masri et al. (1997) que detectaram animais PCR positivo e SAM negativo.

Os animais durante a fase de leptospirúria eliminam leptospiras na urina durante grandes períodos, que podem ir de meses a anos, favorecendo a

contaminação do sêmen desses animais nessa fase, pois há possibilidade do fluido ser contaminado durante sua passagem pela uretra de animais infectados, visto que urina e sêmen compartilham o mesmo ducto excretor (SLEIGHT e WILLIAMS 1961; FAINE, 1999).

Masri et al. (1997) e Heinemann et al. (1999) detectaram DNA de *Leptospira* spp. em sêmen de animais negativos na SAM sugerindo ser a PCR mais eficiente na detecção de animais infectados. Porém nessa pesquisa podemos observar que a SAM detectou animais infectados e os resultados da PCR não confirmaram a presença da infecção nesses animais. Assim é necessário cautela no uso da técnica da PCR e atentar-se para a importância de se associar métodos de diagnósticos para a obtenção de resultados precisos.

Não foi encontrado material genético de *Leptospira* spp. nas 32 amostras de testículo. De acordo com limiar de detecção da técnica realizada os animais com 10^5 ou mais leptospiras por mL de testículo macerado teriam seu DNA constatado, porém o processamento de amostras de tecido são mais difíceis e o material pode conter inibidores que inviabilizem a reação de amplificação (BOLIN e ALT, 1999).

A presença de DNA em rins de bovinos, por meio da PCR foi observada por Corrêa et al. (2013) em 16 amostras, das 200 analisadas. As amostras eram provenientes de animais abatidos em matadouro frigorífico. Nenhum teste padrão, SAM ou cultura, foi realizado, não sendo possível analisar a sensibilidade da técnica.

Em 2011 Mineiro e colaboradores realizaram a PCR em amostras de urina e de rins de 40 bovinos, sendo 20 deles positivos e 20 negativos na sorologia. A PCR na urina coincidiu com os resultados sorológicos, já na técnica realizada em rins dos 20 animais reagentes na SAM apenas 10 foram positivas na PCR, confirmando a dificuldade da técnica em tecidos.

Magajevski et al. (2007) pesquisaram a presença de DNA de *Leptospira* spp. em tecidos de fetos bovinos de 3 a 7 meses. Algumas das amostras de rim e fígado foram positivas na PCR quando a técnica foi realizada em meio de cultura cultivado com os tecidos. A PCR não obteve resultado semelhante quando aplicada diretamente nos tecidos, sem intermédio da cultura. No presente trabalho também não foi possível detectar DNA de *Leptospira* spp. por meio da PCR realizada diretamente em testículo.

5 CONCLUSÕES

-A técnica utilizada para a extração de DNA de *Leptospira* spp. tanto em sêmen quanto em testículo contaminados experimentalmente mostrou-se eficiente, assim como a PCR.

-Porém em amostras de animais naturalmente infectados a técnica precisa ser aperfeiçoada, pois não os identificam. Há ainda a possibilidade das leptospiros não serem eliminadas via sêmen, ou não estarem sendo eliminadas no momento da coleta das amostra, podendo não trazer riscos de transmissão venérea da doença.

REFERÊNCIAS

ADLER, B; MOCTEZUMA, A. L. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v. 140, p. 287-296, 2010.

ALTHOUSE, G. C; ROSSOW, K. The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine. **Reproduction in Domestic Animals**, [s.l.], v. 46, p. 64-67, 2011.

ARAÚJO, V. E. M. et al. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 430-435, 2005.

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.

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.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. **Bovine Practice**, [s.l.], v.33, n.1, p. 50-55, 1999.

BOLIN, C. A. et al. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection on pregnant cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 50, n. 1, p.161-165, 1989.

BONDURANT, R. H. Venereal diseases of cattle: Natural history, diagnosis and the role of vaccines in their control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, [s.l.], v. 21, p. 383-408, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de controle de zoonoses e animais peçonhentos.

Manual de Leptospirose. 2. ed. Brasília, 1995. 98p.

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

CORRÊA, J. M. X. et al. Investigação molecular de *Leptospira* spp. em rins de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 1-6, 2013.

DIAS, F. E. F. et al. Detecção de *Leptospira pomona* em sêmen bovino por eletroforese capilar fluorescente. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 394-399, 2006

DIAS, F. E. F. et al. PCR Multiplex fluorescente para detecção de bactérias em sêmen bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 32, n. 3, p. 211-216, 2012.

ELLINGHAUSEN, Jr. H. C; McCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American Journal of Veterinary Research**, [s.l.], v.26, p.45-51, 1965.

ELLIS, W. A; CASSELS, J. A; DOYLE, J. Genital leptospirosis in bulls. **Veterinary Record**, London, v. 118, n. 12, p.333, 1986.

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

ERLICH, H. A; GELFAND, D, SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science Classic**, Washington DC, v. 21, n. 252, p. 1643-1651, 1991.

FAVERO, M. et al. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospires**. 2 ed Geneva: World Health Organization. 1982.

FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2 ed. Melbourne, Australia: Medisci; 1999. 272p.

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.

GALE, S. P, KINGSCOTE, B F. Failure of a seropositive bull to transmit *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection to heifers. **Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 30, n. 1, p. 65–67, 1989.

GALLI, C. et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 599-616, 2003.

GIRIO, T. M. S. et al. Uso de estreptomicina na eliminação da leptospirose em touros (*Bos taurus indicus*) naturalmente infectados pelo sorovar hardjo. **Arquivo do Instituto de Biologia**, [s.l.], v. 72, n.2, p. 161-170, 2005.

GUIMARÃES, M. C. **Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e o seu controle terapêutico**. 1982, 50p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

HAMOND, C. et al. Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s.l.], p. 1-3, 2013.

HEINEMANN, M. B. et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 261-267, 2000.

HEINEMANN, M. B. et al. Detection of Leptospire in bovine semen by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 32-34, 1999.

KEE, S. et al. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.4, p.1035 –1039, 1994.

KIKTENKO, V. S; BALASHOV, N. G; RODINA, V. N. Leptospirosis infection through insemination of animals. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, Prague, v. 20, n. 2, p. 207-213, 1976.

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

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Veterinary**, [s.l.], v.14, p.296-326, 2001.

LEVETT, P.N. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**. Saskatchewan, Canada, v. 4, n. 6, p. 435-448, 2004.

LEVETT, P. N; HAAKE, D. A.; *Leptospira* species (leptospirosis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. **Principles and Practice of Infectious Diseases**, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; p. 3059-3065, 2010.

LILENBAUM, W. et al. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, [s.l.], v. 69, p. 837-842, 2008.

MAGAJEVSKI, F. S. et al. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 434-437, 2005.

MAGAJEVSKI, F. S; GIRIO, R. J. S; MEIRELLES, R. B. Pesquisa de *Leptospira* em feto de vacas abatidas no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, p. 67-72, 2007.

MAGAJEVSKI, F. S; GIRIO, R. J. S. Avaliação da sensibilidade da PCR frente a quatro técnicas para extração de DNA de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona em sêmen bovino experimentalmente contaminado. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 29-33, 2008.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

Instrução Normativa SDA Nº 8, 2006. Disponível em: <
<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 19 jan 2012.

MARINHO, M. et al. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos em geneticamente selecionados para bons e maus respondedores de anticorpos e balb/c, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 23, p. 5-12, 2003.

MASRI, S. A. et al. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.61, n.1, p. 15-20, 1997.

MÉRIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.9, p.2219-2224, 1992.

MINEIRO, A. L. B. B. et al. Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n.10, p. 859-866, 2011.

OIE - Organização Mundial de Sanidade Animal. Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Healthstandards/tahc/2010/enchapitre1.1.3>.

Acesso em: 16/03/2012.

RODRIGUES, R. O. et al. Comparação entre a imunidade induzida em bovinos vacinados com bacterinas polivalentes comerciais e uma monovalente experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 31, p. 10-16, 2011.

ROLIM, M. B. Q. et al. Leptospirose em bovinos: revisão. **Medicina Veterinária**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 26-31, 2012.

SAMBROK, J; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ªed.Londres: CSHL Press, 2001. 1448p.

SIEGEL, S; CASTELLAN JUNIOR, N. J. **Estatística Não-Paramétrica para Ciências do Comportamento**. 2. ed. Penso, 2006. 448p.

SLEIGHT, S. D; WILLIAMS, J. A. Transmission of bovine leptospirosis by coition and artificial insemination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 138, p. 151 – 152, 1961.

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

TUNG, JY. et al. Calcium binds to LipL32, a lipoprotein from pathogenic *Leptospira*, and modulates fibronectin binding. **The journal of biological chemistry**. Published online. 2009. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2823465>. Acesso em 19 de Janeiro de 2013.

VANASCO, N. B. et al. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, [s.l.], v. 60, p. 227–235, 2003.

VASCONCELLOS, S. A. et al. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, período de janeiro à abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.7-15, 1997.

VELOSO, I. F. **Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD-PCR) na detecção e identificação de Leptospira sp.** 1999, 60p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

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

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WHO). Leptospirosis. In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)**, Cap. 2.1.9, p. 251-264, 2008.

ANEXO A



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 188/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 054/12

Projeto Pesquisa: "Identificação de DNA de *Brucella abortus* e *Mycobacterium bovis* em vísceras de bovinos abatidos em Frigorífico Exportador".

Pesquisador Responsável: 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. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

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, 13 de setembro de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO B



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 126/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 089/12

Projeto Pesquisa: "Pesquisa de aglutininas anti-leptospira spp. em soro e identificação do DNA de Leptospira spp. em sêmen bovino".

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros

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