

Investigação do DNA de *brucella abortus* em sêmen de touros de centrais de inseminação artificial

Detection of Brucella abortus DNA in bull semen from artificial insemination centers

TIAGO HENRIQUE GONÇALVES
Discente de Medicina Veterinária (UNIPAM)
thg030321@unipam.edu.br

MARIANA ASSUNÇÃO DE SOUZA
Professora orientadora (UNIPAM)
marianaa@unipam.edu.br

LUIZ FLAVIO NEPOMUCENO DO NASCIMENTO
Professor coorientador (UNIPAM)
luiznepomuceno@unipam.edu.br

Resumo: A brucelose bovina é uma zoonose de grande impacto na pecuária, podendo comprometer a reprodução e a qualidade do sêmen em centrais de inseminação artificial. Objetivou-se com este estudo investigar a presença do DNA de *Brucella* sp. em sêmen de touros pela técnica de qPCR e identificar anticorpos anti-*Brucella abortus* no plasma seminal por meio da técnica de sêmen plasma aglutinação (SPA) com antígeno acidificado tamponado (AAT). Todas as amostras foram negativas na qPCR, enquanto uma apresentou reatividade no teste de SPA. Esses achados reforçam a importância da associação de diferentes métodos diagnósticos para uma detecção mais precisa da brucelose. Concluiu-se que a adoção de protocolos abrangentes de biossegurança e vigilância sanitária é essencial para a prevenção da brucelose em rebanhos de reprodução assistida.

Palavras-chave: brucelose; bovinos; sêmen; plasma; aglutinação.

Abstract: Bovine brucellosis is a zoonosis with a significant impact on livestock production, potentially compromising reproduction and semen quality in artificial insemination centers. This study aimed to investigate the presence of *Brucella* spp. DNA in bull semen using the qPCR technique and to identify anti-*Brucella abortus* antibodies in seminal plasma by means of the Seminal Plasma Agglutination (SPA) test with Buffered Acidified Antigen (AAT). All samples tested negative by qPCR, while one sample showed reactivity in the SPA test. These findings reinforce the importance of combining different diagnostic methods for more accurate detection of brucellosis. It was concluded that adopting comprehensive biosafety and sanitary surveillance protocols is essential for preventing brucellosis in herds used for assisted reproduction.

Keywords: brucellosis; cattle; semen; plasma; agglutination.

1 INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma zoonose causada pela bactéria *Brucella abortus*, que infecta primariamente bovinos e bubalinos, assim como o humano, sendo que os maiores prejuízos ocorrem na bovinocultura do país, em função da extensão dos rebanhos brasileiros (Brasil, 2006). Por apresentar graves problemas na saúde pública, sobretudo pelo caráter ocupacional, os bovinos infectados são fontes de infecção para pessoas e outros animais (Freitas *et al.*, 2001; Megid *et al.*, 2016). Por ser uma zoonose de distribuição universal, acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos, com manifestações nos animais, como abortos, nascimentos prematuros, esterilidade e diminuição na produção de leite e carne (Brasil, 2006).

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), 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 (Herrán-Ramírez *et al.*, 2022).

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 cumpram os requisitos sanitários mínimos para a produção e a comercialização de sêmen bovino e bubalino no país. Essa resolução estabelece exigências para o touro doador quanto à pré-quarentena e à quarentena para ingresso no CCPS, controle do rebanho residente e adição de antibióticos ao processamento de sêmen (MAPA, 2006).

Em busca de maior qualidade, 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, assim mostrando a importância do controle sanitário no sêmen (Barcelos *et al.*, 2009). 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 (ASBIA, 2012).

A contaminação bacteriana do sêmen congelado pode afetar sobremaneira a fertilidade, pois, quando microrganismos 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. Assim, o diagnóstico desse patógeno no sêmen bovino 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. Diante disso, objetivou-se com este estudo detectar a presença do DNA de *Brucella* spp. no sêmen de touros de centrais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

O estudo foi realizado com amostras de sêmen de touros (*Bos taurus* e *Bos indicus*) provenientes de centrais de coleta de sêmen. Foram selecionadas três centrais de comercialização de sêmen bovino da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba em Minas Gerais. De cada estabelecimento foram adquiridas comercialmente cinco amostras de sêmen, independentemente de raça, aptidão reprodutiva e idade do animal. Cada amostra foi identificada de acordo com o reprodutor e dados como identificação da central produtora e número de registro dos touros foram mantidos em sigilo.

2.2 DELINEAMENTO AMOSTRAL

Para a determinação do tamanho da amostra (n), foi admitida uma prevalência esperada de 1% (Gonçalves *et al.*, 2009), nível de confiança de 95% e variação de 5%. A fórmula utilizada, segundo Thrusfield (2004), foi:

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

Nessa fórmula,

n = tamanho da amostra baseado em uma população infinita,

P_{esp} = prevalência esperada,

d = precisão absoluta desejada.

Substituindo os valores na fórmula:

$$n = \frac{1,96^2 0,01 (1 - 0,01)}{0,05^2}$$

n = 15 amostras

2.3 TESTES DE DIAGNÓSTICO

Em cada amostra de sêmen, foi realizado o exame para detecção de anticorpos anti-*Brucella abortus*, por meio do teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e exame para detecção do DNA de *Brucella* spp, o qual foi encaminhado para laboratório particular da área de Medicina Veterinária credenciado pelo MAPA.

2.3.1 Sêmen Plasma Aglutinação (SPA)

Após descongelamento, o sêmen total foi centrifugado e retirado o plasma, em seguida foi submetido à prova de AAT (Paulin, 2003). O exame AAT foi realizado e interpretado de acordo com metodologia descrita no PNCEBT (Brasil, 2006). O exame foi realizado no Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM)

2.3.2 Diagnóstico Molecular de *Brucella* spp.

As amostras de sêmen foram enviadas para laboratório de referência, onde foi investigada a presença do DNA de *Brucella* spp. por meio de diagnóstico molecular pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa (qPCR). Para a extração do DNA bacteriano, foi utilizado o kit Patógeno IndiMag® 48 (*Indical Bioscience GmbH*), método automatizado de extração de ácidos nucleicos à base de esferas magnéticas. A amplificação do DNA foi realizada com a utilização dos reagentes Go Taq® Probe qPCR Master Mix (*Promega*) para qPCR. O protocolo de execução das técnicas foi seguido mediante as recomendações do fabricante.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo da frequência, foi estabelecida a relação do número de amostras reagentes aos testes de diagnóstico em relação ao número de animais amostrados, utilizando-se de análise estatística descritiva, por meio de frequência absoluta e relativa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise molecular por qPCR, não foi detectada a presença do DNA de *Brucella* sp. no sêmen dos touros das centrais de inseminação artificial. Esse achado é consistente com os resultados de outros estudos que não encontraram *Brucella* no sêmen de touros (Fuverk, 2010), o que sugere que o grupo de touros estudados não tinha infecção ativa ou uma carga bacteriana suficientemente alta para ser detectada por essa técnica e que a transmissão da brucelose por essa via pode não ser tão prevalente ou significativa quanto outras formas de transmissão, como a via oral, conforme discutido por SOUZA *et al.*, (2016).

O uso da qPCR para a detecção do DNA de *B. abortus* é altamente sensível, o que confere robustez a esses resultados negativos, reforçando a ideia de que a infecção no sêmen de touros não é comum nas condições estudadas. Rocha, Brugeff e Bier (2019) avaliaram a ocorrência de animais sororreagentes à brucelose bovina em fazendas do Estado de Mato Grosso do Sul, utilizando o AAT. Foram testados 724 bovinos da raça Nelore, sendo 274 machos e 450 fêmeas. Os resultados mostraram baixa soroprevalência da doença nos bovinos testados, com prevalência de 1,10% nos machos e 2,88% nas fêmeas. Embora o estudo tenha focado na soroprevalência e não especificamente na

presença da bactéria no sêmen, os baixos índices de soropositividade nos machos sugerem uma menor probabilidade de detecção da bactéria no sêmen desses animais.

Estudos como os de Xavier *et al.*, (2010) e os de Nardi Junior *et al.* (2017) demonstraram a eficácia da qPCR na identificação do DNA de *Brucella* em sêmen de touros, destacando a sensibilidade dessa técnica para a detecção precoce de infecções. Entretanto, o teste SPA oferece outra perspectiva diagnóstica ao detectar anticorpos anti-*Brucella* no plasma seminal, o que pode indicar uma infecção passada ou uma resposta imunológica à exposição ao patógeno, mesmo na ausência de material genético detectável por PCR.

A ausência de detecção do DNA de *Brucella* no sêmen dos touros em nosso estudo, aliada à reatividade de uma amostra no teste SPA com AAT, sugere uma exposição prévia ao patógeno sem a presença atual da bactéria viável no sêmen. Esse achado está de acordo com os estudos de Lourencetti *et al.* (2018), que, ao avaliarem 100 amostras de sêmen bovino, identificaram 68% de positividade no PCR, enquanto 11% das amostras foram reagentes no SPA, mas todas negativas no AAT e com o estudo de Junqueira Júnior *et al.* (2015), que, ao investigarem 177 touros, não detectaram anticorpos anti-*Brucella* no soro sanguíneo, mas identificaram 5,06% de amostras reagentes no SPA, enquanto todos os animais foram negativos nos testes sorológicos tradicionais, sugerindo que touros soronegativos podem eliminar a bactéria no sêmen.

Nossos resultados reforçam a importância de utilizar múltiplas técnicas diagnósticas para uma avaliação mais precisa da infecção em reprodutores bovinos. A utilização de métodos distintos é fundamental para aumentar a sensibilidade na detecção de *Brucella* sp e minimizar o risco de resultados falso-negativos ou falso-positivos (Batista, 2016). A qPCR, por ser uma técnica molecular altamente sensível e específica, permite a detecção do DNA do patógeno em amostras biológicas, mesmo quando o agente está presente em quantidades baixas ou em infecções subclínicas (OIE, 2018).

Além disso, o emprego de diferentes abordagens diagnósticas é essencial para o monitoramento eficaz de doenças como a brucelose, especialmente em centrais de inseminação artificial, onde a segurança e a qualidade do sêmen são determinantes. A detecção do DNA de *Brucella* em sêmen de touros por PCR tem sido indicada como uma estratégia importante para o controle de infecções em programas reprodutivos, como evidenciado no estudo de Xavier *et al.*, (2010), que ressaltaram a importância da qPCR na identificação de infecções em estágios iniciais, muitas vezes antes que sinais clínicos evidentes apareçam. Nardi Júnior *et al.* (2017) relatam que, sendo a brucelose uma zoonose de grande importância veterinária e humana, é importante que as técnicas de diagnóstico sejam precisas para evitar sua disseminação, especialmente em ambientes de reprodução assistida. Ao combinar a detecção direta do patógeno, como a qPCR, com a avaliação da resposta imunológica por meio de testes sorológicos, como o SPA, é possível identificar de maneira mais eficaz a presença do patógeno ou da resposta imune, melhorando as estratégias de prevenção e controle da doença nas populações de touros e reduzindo os riscos à saúde pública.

As amostras utilizadas neste estudo foram provenientes de centrais de inseminação artificial que seguem rigorosos padrões sanitários, sendo reconhecidas por sua credibilidade e referência na região. Essas centrais desempenham um papel

fundamental na disseminação de genética de alta qualidade, contribuindo para o melhoramento genético e a produtividade dos rebanhos. A tecnologia minimiza os riscos associados à monta natural, garantindo maior segurança sanitária ao impedir o contato direto entre machos e fêmeas, fator essencial no controle e prevenção de enfermidades (SENAR/MT, 2023). No entanto, a contaminação do sêmen com agentes patogênicos pode resultar na ampla disseminação de diversas doenças, tornando imprescindível a adoção de medidas rigorosas de monitoramento e biossegurança (EMBRAPA, 2021).

Diante dos desafios diagnósticos da brucelose em touros, especialmente pela predileção de *Brucella abortus* pelas glândulas acessórias e testículos, a ausência ou presença de baixos títulos séricos de imunoglobulinas podem comprometer a eficácia dos métodos sorológicos convencionais. Esse fato reforça a necessidade da utilização de exames complementares no plasma seminal, como a PCR e os testes de aglutinação com AAT e SPA, permitindo uma abordagem mais precisa na detecção da infecção (Oliveira *et al.*, 2013; Nardi Junior *et al.*, 2011). Dessa forma, a adoção de protocolos laboratoriais que integrem a análise do sêmen pode contribuir significativamente para o controle da brucelose bovina, particularmente em centrais de inseminação artificial, onde a biossegurança é essencial para evitar a disseminação da doença.

4 CONCLUSÃO

Este estudo reforça a necessidade de protocolos diagnósticos abrangentes e contínuos em programas de reprodução assistida, visando à prevenção e ao controle da brucelose bovina. Novas investigações, associando diferentes técnicas e ampliando o escopo das análises, são essenciais para aprimorar as estratégias de vigilância sanitária e reduzir o impacto da doença na pecuária.

REFERÊNCIAS

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Relatório de comercialização de sêmen bovino**. Brasil, 2012.

BARCELOS, V. B.; MAZUREK, M.; BECKER, R. C.; MADEIRA, E. M.; SCHWEGLER, E.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M. N. **Agentes infecciosos no sêmen de touro**. Grupo Cultivar, 2009.

BATISTA, M. B. **Investigação soroepidemiológica de *Brucella spp.* em suínos abatidos no estado da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Defesa Agropecuária) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brucelose e Tuberculose Bovina**. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). 2006. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt/brucelose-e-tuberculose>.

EMBRAPA. Medidas de biossegurança no uso da inseminação artificial em bovinos. **Circular Técnica**, Brasília, v. 12, p. 1-8, 2021.

FREITAS, J. A.; GALINDO, G. A. R.; SANTOS, E. J. C.; SARRAF, K. A.; OLIVEIRA, J. P. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 1, 2001.

FUVERKI, R. B. N. **Padronização de um protocolo para detecção molecular de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em sêmen bovino comercial**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2010.

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. 2009.

HERRÁN-RAMÍREZ, O. L.; SANTOS, H. A.; PAULINO, P. G.; VAN DER MEER, C. S.; RODRÍGUEZ-BAUTISTA, J. L.; JARAMILLO-DELGADO, I. L.; GONZÁLEZ-OBANDO, J.; RAMÍREZ-GARCIA, R.; ANGELO, I. C. Estudo transversal de *Brucella* spp. utilizando PCR em tempo real a partir de sangue total bovino na Colômbia. **Veterinary Research Communications**, v. 46, p. 189-201, 2022.

JUNQUEIRA JÚNIOR, D. G.; LIMA, A. M. C.; MORAES, G. P. Diagnosis of bovine brucellosis in bulls by sero agglutination and seminal plasma agglutination tests. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 36, n. 5, p. 3203-3210, set./out. 2015.

LOURENCETTI, M. P. S.; SOUZA, M. A.; GANDA, M. R.; SANTOS, J. P.; FERREIRA JÚNIOR, A.; LIMA, A. M. C.; MIYASHIRO, S. High level of B19 strain detection in Brazilian cattle semen. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, p. 433–439, 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA n. 8, de 10 de março de 2006**. Dispõe sobre normas sanitárias para comercialização de sêmen bovino. Brasília: MAPA, 2006.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016

NARDI JÚNIOR, G.; SILVA, D. A. O.; HADDAD, J. P. A. *et al.* Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of *Brucella abortus* in semen and serum of bovine bulls. **Biologicals**, v. 48, p. 6-9, 2017.

OIE. **Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres**. Paris: World Organisation for Animal Health, 2018.

OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, M. R.; SOUZA, M. A.; MOREIRA, R. Q.; LIMA-RIBEIRO, A. M. Avaliação de protocolo de extração de DNA de *Brucella* spp. em sêmen bovino. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 2, p. 91-97, 2013.

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

ROCHA, V. P.; BRUGEFF, E. C. L.; BIER, D. Inquérito sorológico de brucelose em machos e fêmeas bovinas em fazendas do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 143-148, 2019.

SENAR/MT. **Manual de boas práticas na inseminação artificial de bovinos**. Cuiabá: SENAR/MT, 2023.

SOUZA, F. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. *et al.* Soroprevalência e fatores de risco para brucelose bovina no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3365-3378, 2016.

THRUSFIELD, M. **Epidemiology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 2004.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, É. A. *et al.* Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting *bcs31* gene for the detection of *Brucella* spp. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 158-164, 2010.