

**DETECÇÃO DE *Haemophilus somnus* EM SÊMEN BOVINO CONTAMINADO  
EXPERIMENTALMENTE PELA TÉCNICA DE PCR FLUORESCENTE  
DIAS, Francisca Elda Ferreira –Dra.<sup>1\*</sup>; NUNES, Caris Maroni-Dra.<sup>2</sup>;  
CAVALCANTE, Tânia Vasconcelos- Dra.<sup>1</sup>; TRINDADE, Hébelys Ibiapina -  
Mestranda<sup>1</sup>; ALMEIDA, Katyane de Sousa-Dra<sup>1</sup>, MODULO, José Rafael-Dr;  
GARCIA, José Fernando -Dr.<sup>2</sup>**

\*<sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFT – Campus Araguaia-TO. E-mail:  
[eldadias@uft.edu.br](mailto:eldadias@uft.edu.br)

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista -Araçatuba-SP.

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista - Botucatu-SP

## RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar a sensibilidade e especificidade do PCR fluorescente para diagnóstico de *Haemophilus somnus* em sêmen bovino. Doses inseminantes livres de patógenos foram contaminadas experimentalmente com *H. somnus*, diluídas em escalas de  $10^0$  à  $10^6$  bactérias/ml e submetidas à extração de DNA pelo método de fenol/clorofórmio e amplificados por PCR. Os microtubos contendo o DNA foram submetidos a 35 ciclos de amplificação, precedidos por desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos. Os ciclos consistiram de desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, ao final de 35 ciclos, os tubos foram mantidos a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação do DNA foram separados por eletroforese em gel de acrilamida 8% e separação eletroforética por sistema capilar em equipamento automático de análise de fragmentos de DNA ABI-PRISM<sup>®</sup> 310. Através dos oligonucleotídeos iniciadores HF e HR conseguiu-se a amplificação de um fragmento de 400 pares de bases a partir do DNA da bactéria *H. somnus*. Pela eletroforese em gel de poliácridamida observa-se sinal positivo até aproximadamente  $10^3$  bactérias/mL a partir das concentrações iniciais das soluções estoque já na análise por eletroforese capilar revelou positividade até a diluição de  $10^{-3}$  bactérias/mL a partir das concentrações iniciais das soluções estoque de *Haemophilus*. A técnica de PCR mostrou-se uma valiosa ferramenta na detecção de *H. somnus* por permitir rapidez e sensibilidade, vantagens estas que poderão no futuro ser adicionadas aos métodos convencionais de detecção de patógenos no sêmen bovino.

**Palavras-chave:** Bovino; Sêmen; Diagnóstico; PCR.

## ABSTRACT

This study aimed at assessing the sensitivity and specificity of PCR fluorescent for diagnosis of *Haemophilus somnus* in cattle semen. Doses inseminantes free of pathogens were experimentally infected with *H. somnus*, diluted in scales of  $10^0$  to  $10^6$  bacteria / ml and subjected to DNA extraction by the method of phenol / chloroform and amplified by PCR. The microvials containing the DNA were submitted to 35 cycles of amplification, preceded by initial denaturation to 94°C for 5 minutos. The cycle consisted of denaturing to 94°C for 60 seconds, hybridization of oligonucleotides initiators to 55°C for 60 seconds and extension at 72°C for 60 seconds, the end of 35 cycles, the tubes were kept at 72°C for 10 minutos. The products of the amplification of DNA were separated by gel electrophoresis of acrylamide 8% and electrophoretic separation by capillary system in automated-310. Through®equipment for analysis of DNA fragments ABI-PRISM oligonucleotides initiators HF HR and there was the amplification of a fragment of 400

pairs of bases from the DNA of the bacterium *H. somnus*. For the polyacrylamide gel electrophoresis, there is positive sign up to approximately  $10^{-2}$  bactérias/mL from the initial concentrations of solutions already in stock analysis by capillary electrophoresis was positive to the dilution of  $10^{-3}$  bacteria/mL from the concentrations of initial stock solutions of *Haemophilus*. The PCR technique has proved a valuable tool in detecting *H. somnus* to allow speed and sensitivity, these advantages that may in future be added to conventional methods of detection of pathogens in cattle semen.

Keywords: Cattle; Semen; Diagnosis; PCR.

## INTRODUÇÃO

Em rebanhos de gado de corte, as enfermidades de caráter reprodutivo causadas pela ação de agentes infecciosos podem determinar sérios prejuízos econômicos em função do abortamento, uma vez que em rebanhos de gado de corte os bezerros são a fonte de renda mais importante. Adicionalmente, a infertilidade permanente ou temporária resulta na eliminação de vacas de elevado valor zootécnico ou até mesmo na morte de animais em decorrência de metrites.

É importante ressaltar que a produção de leite e carne desenvolvida com eficiência é largamente dependente da manutenção de machos e fêmeas férteis. Conseqüentemente, gametas livres de agentes infecciosos são pré-requisitos para a obtenção de altas taxas de fertilidade e natalidade no rebanho.

A bactéria *Haemophilus somnus* está associada à pneumonia bovina e doenças reprodutivas, inclusive endometrites e abortos (TAGAWA et al., 2000). Este agente pode ser isolado do trato genital de touros com ejaculados purulentos, porém alta prevalência de infecção prepucial pode ocorrer na ausência de manifestações clínicas da infecção. O touro representa um dos mais importantes reservatórios desta bactéria, podendo ser portador assintomático de *Haemophilus somnus*. Em fêmeas, esta bactéria é responsável por abortos em vacas (TAGAWA et al., 2000). A identificação desta bactéria é difícil uma vez que exibe extensa variabilidade morfológica e bioquímica. WARD et al. (1995), sugerem que a baixa taxa de isolamento para o *Haemophilus somnus* pode ser devida à ineficiência de técnicas microbiológicas.

Nos últimos anos, a técnica de PCR vem sendo realizada com sucesso na detecção de vários agentes infecciosos em amostras de sêmen. Utilizaram a PCR para a detecção de vírus. ORTEGA-MORA et al. (2003), MUKHUFHI et al. (2003) empregaram a PCR para detecção de protozoários. Entretanto, ainda são poucas as pesquisas para detecção de agentes infecciosos de transmissão venérea em amostras de sêmen. Pesquisas visando a detecção de agentes bacterianos no sêmen bovino vêm sendo intensificadas a cada ano.

A técnica de reação em cadeia pela polimerase-PCR pode acrescentar vantagens aos métodos convencionais de diagnóstico em infecções bacterianas. Via de regra, os procedimentos clássicos baseia-se no crescimento do agente infeccioso em cultura, o que pode levar semanas, ou na detecção de sua presença por métodos imunológicos, com variável sensibilidade e especificidade. Por esses motivos nos últimos anos tem-se intensificado a busca por técnicas que possibilitem o diagnóstico das doenças infecciosas com maior rapidez, precisão, confiança e grau de sensibilidade e especificidade similares ou superiores aos de procedimentos convencionais. Nosso objetivo é avaliar a sensibilidade e especificidade do PCR fluorescente para diagnóstico de *Haemophilus somnus* em sêmen bovino.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal, da Faculdade de Odontologia da UNESP, Campus -Araçatuba. Com o intuito de minimizar o potencial risco de contaminação de utensílios e equipamentos do laboratório com DNA, foram tomadas precauções para manter os ambientes destinados a execução de cada etapa do procedimento de PCR (extração de DNA, manipulação de reagentes de PCR e eletroforese) fisicamente separados. Para cada procedimento foram utilizadas luvas descartáveis, que eram trocadas sempre que se fizesse necessário ou em caso de mudança de um ambiente para outro. Todas as ponteiras plásticas descartáveis continham filtro para evitar aerossóis e antes do uso as bancadas foram cobertas com papel descartável. Todo o material contendo resíduos de fenol-cloroformio, brometo de etídio ou nitrato de prata foi armazenado em recipientes específicos até serem descartados adequadamente.

Amostras de sêmen bovino livre de patógenos, oriunda de diversos touros mantidos em regime de coleta semanal e sob rigoroso controle sanitário, tiveram a concentração de espermatozoides determinada e foram mescladas para formar uma solução homogênea contendo aproximadamente com  $1,606 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Esse material constituiu a solução de sêmen utilizada para a contaminação experimental com o agente infeccioso empregado nesse trabalho. O critério adotado para utilização do sêmen foi o fato de os animais doadores não apresentarem resultados positivos para o agente em questão nas provas de rotinas realizadas na central de inseminação artificial (sorologia ou cultivo).

Doses inseminantes livres de patógenos foram contaminadas experimentalmente com *Haemophilus somnus* (ATCC nº700025), cepas padrão das bactérias foram adquiridas junto a *American Type Culture Collection* (ATCC-EUA), em escalas que variavam de  $10^0$  à  $10^6$  bactérias/mL e submetidas à extração de DNA. As extrações de DNA de todas as soluções contendo espermatozoides e bactérias no presente estudo foram realizadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL segundo protocolo descrito por HEINEMANN et al. (2000) com algumas modificações.

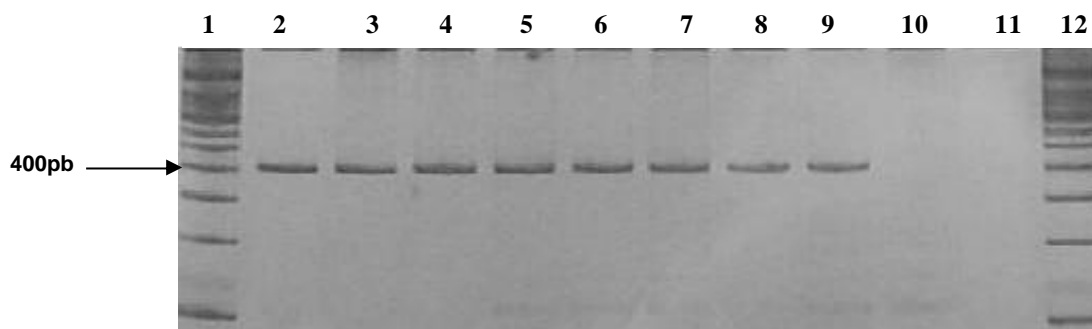
Posteriormente, as amostras foram submetidas à amplificação por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores HF-5'GAAGGCGATTAGTTTAAGAG3' (cromóforo FAM) e HR-5'TTCGGGCACCAAGTRTTCA'3 que amplificavam um fragmento de 400 pares de base. Os microtubos contendo o DNA foram submetidos a 35 ciclos de amplificação, precedidos por desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos. Os ciclos consistiram de desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, ao final de 35 ciclos, os tubos foram mantidos a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação do DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, gel de acrilamida 8% e visualizados com brometo de etídeo, nitrato de prata respectivamente e separação eletroforética por sistema capilar em equipamento automático de análise de fragmentos de DNA ABI-PRISM® 310 (Applied Biosystems-Genetic Analyser for automatic injection - Applied Biosystems®).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

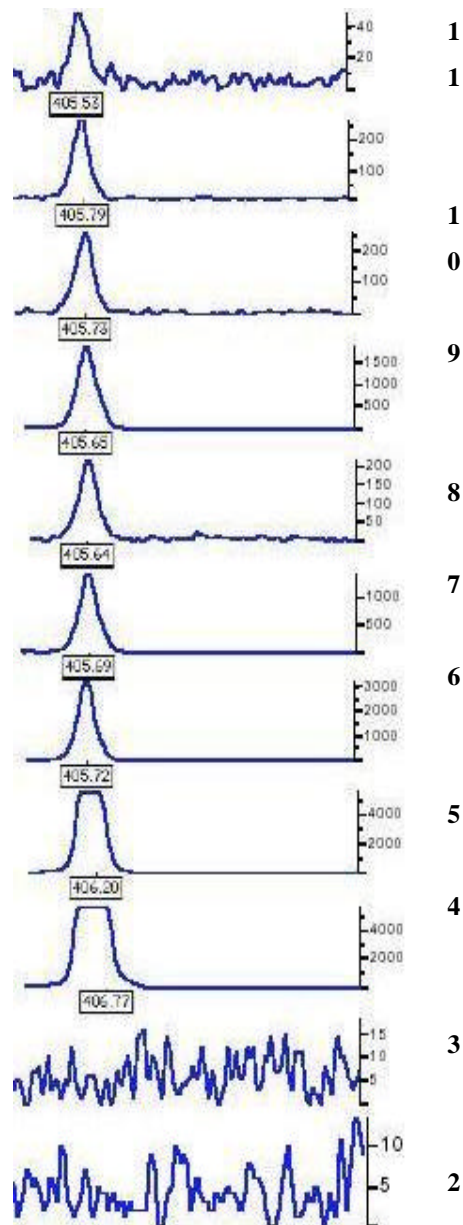
Após contaminação de amostras de sêmen bovino com a bactéria empregada no presente estudo, procedeu-se a PCR fluorescente com oligonucleotídeos específicos e observou-se a amplificação de fragmentos de DNA de tamanho esperado.

A Figura 1 apresenta o limiar de detecção do DNA de *Haemophilus somnus* por PCR em amostras de sêmen experimentalmente contaminadas. A partir da concentração inicial de soluções estoque, o limiar de detecção da PCR para *Haemophilus somnus* em análise de eletroforese em gel de poliácridamida 8% foi possível até a diluição de  $10^{-2}$  bactérias/mL. Já na análise pela técnica de eletroforese capilar revelou positividade até a diluição de  $10^{-3}$  bactérias/mL como demonstrado na Figura 2.

Ainda são poucos os dados de literatura que reúnem a amplificação de patógenos por PCR com sua detecção em sistema automático para análise de fragmentos de DNA marcados com fluorocromos.



**Figura 1** – Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos de amplificação por PCR do DNA de amostras de sêmen contaminadas com *Haemophilus somnus* mostrando o limiar de detecção. Linha 1 e 12) Marcador de peso molecular em escada de 100pb, Linha 2) Controle Positivo, Linhas 3 a 9) Diluição seriada na base 10 ( $10^7$  a  $10^1$  bactérias/mL), Linha 10) Sêmen não contaminado, Linha 11) Controle negativo (sem DNA).



**Figura 2** – – Eletoferograma dos produtos de amplificação por PCR fluorescente DNA de amostras de sêmen bovino contaminadas experimentalmente com *Haemophilus somnus* (4 a 11) Diluição seriada na base 10 ( $10^4$  a  $10^{-3}$  bactérias/ml) a partir das concentrações iniciais da solução estoque de *Haemophilus somnus* 3) Controle positivo *Haemophilus somnus*, 2) Sêmen não contaminado, 1) Controle negativo (sem DNA).

Dentre os diversos patógenos listados pela OIE que afetam a bovinocultura, (THIBIER & GUERIN, 2000), alguns tem papel de relevante importância na situação brasileira como, por exemplo, a *Brucella abortus* (POESTER et al., 2002) a *Leptospira* sp (HEINEMANN et al., 2000) e o *Campylobacter fetus* (VARGAS et al., 2003). Outro patógeno da lista B da OIE que apresenta significância econômica em outros países, mas que não foi ainda devidamente estudado no Brasil, é o *Haemophilus somnus* (TEGTMEIER et al., 2000). No presente estudo buscou-se o desenvolvimento de metodologia para acessar a presença destes patógenos de relevância sanitária, e conseqüentemente econômica, em amostras de sêmen bovino aliando rapidez e eficiência.

A técnica de PCR mostrou-se uma valiosa ferramenta na detecção de *Haemophilus somnus* por permitir rapidez e sensibilidade, vantagens estas que poderão no futuro ser adicionadas aos métodos convencionais de detecção de patógenos no sêmen bovino.

## CONCLUSÃO

Quando comparado à eletroforese em gel de poliacrilamida, a eletroforese capilar demonstrou ser uma alternativa eficaz e rápida na detecção de DNA de bactérias em sêmen bovino podendo constituir-se em valiosa ferramenta para a avaliação da sanidade de rebanhos e para o controle de qualidade do sêmen produzido em centrais de inseminação artificial.

## LITERATURA CITADA

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira spp* serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v.73, n.4, p.261-267, 2000.

MUKHUFHI, N.; IRONS, P. C.; MICHEL, A.; PETA, F. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection methods, storage and transport medium on the test. **Theriogenology**, v.60, n.7, p.1269-1278, 2003.

ORTEGA-MORA, L. M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.4, p. 301-308, 2003.

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

TAGAWA, Y.; BASTIDA-CORCUERA, F.; CORBEIL, L. B. Immunological characterization of the major outer membrane protein of *Haemophilus somnus*. **Veterinary Microbiology**, v.71, p.245-254, 2000.

TEGTMEIER, C.; ANGEN, O.; AHRENS, P. Comparison of bacterial cultivation, PCR, hybridization and immunohistochemistry as tool for diagnosis of *Haemophilus somnus* in pneumonia in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.385-394, 2000.

THIBIER, M.; GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-3, p.233-251, 2000.

VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; VAINSTEIN, M. H.; KREUTZ, L. C.; NEVES, J. P. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.93, n.2, p.121-132, May 2003.

WARD, A. C. S.; JOWORSKI, M. D.; EDDOW, J. M.; CORBIEL, L. B. A comparative study of bovine and ovine *Haemophilus somnus* isolates. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.59, n.3, p.173-178, 1995.