



# Detecção de patógenos no sêmen

**Nivaldo da Silva**

Doutor em Veterinária pela  
Universidad Complutense de Madrid - Espanha  
Prof. Adjunto do Departamento de  
Medicina Veterinária Preventiva  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Email: nivsilva@dedadlus.lcc.ufmg.br

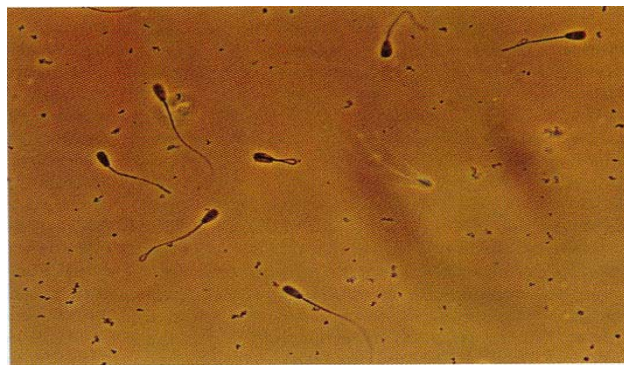
## Detecção de agentes patogênicos em sêmen bovinos destinado a inseminação artificial

A utilização da inseminação artificial (I.A.) tornou possível o intercâmbio de material genético de melhor qualidade, e através dessa tecnologia, uma melhora da produção de leite e carne, tanto a nível nacional como internacional. As possibilidades da contaminação do sêmen por agentes patogênicos (Fig. 1) e sua possível disseminação através do mesmo, entretanto, se converteram em uma das principais preocupações para criadores e autoridades sanitárias dos países onde se emprega essa tecnologia (Afshar & Eaglesome, 1990). A tudo isso se deve, também, acrescentar o risco que supõe o uso do sêmen infectado nos processos de transferência de embriões (Bielanski & Dubuc, 1994). Este alarmar crescente está relacionado às implicações epizootológicas da presença de vírus no sêmen, implicações essas que não só se centram na infecção exclusiva da fêmea receptora, ou do coletivo da exploração pecuária, como também na possível introdução de viroses exóticas no país importador. Esse risco potencial de transmissão, gera uma grande preocupação sobre o intercâmbio nacional e internacional deste material genético, e em especial, sobre os métodos de detecção dos possíveis vírus vinculados através do sêmen ou dos embriões, obrigando quase todos os países a implantarem rigorosos programas sanitários voltados para o controle das importações.

A origem dos vírus no sêmen pode ser extrínseca, devido a contaminação fecal do sêmen no momento da coleta (por exemplo, os enterovírus) ou intrínseca, devido a infecções locais ou sistêmicas com a disseminação dos vírus através dos testículos, glândulas acessórias ou prepúcio. Dessa maneira, o sêmen é um excelente veículo para a difusão de agentes patogênicos e de defeitos genéticos, principalmente pela gran-

de distribuição de sêmen congelado, e pela capacidade que possui um touro para produzir até 1000 doses deste material a partir de uma única ejaculação.

Atualmente, as enfermidades víricas transmitidas via sêmen, como a Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR) e a Diarréia Bovina a Vírus (BVD), têm despertado um



Sêmen bovino: risco potencial de transmissão de agentes patogênicos através da inseminação artificial.

grande interesse nas autoridades sanitárias mundiais, principalmente por que nesses processos infecciosos os sinais clínicos são raramente evidentes, sendo de grande importância a detecção desses vírus no sêmen (Philpott, 1993).

Uma vez que a congelação do sêmen possibilita a sobrevivência da maioria dos agentes patogênicos, e o uso dos crioprotetores diminui a eficácia dos antibióticos, se faz necessário normas oficiais para regulamentar a produção e o comércio de material genético livre de agentes infecciosos (Afshar & Eaglesome, 1990). Desta maneira, a Oficina Internacional de Epizootias (OIE) definiu suas diretrizes no ano de 1986. Nos Estados Unidos da América (EEUU) essas normas foram padronizadas em 1989, sob controle da Associação Nacional de Repro-

dução Animal (NAAB) (Philpott, 1993) e, recentemente, a União Européia (EU) através da diretiva 93/60/EEC estabeleceu suas normas de controle. Essas exigências estão baseadas na transmissão dessas viroses através do sêmen infectado. Por esses motivos, recomendam um rigoroso controle sanitário sobre os touros mantidos nos centros de I.A., exigindo provas de isolamento de agentes infecciosos, ou provas sorológicas de todos os animais com idades superiores aos seis meses.

Países do MERCOSUL estão, ainda, estudando normas para o comércio de sêmen entre seus integrantes.

Apesar dessas medidas, o perigo da transmissão de vírus via sêmen segue vigente, como consequência da existência nos centros de I.A. de animais clinicamente sadios ou sorologicamente negativos, porém que estão latentemente infectados pelo herpes vírus bovino tipo 1 (BHV-1) causador da IBR ou persistentemente infectados pelo vírus da BVD. Por outro lado, e especificamente no caso da IBR, ainda existe uma reconhecida demanda por sêmen de touros de apreciável valor genético e que apresentam sorologia positiva frente a este vírus. Isso obriga a um contínuo monitoramento dos seus ejaculados para a detecção do vírus e, assim, evitar o risco de transmissão por essa via. Segundo Afshar & Eaglesome (1990), os vírus da IBR e BVD estão presentes em quase todos os centros de I.A. dos EEUU e Canadá, de onde provêm a maioria do sêmen importado pelo Brasil.

Por outro lado, e apesar de não dispor de muitas informações sobre a incidência dessas enfermidades nos países sul americanos, pode-se considerar que pelo menos as infecções causadas

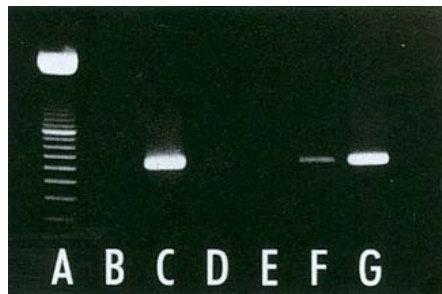
pelo BHV-1 estão presentes nesses países, apesar de não serem rotineiramente diagnosticadas ou notificadas. Nesse sentido, no Brasil estão registrados casos de Balanopostites em touros com eliminação de vírus no sêmen, assim como a presença de anticorpos em doadoras e receptoras de embriões. Em países do Mercosul, o vírus da IBR está amplamente disseminado, sendo detectado em amostras de sêmen congelado na Argentina.

O êxito dos programas de controle das doenças infecciosas depende, em boa medida, da identificação e eliminação de animais infectados e ou portadores. Usualmente nesses animais, o controle é feito através do isolamento de microrganismos em meios de cultura, cultivos celulares, inoculação em animais susceptíveis ou, então, pela detecção indireta através de técnicas sorológicas, como a soroneutralização, fixação de complemento, imunofluorescência indireta, hemaglutinação, imunodifusão, etc. A maioria destas técnicas, entretanto, apresentam limitações principalmente de ordem prática, resultantes da sua complexidade, da infra-estrutura necessária à sua realização, ou da lentidão dos procedimentos laboratoriais necessários para a detecção e caracterização dos agentes patogênicos. Por outro lado, existem, também, limitações de sensibilidade e especificidade. Por estes motivos, nos últimos anos têm-se intensificado a busca por técnicas de maior rapidez, precisão e confiança, que possibilitem o diagnóstico das doenças infecciosas com um grau de sensibilidade e especificidade similar ou superior aos procedimentos convencionais, e cujos resultados sejam dados no mesmo dia (Rodríguez & Schudel, 1993). Desta maneira, técnicas simples e de fácil execução para a caracterização de proteínas e ácidos nucleicos, como as imunoenzimáticas - ELISA (Enzyme-linked immunoabsorvent assay) e Immunoblotting, ou as amplificações "in vitro" de ácidos nucleicos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são recomendadas para substituir os métodos convencionais de diagnóstico de várias doenças.

#### Utilização da técnica de PCR para detecção de agentes patogênicos no sêmen

A amplificação "in vitro" dos ácidos nucleicos (PCR) permite a obtenção de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA. Por isso, a PCR tem facilitado o desenvolvimento de uma variedade de sistemas, baseados na detecção de ácidos nucleicos de bactérias, vírus, e outros microrganismos, bem como de alterações genéticas. Devido a

sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez, a PCR oferece muitas vantagens sobre os métodos convencionais de diagnóstico, porque está baseada na am-



Deteção do vírus da BVD em sêmen fresco e/ou congelado através da técnica de RT-PCR.

A) Marcador de peso molecular;  
B) Controle negativo;  
C) Controle positivo, sobrenadante de cultivo celular ( $10^5$  DI<sub>50</sub>/CT/ml);  
D-E) Sêmen fresco e sêmen congelado contaminados com  $10^5$  DI<sub>50</sub>/CT/ml do BVDV, extração do RNA sem passar o plasma seminal por coluna de Sephacryl S-400;  
F-G) Depois de passado por coluna de Sephacryl S-400.

plificação específica de um fragmento de ácido nucleico, compreendido entre dois oligonucleotídeos sintéticos complementares (primers), respectivamente, a cada uma das duas fitas de DNA a ser amplificada. O tamanho deste fragmento é definido pela distância entre a posição de anilamento dos primers (iniciador e reverso) dentro da sequência genômica.

A PCR é realizada em repetidos ciclos, cada um consistindo de três etapas com diferentes temperaturas. Na primeira etapa, a dupla fita de DNA é desnaturada a alta temperatura, resultando em uma molécula simples de DNA (DNA molde). Em seguida os primers (iniciador e reverso) se unem às suas sequências homólogas e complementares nas regiões correspondentes ("target") da molécula do DNA



Utilização da técnica de PCR para detecção de BHV-1 em sêmen congelado.

A) Controle positivo, sobrenadante de cultivo celular -  $10^5$  DI<sub>50</sub>/CT/ml;  
B) Produto não amplificado pela PCR a partir de sêmen congelado e infectado com  $10^5$  DI<sub>50</sub>/CT/ml;  
C) Marcador molecular;  
D) Controle negativo;  
E-F) Sêmen fresco e infectado com  $10^5$  e  $10^2$  DI<sub>50</sub>/CT/ml;  
G-H) Sêmen congelado e infectado com  $10^5$  e  $10^2$  DI<sub>50</sub>/CT/ml; (passado por coluna de Sephacryl S-400). DNA extraído com Chelex-100.

molde (anilamento). Na terceira fase, a região 3' de cada um dos primers é estendida nos dois sentidos pela ação enzimática da enzima termoestável Taq polimerase (alongamento), formando uma nova molécula de DNA de dupla fita. As novas moléculas de DNA, sintetizadas pelo processo, servirão de molde para a produção de outras cópias de DNA em outros ciclos da reação, resultando em uma amplificação exponencial (Silva, 1995).

Apesar de sua simplicidade, a amplificação "in vitro" dos ácidos nucleicos pode ser afetada por uma variedade de parâmetros, entre eles, o desenho dos "primers", a existência de áreas de homologia na sequência do DNA molde, as temperaturas de anilamento, concentração de nucleótidos, e principalmente pela presença de inibidores (proteínas) (Erlich et al., 1989).

A aplicação desta técnica para a detecção de vírus RNA, é feita mediante a síntese de uma molécula de DNA complementar (cDNA), através de uma reação de retrotranscrição, utilizando-se a enzima transcriptase reversa (RT). Normalmente, o primer utilizado para iniciar esta síntese é o mesmo que se utiliza para a amplificação específica do DNA. Essa reação é conhecida como RT-PCR, e pode ser realizada no mesmo tubo de reação, evitando-se, assim, a possibilidade de contaminações com outros DNAs por excesso de manipulações. O produto de PCR (amplicon) pode ser detectado em gel de agarose, após a tincão com brometo de etídio. Seu tamanho é comparado com pesos moleculares de referência (DNA Ladder) e corresponde ao número de pares de bases (pb) de nucleótidos distribuídos ao longo da sequência genômica do DNA molde. O amplicon também pode ser digerido por endonucleases de restrição, para confirmar se as áreas do DNA amplificado correspondem aos sítios de restrição dessas enzimas. A PCR em combinação com os fragmentos de diferentes tamanhos, obtidos pela digestão do DNA com enzimas de restrição (RFLP) é, frequentemente, usada para classificar um grupo de microrganismos patogênicos, ou definir a posição de diferentes alelos na detecção de doenças de caráter hereditário. A especificidade também pode ser definida através da técnica de hibridação de Southern blot, na qual o produto da PCR é transferido após a eletroforese para uma membrana de nylon de carga elétrica positiva e hibridizado com uma sonda sintética específica, marcada com isótopos radioativos ou não radioativos (Silva, 1995).

Segundo Rodríguez & Schudell (1993), o emprego dessa técnica de maior precisão e confiança, é recomendada, principalmente, para o diagnóstico de vírus em

Tabela 1:

Aplicação das técnicas de PCR e RT-PCR para detecção dos principais agentes infecciosos presentes no sêmen de bovinos

MICROORGANISMOS	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	REFERÊNCIAS
<i>Campylobacter fetus subsp venerealis</i>	PCR	Eaglesome <i>et al.</i> (1995)
<i>Leptospira spp</i>	PCR	Masri <i>et al.</i> (1997)
<i>Brucella abortus</i>	PCR	Leal-klevezas (1995)
<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR	Bsat & Batt (1993)
<i>Mycoplasma bovis</i>	PCR	Hotzel <i>et al.</i> (1993)
<i>Trichomonas fetus</i>	PCR	Ho <i>et al.</i> (1993)
IBR (BHV-1)	Nested PCR	Wiedmann <i>et al.</i> (1993)
	PCR	Santurde <i>et al.</i> (1996)
BVD	RT-PCR	Silva <i>et al.</i> (1995)
Bluetongue	RT-PCR	MacLachlan <i>et al.</i> (1994)
	Nested e multiplex RT-PCR	Wilson & Chase (1993)
Leucose bovina	PCR	Fechner <i>et al.</i> (1996)
	Nested PCR	Klintevall <i>et al.</i> (1994)
Aftosa	RT-PCR	Prato-Murphy <i>et al.</i> (1994)

sêmen, e possibilita a detecção mais rápida dos vírus da IBR e BVD e de outros vírus, com menores custos e sobretudo com altas taxas de sensibilidade e especificidade (Reubel & Studdert, 1998).

Apesar da ampla aplicabilidade das técnicas de amplificação dos ácidos nucléicos em sêmen, ela sofre algumas limitações, devido à presença de inibidores da polimerização do DNA ou à grande quantidade de proteínas presentes nos diluentes usados para proteger os espermatozóides, durante os processos de congelamento. Assim, os processos descritos para a extração dos ácidos nucléicos de que já haviam sido sacrificados há vários anos por apresentarem reações sorológicas positivas à prova de ELISA (Silva *et al.*, 1997).

Falhas no isolamento do vírus da BVD podem ser atribuídas aos efeitos viricidas do sêmen, aos baixos títulos

deste vírus no sêmen, entre 5 y 75 DI50CT/ml, ou à natural inibição da transcrição do vírus, como consequência da presença no plasma seminal de bovinos de uma proteína, a seminalplasmina. Essa última propriedade do plasma seminal afeta a detecção do vírus no sêmen quando se emprega a técnica de RT-PCR, razão pela qual não se conhecem muitos trabalhos relacionados ao tema. Silva *et al.* (1995), entretanto, utilizando o procedimento de passar o plasma seminal pela coluna de Sephacryl S-400, previamente à extração do RNA viral pelo método do tiosulfato de guanidina, conseguiram detectar através da RT-PCR, até 4 DI50 CT/ml de vírus da BVD, no sêmen infectado, tanto fresco como congelado. Esses autores amplificaram um fragmento de 440 pb visível em gel de agarose a 2%, tingido com brometo de etídio, do gene da proteína de infecção p80 desse vírus (Fig. 3). Essa técnica apresentou

doenças infecciosas da reprodução de bovinos. A sensibilidade e especificidade destas técnicas foram comparativamente maiores que as técnicas convencionais de diagnóstico. Os resultados demonstraram o potencial da PCR para a detecção rápida de microrganismos, ou mesmo para substituir conhecidos métodos.

Apesar desses aspectos amplamente favoráveis, nos dias de hoje a aplicação da prova de PCR para detecção de agentes patogênicos no sêmen e em outros materiais clínicos, está restrita a laboratórios bem equipados, dificultando, principalmente, sua ampla utilização na prática Veterinária. O que se espera, entretanto, é que no futuro a técnica da PCR possa ser utilizada por profissionais de campo, sob a forma de kits de diagnóstico, como se faz hoje, por exemplo, com a técnica de ELISA para o diagnóstico da influenza equina ou para outras doenças.

especificidade e sensibilidade maiores que aquelas apresentadas por outros métodos convencionais de detecção de vírus em sêmen, sugerindo sua utilização para o diagnóstico dessa virose em sêmen fresco ou congelado, tanto nacionais como importados.

Outros microrganismos foram também detectados em sêmen, a partir das técnicas de amplificação dos ácidos nucléicos. Masri *et al.* (1997), descreveram um rápido e específico método para detecção de *Leptospiras spp* a partir do sêmen bovino infectado. Esses autores amplificaram através de um nested-PCR, um fragmento de 450 pb do genoma da *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjobovis, detectando até 50 organismos/ml de sêmen infectado. Em outro estudo, Eaglesome *et al.* (1995), detectaram por PCR até 4 organismos/ml de sêmen infectado pelo *Campylobacter fetus subsp venerealis*.

Na Tabela 1, encontram-se descritas as aplicações PCR e RT-PCR, para o diagnóstico de algumas das principais

