



DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS NO SÊMEN DE REPRODUTORES OVINOS DO ESTADO DO TOCANTINS

Ana Beatriz Saldanha MORAES¹; Ana Patrícia de Carvalho da SILVA²

Diversas enfermidades podem acometer os ovinos, comprometendo diretamente a sanidade do rebanho e o desenvolvimento da produção animal. A epididimite infecciosa ovina representa uma das principais doenças reprodutivas em ovinos, promovendo prejuízos econômicos pela redução da fertilidade ou infertilidade dos animais, sendo os agentes causadores mais comuns *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*. O diagnóstico definitivo dessas infecções por isolamento bacteriano é limitado, devido à ausência de meios seletivos e à diversidade morfológica e bioquímica das culturas. Como alternativa, técnicas moleculares como a PCR têm se mostrado mais sensíveis e específicas. O objetivo deste trabalho foi detectar os principais agentes patogênicos em amostras de sêmen - de reprodutores ovinos do estado do Tocantins por meio de PCR. Foram utilizadas amostras de sêmen de 88 reprodutores ovinos oriundos de diferentes regiões do Tocantins (CEUA UFT 23101.005639/2016-14), sendo submetidas à extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio e à PCR multiplex para *B. ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* e PCR convencional para *Leptospira* sp., *Campylobacter fetus* e *Toxoplasma gondii*. Os resultados demonstraram que houve detecção de *A. seminis* em 28,4%, de *H. somni* em 23,8% e de *B. ovis* em 59% das amostras. Não houve detecção de *Leptospira* sp., *Campylobacter fetus* e *Toxoplasma gondii*. Este estudo é o primeiro a detectar a presença simultânea desses três microrganismos em amostras de sêmen de reprodutores ovinos no Tocantins. Tais resultados fornecem suporte para a adoção de estratégias de prevenção e controle da epididimite infecciosa ovina no estado, contribuindo para a sanidade dos rebanhos e a sustentabilidade da produção animal da região.

Palavras-chave: diagnóstico molecular; fertilidade; infecção reprodutiva.

1 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. ana.saldanha@ufnt.edu.br

2 Professora Doutora do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. ana.silva@ufnt.edu.br



I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A ovinocultura apresenta papel de destaque no cenário da produção animal, não apenas como fonte de proteína de alto valor biológico, mas também como atividade estratégica para a subsistência e o desenvolvimento socioeconômico de regiões rurais brasileiras (SANTOS et al., 2023). As enfermidades do sistema reprodutivo representam um dos principais entraves ao desenvolvimento da cadeia ovina, uma vez que resultam em queda da fertilidade, aumento do intervalo entre partos, descarte precoce de reprodutores e, conseqüentemente, perdas econômicas expressivas (OLIVEIRA et al., 2019).

Dentre essas enfermidades, a epididimite infecciosa destaca-se por comprometer a fertilidade dos carneiros, reduzindo a taxa de prenhez e podendo culminar em infertilidade permanente (MOUSTACAS et al., 2013).

O diagnóstico da epididimite infecciosa ovina constitui outro desafio, pois muitas vezes depende de exames laboratoriais complementares, como sorologia, bacteriologia e biologia molecular, visando a diferenciação entre agentes etiológicos (MOUSTACAS et al., 2013). Nesse cenário, o desenvolvimento e a aplicação de métodos diagnósticos mais rápidos, específicos e sensíveis representam ferramentas essenciais para a medicina veterinária, auxiliando no controle sanitário e no planejamento estratégico da produção.

Assim, considerando os impactos da epididimite sobre a eficiência reprodutiva dos ovinos, a relevância econômica para a ovinocultura nacional e a necessidade de aprimorar os métodos de detecção da enfermidade, justifica-se a realização deste estudo.

II. BASE TEÓRICA

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticadas pelo homem. A sua criação possibilitava alimento, principalmente pelo consumo da carne



e do leite, e proteção, pelo uso da lã, fibra que servia como abrigo contra as intempéries do ambiente e hoje a ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes sendo destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (VIANA, 2008).

Diversas enfermidades podem acometer os ovinos, comprometendo diretamente a sanidade do rebanho e o desenvolvimento da produção animal (OLIVEIRA et al. 2019) e a falta de cuidados com questões sanitárias reprodutivas favorecem a manutenção e disseminação de microrganismos causadores de doenças (CARVALHO-JUNIOR et al. 2010).

Uma das principais doenças reprodutivas que acometem os carneiros é a epididimite infecciosa que pode ser ocasionada por uma variedade de agentes etiológicos, como: *Actinobacillus lignieresii*, *Chlamydia psittaci*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Yersinia pseudotuberculosis* (MOUSTACAS et al. 2013 sendo os mais comuns : *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* (RODRIGUES, 2020).

III. OBJETIVOS

Geral

Detectar os principais agentes patogênicos no sêmen de reprodutores ovinos do estado do Tocantins.

Específicos

- (i) Avaliar a presença de células inflamatórias no sêmen de reprodutores ovinos, do estado do Tocantins, naturalmente infectados através de esfregaço do sêmen.
- (ii) Avaliar a presença de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*, *Leptospira sp.*, *Campylobacter fetus* e *Toxoplasma gondii* em amostras de sêmen de



reprodutores ovinos, do estado do Tocantins, naturalmente infectados, através de PCR multiplex e convencional.

IV. METODOLOGIA

Reprodutores ovinos

Foram coletadas amostras de sêmen de reprodutores ovinos machos, sem raça definida, entre 18 e 24 meses de idade, de propriedades 21 propriedades criadoras de ovinos em todo o estado do Tocantins (CEUA nº 23101.005639/2016-14 UFT).

Extração de DNA

Para extração do DNA ica do fenol-clorofórmio de acordo com Matrone et al., 2009.

PCR

A reação de PCR foi realizada utilizando uma solução de volume final de 31 μL , contendo 22 μL de PCR supermix (Invitrogen) com 1.65 mM MgCl_2 , suplementado com 0,5 μL de MgCl_2 , 1 μL de cada iniciaizador (25mM) e 200-500ng de DNA.

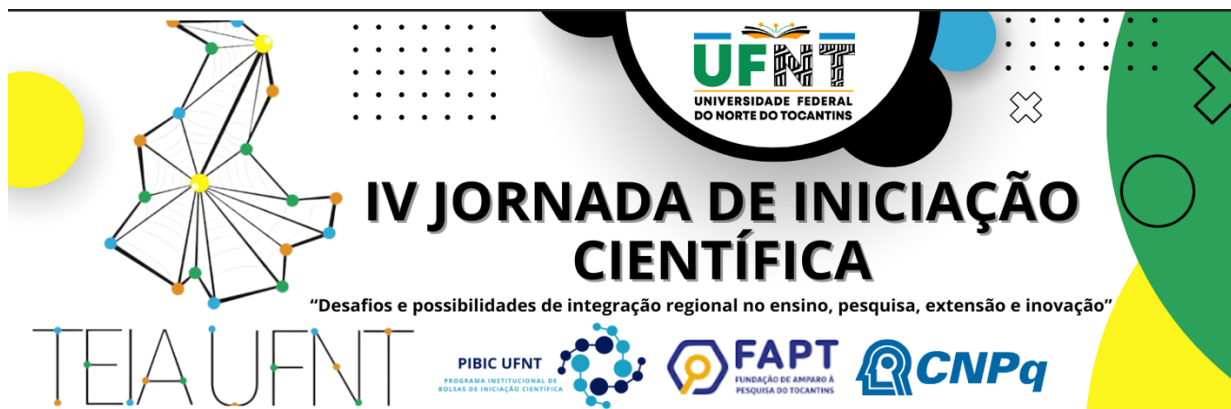
Esfregaço de sêmen

Alíquotas (2 μL) de sêmen de cada animal serão coletadas para realização do esfregaço com auxílio de lâminas de vidro que serão coradas com panótico rápido com o objetivo de avaliar a presença de células inflamatórias.

Análise estatística

As frequências de detecção de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, *Lepstospira sp.*, *Campylobacter fetus* e *Toxoplasma gondii* por PCR serão comparadas pelo Teste Exato de Fisher. A análise do esfregaço de sêmen será comparada através do teste de Mann-Whitney utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Prisma software, Inc 5.0, EUA).

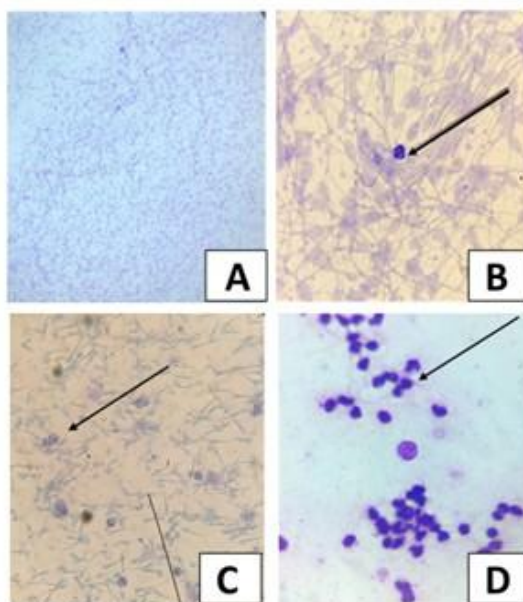
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO



Observaram-se células inflamatórias em 54,54% (48/88) das amostras avaliadas, sugerindo, portanto, infecção. Em 85,41% (41/48) destas amostras predominaram neutrófilos e em 56,25% (27/48), linfócitos.

A Figura 1 ilustra diferentes tipos de ejaculados contendo quantidades diferenciadas de células Inflamatórias, com predomínio de neutrófilos (setas).

Figura 1. Esfregaços de sêmen de ovinos apresentando ausência de células inflamatórias, 10x (A) em discreta quantidade discreta (B), em moderada quantidade (C) e intensa quantidade (D) com predomínio de neutrófilos. Panótico rápido, 40 X.

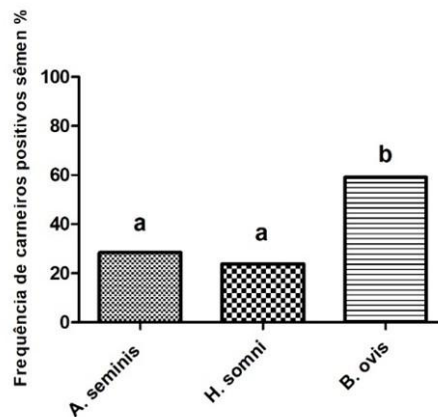


A presença de células inflamatórias em mais da metade das amostras de sêmen avaliadas neste estudo indica um comprometimento da qualidade espermática dos reprodutores ovinos do Tocantins. O predomínio de neutrófilos sugere processos infecciosos de origem bacteriana, conforme descrito por Moustacas et al. (2013), que associaram a inflamação do trato genital masculino à ocorrência de epididimite infecciosa ovina.

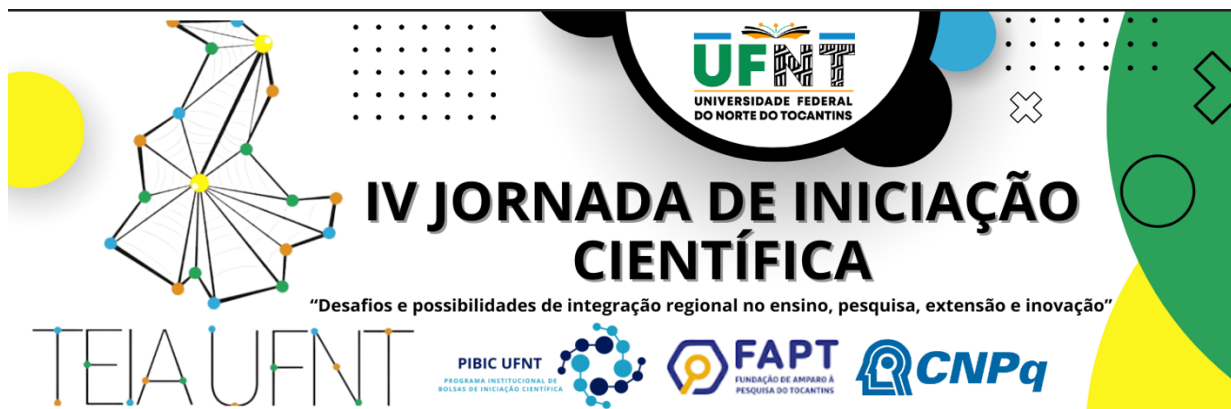


As frequências de detecção por PCR multiplex espécie-específico dos principais agentes causadores da epididimite infecciosa ovina no sêmen de reprodutores do Tocantins estão representadas na figura 2. Os dados mostram que houve detecção de *A. seminis* em 28,4,% (25/88) das amostras de sêmen dos reprodutores, detecção de *H. somni* em 23,8 % (21/88) e detecção de *B. ovis* em 59% . Geralmente, o diagnóstico definitivo dessas infecções é baseado no isolamento bacteriano o qual pode ser difícil devido à ausência de meio seletivo e à variedade morfológica e bioquímica das culturas de *A. seminis* e *H. somni*. Dessa forma, ensaios de PCR são considerados como alternativas para superar as limitações da bacteriologia.

Figura 2. Frequência de detecção de *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*, e *Brucella ovis* por PCR multiplex espécie-específico e *Leptospira sp.*, *Campylobacter fetus* e *Toxoplasma gondii* por PCR convencional de amostras de sêmen de reprodutores ovinos no estado do Tocantins. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P \leq 0,05$).



Os achados moleculares obtidos por PCR multiplex revelaram uma elevada frequência de detecção dos principais agentes etiológicos da epididimite infecciosa. A taxa de 59% de positividade para *Brucella ovis* encontrados no presente estudo é superior à relatada em outros estados brasileiros, onde a prevalência variou de 1,9% a 34,4% (SANTOS et al., 2013). Essa diferença pode estar relacionada à ausência de fiscalização rigorosa no trânsito de animais e à baixa exigência de documentos sanitários,



facilitando a disseminação da doença entre rebanhos, conforme já apontado por Gouveia.

VI. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho representa o primeiro registro no estado do Tocantins da detecção de *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni* e *Brucella ovis* em amostras de sêmen ovino, por meio de isolamento bacteriano e PCR. A associação desses resultados com a soropositividade, os achados clínicos do aparelho reprodutor e a análise citológica seminal permitiu a confirmação do diagnóstico de epididimite infecciosa ovina na região.

VII. REFERÊNCIAS

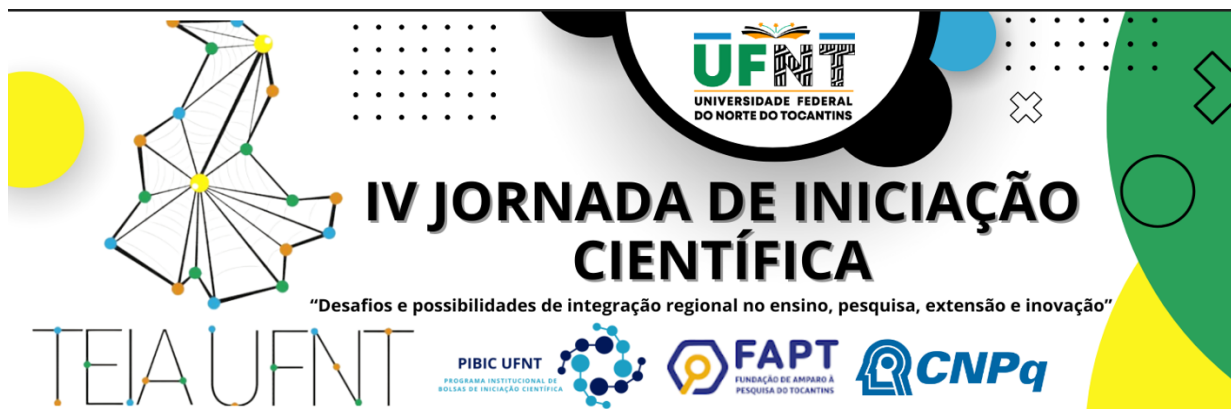
CARVALHO-JUNIOR, C. A. et al. Importância da sanidade reprodutiva na ovinocultura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 3, p. 152–158, 2010.
COSTA, L. F. et al. Epidemiological study of *Brucella ovis* infection in rams in the State of Piauí, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 9, p. 875–879, 2012.

MATRONE, M. A. S. et al. Extraction of genomic DNA from semen samples for molecular diagnostics. *Molecular Biology Reports*, v. 36, p. 1115–1121, 2009.

MOUSTACAS, V. S. et al. Epidemiological and diagnostic aspects of ovine epididymitis. *Small Ruminant Research*, v. 109, n. 2–3, p. 153–159, 2013.

SANTOS, C. S. A. B. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos no estado da Paraíba. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 20, n. 1, p. 37–41, 2013.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 3, p. 130–135, 2008.



TRABALHO PUBLICADO EM EVENTO

Ana Beatriz Saldanha MORAES; Andressa Cristiane Borges GUEDES; Márcia Aparecida RODRIGUES, Auricélio Alves de MACEDO; Renato de Lima SANTOS; Ana Patrícia de Carvalho da SILVA. **DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS NO SÊMEN DE REPRODUTORES OVINOS DO ESTADO DO TOCANTINS** *In:* XVII SEMAVET e o II CONTVET, 2025, Araguaína, TO. **Anais do XVII SEMAVET e o II CONTVET.**

VIII. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.