

**PESQUISA DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA ATRAVÉS DA PCR
MULTIPLEX EM EJACULADOS DE REPRODUTORES SUÍNOS (*SUS SCROFA*)
UTILIZADOS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.**

ANDRESSA CARINE DALMUTT¹*, ANTONIO CARLOS PEDROSO¹

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza;

*Autor para correspondência: Andressa Carine Dalmutt (andressacd2011@hotmail.com)

1 Introdução

A inseminação artificial (IA) em suínos representa uma biotecnologia sólida na rotina de produção da suinocultura intensiva no Brasil e no mundo, fazendo com que a qualidade do sêmen utilizado para produção de doses seminais se torne ponto chave para o sucesso da cadeia produtiva. Várias cepas bacterianas de vários gêneros diferentes já foram detectadas como contaminantes do sêmen, e segundo Althouse e Lu (2005), as mais frequentes são *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Proteus* spp. A contaminação bacteriana por *E. coli* de alto grau causa redução na motilidade (YÁNIZ et al., 2010).

Existem vários fatores que podem interferir na conservação dos ejaculados, entre eles a contaminação bacteriana por *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC), que pode ocasionar alterações morfológicas e funcionais no ejaculado, diminuindo a fertilidade do macho, e falhas reprodutivas na fêmea (BERTÃO e SARIDAKIS, 2007). Os efeitos negativos não ocorrem somente no macho, nas fêmeas o sêmen contaminado pode resultar na infertilidade e possível descarte da fêmea (PRIETO & CASTRO, 2005).

O monitoramento sanitário e a análise da qualidade e quantidade seminal produzida pelo reprodutor é de grande importância para as centrais, sendo um passo crítico para o sucesso dos programas de Inseminação Artificial (IA) nas granjas (LOPEZ RODRIGUEZ et al., 2012)..

2 Objetivo

O presente projeto teve como principal objetivo realizar uma checagem no controle sanitário bacteriológico de sêmen suíno (*Sus scrofa*), oriundos da Central de Inseminação Artificial da Região Sudoeste do Paraná. Através da técnica de PCR multiplex, fez-se a pesquisa da presença da bactéria *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC) em amostras de sêmen suíno oriundos da central de inseminação artificial, uma vez que esta

destina doses de sêmen para inseminação artificial em granjas produtoras de leitões na região Sudoeste do Paraná.

3 Metodologia

3.1 Origem do Sêmen

O presente trabalho receberá o sêmen acondicionado corretamente, oriundo de granjas núcleos da Central de Inseminação, coletados por funcionários dessa empresa, uma vez que essa coleta já faz parte de uma rotina diária da Central.

Os ejaculados serão provenientes de 100 varrões, com idade entre 12 a 36 meses, da genética HiperSadia (linhagem comercial), de fertilidade comprovada, pertencentes à Central de Inseminação Artificial (CIA)/Centro de Difusão Genética (CDG) Cooperxanxerê – Cooperativa Agrária Xanxerê, localizada no Município de Enéas Marques, na Região Sudoeste do Estado do Paraná.

3.2 Coleta e avaliação seminal

Foram coletadas até o presente momento 30 amostras de ejaculados (ainda há mais 70 amostras a serem coletadas) através da técnica da mão enluvada em frasco/recipiente graduado com capacidade para um volume de 500 ml, pré-aquecido a 37 °C e protegido por recipiente isotérmico (copo térmico). Para a execução da coleta foi utilizado um manequim fixo, sendo este macio para que o varrão se sinta confortável durante a monta; além de evitar a ocorrência de traumatismos no pênis ou aparelho locomotor dos animais. Antes da coleta foi realizada a higienização do prepúcio dos animais por meio de pressão manual craniocaudal no sentido da abertura prepucial e posterior limpeza da região com papel toalha. Foi coletado todo o ejaculado, sendo a fração gelatinosa separada por meio de uma camada tripla de gaze/papel-filtro adaptada ao frasco coletor. Após a coleta das amostras dos ejaculados, coletou-se com auxílio de uma pipeta eletrônica 60µl (microlitros) da amostra *in natura* em microtubos autossustentáveis com tampa de rosca capacidade 2ml contendo meio de cultura específico para *Escherichia coli*, disponibilizado pelo laboratório de Patologia da Universidade de São Paulo (USP). Para uma melhor dispersão do coletado ao meio foi introduzida a ponteira da pipeta até a metade do conteúdo total do meio. Para cada amostra foi usado uma ponteira. As amostras foram enviadas ao laboratório de Patologia da USP, para realização do cultivo.

3.3 Cultivo:

Foi realizado a diluição do suabe em caldo BHI (brain heart infusion), incubado por 24 horas a 37°C e plaqueado em ágar MacConkey 37°C por 24 horas.

3.4 Técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase):

Os processos laboratoriais microbiológicos/bioquímicos e molecular foram realizados no laboratório de Patologia da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). As amostras foram submetidas a extração de DNA pelo protocolo descrito por Lucca (2015). Para detecção dos genes *eaeA* e *stx1* por PCR Multiplex foi seguido a padronização descrita por Lucca (2015). Os *primers* utilizados para pesquisa de *eaeA* foram os mesmos descritos por Paton e Paton (2002), e para pesquisa de *stx1* os mesmos primers descrito por Machado et al. (2014). Foi utilizado a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). As temperaturas de *Melting* utilizadas no termociclador foram as mesmas descritas por Lucca (2015). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio em concentração de 3%. A leitura foi realizada com uso de um marcador de peso molecular (Ladder) de 100pb (pares de base), com uma formação de banda marcadora para *eaeA* e *stx1* respectivamente de 384 e 346pb.

4 Resultados e Discussão

Do total até o presente momento, de 30 amostras avaliadas, o resultado bacteriológico mostrou que quatro amostras (13%) foram positivas para *Escherichia coli*, e sete amostras inconclusivas (23%), aos quais serão submetidas à identificação pela técnica de espectrometria de massa para detectar e identificar moléculas de interesse por meio da medição da sua massa e da caracterização de sua estrutura química.

Pelo baixo número de amostras E. Coli positivas encontradas em 30 amostras optou-se por aumentar o número de amostras coletadas. Para isso serão coletadas mais 70 novas amostras de animais diferentes. As amostras positivas serão submetidas à técnica de PCR multiplex, para as pesquisas dos genes *eaeA* e *stx1*.

5 Conclusão

Das 30 amostras de ejaculados suíno até o presente momento avaliadas, em 04 amostras (13%) foi confirmada a contaminação por *E. coli*. As preliminares dos resultados sugerem que há contaminação do sêmen suíno, ao qual pode causar redução na motilidade total e progressiva,

alterar a viabilidade espermática, contaminar o ambiente uterino, contribuir como causa de abortos e infertilidades em fêmeas.

Referências

ALTHOUSE, G. C.; LU, K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 573-584, Jan. 2005.

BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. Escherichia coli produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, jul./dez. 2007

LÓPEZ RODRÍGUEZ, A.; RIJSSELAERE, T.; VYT, P.; VAN SOOM, A.; MAES, D. Effect of dilution temperature on boar semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 5, p. e63-e66, Oct. 2012.

LUCCA, F; ALVES, J; BUSTAMANTE-FILHO, I. C. Uso de PCR multiplex no diagnóstico de contaminação de doses de sêmen suíno por *Escherichia coli* patogênica. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.9, n.1, 185-194, abr - jun 2015.

MACHADO, L. A. P; LUCCA, F; ALVES, J; POZZOBON, A; BRUSTAMANTE-FILHO, I. C. B. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v. 8, n.1, p. 128-145, 2014.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA*, and *saa*. **Journal Clinical Microbiology**. V. 40(1), p. 271-274, 2002.

PRIETO, C.; CASTRO, J. M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. **Theriogenology**, v.63, p.1–16, 2005.

YÁNIZ, J. L., MARCO-AGUADO, M. A., MATEOS, J. A., & SANTOLARIA, P. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 142-149, 2010.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; contaminação bacteriana; reprodução; suíno; sêmen.

Fonte de Financiamento

BOLSAS DE INCLUSÃO SOCIAL PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA - PIBIS/FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA