



## Uso de PCR multiplex no diagnóstico de contaminação de doses de sêmen suíno por *Escherichia coli* patogênica

Franciele Lucca<sup>1</sup>; Jayse Alves<sup>2</sup>; Ivan Cunha Bustamante-Filho<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bióloga. Mestranda, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, UNIVATES

<sup>2</sup> Acadêmica do curso de Biomedicina, UNIVATES.

<sup>3</sup> Professor Adjunto, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, UNIVATES.

\*Autor para correspondência: ivanbustamante@univates.br

**RESUMO:** A contaminação microbiológica do sêmen suíno para uso em inseminação artificial resulta em perda de qualidade da dose por alterações morfológicas e funcionais, diminuindo a fertilidade do macho. Contudo, as consequências podem ser maiores já que uma das formas de contaminação com patógenos que afetam a reprodução de matrizes suínas é via doses de sêmen refrigerado contaminadas. A bactéria *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC) está associada a casos de falhas reprodutivas na porca, sendo também de grande importância como um agente etiológico em humanos, causando como por exemplo a colite hemorrágica (CH) e a síndrome hemolítico urêmica (SHU). O objetivo deste trabalho foi identificar a contaminação de doses de sêmen suíno por STEC através de um protocolo de PCR multiplex utilizando os genes *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *uspA* e *cysG*. Os resultados apresentados em 59 amostras de sêmen suíno, indicam que há contaminação em 66,1% das amostras por *E. coli*. Destas, onde a prevalência de 70,4% das amostras foram positivas para o gene de *stx1*, que codifica a síntese da toxina Shiga 1 e 29,6% para o gene *eaeA*, responsável pela produção da toxina intimina. Na amostra e condições avaliadas, a contaminação do sêmen suíno para comercialização com *E. coli* é uma realidade, em especial com cepas portadores de *stx1* e *eaeA*, importantes genes de virulência.

**Palavras Chaves:** STEC, diagnóstico molecular, PCR multiplex, contaminação do sêmen.

### Use of multiplex PCR in the diagnosis of contamination of boar semen doses by pathogenic *Escherichia coli*

**ABSTRACT:** Microbiological contamination of boar semen for use in artificial insemination results in loss of quality of the dose by morphological and functional changes, reducing the fertility of male. However, the consequences may be higher once artificial insemination with cooled semen is one of the most common ways to contaminate the reproductive tract of sows. The bacteria *Escherichia coli* producing Shiga toxin (STEC) is associated with cases of reproductive failure in the female swine and is also of great importance as etiological agent in humans, causing hemorrhagic colitis (HC) and the hemolytic uremic syndrome (HUS). The objective of this study was to identify the contamination of boar semen doses by STEC through a protocol multiplex PCR using the *eaeA* genes, *stx1*, *stx2*, *USPA* and *cysG*. The results for 59 samples of boar semen, indicate that there is contamination in 66.1% of the samples for *E. coli*. Of these, where the prevalence of 70.4% of the samples were positive for *stx1* gene encoding the synthesis of Shiga toxin 1 and 29.6% for the *eaeA* gene responsible for production of toxin intimin. In the samples and conditions tested, the contamination of commercial swine semen doses with *E. coli* is a reality, specially with strains harboring *stx1* and *eaeA*, important virulence genes.

**Key Words:** STEC, molecular diagnostics, multiplex PCR, semen contamination.

Autor para correspondência: \* ivanbustamante@univates.br

Recebido 10/04/2015; Aceito 08/06/2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20150017>

## INTRODUÇÃO

O sêmen suíno refrigerado é amplamente utilizado na inseminação artificial (IA) que segue crescendo mundialmente (Althouse et al., 2000). Este aumento é alavancado pelo constante aperfeiçoamento da tecnologia de preservação do sêmen que permite a distribuição das doses a granjas distantes da central de inseminação artificial (BROEKHUIJSE et al., 2012). Porém, um dos aspectos que ainda comprometem a qualidade das doses é a contaminação microbiológica, que pode ocorrer por consequência de bacteriospermia (ALTHOUSE & LU, 2005), afetando a qualidade *in vitro* como a longevidade do sêmen pós-ejaculado estando puro ou com diluentes, ou durante o processamento das doses (ALTHOUSE et al., 2000; ÚBEDA et al., 2013), contudo o sêmen contaminado resulta na infertilidade e possível descarte da fêmea (PRIETO & CASTRO, 2005). Assim, o cuidado com a biossegurança das doses é de grande relevância no processamento e distribuição do sêmen suíno (ALTHOUSE et al., 2008).

Cepas bacterianas pertencentes a pelo menos 25 gêneros diferentes já foram detectadas como contaminantes do sêmen, sendo as mais frequentes são *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Proteus* spp (ALTHOUSE & LU, 2005). Em cachaços, o trabalho desenvolvido por Úbeda et al., em 2013, com 1785 animais de 43 centrais diferentes, mostra

que os principais contaminantes foram: *Serratia marcescens* (12,55%), *Klebsiella oxytoca* (11,79%), *Providentia stuarti* (9,12%), *Morganella morganii* (3,8%), *Proteus mirabilis* (1,9%) e *Escherichia coli* (1,52%).

A contaminação bacteriana por *E. coli* de alto grau causa redução na motilidade (YÁNIZ et al., 2010), aumento de formas anormais (ÚBEDA et al., 2013) e viabilidade (BUSSALLEU et al., 2011). Soma-se a isto, as consequências da contaminação bacteriana do trato reprodutivo da porca através da IA, levando ao aumento do retorno ao estro, corrimentos vaginais, reduzindo assim o desempenho reprodutivo (VANNIER, 1999), em resumo os microrganismos causadores de patógenos podem atingir diretamente a produtividade (CARDOSO et al., 2000).

Associada a diversos casos de falhas reprodutivas na porca, a bactéria *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) apresenta-se de grande importância não só pelos seus efeitos deletérios ao sêmen suíno (BUSSALLEU et al., 2011), mas como agente etiológico de sérias patologias em humanos como por exemplo, a colite hemorrágica (CH) e a síndrome hemolítico urêmica (SHU) (NATARO & KAPER, 1998; GRIFFIN & TAUXEN, 1991). THOMSON (2001), descreveu a alta prevalência deste patógeno em fazendas de gado leiteiro e de corte, o que ocorre pois o bovino é reservatório natural de STEC (SAVOYE et al.,

2011), já AUROUX et al., (1991), observaram que a *E. coli*, quando presente no sêmen induz aglutinação de espermatozoides e baixa a baixa motilidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar a contaminação de doses de sêmen suíno por STEC através de um protocolo de PCR multiplex utilizando os genes *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *uspA* ou *cysG*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e coleta das amostras de ejaculados

Os animais coletados são cachaaos, com idade entre 10 e 30 meses. As amostras foram obtidas de uma Central de Inseminação Artificial, coletadas de forma asséptica (técnica da mão enluvada), seguindo o protocolo da Central. Foram utilizadas 59 amostras de sêmen suíno, a obtenção das amostras ocorreu entre os meses de junho de 2013 à fevereiro de 2014. As mesmas foram coletadas e armazenadas em caixa térmica para transporte até o laboratório para posterior análise.

### Extração e quantificação do DNA

As amostras foram submetidas a extração de DNA pelo protocolo de proteinase K (DE GRACIA, 1997), onde em 200 µL de amostra, adicionou-se 20 µL de Tween 20, centrifugou-se a 12000 x g por 10 min a 20°C. Suspendeu-se o *pellet* em 300 µL de tampão de lise [60 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 250 mM NaCl), 30 µL de SDS a 10%, 15 µL de proteinase K (20 mg/mL), 195 µL de água ultra-pura], após incubou-se por 1 h

a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 250 µL de fenol tamponado (pH 8,0) e centrifugado a 12.000 x g por 5 min, posteriormente transferiu-se 200 µL do sobrenadante para um novo microtubo. Após, adicionou-se 100 µL de fenol clorofórmio-álcool- isoamílico na proporção de 25:24:1 (centrifugado a 12000 x g por 5 min e transferiu-se 150 µL do sobrenadante para um novo microtubo). Adicionou-se 26,5 µL de acetato de sódio (2 M) e 400 µL de etanol absoluto permanecendo -20 °C por 18 horas. Por fim centrifugou-se a 12.000 x g por 20 min e suspendeu-se o *pellet* com 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), incubou-se a 56°C por 15 minutos e estocou-se a -20°C até o momento da análise.

Para quantificação do DNA usou-se espectofotômetro L-Quanti, Locus Biotecnologia em comprimentos de onda 260 - 280 nm, as amostras foram lidas em duplicata. Para a aplicação da técnica de PCR multiplex, as amostras foram diluídas em água ultra-pura estéril até a concentração de 150 ng/µL de DNA.

### Detecção dos genes *eaeA*, *stx1*, *uspA* e *cysG* por PCR Multiplex

Para a realização da genotipagem das amostras de DNA bacteriano extraído de sêmen suíno, foi padronizada uma reação de PCR multiplex, para identificação simultânea de 3 genes. Para tanto, foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** – *Primers* utilizados na reação de PCR multiplex para identificação da contaminação por *E. Coli* portadora dos genes *stx1* e *eaeA*.

Gene	<i>Primers</i> Sequencia 5' – 3'	TM (°C)	Tamanho do amplicon	Referência
<i>uspA</i>	CCGATACGCTGCCAATCAGT	57,8	884 pb	Chen & Griffiths (1998)
	ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	61,0		
<i>CysG</i>	GCAGCAGGATCTGGTTAATCTC	63,9	580 pb	Este trabalho
	GCTCGTCGCATCTTCTGTAAC	63,8		
<i>eaeA</i>	ATTACCATCCACACAGACGGT	63,1	384 pb	Paton & Paton (2002)
	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT	67,9		
<i>stx1</i>	GATTTATCTGCATCCCCGTACG	55,5	346 pb	Machado et al. (2014)
	CTTACGCTTCAGGCACATACAG	55,8		

As reações foram montadas a partir de testes realizados para melhor obtenção de desempenho avaliando: temperatura, quantidade de *primer*, quantidade de MgCl<sub>2</sub> e quantidade de DNA. Utilizou-se para a reação: 10,4 µL de H<sub>2</sub>O, 2 µL de PCR Buffer (20 mM de Tris HCL pH 8,4 e 50mM de KCL), 3,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de *dNTPs* mix, 0,25 µM de *primers sense* e *antisense* para amplificação dos genes *stx1*, *eaeA*, *uspA* ou *cysG*, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 150 ng de DNA genômico. A técnica de PCR foi realizada em termociclador Veriti® 96-Well

(*Life Technologies*), tendo 20 µL como volume final. As condições utilizadas para a reação da PCR foram: 94 °C por 5 min, 36 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg e 72 °C por 1:30 min.

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de Etídio, em uma concentração de 3%.

O controle positivo de DNA bacteriano isolado da cepa de *E. coli* O157:H7 Edl 933, foi gentilmente cedido pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline Pigatto De Nardi, do Instituto Federal de São Paulo.

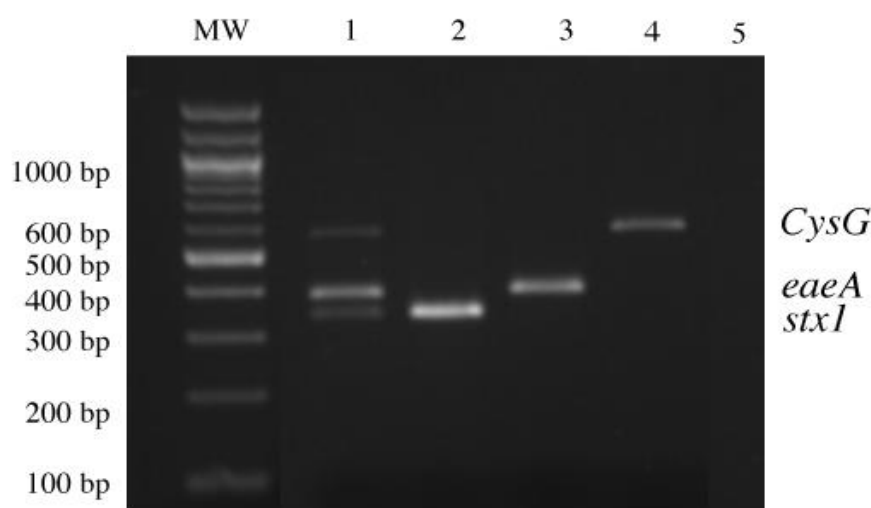
## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tabelados e apresentados por estatística descritiva, sendo analisados pelo software Prism 6 (GraphPad, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após diversos testes de padronização, obteve-se uma reação de PCR multiplex onde é possível identificar a ocorrência da bactéria *E. coli* portadora dos genes *eaeA* e *stx1*, relacionados a patogenicidade (Figura 1). A técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) possibilita um

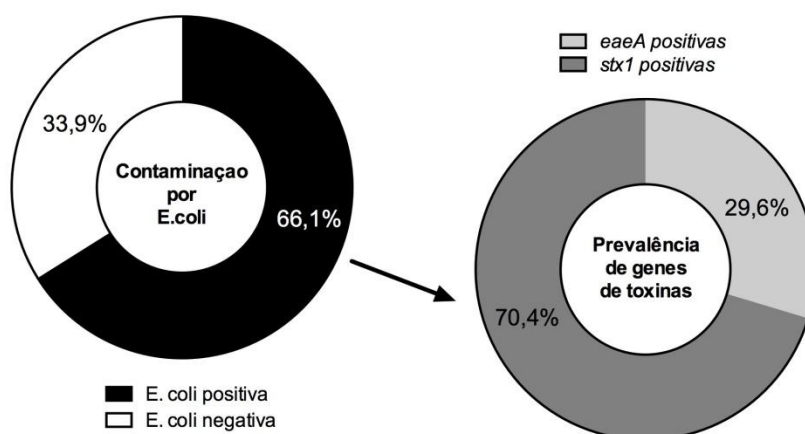
diagnóstico rápido e seguro nas análises, tendo em vista sua eficiência para doenças infecciosas (OLIVEIRA, 2003). Atualmente, é um dos principais métodos moleculares empregados para detecção de STEC (BUSSALLEU et al., 2011; PARK et al., 1999). Em especial, o uso do protocolo multiplex possibilita a amplificação de mais de um gene na mesma reação, viabilizando a distinção de espécies e identificação de genes de resistência a antimicrobianos e genes codificadores de toxinas (EDWARDS & GIBBS, 1994).



**Figura 1** - Diagnóstico por PCR multiplex da ocorrência de *E. coli* portadora dos genes *eaeA* e *stx1*, relacionados a patogenicidade. MW: marcador de peso molecular de 100 pb. 1: PCR multiplex do controle positivo; 2–4: Reações uniplex para cada um dos genes indicados; 5: Controle negativo. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio.

A técnica de PCR multiplex foi empregada em 59 amostras de sêmen suíno. Observou-se uma contaminação de 66,1% das amostras por *E. coli*. Destas, foi identificada a prevalência de 70,4% de amostras positivas

para o gene de *stx1*, que codifica a síntese da toxina Shiga1 e 29,6% para o gene *eaeA*, responsável pela produção da toxina intimina (Figura 2).



**Figura 2** – Ocorrência de *E. coli* patogênica em sêmen suíno diagnosticada por PCR multiplex.

A ocorrência de infecção bacteriana por *E. Coli*, assim como por outros microorganismos é algo que não pode ser evitado, contudo deve ser minimizado (AURICH & SPERGSER, 2007; ALTHOUSE & LU, 2005, ALTHOUSE et al., 1998). As diversas etapas de coleta, processamento, estocagem, distribuição, e inseminação possuem inúmeros pontos críticos para controle de qualidade microbiológico da produção de doses que devem ser observados atentamente (GOLDBERG et al., 2013; THACKER et al., 1984). Goldberg et al. (2013) apontaram os fatores de risco para contaminação microbiológica do sêmen, e dentre as diversas variáveis avaliadas, o tempo de coleta prolongado (6 a 7 minutos) e gotejamento do líquido prepucial dentro do copo coletor foram responsáveis por níveis significativamente maiores de contaminação. Os autores afirmam que tais contaminações

podem ser evitadas com planejamento e estratégia de treinamento e reciclagem dos colaboradores nas centrais de reprodução. A atenção aos procedimentos corretos e boas práticas de produção podem garantir melhores resultados para a central (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

A importância na precaução da contaminação das doses de sêmen suíno reside nos efeitos deletérios sobre a função do espermatozoide, causando alteração na estrutura, afetando a sua motilidade (Depuydt et al., 1998), provocando uma reação prematura do acrossoma (KOHN et al., 1998).

Bussaleu et al. (2011) testaram diferentes concentrações de STEC em sêmen suíno refrigerado por até 11 dias e observaram redução na motilidade total e progressiva, além da viabilidade espermática.

Além dos efeitos seminais, a contaminação do ambiente uterino por

microorganismos pode resultar em perdas significativas da fertilidade da porca. A contaminação por *E. coli*, pode acarretar na interrupção da gestação, podendo ocasionar lesões endometriais e redução no tamanho da leitegada. Podem ocorrer também mumificação fetal ou aborto devido a septicemia, toxemia e pirexia (GRESHAM, 2003). Inclusive, a infecção antes dos 35 dias de gestação pode originar morte embrionária ou fetal, resultando em reabsorção, maceração e abortamento (VANROOSE et al., 2000).

Apesar de sua importância epidemiológica, existe uma carência de informações sobre a ocorrência de STEC na produção suína, resultando, na dificuldade de diagnóstico da contaminação. Assim, novas ferramentas para detecção de STEC em sêmen podem auxiliar no controle da contaminação por este patógeno.

Um ponto importante a ser destacado é que a bactéria é mais resistente a baixas temperaturas que o espermatozoide. Enquanto este pode sofrer alterações significativas na membrana plasmática, a bactéria passa por apenas uma redução do metabolismo, ficando em um estado dormência. Este fato leva a um aumento na longevidade da bactéria, ampliando os potenciais patológicos da contaminação (ALTHOUSE, 2008). O uso de antimicrobianos nos diluentes de sêmen visam diminuir este problema, porém alguns estudos

já demonstraram que 90% das bactérias isoladas de doses de sêmen suíno apresentam resistência a antimicrobianos (BOLLARÍN GUILLÉN, 2011).

## CONCLUSÃO

Na amostra e condições avaliadas, a contaminação do sêmen suíno para comercialização é uma realidade, em especial com cepas portadores de *stx1* e *eaeA*, importantes genes de virulência.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi desenvolvido com apoio financeiro da FUVATES, FAPERGS e CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTHOUSE GC, KUSTER CE, CLARK SG, WEISIGER RM. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**. v. 53, p. 1167–76, 2000.
- ALTHOUSE GC, LU KG. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology** v. 63, p.573–84, 2005.
- ALTHOUSE, G. C., PIERDON, M. S., & LU, K. G Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. **Theriogenology**, v.70, p. 1317-1323, 2008.

- AURICH, C., & SPERGSE, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 912-918, 2007.
- AUROUX, M. R., JACQUES, L., MATHIEU, D., & AUER, J.. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in-vitro study in man with *Escherichia coli*. **International Journal of Andrology**, v.14, p. 264-270, 1991.
- BOLARÍN GUILLÉN, A. Bacteriología en semen de porcino. **Avances en tecnología porcina**, v.8, p.20-30, 2011.
- BORTOLOZZO, F.P. & WENTZ, I. Suinocultura em ação, 2 – Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. **Pallotti**, Porto Alegre, p.183, 2005.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J., FEITSMA, H., & GADELLA, B. M. Artificial insemination in pigs: predicting male fertility. **Veterinary Quarterly**, v.32, p.151-157, 2012.
- BUSSALLEU, E., YESTE, M., SEPÚLVEDA, L., TORNER, E., PINART, E., & BONET, S. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. **Animal reproduction science**, v.127, p.176-182, 2011.
- CARDOSO, M. V., BLANCHARD, A., FERRIS, S., VERLENGIA, R., TIMENETSKY, J., & DA CUNHA, R. A. F. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. **Veterinary microbiology**, v. 72, p. 241-250, 2000.
- DEPUYDT, C., ZALATA, A., CHRISTOPHE, A., MAHMOUD, A., & COMHAIRE, F. Mechanisms of sperm deficiency in male accessory gland infection. **Andrologia**, v.30, p.29-33, 1998.
- EDWARDS, C.; GIBBS, A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. **Genome Research**, v. 3, p. 65-75, 1994.
- GOLDBERG A.M.; ARGENTI L.E.; FACCIN J.E.; LINCK, L.; SANTI M.; BERNARDI M.L.; CARDOSO, M.R.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Risk factors for bacterial contamination during



boar\_semen\_collection. **Res Vet Sci.** v.95, p.362-367, 2013.

GRESHAM, A. Infectious reproductive disease in pigs. **In Practice**, v, 25, p.466 – 473, 2003.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli*O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**, v. 13, p. 60-98, 1991.

KÖHN, F. M., ERDMANN, I., OEDA, T., EL MULLA, K. F., SCHIEFER, H. G., & SCHILL, W. B. Influence of urogenital infections on sperm functions. **Andrologia** v.30, p.73-80, 1998.

MAXWELL WMC, DE GRAAF SP, EL-HAJJ GHAOUI R, EVANS G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 64, p. 13, 2007.

NATARO, J. P.; KAPER, B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

OLIVEIRA CJR. **Aplicações teóricas da biologia molecular/engenharia genética em análises clínicas.** Apostila (Disciplina Engenharia Genética) - Curso de Biomedicina, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Metodista, São Paulo, p.17-20, 2003.

PARK, S.; WAROBO, R. W.; DURST, R. A. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 39, p. 481-502, 1999.

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

SAVOYE F, FENG P, ROZAND C, BOUVIER M, GLEIZAL A, THEVENOT D. Comparative evaluation of a phage protein ligand assay with real-time PCR and a reference method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef and trimmings **Journal of Food Protection®**, v. 74, p. 6-12, 2011.

THACKER, B. J., LARSEN, R. E., JOO, H. S., & LEMAN, A. D. Swine diseases transmissible with artificial insemination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.185, p.511-516, 1984.

THOMSON, J. Etiología y control de las enfermedades entéricas en porcino. **Anaporc. Revista de Porcinocultura**, v. 21, p.36-55, 2001.

ÚBEDA, J. L., AUSEJO, R., DAHMANI, Y., FALCETO, M. V., USAN, A., MALO, C. PEREZ-MARTINEZ, F. C. Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. **Theriogenology**, v. 80, n. 6, p. 565-570, 2013.

VANNIER, P. Infectious causes of abortion in swine. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p. 367-376, 1999.

VANROOSE, G., DE KRUIF, A., & VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p.131-143, 2000.

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