



Análises do Sêmen de Suínos em Centrais de Inseminação Artificial e Detecção de Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV2)

Janice Reis Ciacci-Zanella¹
Eraldo Zanella²
Marcelo L. Locatelli³
José L. Brambatti⁴
Neide L. Simon⁵
Michelle Coldebella⁶

1. Introdução

A síndrome da circovirose suína é causada pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2), um vírus patogênico para suínos de elevada prevalência em criações suínícolas. Existem várias manifestações clínicas desta infecção pelo PCV2, porém a Síndrome do Definhamento Multisistêmico dos Suínos ou a Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (SDNS) e doenças relacionadas à falhas reprodutivas como abortos, natimortos e mumificados são manifestações clínicas reproduzidas experimentalmente com PCV2. O DNA de PCV2 já foi detectado em sêmen de machos suínos infectados experimentalmente e também em condições naturais através de PCR-interna (reação em cadeia da polimerase – interna) por nós e outros autores. Órgãos de cachaços infectados natural-

mente também abrigam o DNA de PCV2, sugerindo que o macho suíno infectado representa um fator importante na disseminação do PCV2 dentro do plantel, principalmente através de sêmen infectado. Isso sugere que o PCV2, assim como outros vírus de transmissão genital, pode infectar células do sistema reprodutivo do macho, manter uma produção viral eficiente capaz de ser transmitido pelo sêmen, infectar fêmeas e conseqüentemente levar à patologia reprodutiva. O objetivo deste trabalho foi diagnosticar a presença de PCV2 em amostras de sêmen de machos suínos oriundos de centrais de inseminação artificial (CIAs). Além disso, avaliar a duração da positividade naqueles cachaços positivos, para a aplicabilidade de um protocolo de testagem de PCV2 em CIAs.

¹ Médica Veterinária, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Cx. Postal 21, CEP 89.700-000, Concórdia – SC, e-mail: janice@cnpa.embrapa.br

² Médico Veterinário, Ph.D., Professor da Faculdade de Veterinária da UPF

³ Estudante de Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária da UPF

⁴ Médico Veterinário, B.Sc., Faculdade de Veterinária da UPF

⁵ Química, B.Sc., Assistente da Embrapa Suínos e Aves

⁶ Estudante de Química Industrial de Alimentos, UnC Concórdia, Bolsista do PBIC - CNPq.

2. Material e Métodos

Amostras: foram utilizadas 304 amostras de sêmen de 225 machos suínos de 03 CIAs denominadas A (n=20), B (n=109) e C (n=169), além de 6 amostras de sêmen de reprodutores suínos de uma granja que utiliza monta natural (central D). As propriedades estão localizadas na região Sul do Brasil. A idade dos animais avaliados variou de 171 a 1686 (média de 695,87) dias. O sêmen foi obtido por colheita manual, centrifugado a 12.000 rpm por 30 segundos e o DNA do fluído seminal (sobrenadante) foi extraído e purificado pelo método de extração de DNA pelo método da proteinase K.

Análises virológicas : PCR-interna

Para realizar a extração do DNA do sêmen as amostras foram digeridas por 18 h a 55°C em tampão TNE (10mM Tris, 1mM EDTA, 100mM NaCl) contendo 0,5% SDS e 0,1 mg de proteinase K. O DNA foi extraído duas vezes com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24: 1), precipitado em etanol (-20°C por 2 horas), lavados em etanol 70%, seco e ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). O diagnóstico virológico foi realizado através da técnica de PCR-interna utilizando seqüência de primers específica para amplificar a seqüência da ORF2 (fase aberta de leitura 2) do DNA do PCV2 descritos anteriormente (Zanella et al, 2006).

Análises espermáticas: Uma amostra do mesmo ejaculado de sêmen foi avaliado quanto a motilidade e após adicionada ao formol citrato na proporção de 1:200 para avaliação da morfologia espermática. As avaliações de média e porcentagem foram realizadas utilizando o programa Origin (Microcal Software, Inc).

3. Resultado e Discussão

Todos os machos estudados estavam em boas condições sanitárias, não apresentaram histórico de doença clínica e estavam sendo utilizados no fornecimento de sêmen, e/ou em treinamento.

Todas as CIAs (A, B, C) e granja (D) avaliadas apresentaram amostras de sêmen de cachaço positivas para PCV2, sendo 25% na central A, 20% na central B, 22% na central C e 50% na central D. Após a primeira colheita, os 14 machos das centrais B e C, que resultaram positivos foram recoletados 30 dias depois para avaliar se ainda havia PCV2 no sêmen destes cachaços, porém das 14 amostras somente 6 continuaram positivas (Tabela 1). Na terceira colheita, seis amostras foram coletadas e apenas duas resultaram positivas. Na CIA C, 30 amostras foram recoletadas e destas apenas 12 resultaram positivas. Isso indica que os cachaços podem ter passado por um período de viremia ou reativação e liberação viral dependente de algum fator, talvez estresse. Mesmo assim é importante salientar que no total de 304 amostras testadas, 67 foram positivas, ou seja, 22%.

Tabela 1 - Resultados do teste de PCR-interna para detecção de PCV2 em amostras de sêmen suíno das centrais testadas.

CIA	N total de amostras testadas	Resultado da 1 Colheita		Resultado da 2 Colheita		Resultado da 3 Colheita		Total de amostras positivas (%)
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	
A	20	5/20	15/20	NR	NR	NR	NR	5/20 (25%)
B	109	14/89	75/89	6/14	8/14	2/6	4/6	22/109 (20%)
C	169	25/139	114/139	12/30	18/30	NR	NR	37/169 (22%)
D*	6	3/6	3/6	NR	NR	NR	NR	3/6 (50%)
TOTAL DE AMOSTRAS	304	47/254	207/254	18/44	26/44	2/6	4/6	67/304 (22%)

- A propriedade "D" é um granja onde se utiliza monta natural.
NR = Teste Não Realizado.

Como já reportado anteriormente por nosso grupo, utilizando as técnicas de PCR-interna e imunohistoquímica demonstrou-se o PCV2 está presente em órgãos do aparelho reprodutor do cachaço positivo para PCV2 no sêmen, como o testículo, próstata, epidídimo, dentre outros, o que indica que o vírus pode estar persistente em células nestes órgãos e talvez ser liberado destas células esporadicamente a partir de estímulos. Além disso, o fato da detecção do DNA de PCV2 de forma esporádica e não continuada alerta que os machos que resultaram negativos na primeira colheita podem também ser positivos, caso a monitoria destas centrais forem feitas de forma rotineira, justificando um estudo mais detalhado dos riscos que essa positividade pode significar.

Os animais positivos nas centrais B e C, eram mais velhos ($p < 0,05$) do que os animais negativos, $417,3 \pm 295,2$ vs $675,8 \pm 222,7$ dias de idade e $462,8 \pm 247,6$ vs $760,9 \pm 365,6$ dias de idade, para as centrais A e B, respectivamente. A presença do PCV2 nas amostras de sêmen, em animais mais jovens, pode indicar inicialmente uma infecção recente destes animais nas CIAs, ou mesmo uma reativação do vírus por algum mecanismo ainda desconhecido, talvez o estresse da rotina de coleta, ou mesmo o manejo nas CIAs.

Quanto as avaliações de morfologia, não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras avaliadas desses machos, indicando que o PCV2 não afeta a motilidade e a morfologia espermática. Todas as amostras de sêmen apresentaram motilidade superior a 80%, o que permitiria que as mesmas fossem utilizadas para o processamento, diluição e inseminação artificial.

4. Conclusões

Neste trabalho o DNA de PCV2 foi amplificado por PCR-interna em 22% das amostras testadas, uma porcentagem significativa das amostras de sêmen de suíno adulto de CIAs, sem alteração na qualidade (motilidade e morfologia espermática)

do ejaculado. Além disso, a eliminação do PCV2 no sêmen destes cachaços não é intermitente, necessitando uma monitoria freqüente dos cachaços destas CIAs. No exame clínico nenhum animal apresentou sintomatologia característica de circovirose suína.

5. Implicações

1. Neste trabalho o DNA de PCV2 foi amplificado em sêmen de cachaços em produção, tornando assim um grande risco para transmissão do agente da circovirose suína através de sêmen distribuído pelas centrais de inseminação.
2. A PCR-interna é uma ferramenta para testar o sêmen de cachaços de centrais e auxiliar no controle da circovirose suína. "Pools" de amostras de sêmen de três machos poderão ser enviadas ao laboratório para exame a cada 6 meses.

6. Referencias Bibliográficas

ALLAN, G. M.; MCNEILLY, F. PMWS/PCVD: Diagnosis, disease and control: what do we know? In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 19., 2006, Copenhagen... **Proceedings**. Copenhagen: IPVS, 2006. v. 1, p. 1-9.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; BASSI, S.S.; ASCOLI, K.; DAHMER, A.; ZANELLA, E.L. Detecção de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em sêmen de suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. p.97-98.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; BASSI, S.S.; ASCOLI, K.; SIMON, N.L.; DAHMER, A.; ZANELLA, E.L. Detecção de DNA de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em órgãos de macho suíno. In: CONGRESSO

LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., 2004, Foz do Iguaçu. **Anais...** Campinas: Ed. AnimalWorld, 2004. p.456-457.

KIM, J.; HAN DU; CHOI, C.; CHAE, C. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 25-31, 2001.

LAROCHELLE, R., BIELANSKI, A., MULLER, P., MAGAR, R. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 (PCV2) in boars semen following experimental infection. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne...**Proceedings**. Melbourne: IPVS, 2000. p. 580.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a**

laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press;1989.

WEST, K.H.; BYSTROM, J.M.; WOJNAROWICZ C.; SHANTZ, N.; JACOBSON, M.; ALLAN G. M.; HAINES, D.M.; CLARK, E.G.; KRAKOWKA, S.; MCNEILLY, F.; KONOBY, C.; MARTIN, K.; ELLIS J.E. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, v.11, p.530-532, 1999.

ZANELLA, J.R.C.; MORÉS, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S. R.; GAVA, D. Identificação do circovirus suíno tipo 2 (PCV2) por reação em cadeia da polimerase e por imunistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 36, n. 5, p.1480-1485, 2006.

Comunicado Técnico, 438

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves
Endereço: Br 153, Km 110,
Vila Tamanduá, Caixa postal 21,
89700-000, Concórdia, SC
Fone: 49 3441 0400
Fax: 49 3442 8559
E-mail: sac@cnpsa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2006): tiragem: 100

Comitê de Publicações

Presidente: Claudio Bellaver
Membros: Teresinha M. Bertol, Cícero J. Monticelli, Gerson N. Scheuermann, Airton Kunz, Valéria M. N. Abreu
Suplente: Arlei Coldebella

Revisores Técnicos

Cícero J. Monticelli, Paulo R.S. da Silveira, Armando L. do Amaral, Irene Z.P. Camera

Expediente

Supervisão editorial: Tânia M. B. Celant
Editoração eletrônica: Vivian Fracasso
Foto: Janice R. Ciacci-Zanella