

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

FRANCIANE BATISTA

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA SOBRE OS
PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE SUÍNOS E PERFIL DE
RESISTÊNCIA DOS AGENTES ISOLADOS**

LAGES-SC

2011

FRANCIANE BATISTA

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA SOBRE OS PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS DE SUÍNOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS AGENTES
ISOLADOS**

Dissertação apresentada à coordenação do curso de Mestrado em Ciência Animal, área de concentração Microbiologia e Sanidade Suína como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Eliana Knackfuss Vaz

LAGES-SC

2011

FRANCIANE BATISTA

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA SOBRE OS PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS DE SUÍNOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS AGENTES
ISOLADOS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciência Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre. Universidade do Estado de Santa Catarina; área de concentração Microbiologia e sanidade suína.

Banca examinadora:

Orientador: _____
Profa. Doutora Eliana Knackfuss Vaz
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro: _____
Doutor Paulo Bennemann
Master Agropécuária

Membro: _____
Profa. Doutora Sandra Maria Ferraz
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Lages, dezembro 2011

Dedico este trabalho aos meus amados pais...

Minha maior alegria é saber que vocês estão felizes... e tenho certeza que os senhores, PAI e MÃE estão extremamente orgulhosos e contentes com a finalização deste trabalho... Amo muito vocês...

AGRADECIMENTO

Muitas vezes em nossas vidas nos deparamos com situações e obstáculos que não sabemos como vencer ou até mesmo como superar aquele momento... Mas, enfim descobrimos que existe uma força maior e pessoas que nos ajudam a enfrentar todos os desafios que a vida nos proporciona.

Durante o mestrado tive muita sorte de ser abençoada por uma força maior e dessa forma quero agradecer a Deus por ter me dado saúde, força e coragem para concluir esse trabalho.

Além da ajuda divina, muitas pessoas especiais passaram por meu caminho, e sem dúvida a principal delas foi a minha orientadora Professora Eliana K. Vaz, obrigado pela confiança em mim depositada, por sua amizade, por fazer que o meu objetivo de concluir o mestrado fosse alcançado, pelos conhecimentos e experiências a mim compartilhados...

Aos professores Ubirajara Maciel da Costa, Sandra Ferraz e André Thaler, a vocês quero fazer um agradecimento todo especial, obrigada pela compreensão, por dividir comigo seus conhecimentos, por me ajudarem em qualquer situação e principalmente pela amizade de vocês.

Professora Eliana, Sandra, Bira e Thaler vocês são profissionais que eu vou seguir como exemplo em minha carreira profissional. Admiro muito vocês...

Em um ambiente de trabalho é necessário que haja certa harmonia para que o trabalho atinja o resultado esperado, dessa forma quero agradecer aos meus colegas de laboratório: mestrandos, bolsistas e estagiários... Muito obrigado a todos que ajudaram no meu projeto... E não podia deixar de fazer um agradecimento especial as minhas amigas Fernanda Mello, Dayane Dambrós e Daniela Lentz a companhia e amizade de vocês fez com esse mestrado fosse concluído de uma forma mais agradável, muito obrigado...

Toda pessoa tem um alicerce, um porto seguro que é para onde recorremos diante de qualquer situação desagradável, naqueles momentos que achamos que não seremos capazes. E assim, quero agradecer carinhosamente a minha família, meus pais Felisberto Ortiz Batista e Cirley Jentig Batista, meus irmãos Sanny Batista e Leandro Jentig Batista e especialmente ao meu marido Volmir Pucci Borges, a presença, o carinho, a compreensão de vocês foi fundamental nessa jornada, vocês são as pessoas mais especiais da minha vida é em vocês que eu encontro força para enfrentar todos os obstáculos do caminho...

Agradeço a Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias ao curso de Mestrado em Ciência Animal e todos os professores que fazem parte dessa instituição, em especial ao laboratório de Reprodução Animal CAV-UDESC pela experiência compartilhada. As agroindústrias que forneceram material para o projeto, obrigada pela atenção e pela disponibilidade. A todos meu muito obrigado....

RESUMO

A Inseminação Artificial é uma biotécnica da reprodução bem estabelecida e aplicada na suinocultura atual, cujo objetivo principal é a maximização do uso dos ejaculados, mantendo e melhorando a eficiência reprodutiva. Entretanto, quando há contaminação bacteriana no sêmen, pode haver sério comprometimento para a viabilidade espermática. Doses inseminantes com contaminação bacteriana apresentam diminuição da motilidade e do pH, aumento da aglutinação, de anormalidades do acrossoma e de células mortas. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a contaminação bacteriana em sêmens coletados em centrais de inseminação artificial e relacionar com suas qualidades quantitativas e qualitativas, além de testar a sensibilidades dos agentes isolados frente a diferentes antibióticos. Foi coletado sêmen suíno de três centrais de inseminação artificial em diferentes regiões do estado de Santa Catarina. Essas amostras foram submetidas à análise microbiológica no Centro de Diagnóstico Microbiológica Animal CAV-UDESC, onde foi realizado o isolamento, identificação, contagem bacteriana além dos antibiogramas. Estas mesmas amostras foram também avaliadas quanto à motilidade, vigor, aglutinações e concentração. Para esta avaliação foram utilizados dados fornecidos pela empresa. Foram realizados esfregaços das amostras de sêmen e corados com eosina-negrosina para a avaliação da morfologia espermática. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS. Houve isolamento de 17 diferentes gêneros bacterianos, entre os quais os mais freqüentes foram *Staphylococcus* sp. (26,43%) *Proteus* sp. (20,53%), *Escherichia coli* (9,47%), *Pseudomonas* sp. (11,05%), porém não houve uma correlação significativa ($P > 0,05$) quando comparados o número de unidade formadora de colônia /mL do sêmen com motilidade, concentração e alterações morfológicas. Foi encontrado um efeito isolado do gênero *Staphylococcus* sp. ($P < 0,05$) provocando uma diminuição na motilidade dos espermatozóides das amostras onde o mesmo foi isolado. A maioria dos agentes bacterianos mostrou-se resistentes aos antibióticos comerciais testados que foram aqueles mais utilizados para diluição de sêmen nas centrais de inseminação artificial.

Palavras chaves: Sêmen, suíno, contaminação bacteriana, antibiograma.

ABSTRACT

Artificial insemination is an established and applied biotech of reproduction to the current swine production, whose main objective is to maximize the use of ejaculated, maintaining and improving reproductive efficiency. However, when there is a bacterial contamination in the semen, it may be seriously impaired for sperm viability. Inseminated doses with bacterial contamination have reduced motility and pH, increase of agglutination, abnormalities of the acrosome and dead cells. The objective of this study was to investigate the bacterial contamination in semen collected in boar studs and relate it to quantitative and qualitative semen qualities, and test the sensitivities of the isolated agent using different antibiotics. Boar semen was collected from three artificial insemination centers in different regions of the state of Santa Catarina. These samples were analyzed at the Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal CAV-UDESC, where it was performed the isolation, identification, bacterial count besides the antibiograms. The same samples were also evaluated for motility, vigor, concentration and agglutination. For this evaluation it was used data provided by the company. Smears were prepared from semen samples and stained with eosin-negrosina for the evaluation of sperm morphology. The data were subjected to analysis of variance using the GLM procedure of SAS statistical package. There were isolated 17 different bacterial genera, among which the most frequent were *Staphylococcus* sp. (26.43%), *Proteus* sp. (20.53%), *Escherichia coli* (9.47%), *Pseudomonas* sp. (11.05%), but there was not a significant correlation ($P > 0.05$) when comparing the number of colony forming unit / mL of semen with motility, concentration and morphological changes. It was found an isolated effect of the genus *Staphylococcus* sp. ($P < 0.05$) causing a decrease in sperm motility of the samples where it was isolated. Most bacterial pathogens showed resistant to commercial antibiotics tested which refers to those used in the preparation of the inseminated doses from the boar studs.

Keywords: semen, boar, bacterial contamination,, antibiograma.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Coleta de sêmen com auxílio de manequim.....	25
FIGURA 2: Coleta de sêmen, técnica da mão enluvada.....	25
FIGURA 3: Teste de sensibilidade bacteriana frente a diferentes tipos de antibióticos.....	25
FIGURA 4: Esfregaço para leitura da morfologia espermática	26
FIGURA 5: Contagem Bacteriana Total.....	26

LISTA DE TABELA

TABELA 1: Número de Amostras coletadas nas diferentes centrais de inseminação	24
TABELA 2: Amostras de sêmen com contaminação bacteriana.....	27
TABELA 3: Diferentes gêneros bacterianos isolados nas amostras de sêmen.....	28
TABELA 4: Médias das variáveis analisadas nas três centrais de inseminação testadas...	29
TABELA 5: Bactérias isoladas e sua sensibilidade frente aos diversos antibióticos usados atualmente na suinocultura.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Importância da Inseminação artificial em suínos.....	14
2.2 Vantagens e desvantagens do uso da inseminação artificial.....	14
2.3 Contaminação bacteriana	15
2.4 Cuidados básicos em uma central de inseminação artificial.....	17
2.5 Exames do ejaculado.....	17
2.6 Bactérias normalmente encontradas em sêmen suíno.....	19
3 ARTIGO	20
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira, a exemplo de outras cadeias produtivas do agronegócio, cresceu significativamente nos últimos anos. Esse crescimento é notado quando se analisa os vários indicadores econômicos e sociais, como volume de exportações, participação no mercado mundial, número de empregos diretos e indiretos, entre outros.

A criação de “porcos” do passado evoluiu também na técnica e no modelo de coordenação das atividades entre fornecedores de insumos, produtores rurais, agroindústrias, atacado, varejo e consumidores. Passou a ser uma cadeia de produção de suínos, explorando a atividade de forma econômica e competitiva.

As atividades relacionadas à suinocultura ocupam lugar de destaque na matriz produtiva do agronegócio brasileiro, destacando-a como uma atividade de importância no âmbito econômico e social. Segundo estimativas, mais de 730 mil pessoas dependem diretamente da suinocultura, sendo essa atividade responsável pela renda de mais de 2,7 milhões de pessoas (ROPPA, 2002).

A evolução da atividade suinícola está diretamente ligada com as inúmeras melhorias que o setor vem passando atualmente como o uso de instalações adequadas a produção, com o máximo de higiene possível, pois ao contrário do que se pensava antigamente, esses animais precisam de ambientes limpos e um manejo adequado, livre de fatores que possam estressá-los e influenciar negativamente nos níveis de produção apresentados.

Mas sem dúvida o fator mais importante relacionado com a qualidade da suinocultura atual é o melhoramento genético. Empresas e grupos de pesquisas especializados investem cada vez mais nesse ramo para oferecer aos suinocultores e consumidores produtos de melhor qualidade, com melhores rendimentos e conseqüentemente maiores vantagens econômicas.

O melhoramento genético iniciou-se no Brasil na década de 70, com a importação de animais da Europa e da América do Norte (LOPES, 2004). Aos poucos melhorias alcançadas com esses novos reprodutores (maior rendimento de carcaça, menor consumo de ração e menos tempo para o abate, etc.) começaram a ser repassadas a outros produtores através de cachacos geneticamente superiores, introduzidos nos rebanhos ou através da Inseminação Artificial. Com o passar do tempo grandes empresas, como Sadia, Perdigão e Seara, Cooperativas e Companhias de Melhoramento passaram a dominar o mercado de comercialização de reprodutores suínos, e os criadores independentes praticamente

encerraram a atividade ou passaram a serem multiplicadores ou produtores comerciais de suínos (LOPES, 2004).

Através da Inseminação Artificial essas melhorias genéticas são repassadas para a maioria dos grandes produtores, os quais passaram a produzir animais geneticamente superiores.

A Inseminação Artificial em suínos é uma técnica, que vem sendo desenvolvida desde a década de 30 e, a partir de 1970 tomou um grande impulso, por constituir um método de reprodução de grande eficiência econômica. Na atualidade, esta técnica é praticada em todo o mundo. No Brasil, teve uma grande expansão a partir de 1975, e atualmente estima-se a realização de 4,8 milhões de inseminações, o que equivale utilização desta técnica em 65% das matrizes do plantel tecnificado (ABIPECS, 2010).

Na última década, houve um aumento de 1.700% no emprego da Inseminação Artificial na suinocultura brasileira. A técnica de inseminação é de grande simplicidade e consiste em introduzir o sêmen do macho, por meios instrumentais, no local mais apropriado do sistema genital da fêmea, possibilitando a ocorrência da fertilização.

Uma série de medidas deve ser tomada para garantir o resultado esperado em um programa de inseminação artificial. É de fundamental importância que haja um manejo adequado, instalações, cuidado com a idade dos animais a serem inseminados e a higiene. A prática da boa higiene é um dos fatores de maior importância em todo o processo de inseminação, coleta e diluição do sêmen. O material a ser utilizado bem como os órgãos genitais da fêmea deve estar limpo, para evitar a entrada de microrganismos que poderão alterar a qualidade do sêmen e provocar infecções no aparelho reprodutivo da fêmea.

São muitos os pontos de riscos de contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno. As bactérias podem ser oriundas do próprio macho e em falhas em vários pontos do processo como: higienização prepucial, fixação do pênis, limpeza e esterilização dos recipientes da coleta, higienização da sala, contaminação ambiental, limpeza das baias de alojamento dos cachaços, e, inabilidade do coletador para realizar o procedimento (ALTHOUSE *et al.*, 2000). O sêmen suíno pode ser o veículo de determinadas enfermidades, resultando na diminuição tanto dos índices reprodutivos quanto dos produtivos. Animais clinicamente doentes devem ser afastados da coleta de sêmen para elaboração de doses, reduzindo, assim, o risco de transmissão de patógenos por meio da Inseminação Artificial. No entanto, animais aparentemente sadios podem encontrar-se no período de incubação da doença, cuja possibilidade de eliminação de patógenos pelo ejaculado é alta. Dessa forma, o

ejaculado contaminado pode ser destinado para a inseminação antes que sinais clínicos da doença sejam reconhecidos e o diagnóstico definitivo seja estabelecido (BIANCHI *et al.*, 2007).

Althouse *et al.* (2000) relacionaram a presença de bactérias no sêmen com redução significativa da motilidade espermática (usualmente maior que 30%), aglutinação espermática, alta taxa de alterações de acrossoma (menor que 20%) e morte de espermatozoides dois dias após a coleta e o processamento do sêmen, independente do diluente utilizado. Outra importante consequência da contaminação do sêmen é a redução da vida útil das doses. Na rotina da maioria das companhias de Inseminação Artificial, a perda precoce e significativa da motilidade no sêmen diluído é atribuída a outras causas, como problemas com o reprodutor, choque térmico e qualidade do diluente, sendo esporádica a investigação bacteriológica para a solução de problemas de conservação de sêmen diluído.

O sêmen contaminado por bactérias impõe risco de infecção genital da fêmea inseminada, podendo causar, em determinadas situações, descargas vulvares multifatoriais, metrites, retornos regulares ou irregulares ao estro, abortos, aumento do número de natimortos e mumificados, redução do tamanho da leitegada e nascimento de leitões fracos (SOBESTIANSKY E MATOS, 2000).

No presente estudo foi realizada uma avaliação na qualidade do sêmen suíno, em três centrais de inseminação de Santa Catarina, onde foi analisada a presença de bactérias e a quantificação das mesmas. Esses resultados foram relacionados com dados como: motilidade, vigor, aglutinação e morfologia espermática, com objetivo de encontrar uma possível relação entre esses fatores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da Inseminação artificial em suínos

A maximização da eficiência reprodutiva de uma unidade produtora de suínos é fundamental para a viabilidade econômica na exploração. Para tanto, é necessário que existam técnicas, como a Inseminação Artificial que permitam alcançar taxas de parto e tamanho de leitegadas compatíveis com o custo-benefício.

A Inseminação Artificial é uma biotécnica da reprodução bem estabelecida e aplicada na suinocultura, cujo objetivo principal é a maximização do uso dos ejaculados, mantendo e melhorando a eficiência reprodutiva (SOBESTIANSKY, 1998). As principais razões do crescimento da Inseminação Artificial estão vinculadas às mudanças verificadas na cadeia de produção, em especial ao aumento do tamanho dos plantéis, a redução gradativa das margens de lucro do negócio e às exigências na qualidade de produto. A Inseminação Artificial tornou-se importante ferramenta na suinocultura industrial, pois viabiliza o manejo reprodutivo dos grandes plantéis, é poupadora de mão de obra e permite a rápida incorporação dos avanços genéticos no extrato comercial (SCHEID, 2000).

2.2 Vantagens e limitações do uso da inseminação artificial

São inúmeras as vantagens existentes no uso da Inseminação Artificial entre as quais podemos citar: O uso de sêmen de machos geneticamente superiores; permite a introdução de reprodutores de alto valor zootécnico e com isso agregando valor genético ao rebanho suíno; permite maior aproveitamento (uso intensivo) de bons reprodutores; previne o controle de doenças que podem vir a interferir na eficiência reprodutiva do rebanho, diminuindo assim, o risco de transmissão das mesmas; maior controle da eficiência reprodutiva do plantel, como por exemplo, permite o planejamento do rebanho com programação dos nascimentos das leitegadas e inclusive um monitoramento individual das matrizes; necessita de materiais simples para o seu emprego, tornando viável o custo de produção; dispensa os gastos utilizados na compra e manutenção de reprodutores na criação, ou seja, ao se reduzir o número de reprodutores para atender o rebanho diminui-se os gastos com a alimentação possibilitando um investimento maior em animais de maior qualidade (em termos de desempenho); homogeneidade dos lotes de animais pela padronização das características de

produção e de carcaça; controle da qualidade espermática dos ejaculados; diminuição do tempo e esforços por evitar a monta e deslocamento dos reprodutores; permite o uso de machos muito maiores que as fêmeas; os dados de fertilidade e prolificidade com o uso da inseminação artificial são iguais ou superiores aos da monta natural; viabilização do manejo do desmame em lotes, pois a inseminação artificial possibilita a cobertura de um grande número de porcas que entram em cio ao mesmo tempo, viabilizando o desmame em lotes (OBERLENDER *et al.*, 2008).

Apesar de serem muitas as vantagens encontradas com o emprego da IA não deve ser desconsiderados algumas limitações existentes como: necessidade de pessoal qualificado, tanto na central (boa coleta, análise e conservação do sêmen) quanto na propriedade (detecção de cio e realização da inseminação); se não for bem empregada, pode provocar lesões e infecções no trato genital da fêmea; disseminação de problemas de ordem genética (hipoprolificidade inerente ao macho resultando em leitegadas pequenas ou doenças infecto-contagiosa); limitações das técnicas de conservação do sêmen resfriado, sendo este viável por um período médio de três dias, sendo a temperatura de refrigeração também uma limitação, devido ao ajuste das geladeiras comerciais serem diferentes; a granja deve possuir adequada infra-estrutura, principalmente em relação a estradas e aos meios de comunicação (OBERLENDER *et al.*, 2008).

2.3 Contaminação bacteriana

A contaminação bacteriana do sêmen suíno pode ocorrer tanto durante a coleta como no processamento do mesmo (ALTHOUSE *et al.*, 2000). Doses inseminantes com contaminação bacteriana apresentam diminuição da motilidade e do pH, aumento da aglutinação, de anormalidades do acrossoma e de células mortas (ALTHOUSE *et al.*, 2000).

Durante a coleta os fatores mais comumente relacionados à contaminação bacteriana são de origem animal. No suíno, a coleta é feita com o método da mão enluvada que, apesar de ser simples e de baixo custo, é necessário que sejam tomados cuidados específico para diminuir a contaminação bacteriana (KING, 1973). Segundo Weitze (1996), é quase impossível uma coleta de sêmen livre de qualquer contaminação.

Martín *et al.* (2010) relatam que microrganismos são importantes contaminantes de muitos fluídos corporais, incluindo sêmen de animais e humanos. Consequentemente, a contaminação microbiana é um importante parâmetro para considerar a qualidade do sêmen.

A qualidade microbiológica das doses inseminantes produzidas nas Centrais de Inseminação Artificial está diretamente relacionada ao grau de higiene das instalações e dos machos. Por essa razão a central deve ter um sistema prático a ser usado para a limpeza a seco e para lavação, bem como para a desinfecção das instalações e machos (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

Uma das principais fontes de contaminação do sêmen suíno é proveniente dos líquidos contidos nos divertículos prepuciais. A disposição e posição anatômica dessas estruturas favorecem o acúmulo de urina, células de descamação e uma grande microbiota. A limpeza dos divertículos por compressão antes de cada coleta deve ser feita com o objetivo de reduzir os riscos de contaminação do ejaculado durante a coleta (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

O controle da contaminação do sêmen in natura e diluído é importante, pois bactérias irão concorrer diretamente com a célula espermática pelos substratos existentes no meio, além de alterarem o pH e, conseqüentemente, diminuindo a viabilidade espermática (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

A manipulação do sêmen após a coleta é ponto fundamental para uma boa conservação da qualidade da dose inseminante. É recomendado o uso de materiais descartáveis, livre de contaminação química e microbiológica, pois diminuem o risco de contaminação e facilitam a rotina na central (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

Mesmo os diluentes possuindo em sua fórmula soluções tampão, seu poder é limitado, quando a contaminação bacteriana se eleva, conseqüentemente há um aumento significativo na produção de ácido láctico e o uso do tampão não é suficiente para impedir a queda no pH. E, além disso, a temperatura que essas doses inseminantes são armazenadas não impede o crescimento bacteriano (GOLDBERG *et al.*, 2009).

Muitas bactérias têm ação espermicida quando incubadas com sêmen diluído. No entanto, o significado patogênico de muitos microrganismos isolados do sêmen ainda não está claro (TAMULI *et al.*, 1984). Produtos do metabolismo bacteriano, como endotoxinas, parecem ter um efeito negativo na sobrevivência espermática (ALMOND & POOLPERM, 1996). Segundo Rideout *et al.* (1982), a perda da viabilidade do sêmen contaminado é devido à competição entre bactéria e espermatozóide pelo mesmo substrato, por efeito tóxico do metabolismo bacteriano ou por alterações do pH.

Muitas das bactérias presentes no sêmen podem não ser patogênicas, mas seus produtos metabólicos têm um efeito deletério à viabilidade espermática (SONE *et al.*, 1982). Conseqüentemente, a qualidade do sêmen, levando-se em conta o número de espermatozoides

viáveis, pode ser reduzida com o aumento da contaminação bacteriana (ALMOND & POOLPERM, 1996).

Althouse *et al.* (2000) relatam que os efeitos da contaminação bacteriana no sêmen não ocorrem imediatamente, mas geralmente necessitam de 36 a 48 horas de armazenamento para se tornarem evidentes.

2.4 Cuidados básicos em uma central de inseminação artificial

Para alcançar os resultados esperados em um programa de inseminação artificial é fundamental que sejam tomados alguns cuidados básicos na rotina dessas Centrais como, barreira sanitária, onde são tomados cuidados referentes a localização, cercas de isolamento e barreiras verdes que procuram isolar a central de outras propriedades. A Central de Inseminação Artificial deverá ter uma área construída anexa à central ou separada, na qual estará localizada o escritório, almoxarifado, refeitório e banheiros, denominados barreira sanitária. Esse deve ser o único local de entrada para a central (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

O fluxo dos vestiários deve permitir a retirada completa das roupas e pertences particulares na entrada. O Controle ambiental também deve ser realizado através do controle da temperatura do ambiente no local de alojamento dos animais, pois se trata de uma das condições essenciais para a produção de ejaculados férteis (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

No laboratório durante todo período de avaliação, recomenda-se que o ejaculado permaneça em banho – maria a temperatura de 32° C. Neste momento o sêmen é submetido ao exame macro e microscópico. Nesta bateria de exames os ejaculados são submetidos à avaliação que objetivam determinar a viabilidade de processamento do mesmo e o número de doses inseminantes possíveis de serem produzidas (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

2.5 Exames do ejaculado

O exame macroscópico consiste na avaliação do volume, cor e odor. O volume do ejaculado é estimado através do seu peso. A cor do ejaculado suíno varia do branco ao branco acinzentado podendo também apresentar coloração amarela clara. Esta variação depende de características individuais ou da nutrição do cachão. O odor é característico, e, eventuais

contaminações, por secreções prepuciais ou urina, são facilmente detectadas (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

O exame microscópico consiste na avaliação da motilidade, aglutinações, vigor, concentração espermática e morfologia espermática. Apesar da avaliação da motilidade ser efetuada de forma subjetiva, ela indica a viabilidade espermática, sendo um exame indispensável no laboratório de processamento de sêmen. A motilidade é baseada no número total de células espermáticas móveis nos vários campos examinados. Estudos demonstram que o uso de ejaculados com motilidade inferior a 60% pode trazer prejuízos no desempenho reprodutivo (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

Em algumas centrais de coleta de sêmen também é efetuada a avaliação do vigor, parâmetro que avalia a qualidade do movimento espermático. O vigor é normalmente estabelecido com base em um escore de 0 a 5 e corresponde ao espermatozóide que se movimenta progressivamente, levando em consideração o tipo e a direção do movimento. Este parâmetro, assim como a motilidade espermática, é determinado empiricamente e serve para auxiliar na avaliação da qualidade do sêmen (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

As aglutinações são observadas em grande parte dos ejaculados na espécie suína, com pequenas variações na intensidade. A aglutinação espermática quando muito intensa, causa dificuldade e erro na avaliação da concentração, independente do método utilizado sendo o motivo de descarte do ejaculado. Flowers (1996) relata que, em muitas centrais, ejaculados que apresentam um percentual muito alto de aglutinações espermáticas (maior que 30%) são rejeitados, mesmo não sendo bem esclarecida a relação entre as aglutinações e um possível efeito sobre a fertilidade. Estas aglutinações podem ser causadas pela presença de impurezas no material que entram em contato com o ejaculado, ou também por bactérias (KUSTER e ALTHOUSE, 1997).

A concentração espermática é um parâmetro quantitativo que deve ser analisado na rotina das centrais de Inseminação Artificial, pois aliada ao volume do ejaculado, permite a determinação do número total de espermatozoides do mesmo e, conseqüentemente, do número de doses que podem ser obtidas desse ejaculado (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

A morfologia espermática tem como objetivo a avaliação qualitativa das células espermáticas para determinar o percentual de alterações morfológicas. Um percentual elevado de células anormais pode ser um indicativo da ocorrência de alterações na espermatogênese, na maturação espermática ou de que o ejaculado tenha sido manipulado de forma imprópria. Com esse exame é possível descartar reprodutores com ejaculado de baixa qualidade para

emprego na Inseminação Artificial. No entanto, quando os parâmetros morfológicos estão dentro dos limites aceitáveis, o resultado do exame de morfologia espermática não permite estabelecer o nível real de fertilidade do ejaculado (RODRÍGUEZ & ERICKSSON, 2000).

2.6 Bactérias normalmente encontradas em sêmen suíno

Bianchi *et al.* (2007) comentam que a microbiota bacteriana do aparelho reprodutor do macho pode conter uma grande variedade de agentes potencialmente patogênicos. Entretanto, trabalho realizado por Gall *et al.* (1998) demonstrou que o trato genital, composto pelos testículos, epidídimos, glândulas vesiculares, próstata, glândulas bulbouretrais e uretra peniana encontram-se relativamente livres de contaminação, não havendo indicação de que a presença de grande número de bactérias no ejaculado tenha origem nesses órgãos do aparelho reprodutivo.

A presença de contaminação bacteriana no ejaculado pode ser originária de uma infecção sistêmica ou infecção do sistema reprodutivo, bem como do contato do ejaculado com secreções prepuciais, pêlos, mãos do funcionário, contato indireto com aerossóis, contaminação dos materiais e equipamentos utilizados na coleta (fômites), diluição e acondicionamento do sêmen (MAZUROVA e KRPA TOVA, 1990).

As bactérias usualmente presentes na microbiota do aparelho reprodutor do macho suíno tais como *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp entre outras, podem ser encontradas no ejaculado após a coleta em maior ou menor frequência (BIANCHI *et al.*, 2007).

Goldberg *et al.* (2009) relatam que as alterações de aglutinação, motilidade, pH e acrossoma nas doses inseminantes são dependentes tanto da concentração bacteriana como de seu gênero. Esses fatores serão responsáveis pelo tempo que esse processo leva para ocorrer, fazendo com que essas alterações nas doses inseminantes sejam observadas em diferentes períodos de armazenamento.

3. DESENVOLVIMENTO

ARTIGO

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA SOBRE OS PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS DE SUÍNOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS AGENTES
ISOLADOS**

RESUMO

A Inseminação Artificial é uma biotécnica da reprodução bem estabelecida e aplicada na suinocultura atual, cujo objetivo principal é a maximização do uso dos ejaculados, mantendo e melhorando a eficiência reprodutiva. Entretanto, quando há contaminação bacteriana no sêmen, pode haver sério comprometimento para a viabilidade espermática. Doses inseminantes com contaminação bacteriana apresentam diminuição da motilidade e do pH, aumento da aglutinação, de anormalidades do acrossoma e de células mortas. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a contaminação bacteriana em sêmens coletados em centrais de inseminação artificial e relacionar com suas qualidades quantitativas e qualitativas, além de testar a sensibilidades dos agentes isolados frente a diferentes antibióticos. Foi coletado sêmen suíno de três centrais de inseminação artificial em diferentes regiões do estado de Santa Catarina. Essas amostras foram submetidas à análise microbiológica no Centro de Diagnóstico Microbiológica Animal CAV-UDESC, onde foi realizado o isolamento, identificação, contagem bacteriana além dos antibiogramas. Estas mesmas amostras foram também avaliadas quanto à motilidade, vigor, aglutinações e concentração. Para esta avaliação foram utilizados dados fornecidos pela empresa. Foram realizados esfregaços das amostras de sêmen e corados com eosina-negrosina para a avaliação da morfologia espermática. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS. Houve isolamento de 17 diferentes gêneros bacterianos, entre os quais os mais freqüentes foram *Staphylococcus* sp. (26,43%) *Proteus* sp. (20,53%), *Escherichia coli* (9,47%), *Pseudomonas* sp. (11,05%), porém não houve uma correlação significativa ($P > 0,05$) quando comparados o número de unidade formadora de colônia /mL do sêmen com motilidade, concentração e alterações morfológicas. Foi encontrado um efeito isolado do gênero *Staphylococcus* sp. ($P < 0,05$) provocando uma diminuição na motilidade dos espermatozoides das amostras onde o mesmo foi isolado. A maioria dos agentes bacterianos mostrou-se resistentes aos antibióticos comerciais testados que foram aqueles mais utilizados para diluição de sêmen nas centrais de inseminação artificial.

Palavras chaves: Sêmen, suíno, contaminação bacteriana, antibiograma.

ABSTRACT

Artificial insemination is an established and applied biotech of reproduction to the current swine production, whose main objective is to maximize the use of ejaculated sperm, maintaining and improving reproductive efficiency. However, when there is bacterial contamination in the semen, it may be seriously impaired for sperm viability. Inseminated doses with bacterial contamination have reduced motility and pH, increase of agglutination, abnormalities of the acrosome and dead cells. The objective of this study was to investigate the bacterial contamination in semen collected in boar studs and relate it to quantitative and qualitative semen qualities, and test the sensitivities of the isolated agent using different antibiotics. Boar semen was collected from three artificial insemination centers in different regions of the state of Santa Catarina. These samples were analyzed at the Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal CAV-UDESC, where it was performed the isolation, identification, bacterial count besides the antibiograms. The same samples were also evaluated for motility, vigor, concentration and agglutination. For this evaluation it was used data provided by the company. Smears were prepared from semen samples and stained with eosin-negrosina for the evaluation of sperm morphology. The data were subjected to analysis of variance using the GLM procedure of SAS statistical package. There were isolated 17 different bacterial genera, among which the most frequent were *Staphylococcus* sp. (26.43%), *Proteus* sp. (20.53%), *Escherichia coli* (9.47%), *Pseudomonas* sp. (11.05%), but there was not a significant correlation ($P > 0.05$) when comparing the number of colony forming unit / mL of semen with motility, concentration and morphological changes. It was found an isolated effect of the genus *Staphylococcus* sp. ($P < 0.05$) causing a decrease in sperm motility of the samples where it was isolated. Most bacterial pathogens showed resistant to commercial antibiotics tested which refers to those used in the preparation of the inseminated doses from the boar studs.

Keywords: semen, boar, bacterial contamination, antibiograma.

INTRODUÇÃO

Para se obter sucesso em um programa de Inseminação Artificial (IA) em suínos é fundamental o emprego de doses inseminantes que atendam parâmetros espermáticos pré-determinados, tanto do ponto de vista qualitativos quanto quantitativo (COLEBRANDER, 1993). Quando se discute sobre esses parâmetros, menciona-se, geralmente, motilidade espermática, a morfologia e o número de espermatozóides na dose. Outros parâmetros, como o número de unidades formadoras de colônia (UFC) da dose ou do ejaculado, entretanto, normalmente são negligenciados. Doses com alta contaminação bacteriana tendem a ter um comprometimento qualitativo, principalmente devido ao metabolismo desses microrganismos, que alteram o pH comprometendo a motilidade da amostra (GOLDEBERG, 2008). O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento da contaminação bacteriana de sêmen suíno de três Centrais de Inseminação do estado de Santa Catarina e relacionar o número de UFC/mL com alterações na motilidade, concentração, vigor, aglutinações e morfologia espermática, além de testar a sensibilidade das bactérias isoladas frente a diferentes tipos de antibióticos.

MATERIAIS E MÉTODO

Foi coletado sêmen, após desprezar ejaculado inicial, de no mínimo 50% dos cachacos de três Centrais de Inseminação do estado de Santa Catarina. As coletas foram realizadas com o auxílio de manequim (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005) (Fig. 1). Após a coleta (Fig.2), foi retirado uma alíquota (3mL) de sêmen e armazenados em tubos do tipo *ependorf*, essas amostras foram colocadas em caixas isotérmicas com gelo descartável e levadas ao laboratório de Bacteriologia do CEDIMA - CAV/UEDESC, onde foram processadas em, no máximo, 12 horas.

Tabela 1: Número de amostras coletadas nas diferentes centrais de inseminação durante o período do experimento.

Central de Inseminação Artificial	1	2	3	Total
Quantidade de amostras	71	61	65	197

No laboratório as alíquotas foram semeadas em Agar sangue e Agar Mac Conkey, em condições aeróbicas e microaeróbicas e, após o período necessário de incubação (24 a 48h), foram identificadas conforme descrito por Oliveira, 2000. A quantificação das bactérias (UFC) foi realizada através da semeadura por espalhamento em Agar PCA em duplicata, das diferentes diluições (em solução salina) da amostra de sêmen (Fig5).

Um representante de cada gênero isolado foi congelado em caldo BHI e glicerol para posterior realização dos antibiogramas(Fig.3). Os antibiogramas foram realizados através do método difusão em disco no Agar Muller-Hinton (VERMELHO *et al.*, 2006).

Os antibióticos foram selecionados de acordo com a maior utilização na suinocultura. Para bactérias Gram positiva foram: gentamicina (GEN), norfloxacin (NOR), rifampicina (RIF), tetraciclina (TET), doxicilina (DOX), florfenicol (FLF), vancomicina (VAN), ampicilina (AMP), ceftiofur (CTF), estreptomicina (EST), lincomicina (LIN) e penicilina (PEN). Para Gram negativas foram usados: cefalexina (CFE), trimetropim (TRI), ciprofloxacina (CIP), bacitracina (BAC), enrofloxacin (ENO), neomicina (NEO), ceftiofur (CTF), ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), tetraciclina (TET), doxicilina (DOX) e cefalotina (CFL). As placas foram colocadas em estufa bacteriológica por 24 horas e após foi realizado a leitura. A zona de inibição de cada disco foi medida em milímetro com o auxílio de uma régua e comparada com uma tabela padrão de interpretação (VERMELHO *et al.*, 2006).

Estas mesmas amostras foram também avaliadas quanto à motilidade, vigor, aglutinações e concentração, de acordo com o descrito por (SOBESTIANSKY, 1998). Para esta avaliação foram utilizados dados fornecidos pela empresa.

Foi realizado esfregão das amostras de sêmen e corados com eosina-negrosina para a avaliação da morfologia espermática(Fig.4). Os mesmos foram observados em microscópio óptico de campo claro com aumento mínimo de 1000X (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005).

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (2000).



Figura 1: coleta de sêmen com auxílio de manequim. Figura 2: Coleta de sêmen, técnica da mão



Figura 3: Teste de sensibilidade bacteriana frente a diferentes tipos de antibióticos

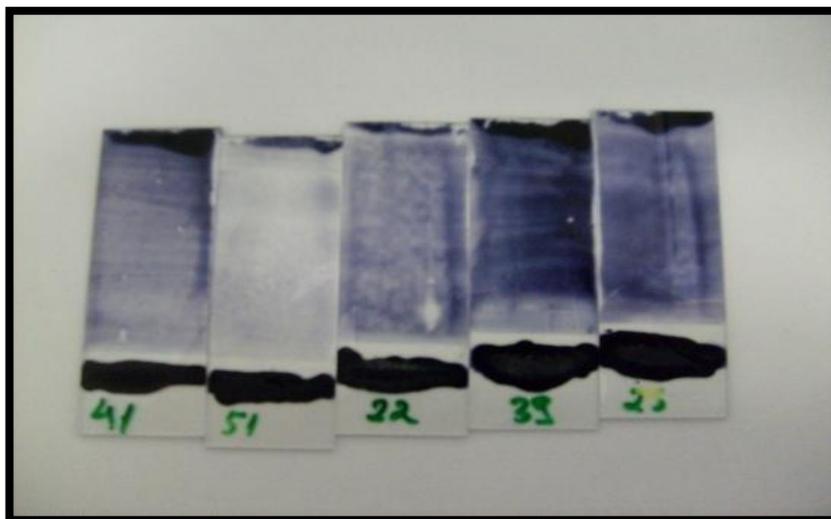


Figura 4: Esfregaço para leitura da morfologia espermática

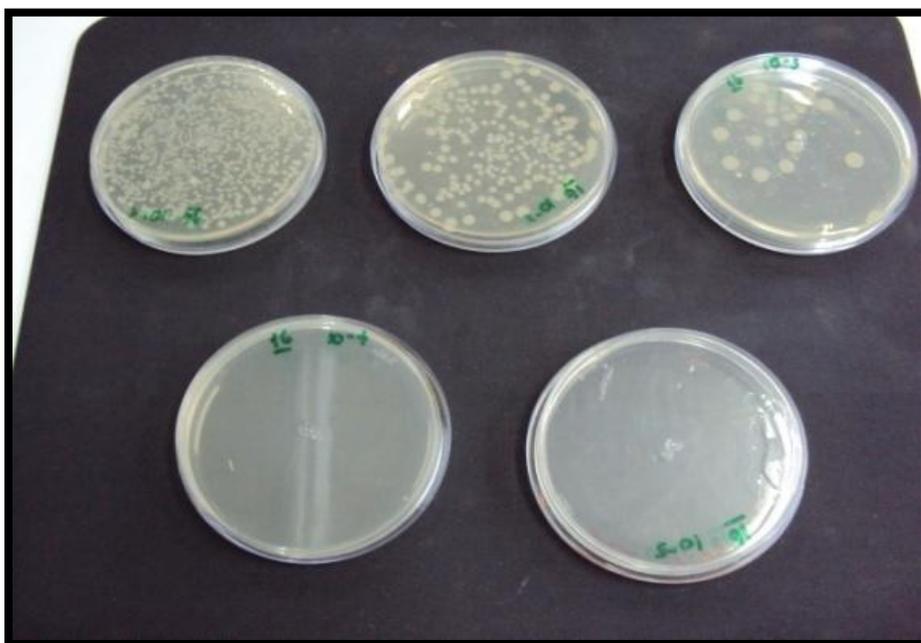


Figura 5: Contagem bacteriana total.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Todas as Centrais de Inseminação Artificial atendiam as exigências legais de biossegurança (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005) e mantinham hábitos higiênicos contínuos nas instalações, porém todas apresentaram doses de sêmen com contaminação bacteriana, conforme tabela 2.

Tabela 2: Amostras de sêmen coletadas nas diferentes centrais de inseminação durante o período do experimento, que apresentaram contaminação bacteriana.

Central Inseminação Artificial	1	2	3	TOTAL
Quantidade de Amostras	71	61	65	197
Amostras com Bactérias	63	10	65	135
Amostras sem Bactérias	08	51	0	62

A diferença entre a quantidade de amostras com a presença de contaminação bacteriana é bastante significativa quando comparamos as três centrais de inseminação artificial onde foram coletadas as amostras. Essa diferença mostra que os procedimentos na coleta e preparação das doses espermáticas na central de inseminação artificial dois foram realizados com maior higiene e isso fica bastante evidente quando é mencionado o fato de que todo o processo nesse estabelecimento é realizado por uma única equipe de trabalho e que somente uma família é responsável por essa atividade. A mão de obra qualificada é de grande importância, pois a manutenção de pessoas treinadas é fundamental para a qualidade do trabalho (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005). O resultado encontrado de baixa contaminação bacteriana nas doses espermáticas na central de inseminação artificial 2 corresponde com o descrito por BENNEMANN *et al.* (2000) relatam que ao coletar ejaculados com absolutos cuidados higiênicos, sob condições experimentais, não observaram crescimento bacteriano até 48 horas de incubação no sêmen *in natura*.

O método de coleta de sêmen foi o mesmo nas três centrais de inseminação artificial, sendo este o método da mão enluvada (HANCOCK & HOVEL, 1959), mas apesar de tratar-

se de um método altamente eficaz, quando não realizado de forma adequada pode favorecer a contaminação bacteriana.

Foi isolado uma grande variedade de gêneros bacterianos no processamento das amostras (Tabela 3) de acordo com SHEID *et al.* (2000) são contaminantes normalmente encontrados em sêmen suíno. Os gêneros bacterianos mais isolados foram *Staphylococcus* sp. (26,43%), *Escherichia coli* (9,47%) e *Pseudomonas* sp. (11,05%) o que corresponde com o descrito por SOBESTIANSKY *et al.* (2000) onde relatam que esses, são contaminantes encontrados com maior frequência em sêmen suíno. SOBESTIANSKY *et al.* (2000) citam que entre os contaminantes isolados com menor frequência em sêmen suíno encontra-se o gênero *Proteus* sp. no entanto no presente trabalho esse gênero bacteriano foi isolado em elevada frequência (20,53%) o que corresponde com o descrito por BENNEMANN (1998) que cita que esse microrganismo esteve sempre presente na maioria das doses inseminantes suínas utilizadas em seu estudo.

Tabela 3: Diferentes gêneros bacterianos isolados nas amostras de sêmen coletados nas centrais de inseminação durante o período do experimento.

Central de Inseminação Artificial

Gêneros Isolados	1 Nº de Isolamento	2 Nº de Isolamento	3 Nº de Isolamento
<i>Staphylococcus</i> sp.	18	7	24
<i>Streptococcus</i> sp.	4	-	5
<i>Escherichia coli</i>	8	-	10
<i>Pseudomonas</i> sp.	6	-	15
<i>Corynebacterium</i> sp.	7	-	8
<i>Proteus</i> sp.	19	5	16
<i>Serratia</i> sp.	4	-	1
<i>Citrobacter</i> sp.	1	-	3
<i>Edwardsiella</i> sp.	1	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	-	6
<i>Shigella</i> sp.	-	-	3
<i>Campylobacter</i> sp.	6	-	-
<i>Yersinia</i> sp.	1	-	2
<i>Bacillus</i> sp.	1	3	1
<i>Enterobacter</i> sp.	2	-	1
<i>Klebsiella</i> sp.	4	-	-

Foi analisado o efeito das variáveis sempre comparando o número de UFC/mL com outra característica.

Tabela 4: Médias das variáveis analisadas nas três centrais de inseminação testadas durante o período do experimento.

Variáveis analisadas	\bar{x} Central de inseminação 1 (dia 1)	\bar{x} Central de inseminação 1 (dia 2)	\bar{x} Central de inseminação 2	\bar{x} Central de inseminação 3
UFC/mL	75.224,14	1.393.555,20	622,95	73.840,63
Motilidade	85%	85%	85%	81%
Patologia	7,87%	8,46%	8,91%	12,83%

Ao analisar o número de UFC/mL em relação à motilidade e patologia, não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$). Esse fato pode ser justificado com o estudo desenvolvido por ALTHOUSE *et al.* (2000) onde relatam que os efeitos da contaminação bacteriana no sêmen não ocorrem imediatamente, mas geralmente necessitam de 36 a 48 horas de armazenamento para se tornarem evidentes. No presente estudo as análises foram feitas imediatamente após a coleta.

As centrais de inseminação artificial preparam as doses inseminantes e distribuem em diversas granjas da região, porém muitas vezes o transporte e armazenamento não são realizados de forma correta, o que leva um comprometimento dos mesmos. BORTOLOZZO & WENTZ, (2005) citam que é importante ter em mente que a garantia das doses que chegam ao produtor deve ser prioridade da central de inseminação artificial. Muitas vezes o sêmen coletado é de excelente qualidade, mas erros de processamento e armazenamento ou transporte podem reduzir ou comprometer o potencial fecundante dos espermatozóides.

As doses inseminantes após grande período de armazenamento tendem a ter um aumento na população bacteriana devido à temperatura que deve ser armazenada. Preconiza-se que entre a coleta e o armazenamento das doses haja uma queda gradual e contínua de temperatura até alcançar o ponto de armazenamento entre 15 e 18° C de temperatura (BORTOLOZZO & WENTZ, 2005). No entanto, essa temperatura não é capaz de impedir o crescimento bacteriano, mesmo os diluentes possuindo em sua fórmula antibióticos nem sempre todos os gêneros bacterianos apresentam-se sensíveis ao mesmo. Segundo Rideout *et al.* (1982) com o aumento da população bacteriana, haverá uma competição maior entre bactérias e espermatozóides pelo mesmo substrato comprometendo a qualidade espermática.

Foi pesquisado o efeito individual dos agentes bacterianos que foram isolados com grande frequência. Entretanto, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. e *Proteus* sp. não apresentaram efeito significativo quando comparados com as demais variáveis, como concentração, motilidade e morfologia espermática ($P > 0,05$). Já as amostras em que houve isolamento de *Staphylococcus* sp. ocorreu uma diminuição na motilidade dos espermatozoides dessas amostras, sendo este considerado um efeito significativo ($P < 0,05$). BENNEMANN *et al.*, (2000) realizaram um estudo onde foi testado a integridade acrossomal e a motilidade espermática em doses inseminantes com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, foi observado que amostras contaminadas com qualquer um desses gêneros bacterianos apresentaram um efeito deletério na motilidade espermática, porém no presente trabalho esse resultado foi observado em amostras que houve isolamento do gênero bacteriano *Staphylococcus* sp. mas, nas amostras que foi isolado *Escherichia coli* não foi observado efeito sobre a motilidade espermática. Cabe ressaltar que as doses inseminantes utilizadas por Bennemann *et al.*, (2000) eram livres de contaminação bacteriana e a inoculação das bactérias testadas foi realizado laboratorialmente. No projeto em estudo as análises foram realizadas de amostras de sêmen coletadas diretamente das centrais de inseminação artificial e em muitas amostras analisadas havia diferentes gêneros bacterianos na mesma amostra e sabe-se que bactérias produzem metabólitos que podem ser tóxicos para outros microrganismos (TORTORA *et al.*, 2000).

De acordo com SHEID *et al.* (2000), para obter controle da contaminação e da proliferação bacteriana no sêmen é essencial a manutenção de um rigoroso padrão de higiene e adição de antibióticos aos diluentes, sendo os mais utilizados gentamicina, penicilina, estreptomicina, neomicina e lincomicina. No entanto, nem todos os gêneros isolados e testados nesse experimento (tabela 5) mostraram-se sensíveis ao uso desses antibióticos o que pode ser considerado um problema na obtenção de doses inseminantes livres de contaminação bacteriana. Althouse *et al.* (2000) demonstraram resultados de resistência da maioria das bactérias isoladas nas doses inseminantes em relação à gentamicina. Dessa forma, a decisão de troca do antibiótico, especialmente frente a problemas no controle da proliferação bacteriana, deve ser muito criteriosa, pois o número de produtos que atendem às características citadas é limitado. A comprovação prévia de resistência bacteriana ao produto em uso deve ser realizada por meio de exames bacteriológicos e antibiograma. De acordo com VAZ (2009) as bactérias podem adquirir resistência aos antibióticos de uma forma intrínseca ou através da aquisição de elementos genéticos que carregam genes de resistência, a

persistência desta resistência no animal depende de um grande número de fatores externos, como o estresse, transporte de animais, manejo, doses terapêuticas utilizadas ou exposição prévia dos animais a antibióticos.

A monitoria bacteriológica periódica do sêmen, imediatamente após a coleta e em diferentes períodos do processamento e conservação do ejaculado, é um procedimento recomendado para avaliação do grau de contaminação nas centrais de inseminação artificial, indicando a necessidade de mudanças ou correção dos procedimentos adotados (Althouse e Lu, 2005). Embora não existam padrões que indiquem níveis máximos aceitáveis para a carga de contaminantes do sêmen ao longo do tempo, cada central de inseminação artificial pode reconhecer a microbiota predominante e estabelecer seus próprios parâmetros para a monitoria da qualidade higiênica do trabalho (BIANCHI *et al.*, 2007). Goldberg *et al.* 2009, realizou um estudo onde demonstrou que o número máximo aceitável de contaminantes no sêmen suíno é de 300 Unidades Formadoras de Colônia por mL, para evitar o comprometimento do mesmo, no entanto a maioria das amostras de sêmen analisadas nesse estudo mostram-se com uma carga bacteriana elevada ao valor indicado.

Dentre os gêneros bacterianos isolados a bactéria que se mostrou mais sensível aos antibióticos testados foi o *Campylobacter* sp., porém não houve grande frequência de isolamento desse gênero bacteriano. *Shigella* sp. e *Stenotrofomonas* sp. mostraram-se resistentes a todos os antibióticos testados, no entanto a quantidade de isolamento nas diferentes amostras não foi freqüente. Os gêneros mais isolados como *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp., apresentaram resultados diferentes em relação a sua sensibilidade. *Staphylococcus* sp. apresentou sensibilidade frente a diferentes tipos de antibióticos, o que facilita a obtenção de doses inseminantes livres de contaminação bacteriana. No entanto *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. apresentaram um grande nível de resistência aos antibióticos testados, isso certamente dificulta a obtenção de doses inseminantes livres de contaminação bacteriana. Corrêa *et al.*, 2001, citam que os antibióticos mais utilizados na preparação de doses inseminantes são: Gentamicina, penicilina/estreptomicina e lincomicina, no entanto *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp., bactérias isoladas com maior frequência, apresentaram-se resistentes a esses antibióticos.

Tabela 5: Gêneros isolados e sua sensibilidade frente aos diversos antibióticos testados. (R: resistente; I: intermediário; S; sensível)

GÊNEROS ISOLADOS	C	A	T	N	C	C	C	E	G	B	T	D	R	N	L	F	P	V	E
	F	M	E	E	F	I	T	N	E	A	R	O	I	O	I	L	E	A	S
	E	P	T	O	L	P	F	O	N	C	I	X	F	R	N	F	N	N	T
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	S	I	-	-	-	S	-	S	-	-	S	R	R	R	S	S	R	S
<i>Streptococcus sp.</i>	-	S	R	-	-	-	S	-	R	-	-	R	S	R	R	R	S	S	R
<i>Bacillus sp.</i>	-	I	S	-	-	-	S	-	R	-	-	S	S	S	R	S	R	S	S
<i>Stenotrofomonas sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiela sp.</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter sp.</i>	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter sp.</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia sp.</i>	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia sp.</i>	R	R	R	S	R	I	S	I	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter sp.</i>	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-

CONCLUSÃO

Houve isolamento de diferentes gêneros bacterianos nas três centrais de inseminação artificial nas quais foram coletadas as amostras. A quantidade de amostras que apresentaram contaminação bacteriana foi diferente nas centrais de inseminação artificial as quais foram realizadas as coletas de sêmen. Os gêneros bacterianos isolados com maior frequência foram *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Proteus* sp. *Pseudomonas* sp. O gênero bacteriano isolado com maior frequência, que mostrou maior sensibilidade frente aos diferentes antibióticos testados foi *Staphylococcus* sp. os que apresentaram maior resistência aos antibióticos testados foram *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. Não foi observado relação entre o número de unidades formadoras de colônia por mL com alterações na morfologia espermática, concentração e motilidade. Foi observado um efeito deletério na motilidade dos espermatozoides em amostras que foram isoladas *Staphylococcus* sp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTHOUSE, GC et al. **Field investigations of bacterial contaminations and their effects on extended porcine semen.** Theriogenology, 53, 1167-1176, 2000.
2. ALTHOUSE, G.C.; LU, K.G. **Bacteriospermia in extended porcine semen.** Theriogenology, v. 63, p. 573-584, 2005.
3. BIANCHI, I. *et al.*, **Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno.** Belo Horizonte; v.30, p 72-77, 2007.
4. BENNEMANN, P.E. **Avaliação de doses inseminantes produzidas em centrais de inseminação artificial de suínos no sul do Brasil e o efeito da contaminação bacteriana sobre a qualidade espermática.** 1998. 254 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
5. BENNEMANN, P.E.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; CARDOSO, M.R.I. **Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suíno refrigeradas e inoculadas com Escherichia coli e Staphylococcus aureus.** Ciência Rural, v. 30, n. 2, p. 313-318, 2000.
6. BORTOLOZZO, F & WENTZ, I. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada.** Ed. Palloti, Porto Alegre, 2005.
7. COLEBRANDER, B et al., **Optimizing semen production for artificial insemination in swine.** Journal of Reproduction and Fertility, 207-215, 1993.
8. CORRÊA M,N, Meincke W, Lucia T, Deschamps JC. (Ed.). **Inseminação artificial em suínos.** Pelotas: Printpar, 2001.
9. GOLDENBERG, AMG. **Fatores relacionados à contaminação bacteriana das doses inseminantes e suas conseqüências.** Suinocultura em Foco número 25, 8-9, 2008.
10. HANCOCK, J.L., HOWELL, G.J.R. **The collection of boar semen.** Veterinary Record, v.71, p.664-665, 1959.
11. Oliveira, S.J. **Guia Bacteriológico Prático**, Ed. ULBRA, Canoas, RS. 2000.

12. RIDEOUT, MI et al. **Influence of bacterial products on the mobility of stallions spermatozoa.** Journal of Reproduction and Fertility. V32, 35-40, 1982.
13. SAS Institute INC. **SAS User's Guide: Statistical Analysis System.** Release 8.0, Cary, North Carolina, U.S.A., 2000.
14. SCHEID R. I, **Aspectos de biossegurança e de higiene associados à inseminação artificial em suínos.** Encontro técnico ABRAVES-SC, Concórdia, V.1, p.44-55. 2000.
15. SOBESTIANSKY J, MATOS MPC. **Doenças transmissíveis via sêmen. In: Simpósio Internacional de Reprodução e Inseminação Artificial de Suínos, 7, 2000, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu, 2000. p.295-297.**
16. VAZ, E.K. **Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura.** Acta Scientiae Veterinariae. 37(Supl 1): s147-s150, 2009.
17. VERMELHO, A.B.et al. **Práticas de microbiologia: antibiograma.** Rio de Janeiro.Guanabara, 2006.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Foram isolados diferentes gêneros bacterianos nas três centrais de Inseminação Artificial nas quais foram coletadas as amostras.

2. Houve diferença na quantidade de amostras com contaminação bacteriana nas diferentes centrais de Inseminação Artificial.

3. Os gêneros bacterianos isolados com maior frequência foram *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Proteus* sp. *Pseudomonas* sp.

4. Dentre esses gêneros bacterianos os que apresentaram maior resistência aos antibióticos testados foram *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. e o que mostrou-se mais sensível aos antibióticos testados foi *Staphylococcus* sp.

5. Não foi encontrada relação entre o número de unidades formadoras de colônia por mL com alterações na morfologia espermática, aglutinações e motilidade espermática.

6. Foi observado que as amostras as quais houve isolamento de *Staphylococcus* sp. apresentaram um efeito deletério na motilidade dos espermatozóides, mesmo as análises sendo feita logo após a coleta do sêmen.

7. Como trabalho futuro sugere-se que sejam feitos estudos nos parâmetros reprodutivos de granjas que utilizaram essas doses inseminantes para observar se houve ou não alteração nos mesmos.

8. Também sugere-se que esta análise que foi feita neste estudo seja realizada em doses inseminantes prontas para o uso, já acrescidas do diluente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIPECS. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/news/257/101/Carne-Suina-avaliacao-dos-resultados-de>. acessado em: 10 de setembro de 2011.
2. ALMOND, G & POOLPERM, P. **Semen contamination and choosing antibiotics**. In: North Carolina Healthy Hogs Seminar, 1996.
3. ALTHOUSE, G.C. *et al.* **Field investigations of bacterial contaminations and their effects on extended porcine semen**. Theriogenology, 53, 1167-1176, 2000.
4. ALTHOUSE, G.C. **Sanitary procedures for the production of extended semen**. Reproduction in Domestic Animals, v. 43, p. 374-378, 2008.
5. ALTHOUSE, G.C.; LU, K.G. **Bacteriospermia in extended porcine semen**. Theriogenology, v. 63, p. 573-584, 2005.
6. BIANCHI, I. *et al.*, **Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno**. Belo Horizonte; v.30, p 72-77, 2007.
7. BENNEMANN, P.E. **Avaliação de doses inseminantes produzidas em centrais de inseminação artificial de suínos no sul do Brasil e o efeito da contaminação bacteriana sobre a qualidade espermática**. 1998. 254 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
8. BENNEMANN, P.E.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; CARDOSO, M.R.I. **Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suíno refrigeradas e inoculadas com Escherichia coli e Staphylococcus aureus**. Ciência Rural, v. 30, n. 2, p. 313-318, 2000.
9. BORTOLOZZO, F & WENTZ, I. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Ed. Palloti, Porto Alegre, 2005.
10. COLEBRANDER, B *et al*, **Optimizing semen production for artificial insemination in swine**. Journal of Reproduction and Fertility, 207-215, 1993.
11. CORRÊA M,N, Meincke W, Lucia T, Deschamps JC. (Ed.). **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar, 2001.

12. FLOWERS, W.L. **Semen evaluation, extension, packaging and transportation methods.** In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 27., 1996. Nashville, Tennessee. Proceedings. P. 469-479. 1996.
13. GALL T.J. WILSON M.E. ALTHOUSE G.C. **Quantification of bacteria in fractionated boar ejaculates.** In: Swine Conference, 5, 1998, Minnesota. Proceedings... Minneapolis, Minnesota: The Conference, 1998. p.45. Resumo.
14. GOLDENBERG, AMG. **Fatores relacionados à contaminação bacteriana das doses inseminantes e suas consequências.** Suinocultura em Foco número 25, 8-9, 2008.
15. GOLDBERG G. M. ANA. **Fatores de risco para contaminação Bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas consequências sobre a qualidade das doses inseminantes.** 2009. 44 pag. , Setor de suíno, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, 19 de Fevereiro de 2009.
16. HANCOCK, J.L., HOWELL, G.J.R. **The collection of boar semen.** Veterinary Record, v.71, p.664-665, 1959.
17. KING, GJ & MACPHEARSON JW. **A comparison of two methods for boar collection.** Journal of Animal Science 36, 1973.
18. KUSTER, G.; C ALTHOUSE, G.C. **Sperm agglutination of extended semen caused by gentamicin - resistant bacteria.** In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS. 28., 1997. American Association of Swine Practitioners. Quebec. USA. Proceedings. p. 293-295.1997.
19. LOPES,P,S. **Melhoramento genético de suínos** , disponível em: <http://www2.ufersa.edu.br/portal/view/uploads/setores/183/arquivos/MELHORAMEN TO%20DE%20SUINOS.pdf> , acesso em: 10 de agosto de 2011.
20. MARTÍN, L,O,M. *et al* **Bacterial contamination of boar semen affects the litter size.** In: Animal Reproduction Science. ed 4. v.120, p 95-100. 2010.
21. MAZUROVA J, KRPA TOVA J. **The risks of the cryopreservation of bull semen.** Veterinarstvi, v.40, p.402-404, 1990.
22. OBERLENDER, G, *et al.*, **Inseminação Artificial de Suínos; Boletim Técnico nº 79.** Ed: Universidade Federal de Lavras; p 1-16; Lavras, MG. 2008.
23. Oliveira, S.J. **Guia Bacteriológico Prático**, Ed. ULBRA, Canoas, RS. 2000.
24. RIDEOUT, MI *et al.* **Influence of bacterial products on the mobility of stallions spermatozoa.** Journal of Reproduction and Fertility. V32, 35-40, 1982.

25. RODRÍGUEZ – MARTÍNEZ, H, ERICKSSON, B. **Evaluación del semen de verraco y su relación com fertilidad.** In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINUTUB, 3.,2000. Flores da Cunha – RS,p.13-33.
26. ROPPA,L. **Carne suína: mitos e verdades.** Disponível em: <HTTP: www.porkworld.com.br> acesso em: 20 de julho de 2011.
27. SAS Institute INC. **SAS User's Guide: Statistical Analysis System.** Release 8.0, Cary, North Carolina, U.S.A., 2000.
28. SCHEID R. I, **Aspectos de biossegurança e de higiene associados à inseminação artificial em suínos.** Encontro técnico ABRAVES-SC, Concórdia, V.1, p.44-55. 2000.
29. SOBESTIANSKY J, MATOS MPC. **Doenças transmissíveis via sêmen.** In: Simpósio Internacional de Reprodução e Inseminação Artificial de Suínos, 7, 2000, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu, 2000. p.295-297.
30. SOBESTIANSKY, J et al. **Suinocultura Intensiva-Produção, Manejo e Saúde do Rebanho.** EMBRAPA, Brasília, 1998.
31. SONE, M et al. **Effects of various antibiotics on the control f bacterial in boar semen.** The Veterinary Record, 111, 11-14, 1982.
32. TAMULI, MK, et al. **Studies on the microbial flora of boar semen.** Indian Veterinary Journal, v61, 858-861,1984.
33. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia ambiental.** Microbiologia. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. cap. 27, p.536.
34. VAZ, E.K. **Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura.** Acta Scientiae Veterinariae. 37(Supl 1): s147-s150, 2009.
35. VERMELHO, A.B.*et al.* **Práticas de microbiologia: antibiograma.** Rio de Janeiro.Guanabara, 2006.
36. WEITZE, KF, **Transmissible diseases by artificial insemination in pigs.** Congresso Pan Americano de Ciências Veterinárias, 15, Campo Grande, 1-7,1996 .