

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**FATORES DE RISCO PARA A CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DURANTE A
COLETA DO EJACULADO SUÍNO E SUAS CONSEQÜÊNCIAS SOBRE A
QUALIDADE DAS DOSES INSEMINANTES**

ANA MARIA GROEHS GOLDBERG

PORTO ALEGRE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**FATORES DE RISCO PARA A CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DURANTE A
COLETA DO EJACULADO SUÍNO E SUAS CONSEQÜÊNCIAS SOBRE A
QUALIDADE DAS DOSES INSEMINANTES**

Autor: ANA MARIA GROEHS GOLDBERG
Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na Área de Reprodução
Animal.

Orientador: Fernando Pandolfo Bortolozzo

Co-orientador: Ivo Wentz

Co-orientadora: Marisa R. de Itapema Cardoso

PORTO ALEGRE

2009

ANA MARIA GROEHS GOLDBERG

FATORES DE RISCO PARA A CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DURANTE A
COLETA DO EJACULADO SUÍNO E SUAS CONSEQUÊNCIAS SOBRE A
QUALIDADE DAS DOSES INSEMINANTES

Aprovada em 19 de Fevereiro de 2009.

APROVADO POR:

Dr. Paulo Eduardo Bennemann,
Membro da Banca de Avaliação

Prof. Dr. Rubens Stahlberg,
Membro da Banca de Avaliação

Dra. Sandra Borowski,
Membro da Banca de Avaliação

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao GRANDE orientador e amigo,
professor Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo,
pelos diferentes períodos de convivência com que fui agraciada,
por ser exemplo de mudança de atitude,
por sua dedicação e seu caráter,
por formar pessoas, além de bons profissionais,
pelo incentivo ao meu desenvolvimento pessoal e profissional e
por ter sempre acreditado no meu trabalho,

MUITO OBRIGADO!

“O verdadeiro mestre não é aquele que ensina um caminho ideal, mas o que mostra ao seu aluno as muitas vias de acesso até a estrada que ele precisará percorrer para encontrar-se com seu destino.”

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido e amigo, Valter Júnior, por estar presente em todos os momentos de minha vida, como fonte de paz, compreensão, auxílio e incentivo.

À minha filha, Paula, por me mostrar a cada dia que nada é impossível, basta você tentar.

Aos meus pais, Gilberto e Erica, incansáveis fontes de dedicação e amor, exemplos de vida, responsáveis por tudo que sou e sem os quais, com certeza, este trabalho não seria possível.

Ao meu “eterno” orientador Fernando Pandolfo Bortolozzo, pela amizade, respeito, conhecimentos transmitidos e por ter sido uma forte influência positiva em meu crescimento pessoal e profissional.

Ao co-orientador, Ivo Wentz, pelos conselhos, conhecimentos transmitidos e por ter sempre acreditado no meu potencial.

À co-orientadora Marisa Cardoso, pelo carinho, amizade e auxílio em mais esta etapa de vida.

À Professora Mari Lourdes Bernandi, pelo auxílio na análise estatística, correções, amizade e ensinamentos.

Ao professor David Barcellos, pela amizade, ensinamentos e experiência profissional compartilhada.

Ao colega de mestrado e amigo Neimar, pelo grande companheirismo e por todas as risadas capazes de transformar estes dois anos em um saudoso período de vida.

À colega de mestrado Mônica, pelo companheirismo, amizade, conversas e auxílio durante todas as fases de realização deste trabalho, transformando este período em maravilhosos momentos vividos. Agradeço também aos seus pais, Janete e Sérgio, pela calorosa acolhida em sua casa, que nos proporcionou alegres momentos de convivência.

À colega de mestrado e amiga Cristiana, pelo auxílio na parte inicial do trabalho.

À colega de pós-graduação Danielle, por sua calma e serenidade em todos os momentos e por sua grande amizade que jamais será esquecida.

Aos demais colegas de pós-graduação e amigos, em especial ao Mores, Rafa, Thomas, Ana Paula, Andréa, Marcelo, Ricardo e Débora pelos maravilhosos momentos de convivência e troca de conhecimentos.

Aos futuros grandes colegas:

Laura, por seu incansável auxílio em todos os momentos, fundamentais a realização deste trabalho e por sua imensa alegria, entusiasmo e amizade.

Lídia, pelo imenso auxílio que tornou esse trabalho possível, por sua amizade, maravilhosos momentos vividos e por não ter desistido da suinocultura.

Jamil, pela grande ajuda sempre presente durante toda a realização deste trabalho, sem a qual o mesmo não seria possível e por seu senso de humor e amizade.

Aos demais colegas e amigos do Setor de Suínos, em especial a Luciana, pelo incentivo e auxílio em todos os momentos, fundamentais a realização deste trabalho.

À empresa Minitub do Brasil, especialmente ao Luis Paulo e Alexandre Marchetti, pelo auxílio e empréstimo do programa Sperm Vision™.

À empresa Perdigão Agoindustrial SA e a Cooperjacuí, que permitiram a realização deste experimento.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todas as demais pessoas que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“Existem momentos que nunca serão apagados, pessoas que nunca serão esquecidas, pois a vida não vale um momento, mas há momentos que valem uma vida.”

RESUMO

Fatores de risco para a contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas consequências sobre a qualidade das doses inseminantes

Autor: Ana Maria Groehs Goldberg

Orientador: Fernando Pandolfo Bortolozzo

Co-orientador: Ivo Wentz

Co-orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência de diferentes pontos de risco de contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e seus efeitos sobre a qualidade da dose inseminante (DI). O experimento foi realizado em quatro centros de difusão genética (CDG), nos quais as coletas dos ejaculados foram observadas buscando possíveis pontos de risco de contaminação. Posteriormente, o sêmen *in natura* e 2 DIs, provenientes da coleta observada, foram avaliados no que se refere à quantificação bacteriana, morfologia e motilidade espermática e pH. Além do ejaculado, amostras de água e diluente foram avaliadas quanto ao número de unidades formadoras de colônia (UFC). Pêlos prepuciais compridos (>1,0 cm), a higiene da luva de coleta, líquido pingando pela mão do coletador para o interior do recipiente de coleta e a duração da coleta foram os 4, dentre os 12 fatores avaliados, que levaram a um aumento no percentual de ejaculados com valor superior a 220 UFC mL⁻¹ de mesófilos aeróbios (P<0,05). Foi avaliado o efeito isolado ou associado de sete fatores (reprodutor sujo, óstio prepucial sujo, divertículo prepucial grande, pêlos prepuciais compridos, luva de coleta suja, pingos pela mão do coletador para dentro do recipiente de coleta e pênis escapou durante a coleta) que pudessem resultar diretamente na contaminação do ejaculado. Houve aumento significativo do número de ejaculados com contaminação superior a 220 UFC mL⁻¹, a partir da associação de 2 fatores, quando comparados aos ejaculados obtidos em coletas sem nenhum fator predisponente para contaminação. Ao classificar as DIs conforme o grau de contaminação do diluente foram observadas redução na motilidade e no pH e aumento nas alterações de acrossoma das DIs, ao longo das 168 horas de armazenamento, no grupo cujo grau de contaminação do diluente foi superior a 14000 UFC mL⁻¹ versus o grupo com contaminação inferior a 330 UFC mL⁻¹. Doses inseminantes provenientes de ejaculados mais contaminados apresentaram maior grau de contaminação bacteriana. Aparentemente, quando o ejaculado é coletado com um protocolo de contaminação mínima, dificilmente seu grau de contaminação será capaz de produzir efeitos deletérios na qualidade da DI, exceto quando a origem da contaminação for proveniente de falhas higiênicas na linha de processamento das mesmas. A produção de DIs com alta qualidade do ponto de vista bacteriano, somente será possível com um rigoroso controle higiênico na linha de processamento, principalmente no que diz respeito à água e ao diluente, associados a um protocolo de contaminação mínima durante a coleta.

Palavras chaves: Suínos, sêmen, dose inseminante, contaminação bacteriana.

ABSTRACT

Risk of factors for bacterial contamination during boar semen collection and the consequences on the quality of extended semen doses

Author: Ana Maria Groehs Goldberg

Advisor: Fernando Pandolfo Bortolozzo

Co-Advisor: Ivo Wentz

Co-Advisor: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

The aim of this study was to check the influence of different risk of factors for bacterial contamination during the collection of ejaculate and the effects in boar extended semen quality. The experiment was conducted in four boar studs, where semen collection was observed, searching for possible risk of factors for bacterial contamination. The ejaculate and two extended semen doses, deriving from the observed collection, were evaluated in regard to numbers of colony-forming units (CFU), sperm morphology and motility, and pH. Water and extender samples were also evaluated for CFU. Long preputial hair (>1 cm), the hygiene of the collection glove, liquid trickling from the hand of the technician into the semen container and the duration of the collection were the four, from twelve factors evaluated, that lead to an increase in the percentage of ejaculates with more than 220 CFU mL⁻¹ of aerobic mesophiles (P<0.05). The isolated or combined effect of seven factors (bad hygiene of boars, dirty preputial ostium, large preputial diverticulum, long preputial hair, dirty collecting glove, liquid trickling from the hand of the technician into the semen container and escape penis during the collection), that could directly result in the contamination of ejaculates was evaluated. There was a significant increase in the number of ejaculates contaminated with more than 220 CFU mL⁻¹ when two or more factors were associated, compared to ejaculates obtained from collections without any predisponent factors. When the extended semen doses were classified according to the degree of contamination of the extender, a decrease in motility and pH and an increase on acrosome alterations in extended semen, during 168 hours of storage, were verified in the group where the degree of contamination was higher than 14,000 CFU mL⁻¹ versus the group with lower than 330 CFU mL⁻¹. Extended semen derived from more contaminated ejaculates showed a higher degree of bacterial contamination. Apparently, when the ejaculate was collected with minimum contamination protocol, its degree of contamination will hardly be able to produce effects in the extended semen quality, unless when the source of contamination was hygienic failure in the processing. The production of semen extended with high quality in the bacterial point of view will only be possible with a strict hygienic control in the processing, mostly in respect to water and extender, associated with minimum contamination protocol during the collection.

Key-words: Swine, semen, extended semen doses, bacterial contamination

LISTA DE FIGURAS

Figuras inseridas no artigo científico

Figura 1a	Tipo de fixação do pênis suíno, realizado durante a coleta nos CDGs A, B e D.....	25
Figura 1b	Tipo de fixação do pênis suíno, realizado durante a coleta no CDG C.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas no artigo científico

Tabela 1:	Caracterização dos centros de difusão genética (CDGs) avaliados.....	24
Tabela 2:	Descrição de alguns fatores avaliados durante a coleta do ejaculado.....	26
Tabela 3:	Análise descritiva dos ejaculados <i>in natura</i> nos diferentes CDGs.....	29
Tabela 4:	Análise descritiva do crescimento bacteriano de mesófilos aeróbios (PCA) e coliformes totais (VRB) nos ejaculados <i>in natura</i>	29
Tabela 5:	Percentual de amostras de sêmen <i>in natura</i> com grau de contaminação superior a 220 UFC mL ⁻¹ , em meio PCA, de acordo com os fatores avaliados durante a coleta do ejaculado.....	31
Tabela 6:	Número de UFC mL ⁻¹ de mesófilos aeróbios e coliformes totais (CT) encontrados no ejaculado <i>in natura</i> de acordo com os fatores avaliados durante a coleta do ejaculado.....	33
Tabela 7:	Efeito isolado de um fator ou da associação de fatores avaliados no momento da coleta e sua influência no número de UFC mL ⁻¹ no ejaculado <i>in natura</i>	34
Tabela 8:	Avaliações de acrossoma, motilidade total e progressiva e pH ao longo do tempo de armazenamento de acordo com o grau de contaminação bacteriana do diluente.....	36
Tabela 9:	Características do ejaculado e das doses inseminantes (DIs) de acordo com o crescimento bacteriano em meio PCA do ejaculado <i>in natura</i> nos 2 CDGs com contaminação do diluente inferior a 330 UFC mL ⁻¹	38

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	7
<i>ABSTRACT</i>	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Cuidados higiênicos na coleta e processamento do ejaculado suíno.....	13
2.2 Avaliação da motilidade espermática através de sistemas computadorizados	14
2.3 Qualidade da água utilizada para preparar o diluente.	15
2.4 Local de armazenamento e qualidade do diluente.....	17
2.5 Alterações nas doses inseminantes por contaminação bacteriana	18
3 ARTIGO	20
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) vem sendo utilizada na maior parte dos países com suinocultura tecnificada. Esta biotécnica da reprodução teve seu início na década de 30, no Japão e na Rússia, sendo oficialmente implantada no Brasil em 1975, quando, a partir de então, houve um crescimento desta tecnologia em todo o país (WENTZ et al., 2000). Entretanto, para a obtenção de resultados satisfatórios com a utilização desta tecnologia, é de fundamental importância a produção de doses inseminantes (DI) de alta qualidade, ou seja, livres de organismos contaminantes e apresentando adequada habilidade de armazenamento, boa capacidade fertilizante e alto valor genético (COLENBRANDER et al., 1993).

Os métodos clássicos de avaliação do ejaculado incluem a mensuração do volume, concentração espermática, número total de espermatozoides por ejaculado, motilidade e morfologia. A motilidade é uma avaliação frequentemente utilizada por ser um teste simples, rápido e barato (GADEA, 2005), capaz de detectar amostras de baixa qualidade que resultam em baixa fertilidade (RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006). A técnica tradicional de avaliação da motilidade é realizada através de uma observação visual do movimento espermático sob microscópio de contraste de fase. Atualmente, avaliações computadorizadas do sêmen podem ser realizadas, registrando dados que o olho humano não é capaz de detectar (TEJERINA et al., 2008).

A contaminação bacteriana do sêmen suíno pode ocorrer tanto durante a coleta como no processamento do mesmo (ALTHOUSE et al., 2000). O macho pode ser a fonte primária de contaminação bacteriana das doses inseminantes, entretanto, outras fontes de contaminação não podem ser desprezadas como o meio ambiente, os funcionários do centro de difusão genética (CDG) e a água utilizada na preparação do diluente (ALTHOUSE e LU, 2005). Doses inseminantes com contaminação bacteriana apresentam diminuição da motilidade e do pH, aumento da aglutinação, de anormalidades de acrossoma e de células mortas (ALTHOUSE et al., 2000).

O objetivo do presente estudo foi avaliar pontos de risco para contaminação bacteriana durante a coleta e processamento do ejaculado e verificar suas consequências sobre a qualidade das DIs em centros de difusão genética suína.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cuidados higiênicos na coleta e processamento do ejaculado suíno

No suíno, a coleta do ejaculado é feita pelo método de fixação do pênis com a mão enluvada (HANCOCK e HOWELL, 1959). Suas vantagens são a simplicidade, baixo custo e eliminação da necessidade de limpeza e esterilização dos materiais utilizados no processo (KING e MACPHERSON, 1973), entretanto, é importante que sejam tomados cuidados específicos para diminuir a contaminação bacteriana. Esta pode ocorrer tanto durante a coleta como no processamento do mesmo (ALTHOUSE et al., 2000), sendo as fontes de contaminação divididas conforme a origem em animal e não-animal. Durante a coleta os fatores mais comumente relacionados à contaminação bacteriana são os de origem animal (ALTHOUSE e LU, 2005).

Segundo Weitze (1996), é quase impossível uma coleta de sêmen livre de qualquer contaminação. Dias et al. (2000) compararam dois métodos de higienização pré-coleta e coleta do ejaculado. Os resultados demonstram que maior frequência de limpeza do macho e das instalações, além de uma melhor higienização pré-coleta e correta fixação do pênis, contribuem para a redução da contaminação bacteriana do sêmen. Quando os cuidados de higiene foram tomados, a média de contaminação encontrada no ejaculado foi de 500 UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por mL), ao passo que nas coletas sem estes cuidados a média de contaminação subiu para 18000 UFC mL⁻¹. Althouse et al. (2000) e Bortolozzo e Wentz (2005) propuseram alguns cuidados que devem ser tomados para diminuir a contaminação bacteriana durante a coleta, entre eles estão a limpeza do macho, adequada higienização prepucial pré-coleta com sobre-luva, adequada fixação do pênis, descarte dos primeiros jatos do ejaculado, utilização de luvas descartáveis específicas para cada coleta, utilização de filtros para separação da porção gelatinosa do ejaculado, descarte dos filtros antes do envio da amostra para o laboratório e habilidade do coletador para realizar o procedimento.

A contaminação química proveniente das luvas de coleta, especialmente as de látex, também desempenha um importante papel na redução da viabilidade espermática. Esta contaminação poderá ocorrer caso o ejaculado entre em contato com as mesmas, em função de procedimentos errôneos no momento da fixação do pênis (BORTOLOZZO e WENTZ, 2005). Scheid et al. (1995) relataram que as luvas empregadas na coleta podem possuir

substâncias tóxicas aos espermatozóides, que levam à redução no percentual de espermatozóides móveis.

Após a coleta, o ejaculado é repassado para o laboratório onde é submetido à análise e processamento para obtenção das DIs. Durante esse processo os fatores que podem ser relacionados com a contaminação bacteriana são, em geral, os de origem não-animal. Segundo Ness et al. (2007), dentre os fatores que possivelmente predispõem a contaminação, a água parece ser o mais preocupante, pois nela as bactérias se multiplicam exponencialmente, inclusive naquelas submetidas a processos de purificação, formando biofilmes nesses sistemas de tratamento e, conseqüentemente, contaminando o diluente. Nesses casos, uma correta manutenção dos filtros utilizados para a purificação da água reduz os níveis de contaminação. Em um estudo sobre doses inseminantes contaminadas, Kuster e Althouse (1997) concluíram que a contaminação das DIs partiu do tonel de preparação do diluente que era apenas enxaguado com água destilada no final de cada dia.

Outros fatores a serem considerados durante o exame e processamento do ejaculado são os materiais não descartáveis utilizados na avaliação e processamento do sêmen, como os termômetros e as pipetas. Esses materiais acabam sendo, muitas vezes, fonte de contaminação cruzada, uma vez que só são limpos e desinfetados ao final do dia e são utilizados de ejaculado em ejaculado. Além dos fatores relacionados com os materiais utilizados, o ambiente laboratorial também é importante. O ar circulante deve ser filtrado sistematicamente, com o intuito de diminuir a circulação das bactérias (ALTHOUSE e LU, 2005). Althouse et al. (2000) propuseram algumas ações que podem ser utilizadas dentro do laboratório para diminuir a contaminação bacteriana, entre elas destacam-se o uso de produtos descartáveis no contato com o sêmen, a desinfecção diária dos materiais não descartáveis com detergente não-residual, desinfecção do chão ao final do dia, preparação de produtos a serem utilizados diariamente e instalação de luzes Ultra-Violeta para limpeza das superfícies do laboratório.

2.2 Avaliação da motilidade espermática através de sistemas computadorizados

A avaliação de motilidade espermática é uma rotina nos CDGs por ser uma forma simples, rápida e barata de se avaliar o ejaculado. Este parâmetro está intimamente relacionado com a viabilidade, apesar de nem sempre representar uma correlação significativa com a fertilidade (BORTOLOZZO et al., 2008). A motilidade progressiva é um indicador de metabolismo funcional e de membranas integras (JOHNSON et al., 2000). O método tradicional de avaliação da motilidade é realizado através da visualização do movimento dos

espermatozóides em um microscópio óptico, preferencialmente com contraste de fase, em um aumento de 100 a 200 vezes. Por ser uma avaliação subjetiva, a acurácia depende da experiência do avaliador (BORTOLOZZO e WENTZ, 2005). Para reduzir a subjetividade desta avaliação, testes que medem a motilidade espermática objetivamente foram desenvolvidos e são conhecidos como “computer-assisted sperm analysis” (CASA) (FOXCROFT et al., 2008).

Esta tecnologia já existe comercialmente há 20 anos, sendo o sistema composto, basicamente, por um microscópio com uma câmara de vídeo acoplada e conectada a um computador. Este digitaliza as imagens com o auxílio de um software, que mede e analisa os parâmetros de motilidade (BAILEY, 2008), podendo ainda avaliar a concentração e a morfologia espermática. Um desses sistemas de análise computadorizada chama-se Sperm Vision™. Este sistema reconhece o espermatozóide a partir da área de sua cabeça (20 – 120 μm^2 para suínos), sendo automaticamente selecionado conforme a espécie avaliada. As células são classificadas como imóveis quando o desvio de orientação da cabeça (AOC – Average Orientation Change of the head) é menor do que 2,5 graus de angulação, com movimento local quando a distância de deslocamento em linha reta (DSL – Distance Straight Line) é menor do que 4 microns e apresentando motilidade progressiva quando as células não se enquadram em nenhuma das classificações anteriores (SPERM VISION™ 3.5 USER'S MANUAL, 2006).

2.3 Qualidade da água utilizada para preparar o diluente.

A obtenção de DIs de alta qualidade está diretamente relacionada à água utilizada no laboratório uma vez que esta pode ser fonte de contaminação química, física e microbiológica. Dentre os órgãos que definem a qualidade da água está a American Society for Testing and Materials (ASTM) que classifica a água em 4 tipos conforme sua composição, sendo que na preparação do diluente, apenas os tipos I ou II devem ser utilizados. Em relação à contaminação bacteriana, o tipo I deve ser livre e o tipo II deve apresentar, no máximo, 10 UFC mL^{-1} (MARCHETTI, 2008). O desejável é que esta água não apresente agentes contaminantes e possua baixa condutividade elétrica, ou seja, mínima ou nenhuma presença de minerais. Essas características são importantes para prevenir lesões espermáticas principalmente de acrossoma (BORTOLOZZO e WENTZ, 2005).

A água do tipo I é altamente purificada e requer a combinação de deionização, destilação, filtração e osmose reversa, enquanto o tipo II é obtido através de dupla destilação (LEVIS, 1997; FLOWERS, 1998). Ambos os tipos devem ser utilizados no momento em que

são produzidos, não podem ser estocados para evitar contaminação. Entre os principais contaminantes da água encontram-se substâncias orgânicas e inorgânicas, solúveis e insolúveis, além de microorganismos que podem se aderir nos recipientes de estocagem e resinas de troca iônica ou carvão ativado, tornando difícil sua remoção e levando à contaminação da mesma (SILVA et al., 2006). Diversos sistemas de purificação de água estão disponíveis no mercado e devem ser escolhidos conforme as impurezas existentes na água de alimentação do CDG.

Alguns filtros são utilizados como pré-tratamento da água e aumentam a eficiência de outros processos de purificação. Apresentam como vantagens a remoção completa das partículas maiores que os poros, mínima manutenção e baixo custo. Suas limitações estão no fato de serem descartáveis e não removerem compostos orgânicos ou pirogênicos (MARCHETTI, 2008). Segundo Silva et al. (2006), o filtro de celulose é utilizado para remover partículas suspensas e microorganismos. O filtro de carvão ativado é utilizado para a remoção de resíduos de desinfetante, como cloro e hipoclorito, além de contaminantes orgânicos dissolvidos. Marchetti (2008) relata que a adsorção por carvão ativado apresenta como limitações a geração de partículas e o crescimento bacteriano devido à remoção do cloro. A ultrafiltração é um processo mecânico ou eletro-mecânico que remove pequenas impurezas dissolvidas ou suspensas na água, conforme o seu tamanho, forma e carga elétrica (SILVA et al., 2006).

Após o pré-tratamento a água está pronta para passar pelos sistemas de purificação, ou seja, deionização, destilação, osmose reversa, oxidação e esterilização por luz ultra-violeta. A deionização é um processo no qual a água passa em resinas trocadoras de íons, efetuando a remoção de sólidos e gases ionizados dissolvidos. As resinas de troca catiônica trocam seus íons hidrogênio (H^+) por contaminantes catiônicos, como o cálcio, magnésio e sódio. As aniônicas trocam seus íons hidroxila (OH^-) pelos contaminantes aniônicos, como clorato, sulfato e nitrato. A pureza da água na saída do processo pode ser determinada pela medição de sua condutividade elétrica, que sempre será reduzida de acordo com a eficiência da purificação, sendo que as águas tipo I e II devem ter no máximo 0,06 e 1,0 $\mu S/cm$ respectivamente. Estas resinas podem ser reutilizadas, entretanto este processo pode recontaminá-las (MARCHETTI, 2008).

O processo de destilação consiste em elevar a temperatura da água até o ponto de ebulição em uma coluna de evaporação. O vapor passa então por um condensador resfriado voltando ao estado líquido, transformando-se em uma água mais pura do que a original. Este sistema remove partículas e bactérias, entretanto não remove substâncias inorgânicas (SILVA

et al., 2006). Entre suas vantagens pode-se citar a possibilidade de uso contínuo e manutenção acessível e suas limitações são a manutenção preventiva, a limitação de vazão nos equipamentos e o grande consumo de água e energia (MARCHETTI, 2008).

A osmose reversa consiste na passagem forçada de água, com o auxílio de uma bomba de alta pressão, através de uma membrana semi-permeável que irá reter as impurezas (SILVA et al., 2006). É capaz de remover entre 90 e 95% de material inorgânico e 99% de material orgânico, entretanto não remove gases ionizáveis insolúveis. Quando utilizado como único processo, produz água tipo III (MARCHETTI, 2008).

O sistema Ultra Violeta é capaz de esterilizar a água, entretanto não remove sólidos e gases dissolvidos. Além disto, os raios devem atingir diretamente os microorganismos, portanto se a água apresentar partículas em suspensão o processo pode ser prejudicado. Seu potencial de esterilização depende da intensidade da lâmpada, da penetração da radiação e do tempo de exposição, ou seja, está diretamente relacionada à velocidade do fluxo da água (MARCHETTI, 2008).

A produção de água de alta qualidade para a preparação do diluente exige uma associação de processos. Marchetti (2008) sugere a associação de filtração, deionização, osmose reversa e esterilização por Luz Ultra Violeta ou filtração, deionização e destilação, nesta ordem. Deve-se ter em mente que cada processo de purificação é capaz de retirar determinada substância da água, em função disto, ao se associar os processos é necessária especial atenção a ordem dos mesmos, caso contrário, corre-se o risco de recontaminar a água. Por exemplo, se a água passar inicialmente pelo processo de destilação para posteriormente ser deionizada, esta poderá apresentar contaminação bacteriana ao final do processo, caso a resina esteja contaminada. Portanto, a última fase do processo deve, preferencialmente, ser capaz de esterilizar a água.

2.4 Local de armazenamento e qualidade do diluente

Além do cuidado com a qualidade da água, outro ponto que deve receber especial atenção é o local onde a água será armazenada e onde o diluente será preparado. Muitas vezes esses locais não são adequadamente higienizados o que propicia a formação dos biofilmes. Os biofilmes são massas de microorganismos que se aderem às superfícies formando uma camada limosa. Os biofilmes podem ser encontrados em qualquer local onde exista água e uma superfície sólida para o seu desenvolvimento (TORTORA et al., 2000). Segundo Friedman e Kolter (2004 apud Silva et al., 2006), as bactérias em biofilmes são mais resistentes aos antimicrobianos do que células da mesma espécie individualizadas.

Outro fator a ser considerado é a forma de armazenamento do diluente em pó. Segundo Bortolozzo e Wentz (2005), um diluente pode sofrer vários tipos de alterações qualitativas quando armazenado em condições inadequadas, portanto as recomendações à respeito da temperatura de armazenamento devem ser rigorosamente seguidas. Além disso, os pacotes de diluente abertos que não forem totalmente utilizados podem ser preparados posteriormente, desde que sejam bem fechados e armazenados a 4°C. Após preparado, o diluente pode ser utilizado em 24 horas, desde que seja armazenado à temperatura de 4 a 6°C. Em um estudo sobre DIs contaminadas, Kuster e Althouse (1997) concluíram que a contaminação das DIs partiu de um lote de diluente que havia sido reempacotado sem cuidados higiênicos.

2.5 Alterações nas doses inseminantes por contaminação bacteriana

A contaminação das DIs leva a aglutinação dos espermatozóides, queda do pH e da motilidade e a alterações no acrossoma. Monga e Roberts (1994) descreveram que a *E. coli* é capaz de se ligar aos receptores específicos para manose existentes nos espermatozóides causando aglutinação espermática. Althouse et al. (2000) relatam que o mecanismo de ação de outras bactérias sobre os espermatozóides deve ser similar ao descrito para *E. coli*. Esses autores também observaram que esses efeitos da contaminação bacteriana no sêmen não ocorrem imediatamente, mas geralmente necessitam de 36 a 48 horas de armazenamento para se tornarem evidentes.

O pH do sêmen na espécie suína oscila entre 7,3 e 7,9 (HAFEZ, 1993). Durante seu metabolismo, tanto espermatozóides como bactérias produzem ácido láctico, o que aumenta a concentração desta substância nas DIs durante o período de armazenamento, levando a uma redução do pH. Com o objetivo de reduzir as flutuações de pH, os diluentes contêm soluções tampão em sua formulação (LEVIS, 2000). Entretanto, como o poder dos tampões é limitado, quando a contaminação bacteriana se eleva, a produção de ácido láctico aumenta e o tampão não é suficiente para impedir a queda do pH. Além disso, a temperatura na qual as DIs são estocadas não é capaz de impedir o crescimento bacteriano e esses microorganismos podem se aderir à membrana espermática ou liberar metabólitos tóxicos no meio, causando lesões na célula espermática (BORTOLOZZO e WENTZ, 2005).

Althouse et al. (2000) relataram que DIs com contaminação bacteriana apresentando aglutinação e redução de sua longevidade, aumentaram o retorno regular ao estro e a descarga vulvar. Da mesma forma, Ness et al. (2007) descreveram que a contaminação das DIs com a bactéria *Achromobacter xylosoxidans*, isolada do sistema de purificação de água, ocasionou

além de redução na qualidade e longevidade das doses inseminantes, infecções uterinas, redução da taxa de concepção e, conseqüentemente, aumento da infertilidade.

3 ARTIGO

ARTIGO A SER APRESENTADO À COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA
“CIÊNCIA RURAL”

Fatores de risco para a contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e suas conseqüências sobre a qualidade das doses inseminantes

Risk of factors for bacterial contamination during boar semen collection and the consequences on the quality of extended semen doses

Ana Maria Groehs Goldberg^I, Laura Espíndola Argenti^{II}, Jamil Elias Faccin^{II}, Lídia Linck^{II}, Mônica Santi^I, Mari Lourdes Bernardi^{III}, Marisa Cardoso^{IV}, Ivo Wentz^V e Fernando Pandolfo Bortolozzo^{V*}

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência de diferentes pontos de risco de contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno e seus efeitos sobre a qualidade da dose inseminante (DI). O experimento foi realizado em quatro centros de difusão genética (CDG), nos quais as coletas dos ejaculados foram observadas buscando possíveis pontos de risco de contaminação. Posteriormente, o sêmen *in natura* e 2 DIs, provenientes da coleta observada, foram avaliados no que se refere à quantificação bacteriana, morfologia e motilidade espermática e pH. Além do ejaculado, amostras de água e diluente foram avaliadas quanto ao número de unidades formadoras de colônia (UFC). Pêlos prepuciais compridos (>1,0 cm), a higiene da luva de coleta, líquido pingando pela mão do coletador para o interior do recipiente de coleta e a duração da coleta foram os 4, dentre os 12 fatores avaliados, que levaram a um aumento no percentual de ejaculados com valor superior a 220 UFC mL⁻¹ de mesófilos aeróbios (P<0,05). Foi avaliado o efeito isolado ou associado de sete fatores (reprodutor sujo, óstio prepucial sujo, divertículo prepucial grande, pêlos prepuciais compridos, luva de coleta suja, pingos pela mão do coletador para dentro do recipiente de coleta e pênis escapou durante a coleta) que pudessem resultar diretamente na contaminação do ejaculado. Houve aumento significativo do número de ejaculados com contaminação superior a 220 UFC mL⁻¹, a partir da associação de 2 fatores, quando comparados aos

^IPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: agroehs@gmail.com

^{II}Aluno da Graduação em Medicina Veterinária e Bolsista do Setor de Suínos-UFRGS

^{III}Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{IV}Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^VDepartamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, UFRGS. Setor de Suínos. Av. Bento Gonçalves, 9090 CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: fpbortol@ufrgs.br. *Autor para correspondência.

ejaculados obtidos em coletas sem nenhum fator predisponente para contaminação. Ao classificar as DIs conforme o grau de contaminação do diluente foram observadas redução na motilidade e no pH e aumento nas alterações de acrossoma das DIs, ao longo das 168 horas de armazenamento, no grupo cujo grau de contaminação do diluente foi superior a 14000 UFC mL⁻¹ versus o grupo com contaminação inferior a 330 UFC mL⁻¹. Doses inseminantes provenientes de ejaculados mais contaminados apresentaram maior grau de contaminação bacteriana. Aparentemente, quando o ejaculado é coletado com um protocolo de contaminação mínima, dificilmente seu grau de contaminação será capaz de produzir efeitos deletérios na qualidade da DI, exceto quando a origem da contaminação for proveniente de falhas higiênicas na linha de processamento das mesmas. A produção de DIs com alta qualidade do ponto de vista bacteriano, somente será possível com um rigoroso controle higiênico na linha de processamento, principalmente no que diz respeito à água e ao diluente, associados a um protocolo de contaminação mínima durante a coleta.

Palavras-chave: Suínos, sêmen, dose inseminante, contaminação bacteriana

ABSTRACT

The aim of this study was to check the influence of different risk of factors for bacterial contamination during the collection of ejaculate and the effects in boar extended semen quality. The experiment was conducted in four boar studs, where semen collection was observed, searching for possible risk of factors for bacterial contamination. The ejaculate and two extended semen doses, deriving from the observed collection, were evaluated in regard to numbers of colony-forming units (CFU), sperm morphology and motility, and pH. Water and extender samples were also evaluated for CFU. Long preputial hair (>1 cm), the hygiene of the collection glove, liquid trickling from the hand of the technician into the semen container and the duration of the collection were the four, from twelve factors evaluated, that lead to an increase in the percentage of ejaculates with more than 220 CFU mL⁻¹ of aerobic mesophiles (P<0.05). The isolated or combined effect of seven factors (bad hygiene of boars, dirty preputial ostium, large preputial diverticulum, long preputial hair, dirty collecting glove, liquid trickling from the hand of the technician into the semen container and escape penis during the collection), that could directly result in the contamination of ejaculates was evaluated. There was a significant increase in the number of ejaculates contaminated with more than 220 CFU mL⁻¹ when two or more factors were associated, compared to ejaculates obtained from collections without any predisponent factors. When the extended semen doses

were classified according to the degree of contamination of the extender, a decrease in motility and pH and an increase on acrosome alterations in extended semen, during 168 hours of storage, were verified in the group where the degree of contamination was higher than $14,000 \text{ CFU mL}^{-1}$ versus the group with lower than 330 CFU mL^{-1} . Extended semen derived from more contaminated ejaculates showed a higher degree of bacterial contamination. Apparently, when the ejaculate was collected with minimum contamination protocol, its degree of contamination will hardly be able to produce effects in the extended semen quality, unless when the source of contamination was hygienic failure in the processing. The production of semen extended with high quality in the bacterial point of view will only be possible with a strict hygienic control in the processing, mostly in respect to water and extender, associated with minimum contamination protocol during the collection.

Key-words: Swine, semen, extended semen doses, bacterial contamination

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é, atualmente, a tecnologia da reprodução mais utilizada nas granjas tecnificadas de suínos (ALTHOUSE et al., 2008). Entretanto, para obter sucesso em um programa de IA é fundamental que os centros de difusão genética (CDG) produzam doses inseminantes (DIs) de alta qualidade.

A produção de DIs deveria incluir além dos exames rotineiros de avaliação de parâmetros espermáticos (motilidade, morfologia, concentração espermática), amostras para análise microbiológica da água, diluente e DIs, bem como um controle de qualidade da higiene do laboratório e do nível de contaminação bacteriana nas amostras de sêmen *in natura* (WABERSKI et al., 2008). As DIs com alta contaminação bacteriana tendem a apresentar aglutinações espermáticas, redução da motilidade e viabilidade, situação que se reflete em retorno regular ao estro, descargas vulvares pós-inseminação e redução da performance reprodutiva do rebanho (ALTHOUSE et al., 2000).

Segundo Althouse e Lu (2005), o processo de coleta do sêmen suíno está longe de ser um procedimento estéril e eles sugerem um protocolo de contaminação mínima para a coleta do sêmen. Dias et al. (2000) demonstraram que um protocolo higiênico durante a coleta produz ejaculados com menor grau de contaminação, embora não tenham identificado especificamente os principais fatores que determinaram as diferenças no grau de contaminação bacteriana do ejaculado. O objetivo desse trabalho foi verificar qual a

influência de diferentes pontos de risco de contaminação bacteriana durante a coleta do ejaculado suíno, visando melhorar a qualidade da dose inseminante.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em quatro CDG localizados na região sul do Brasil, entre abril e novembro de 2008. Foram realizadas duas visitas em cada CDG, com intervalo de 3 a 4 meses, tomando-se o cuidado de não interferir na rotina de funcionamento. Todas as instalações apresentavam certificação GRSC (Granja de Reprodutores Suídeos Certificada). Foram observadas 213 coletas de sêmen de reprodutores das genéticas Dalland, Agroceres PIC, DanBred, Toppigs, Penarlan e Genétiporc com idades entre 8 e 59 meses, sendo algumas características dos CDGs apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização dos centros de difusão genética (CDGs) avaliados.

Características dos CDGs	CDG A	CDG B	CDG C	CDG D
Número de reprodutores alojados	144	87	105	119
Idade média dos reprodutores (meses)	21,6	21,0	15,9	30,1
Meta de reposição anual (%)	60	45	50	40
Produção mensal de DIs*	24143	12994	18082	16837
Número de coletas/mês*	841	458	671	496
Média mensal de DIs/ejaculado*	28,9	28,5	27,0	34,1

* média mensal dos últimos 12 meses.

Os ejaculados foram coletados em sala específica após a higienização dos divertículos prepuciais, entretanto, nos CDGs A e C era utilizada sub-luva, ou seja, os coletadores utilizavam uma luva de látex para manejo dos animais e higienização dos divertículos prepuciais que era coberta com uma luva de vinil no momento da coleta, enquanto nos CDGs B e D era utilizada sobre-luva de plástico descartada no momento da coleta. Todos utilizavam o método de coleta por estimulação mecânica do pênis (HANCOCK e HOWELL, 1959), entretanto, nos CDGs A, B e D a fixação do pênis era realizada pela pressão de todos os dedos sobre a ponta do pênis com o dedo mínimo estendido (Figura 1A), enquanto no CDG C a ponta do pênis era fixada entre o polegar e o indicador estendidos, sendo que os demais dedos permaneciam na lateral do recipiente de coleta (Figura 1B). Em todos os CDGs foram utilizados recipientes térmicos de proteção com material descartável (saco ou copo plástico) no interior e filtro específico para reter a fração gelatinosa das glândulas bulbouretrais.

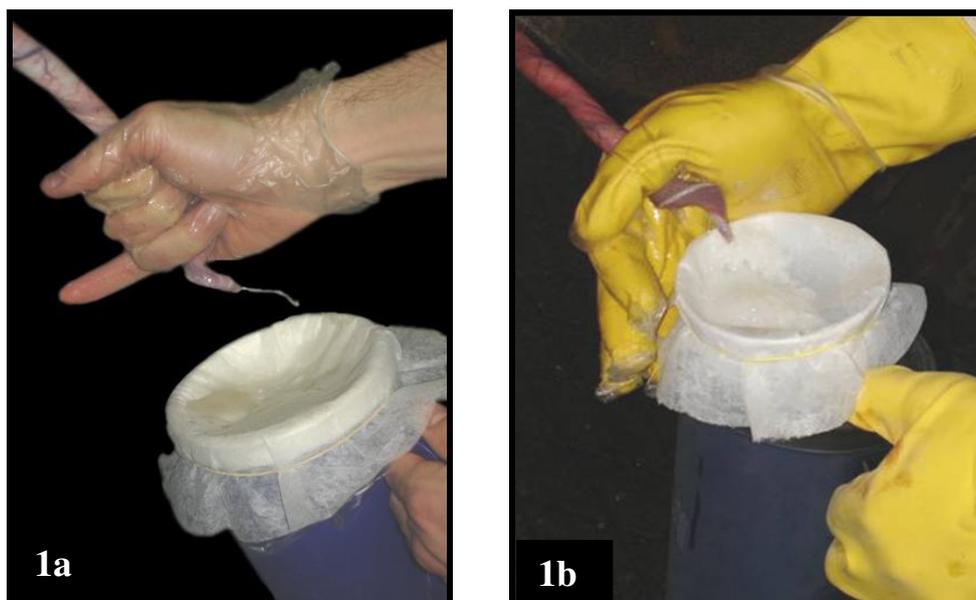


Figura 1: Tipos de fixação do pênis suíno realizados durante a coleta, conforme o CDG; 1a: CDG A, B e D; 1b: CDG C

Em cada visita foi realizada a observação individual das coletas buscando possíveis pontos de risco de contaminação do ejaculado. Para tal, foram avaliados os aspectos descritos na Tabela 2. Além disso, foram também considerados a ordem da coleta, o tempo entre a entrada na baía e realização do salto, duração da coleta e idade dos reprodutores.

Após a observação da coleta do sêmen, o mesmo foi levado ao interior do laboratório do CDG, através de uma janela de comunicação, onde foi submetido às avaliações macro e microscópicas (BORTOLOZZO e WENTZ, 2005), que foram realizadas de forma semelhante em todos os CDGs. Inicialmente o ejaculado foi avaliado quanto à cor, odor, aspecto e volume e, logo em seguida, quanto à motilidade, aglutinação e concentração espermática.

Após a aprovação do ejaculado, o mesmo foi diluído em BTS (Beltsville Thawing Solution), sendo que nos CDGs A, B e C foram utilizados produtos contendo o antimicrobiano gentamicina (200 mg/L, IMV™ ou 250 mg/L, Minitub™) e no CDG D, Linco-Spectim (0,26 g de Lincomicina e Espectinomicina por litro de diluente, Genes Diffusion™). Como local de preparação e aquecimento do diluente, um recipiente de inox com um saco plástico descartável no seu interior foi utilizado nos CDG A e D, enquanto um recipiente de PVC sem revestimento interno foi utilizado nos CDGs B e C. Todas as DIs foram envasadas de forma semi-automática em garrafas com capacidade de 100 mL. A água utilizada na preparação do diluente foi proveniente de poço artesiano em todos os CDGs, sendo que em três deles a purificação foi realizada através de aparelho de osmose reversa com Luz Ultra Violeta e no CDG D a água foi filtrada, deionizada e destilada.

Tabela 2: Descrição de alguns fatores avaliados durante a coleta do ejaculado.

Fatores avaliados	Descrição
Higiene do reprodutor	Limpo: sujidades não perceptíveis sobre o corpo Sujo: presença de qualquer sujidade sobre o corpo
Higiene do óstio prepucial	Limpo: sujidades não perceptíveis Sujo: presença de qualquer sujidade
Comprimento dos pêlos prepuciais	Curtos: aproximadamente 1 cm Compridos: maiores do que 1 cm
Higiene da luva de coleta	Limpa: tocou apenas no pênis Suja: não tocou apenas no pênis
Inclinação do recipiente de coleta	Inclinado: inclinação de 45° durante a coleta Não inclinado: inclinação < 45° durante a coleta
Pingos pela mão do coletador	Dentro do recipiente de coleta Fora do recipiente de coleta
Pênis escapou durante a coleta	Sim Não
Tamanho do divertículo prepucial	Pequeno: menor do que 6,0 cm Grande: maior do que 6,0 cm

Amostras do ejaculado *in natura*, coletadas tanto de forma estéril como em solução de formol citrato, e duas DIs, preparadas conforme o protocolo da central, foram utilizadas para realização de diversas análises laboratoriais. Além do ejaculado, amostras de água e diluente foram coletadas, também de forma estéril, para avaliação microbiológica. O sêmen *in natura*, a água e o diluente foram transportados de forma refrigerada a 5°C, e as DIs foram acondicionadas dentro de uma conservadora portátil a 16°C.

No laboratório, uma alíquota de 12 mL foi retirada das DIs, após completa homogeneização e de forma estéril, para posterior quantificação microbiológica, sendo armazenada, juntamente com as demais DIs, na conservadora onde permaneceram a 16°C durante as 168 horas de análises. Os demais materiais para avaliação microbiológica eram refrigerados a 5°C. As amostras de água, diluente, sêmen *in natura* e DIs com 48 e 168 horas de armazenamento, foram avaliadas para quantificação de mesófilos aeróbios e coliformes totais pela técnica de plaqueamento em profundidade segundo Silva et al. (1997), respectivamente, nos meios de cultura PCA (Plate Count Agar, Oxoid) e VRB (Violet Red Bile Lactose Agar, Oxoid). Todas as amostras foram diluídas até 10⁻² em solução salina a 0,85%, estéril, e semeadas em duplicata (inóculos de 1,0 mL de cada diluição por placa). Após a incubação (37°C/48 h) no meio PCA, foram contadas todas as colônias presentes e no VRB, apenas as colônias consideradas típicas de coliformes totais (1-2 mm de diâmetro,

vermelhas e com halo de precipitação rosado), conforme Siqueira (1995). O número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL⁻¹) de sêmen ou DI foi calculado multiplicando-se a média do número de colônias contadas nas duplicatas, pelo inverso da diluição em que a contagem foi realizada.

A avaliação de morfologia espermática completa (BLOM, 1973) foi realizada no sêmen *in natura* e a morfologia de acrossoma (PURSEL et al., 1972) nas DIs com 24 e 168 horas de armazenamento. As amostras foram fixadas em solução de formol citrato, sendo avaliadas 200 células por amostra em microscópio de contraste de fase (Olympus, BX41) com aumento de 1000x.

As DIs foram avaliadas com 24, 72, 108 e 168 horas de armazenamento quanto ao seu pH e motilidade. Para a avaliação do pH era retirada uma alíquota de 3,0 mL de cada DI, após prévia homogeneização, a qual permanecia sob temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos, após os quais era realizada a medição através de um pHmetro de mesa (Schott, pH-meter CG825). Para a avaliação da motilidade, uma alíquota de 1,5 mL era acondicionada em um tubo para reação, tipo *Eppendorf*, após prévia homogeneização e aquecida a 38,0°C em uma mesa de pré-aquecimento contendo um bloco de alumínio para suporte dos tubos plásticos. Após 15 minutos, a amostra era homogeneizada e 2 µL eram inseridos por capilaridade para o interior de uma câmara de contagem Standard Count (Leja™) aquecida (38°C), tomando-se o cuidado de preenchê-la por completo. A motilidade foi avaliada no eixo longitudinal da porção central da câmara, iniciando-se do lado oposto ao preenchimento, em menos de 45 segundos, pelo programa Sperm Vision™ (Minitub™), com aumento de 200x e contraste de fase negativo. A contagem das células foi realizada em sete campos diferentes com desvio padrão máximo de 15% no número de células entre os campos. As células foram identificadas pela área da cabeça considerada entre 20 – 120 µm², sendo classificadas como imóveis quando o desvio de orientação da cabeça (AOC – Average Orientation Change of the head) era menor do que 2,5 graus de angulação, com movimento local quando a distância de deslocamento em linha reta (DSL – Distance Straight Line) era menor do que 4 microns e apresentando motilidade progressiva quando as células não se enquadravam em nenhuma das classificações anteriores. Além disto, foi realizada a contagem do número de espermatozóides das DIs com 24 horas de armazenamento, com o uso do mesmo programa.

Para fins de análise, os ejaculados *in natura* foram classificados como apresentando um valor inferior ou igual a 220 UFC mL⁻¹ e superior a 220 UFC mL⁻¹. Essa classificação foi baseada no trabalho de Dias et al. (2000) e, além disto, aproximadamente 50% das amostras

avaliadas no presente estudo apresentaram contaminação de até 220 UFC mL⁻¹. As DIs foram classificadas, para fins de análise estatística, em superiores a 10 UFC mL⁻¹ ou 100 UFC mL⁻¹, respectivamente, para DIs semeadas em meio PCA com 48 e 168 horas de armazenamento, pois estes valores representaram aproximadamente 50% das amostras avaliadas no presente estudo.

A análise estatística foi efetuada com o programa estatístico SAS (SAS, 2000), sendo a análise descritiva dos dados obtida pelos procedimentos MEANS e FREQ. O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar os percentuais de ejaculados com mais de 220 UFC mL⁻¹, de acordo com os fatores referentes ao reprodutor ou à coleta propriamente dita e, também, de acordo com a existência de um ou mais fatores que pudessem contribuir para a contaminação do ejaculado. Em todos os casos de análise do número de UFC mL⁻¹, os dados foram transformados em logaritmo antes de serem submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM. Nos dois CDGs que não apresentaram contaminação excessiva do diluente, as características do ejaculado (UFC mL⁻¹ e motilidade) e das DIs (UFC mL⁻¹, motilidade total, motilidade progressiva e pH) foram comparadas de acordo com a classificação do ejaculado *in natura* em dois grupos: ≤ 220 UFC mL⁻¹ (n=43) e > 220 UFC mL⁻¹ (n=62). Em outra análise, foram incluídas todas as DIs de sêmen as quais foram classificadas em dois grupos, de acordo com o grau de contaminação do diluente: UFC mL⁻¹ ≤ 330 (n=105) e UFC mL⁻¹ ≥ 14000 (n=108). As variáveis motilidade total, motilidade progressiva e pH foram analisadas como medidas repetidas no tempo (diferentes momentos de avaliação da mesma amostra de sêmen) pelo procedimento MIXED. No modelo foram incluídos os efeitos do momento de avaliação das amostras, do grau de contaminação do diluente e da interação entre os dois. Os percentuais de acrossomas anormais, nas avaliações efetuadas nas 24 e 168 h de armazenamento da DI, foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM. Em todos os casos de comparação de médias, foram utilizados o teste t (duas médias) ou o teste de Tukey-Kramer (mais de duas médias) com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quatro CDGs utilizados no experimento apresentavam uma tecnologia muito semelhante tanto na coleta como na avaliação e processamento do ejaculado. As particularidades de algumas características macro e microscópicas do sêmen coletado em cada CDG são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Análise descritiva dos ejaculados *in natura* nos diferentes CDGs.

Avaliações	CDG A	CDG B	CDG C	CDG D
Número de ejaculados	53	55	53	52
Volume (mL)	268,8 ± 92,2	286,5 ± 103,5	223,9 ± 86,9	273,6 ± 83,0
Concentração (x10 ⁶ spz/mL)	344,6 ± 105,3	324,9 ± 69,5	327,1 ± 91,0	426,0 ± 120,8
Total spz/ejaculado (x 10 ⁹)	86,1 ± 19,1	89,5 ± 28,5	68,6 ± 21,0	113,1 ± 39,0
Motilidade total (%)	85,7 ± 1,8	94,5 ± 2,4	86,6 ± 2,4	88,6 ± 2,5
Acrossoma anormal (%)	0,7 ± 1,0	1,5 ± 2,8	0,5 ± 1,0	1,2 ± 1,2
Sptz com alterações morfológicas (%)	10 ± 9,3	9,1 ± 13	7,2 ± 7,1	11,1 ± 7,8

Sptz – espermatozóides.

As informações relacionadas ao grau de contaminação bacteriana, por mesófilos aeróbios (PCA) ou por coliformes totais (VRB), bem como o percentual de ejaculados com baixa contaminação bacteriana ou considerados livres de microorganismos, em ambos os meios, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Análise descritiva do crescimento bacteriano de mesófilos aeróbios (PCA) e coliformes totais (VRB) nos ejaculados *in natura*.

Avaliações	CDG A	CDG B	CDG C	CDG D
Nº de ejaculados	53	55	53	52
UFC mL ⁻¹ meio PCA	2985,7 ± 6576,7	2394,1 ± 6377,7	729,7 ± 4110,3	2433,0 ± 4704,0
UFC mL ⁻¹ meio VRB	1058,7 ± 3790,7	842,4 ± 4242,6	622 ± 4115,5	703,9 ± 3463,4
Ejaculados com ≤220 UFC mL ⁻¹ (PCA), % (n)	52,8 (28)	45,4 (25)	77,4 (41)	28,8 (15)
NHC (PCA), % (n)	7,5 (4)	3,6 (2)	37,7 (20)	1,9 (1)
NHC (VRB), % (n)	34,0 (18)	58,2 (32)	50,9 (27)	25 (13)

UFC – Unidade Formadora de Colônia; PCA – Plate Count Agar.

VRB – Violet Red Bile Lactose Agar; NHC – não houve crescimento.

Na Tabela 5 são apresentados os percentuais de ejaculados *in natura* com grau de contaminação de mesófilos aeróbios superior a 220 UFC mL⁻¹, de acordo com os fatores avaliados durante a coleta do ejaculado. Pêlos prepuciais compridos (>1,0 cm), a higiene da luva de coleta, líquido pingando pela mão do coletador para o interior do recipiente de coleta e a duração da coleta foram os quatro, dentre os 12 fatores avaliados, que levaram a um aumento no percentual de ejaculados com valor superior a 220 UFC mL⁻¹ de mesófilos aeróbios (P<0,05).

Esses resultados estão de acordo com o protocolo de contaminação mínima desenvolvido por Althouse et al. (2000) e com Weitze (2008) que recomendam manter os

pelos prepuciais aparados, utilizar uma luva limpa durante a coleta, além de fixar o pênis corretamente para que o líquido prepucial não escorra para dentro do copo de coleta e contamine o ejaculado. O líquido prepucial pode ser uma das maiores fontes de contaminação do sêmen durante a coleta (RILLO et al., 1998) e no presente experimento foi significativo tanto na contaminação por mesófilos aeróbios como por coliformes totais. Esta mesma contaminação também foi observada na variável duração da coleta (Tabela 6). Além destes, o outro fator que contribuiu na contaminação do ejaculado *in natura*, no caso de mesófilos aeróbios, foi a higiene da luva de coleta. As demais recomendações de Althouse et al. (2000) e Weitze (2008), como uso de sobre-luva para a higiene dos divertículos prepuciais e luvas de vinil para a coleta, descarte dos primeiros jatos e remoção do filtro antes do ejaculado entrar no laboratório, eram ações realizadas em todos os CDGs. Entretanto, esses trabalhos não apresentam um número de UFC mL⁻¹ que demonstre o grau de contaminação aceitável ou a influência de cada um desses fatores. Dias et al. (2000) demonstraram que quando a coleta foi realizada de forma higiênica, ou seja, os reprodutores foram lavados 2 dias antes da coleta, o esvaziamento dos divertículos prepuciais foi completo e realizado com sobre-luva, o óstio prepucial foi seco com papel toalha, os primeiros jatos foram descartados e o ejaculado foi direto para o recipiente de coleta, a média de contaminação destes ejaculados ficou em 490 UFC mL⁻¹. Cabe ressaltar, que ao retirar o único valor extremo, que ocorreu em função de uma falha neste protocolo de coleta, essa média passou para 217 UFC mL⁻¹. Já quando a coleta foi realizada com menos cuidados higiênicos, ou seja, os animais foram lavados uma semana antes da coleta, o esvaziamento dos divertículos prepuciais foi parcial e sem sobre-luva, o ejaculado não foi diretamente para o recipiente de coleta e os primeiros jatos não foram descartados, a média passou para 18862 UFC mL⁻¹. O emprego do protocolo de contaminação mínima, descrito por Dias et al. (2000) só que utilizando utensílios esterilizados, permitiu a coleta de ejaculados estéreis (BENNEMANN et al., 2000).

A fixação do pênis no CDG C era realizada entre o polegar e o indicador estendidos (Figura 1B), diferentemente dos demais (Figura 1A). Esse tipo de fixação impediu que o líquido que escorria pelo pênis pingasse para o interior do recipiente de coleta, diminuindo a contaminação do ejaculado, sendo que 37,7% dos ejaculados deste CDG não apresentaram crescimento de mesófilos aeróbios (Tabela 4). Além disso, 44% dos ejaculados onde o líquido pingava pela mão do coletador para o interior do recipiente de coleta, pertenciam ao grupo cuja duração da coleta foi superior a sete minutos (P<0,05). Ou seja, quanto maior a duração da coleta maior a possibilidade de pingar líquido que escorreu pela mão do coletador no ejaculado e, provavelmente, esta é a razão pela qual a duração da coleta superior a sete

minutos também foi significativa para a contaminação bacteriana por mesófilos aeróbios e coliformes totais (Tabela 6). Segundo Weitze (2008), coletando-se apenas a fração rica do ejaculado a contaminação pode ser reduzida, provavelmente porque dessa forma a chance de pingar líquido pela mão do coletador no interior do recipiente de coleta diminui.

Tabela 5: Percentual de amostras de sêmen *in natura* com grau de contaminação superior a 220 UFC mL⁻¹, em meio PCA, de acordo com os fatores avaliados durante a coleta do ejaculado.

Fatores avaliados	Característica	n	> 220 UFC mL ⁻¹ % (n)	P
Higiene do reprodutor	Limpo	145	45,5 (66)	0,16
	Sujo	68	55,9 (38)	
Higiene do óstio prepucial	Limpo	197	48,2 (95)	0,54
	Sujo	16	56,3 (09)	
Comprimento dos pêlos prepuciais	Curtos	160	45,0 (72) a	0,05
	Compridos	53	60,4 (32) b	
Higiene da luva de coleta	Limpa	198	46,5 (92) a	0,01
	Suja	15	80,0 (12) b	
Inclinação do recipiente de coleta	Inclinado	108	53,7 (58)	0,15
	Não inclinado	105	43,8 (46)	
Pingos pela mão do coletador	Dentro recipiente	50	74,0 (37)a	<0,0001
	Fora recipiente	163	41,1 (67)b	
Pênis escapou durante a coleta	Sim	60	56,7 (34)	0,15
	Não	153	45,8 (70)	
Tamanho do divertículo prepucial	Pequeno	111	46,8 (52)	0,55
	Grande	102	51,0 (52)	
Ordem da coleta	1 (1-4)	68	48,5 (33)	0,75
	2 (5-8)	72	45,8 (33)	
	3 (>8)	73	52,1 (38)	
Intervalo entre a entrada na baia e salto (min)	1 (0-2)	54	55,6 (30)	0,32
	2 (3-6)	112	49,1 (55)	
	3(>6)	47	40,4 (19)	
Duração da coleta (min)	1 (2-5)	78	42,3 (33)a	<0,02
	2 (6-7)	70	42,9 (30)a	
	3(>7)	65	63,1 (41)b	
Idade do reprodutor (meses)*	1 (8-18)	53	58,5 (31)	0,85
	2 (>18-30)	75	58,7 (44)	
	3 (>30)	32	53,1 (17)	

*n=160, pois não foram considerados os dados do CDG C, visto que 91% dos machos apresentavam menos de 18 meses de idade.

a,b na coluna, para cada variável, indicam diferença significativa.

A importância dos reprodutores estarem limpos no momento da coleta como auxílio na redução da contaminação do ejaculado tem sido relatada (DIAS et al., 2000; WEITZE, 2008). Entretanto, no presente estudo, tanto a higiene do reprodutor como a do óstio prepucial não influenciaram a contaminação do sêmen *in natura*, provavelmente, porque mesmo os reprodutores classificados como sujos apresentaram poucas áreas de sujidades. Em todos os CDGs eram utilizados manejos de higienização eficientes tanto dos animais como de seus alojamentos, permitindo que estes chegassem limpos à sala de coleta. Além disso, a higienização dos divertículos prepuciais foi realizada em todos os reprodutores de forma seca, pela pressão mecânica e limpeza posterior do óstio prepucial com papel toalha, permitindo que sujidades maiores próximas ao óstio prepucial fossem removidas, reduzindo assim a possível contaminação dos ejaculados.

A forma de fixação do pênis, a duração da coleta, a higiene prepucial, dos machos e da luva, e todos os demais fatores que envolvem a coleta, são dependentes da equipe que a realiza. Wolmmann (2002) observou diferenças entre coletadores em termos de número de espermatozoides no ejaculado e, possivelmente, com o número de UFCs não deve ser diferente. Tem sido relatado que o ser humano, além de ser uma fonte de contaminação, deve ter cuidado com suas ações, pois são importantes na transferência de contaminação de um local ao outro (ALTHOUSE e LU, 2005; ALTHOUSE, 2008). Bortolozzo e Wentz (2005) relatam que um protocolo de coleta com baixa contaminação deve levar em consideração falhas que são ocasionadas pelo ser humano como na higienização prepucial, na fixação do pênis, na higiene das luvas de coleta, na higiene da sala de coleta e ainda em uma possível inabilidade do coletador em realizar o procedimento. Neste estudo, muitas destas falhas puderam ser observadas, principalmente em relação à correta fixação do pênis, e certamente poderiam ser sanadas se os funcionários recebessem uma melhor orientação sobre as consequências de suas ações. Segundo Gall (2008a), o sucesso na higiene e biossegurança dos CDGs depende do desenvolvimento de uma cultura destas questões com os funcionários e essa só será possível pelo treinamento técnico adequado e envolvimento dos mesmos. Portanto, a seleção e o treinamento de uma equipe competente e dedicada deve ser uma prioridade. Outra possível forma de redução destas falhas é o uso de sistemas automatizados de coleta. Ao comparar um sistema automatizado com a coleta manual, não foram encontradas diferenças na duração da coleta, nas características do ejaculado e no número de UFC (TERLOUW et al., 2007).

Tabela 6: Número de UFC mL⁻¹ de mesófilos aeróbios e coliformes totais (CT) encontrados no ejaculado *in natura* de acordo com os fatores avaliados durante a coleta do ejaculado.

Fatores avaliados	Característica	n	Mesófilos (PCA)**	P	CT (VRB)**	P
Higiene do reprodutor	Limpo	145	2145,0 ± 5745,5	0,09	723,4 ± 3513,2	0,26
	Sujo	68	2118,9 ± 5255,3		986,8 ± 4631,0	
Higiene do óstio prepucial	Limpo	197	2057,9 ± 5544,9	0,36	840,7 ± 4038,7	0,64
	Sujo	16	3106,3 ± 6118,0		399,1 ± 1082,4	
Comprimento dos pêlos prepuciais	Curtos	160	1737,5 ± 5206,0	0,08	799,3 ± 4033,9	0,41
	Compridos	53	3341,7 ± 6492,8		832,4 ± 3481,2	
Higiene da luva de coleta	Limpa	198	2058,6 ± 5670,6 a	0,02	825,5 ± 4024,0	0,15
	Suja	15	3167,0 ± 4244,4 b		570,3 ± 1377,5	
Inclinação do recipiente de coleta	Inclinado	108	2210,5 ± 5998,2	0,27	956,9 ± 4321,2	0,89
	Não inclinado	105	2060,7 ± 5145,1		654,0 ± 3417,5	
Pingos pela mão do coletador	Dentro do recipiente	50	4608,5 ± 6975,0a	<0,0001	1245,9 ± 4558,6a	0,0002
	Fora do recipiente	163	1378,4 ± 4856,5b		673,1 ± 3673,9b	
Pênis escapou durante a coleta	Sim	60	2627,8 ± 6047,8	0,13	1475,4 ± 5815,2	0,06
	Não	153	1944,1 ± 5396,1		545,6 ± 2792,2	
Tamanho do divertículo prepucial	Pequeno	111	2022,6 ± 5320,9	0,21	680,0 ± 2879,8	0,34
	Grande	102	2260,8 ± 5875,4		946,3 ± 4773,5	
Ordem da coleta	1 (1-4)	68	2577,2 ± 6188,4	0,55	1103,5 ± 4285,7	0,20
	2 (5-8)	72	1694,4 ± 4590,7		596,3 ± 3575,7	
	3 (>8)	73	2162,5 ± 5909,5		740,2 ± 3854,3	
Intervalo entre a entrada na baía e salto (min)	1 (0-2)	54	2195,7 ± 6116,8	0,55	1383,0 ± 5324,2	0,76
	2 (3-6)	112	1941,0 ± 5045,1		490,5 ± 2960,0	
	3(>6)	47	2535,0 ± 6226,9		901,8 ± 3936,9	
Duração da coleta (min)	1 (2-5)	78	1360,7 ± 3540,1a	0,005	504,4 ± 2906,8a	<0,05
	2 (6-7)	70	1261,6 ± 4373,3ab		485,1 ± 3581,8a	
	3(>7)	65	4010,2 ± 7896,3b		1518,5 ± 5053,4b	
Idade do reprodutor (meses) *	1 (8-18)	53	1749,7 ± 4374,2	0,38	809,2 ± 3716,0	0,41
	2 (>18-<30)	75	3162,7 ± 6943,5		841,0 ± 3701,0	
	3 (>30)	32	2703,0 ± 5566,9		1033,8 ± 4404,9	

*n=160, pois não foram considerados os dados do CDG C, visto que 91% dos machos apresentavam menos de 18 meses de idade.

**Dados analisados após transformação em logaritmo.

a,b na coluna, para cada variável, indicam diferença significativa.

PCA – Plate Count Agar; VRB – Violet Red Bile Lactose Agar.

Ao avaliar o efeito de sete fatores (reprodutor sujo, óstio prepucial sujo, divertículo prepucial grande, pêlos prepuciais compridos, luva de coleta suja, pingos pela mão do coletador para dentro do recipiente de coleta e pênis escapou durante a coleta), isolados ou em associação, sobre o número de UFC mL⁻¹ no ejaculado *in natura*, observou-se um aumento significativo do número de amostras com contaminação superior a 220 UFC mL⁻¹, a partir da associação de 2 fatores, quando comparadas às amostras nas quais nenhum destes fatores esteve presente. Quando essa avaliação foi realizada separadamente para mesófilos aeróbios e coliformes totais, observa-se um aumento gradual da contaminação bacteriana, em ambos os tipos, à medida que aumenta o número de fatores associados. Entretanto, nos mesófilos

aeróbios a diferença foi assegurada a partir da associação de dois fatores e nos coliformes totais a diferença se estabeleceu apenas a partir da associação de três fatores (Tabela 7). A coleta do sêmen suíno apresenta vários passos descritos em diversos trabalhos (DIAS et al., 2000; ALTHOUSE et al., 2000; BORTOLOZZO e WENTZ, 2005; ALTHOUSE, 2008; WEITZE, 2008; GALL, 2008b), sendo que todos devem ser seguidos para a obtenção de um ejaculado com reduzido grau de contaminação. No presente trabalho, pode-se verificar que quanto maior o número de falhas na realização desses passos, maior a probabilidade do ejaculado apresentar um alto grau de contaminação.

Tabela 7: Efeito isolado de um fator ou da associação de fatores avaliados no momento da coleta e sua influência no número de UFC mL⁻¹ no ejaculado *in natura*.

Nº de Fatores	Amostras >220 UFC mL ⁻¹	UFC mL ⁻¹	
		Mesófilos aeróbios (PCA)*	CT (VRB)*
0	10/39 (25,6%) a	1004,2 ± 4791,2 a	316,0 ± 1681,4 a
1	27/62 (43,6%) ab	1669,8 ± 5329,5 ab	671,3 ± 3426,7 ab
2	31/56 (55,4%) bc	2137,9 ± 5362,9 b	870,3 ± 4151,5 ab
3	21/37 (56,8%) bc	2381,9 ± 5520,7 bc	1163,0 ± 4946,6 b
4-5	15/19 (79,0%) c	5503,7 ± 7596,9 c	1384,0 ± 5493,4 b

*Dados analisados após transformação em logaritmo.

a,b,c na coluna, indicam diferença significativa (P<0,05).

CT – Coliformes Totais; PCA – Plate Count Agar; VRB – Violet Red Bile Lactose Agar.

Foi considerada a ocorrência de 7 possíveis fatores de risco para a contaminação do ejaculado: reprodutor sujo, óstio prepucial sujo, divertículo prepucial grande, pêlos prepuciais compridos, luva de coleta suja, pingos pela mão do coletador para dentro do recipiente de coleta e pênis escapou durante a coleta.

Na avaliação das doses inseminantes foi necessário levar em consideração o grau de contaminação no diluente, o qual se apresentou inferior a 330 UFC mL⁻¹ nos CDGs A e D e superior a 14000 UFC mL⁻¹ nos CDGs B e C. Ao classificar as DIs conforme o grau de contaminação do diluente foram observadas diferenças na motilidade, no pH e na morfologia acrossomal das DIs, tanto entre os grupos em alguns momentos de análise, como no mesmo grupo ao longo das 168 horas de armazenamento (Tabela 8).

A motilidade total e a progressiva apresentaram diferença significativa a partir das 108 horas, entre os grupos com maior e menor contaminação do diluente. Althouse et al. (2000) relatam que os efeitos da contaminação bacteriana nas doses inseminantes não são observadas imediatamente, mas necessitam de 36 a 48 horas de armazenamento para que a aglutinação e a redução da motilidade sejam evidentes. Esse tempo é necessário, pois estas alterações são dependentes da aderência bacteriana ao espermatozóide (MONGA e ROBERTS, 1994; DIEMER et al., 1996).

Houve diferença no pH durante todo o período de armazenamento, provavelmente por ser uma consequência da liberação de substâncias do metabolismo bacteriano para o meio, que ocorre desde o momento da contaminação e será dependente do tipo de tampão utilizado no diluente. Althouse et al. (2000) encontraram variações de pH de 5,7 a 6,4 em 93% das amostras contaminadas com diferentes gêneros bacterianos, o que comprova que alguns gêneros bacterianos produzem substâncias que acidificam o meio enquanto outros parecem não produzi-las ou as produzem em menor quantidade.

O percentual de alterações acrossomais diferiu significativamente nas 168 horas de armazenamento de acordo com o grau de contaminação do diluente. Ao se ligarem nos espermatozoides as bactérias provocam lesões ultraestruturais na membrana plasmática (DIEMER et al., 1996), sendo que a integridade acrossomal é comprometida na maioria dos espermatozoides de amostras aglutinadas (KUSTER e ALTHOUSE, 1997). Bennemann et al. (2000), trabalhando com *S. aureus* e *E. coli* em diferentes concentrações na dose inseminante suína, não encontraram alterações de acrossoma até as 48 horas de armazenamento, entretanto após este período a *E. coli*, na concentração de 5×10^7 UFC mL⁻¹, afetou de forma significativa o percentual de acrossomas alterados.

Aparentemente, 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.

Ao longo do período de armazenamento, a motilidade total de ambos os grupos classificados conforme a contaminação do diluente foi menor nas 108 e 168 h em comparação à motilidade nas 24 h. Entretanto, a motilidade progressiva foi menor a partir das 72 h no grupo com menor contaminação e diferiu entre todos os momentos no grupo com maior contaminação do diluente. O pH permaneceu estável ao longo das 168 h de armazenamento no grupo com diluente menos contaminado, mas reduziu de 7,2 para 6,0, entre as 24 e 168 horas de armazenamento, no grupo com diluente mais contaminado. Possivelmente, essa variação de pH auxiliou na redução drástica de motilidade observada no grupo com alta contaminação bacteriana do diluente.

Tabela 8: Avaliações de acrossoma, motilidade total e progressiva e pH ao longo do tempo de armazenamento de acordo com o grau de contaminação bacteriana do diluente.

Variáveis	UFC mL ⁻¹	n	24 h	72 h	108 h	168 h
Acrossomas defeituosos (%)	≤330	105	9,8 ± 6,5 A	-	-	22,3 ± 17,6 A
	≥14000	108	9,9 ± 7,0 A	-	-	48,3 ± 22,6 B
Motilidade total (%)	≤330	105	85,3 ± 8,3 Aa	81,9 ± 11,1 Aab	78,4 ± 14,4 Ab	70,5 ± 21,0 Ac
	≥14000	108	86,2 ± 7,7 Aa	84,7 ± 7,6 Aa	64,6 ± 20,8 Bb*	21,8 ± 9,2 Bc*
Motilidade progressiva (%)	≤330	105	68,0 ± 16,6 Aa	61,1 ± 18,1 Ab	58,1 ± 21,2 Ab	46,5 ± 23,8 Ac
	≥14000	108	72,9 ± 15,6 Aa	61,5 ± 17,3 Ab	33,3 ± 20,4 Bc*	7,1 ± 4,8 Bd*
pH	≤330	105	7,3 ± 0,2 Aa	7,3 ± 0,2 Aa	7,3 ± 0,1 Aa	7,3 ± 0,1 Aa
	≥14000	108	7,2 ± 0,1 Ba	7,1 ± 0,2 Bb	6,7 ± 0,3 Bc	6,0 ± 0,3 Bd

A,B na coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

a,b,c,d na linha indicam diferença significativa (P<0,05).

*n=77, pois foram excluídos os ejaculados nos quais a motilidade não foi avaliada pelo Sperm Vision™.

O alto grau de contaminação do diluente nos CDGs B e C não ocorreu em função da água contaminada, como relatam Ness et al. (2007), mas devido ao local de preparação do mesmo. Esses CDGs utilizavam barriletes de PVC com sistema de aquecimento, sendo higienizados após sua utilização. Entretanto, como esses tanques apresentam vários locais de difícil acesso para limpeza, ocorria a formação e permanência de biofilme no interior do recipiente, permitindo o crescimento e multiplicação destas bactérias, contaminando a dose inseminante. Silva et al. (2006) relatam a dificuldade de limpeza de barriletes de PVC utilizados para o armazenamento de água, propiciando a formação de biofilmes e a contaminação da água. Os microorganismos, quando em biofilmes, tornam-se mais resistentes, tanto à ação de antimicrobianos como de desinfetantes, do que células isoladas. Althouse et al. (2000) recomendam a utilização de detergentes que não deixam resíduos para a higienização de materiais recicláveis no interior do laboratório, entretanto Silva et al. (2006) descrevem que quando existe a presença de biofilmes, os métodos convencionais de desinfecção não são suficientes, sendo necessário o uso de desinfetantes em maior concentração, que geralmente deixam resíduos na água. Esses resíduos podem ser tóxicos aos espermatozoides. Nos outros CDGs, eram utilizados tanques de aço inoxidável contendo um saco plástico no seu interior que era descartado no final de cada dia, impedindo a formação de biofilme.

Althouse (2008) relata que o primeiro passo para reduzir a contaminação bacteriana das doses inseminantes, é melhorar a higiene do reprodutor e da coleta. Concordando com este autor, Weitze (2008) descreve que a única forma de prevenir a contaminação do ejaculado e, portanto, das doses inseminantes, é manter o ambiente de trabalho limpo.

Bennemann (1998) demonstrou que o antimicrobiano é capaz de reduzir a contaminação, mas não é capaz de eliminá-la. Em seu estudo, 99,08% das amostras de sêmen *in natura* apresentaram contaminação, quando doses inseminantes foram produzidas sem antimicrobiano, 97,72% delas continuaram contaminadas, sendo que esse percentual baixou para 71,27% quando o antimicrobiano foi utilizado. Além disso, ocorreram aumentos do número de UFCs ao longo das 96 horas de avaliação de doses inseminantes com e sem antimicrobiano, indicando que as bactérias são capazes de se multiplicar mesmo na presença do antimicrobiano. Ao manter um ambiente de processamento com baixa contaminação bacteriana, ou seja, controle da água, do diluente e da linha de processamento das DIs, a fonte de contaminação será o ejaculado, como o que ocorreu nas centrais A e D. Desta forma pôde-se avaliar a influência desta contaminação sobre as doses inseminantes (Tabela 9). Foi confirmada a importância da higiene no momento da coleta, visto que os ejaculados com baixa contaminação (≤ 220 UFC mL⁻¹) produziram um menor percentual de doses inseminantes com contaminação superior a 10 UFC mL⁻¹, nas 48 h, do que as provenientes de ejaculados com maior grau de contaminação. Entretanto, o crescimento bacteriano com 168 horas de armazenamento não foi influenciado pelo grau de contaminação do ejaculado, ou seja, com a multiplicação bacteriana as doses inseminantes que apresentavam baixa contaminação inicial, passaram a apresentar uma contaminação tão elevada quanto as que apresentavam alta contaminação inicial.

Quando a motilidade destas DIs foi comparada, surpreendentemente observou-se um aumento significativo nas amostras com maior grau de contaminação a partir de 72 h para a motilidade total e de 168 h na motilidade progressiva. Em vários trabalhos (KUSTER e ALTHOUSE, 1997; ALTHOUSE et al., 2000; ALTHOUSE e LU, 2005; ALTHOUSE, 2008; GALL, 2008b; GOLDBERG et al., 2008 e ALTHOUSE et al., 2008) são descritas as alterações que a contaminação bacteriana é capaz de ocasionar nas doses inseminantes durante o período de armazenamento, entre elas o aumento das aglutinações, a queda da motilidade, acidificação do pH e alterações de acrossoma. Entretanto, para que essas alterações ocorram é necessária a presença de uma relação 1:1 entre espermatozóides e bactérias (DIEMER et al., 1996; ALTHOUSE et al., 2000). Como a relação espermatozóides:bactéria máxima alcançada nos CDGs A e D foi de 1450:1 nas 48 horas e 370:1 nas 168 horas, essas alterações não puderam ser observadas. Provavelmente, o aumento da motilidade observado nas amostras mais contaminadas deve-se a outro fator que não foi possível identificar.

Tabela 9: Características do ejaculado e das doses inseminantes (DIs) de acordo com o crescimento bacteriano em meio PCA do ejaculado *in natura* nos 2 CDGs com contaminação do diluente inferior a 330 UFC mL⁻¹.

Variáveis	≤220 UFC mL ⁻¹ (n=43)	>220 UFC mL ⁻¹ (n=62)
UFC mL ⁻¹ no ejaculado (PCA)*	71,4 ± 66,7a	4543,4 ± 6868,4b
UFC mL ⁻¹ no ejaculado (VRB)*	8,6 ± 15,5a	1489,4 ± 4628,1b
UFC mL ⁻¹ na DI 48 h (PCA)*	99,1 ± 228,5a	421,5 ± 2269,2b
UFC mL ⁻¹ na DI 48 h (VRB)*	0,0 ± 0,0**	110,7 ± 613,6**
DIs c/>10 UFC mL ⁻¹ 48 h, % (n)	32,6 (14)a	61,3 (38)b
DIs c/>100 UFC mL ⁻¹ 168 h, % (n)	58,1 (25)a	47,5 (29)a
	<i>in natura</i>	
	24 h	86,9 ± 2,4a
	24 h	83,8 ± 8,7a
Motilidade total (%)	72 h	87,4 ± 2,7a
	108 h	86,4 ± 7,9a
	168 h	83,9 ± 8,5b
	24 h	81,4 ± 10,2b
Motilidade progressiva (%)	72 h	74,7 ± 19,8b
	108 h	65,4 ± 18,5a
	168 h	57,7 ± 20,7a
	24 h	63,5 ± 15,8a
	72 h	61,4 ± 17,5a
	108 h	51,1 ± 22,3b
	168 h	39,9 ± 24,7a
	24 h	7,4 ± 0,2a
	72 h	7,3 ± 0,2a
pH	108 h	7,4 ± 0,3a
	168 h	7,3 ± 0,1a
		7,3 ± 0,1a

*Dados analisados após transformação em logaritmo.

**sem comparação, pois não houve crescimento em 48 horas.

a,b na linha indicam diferença significativa (P<0,05).

Aparentemente, para atingir a relação espermatozóide:bactéria de 1:1 capaz de provocar modificações na DI, é necessário existir um alto grau de contaminação na água ou no diluente conforme citado em alguns trabalhos (KUSTER e ALTHOUSE, 1997; NESS et al., 2007; GOLDBERG et al., 2008). No presente experimento, o CDG que obteve a maior média de UFC mL⁻¹ no ejaculado *in natura* apresentou uma relação superior a 100000 espermatozóides por UFC. Além disso, quando as bactérias são introduzidas em um novo ambiente, que ocorre na diluição do ejaculado, elas necessitam de um tempo de recuperação e de adaptação para iniciar a metabolizar o substrato presente no meio (ALTHOUSE, 2008) podendo apresentar dificuldades para se adaptar e crescer (BENNEMANN et al., 2000) e, se forem sensíveis aos antimicrobianos do diluente, provavelmente, ocorrerá redução da contaminação. Entretanto, se a fonte de contaminação for o próprio diluente, além da possível resistência ao antimicrobiano, as bactérias já estarão totalmente adaptadas ao meio e não

encontrarão dificuldades para se multiplicar cada vez mais em um ambiente com a temperatura adequada e com alta quantidade de substrato.

Se for utilizada a relação espermatozóide:bactéria de 1:1 como parâmetro de avaliação higiênica, os padrões gerais de higiene na coleta foram satisfatórios, uma vez que nenhum ejaculado chegou perto desta relação. Entretanto, ao avaliar o que ocorreu com o CDG C, no qual a média do grau de contaminação por mesófilos aeróbios dos ejaculados *in natura* foi de 729,7 UFC mL⁻¹, enquanto os demais apresentaram valores superiores a 2000 UFC mL⁻¹, e as DIs produzidas apresentaram uma contaminação superior a 30000 UFC mL⁻¹ em função do diluente contaminado, é possível observar a importância de um controle higiênico permanente com o processamento do sêmen. Portanto, o grau de contaminação do ejaculado *in natura* parece ter menos efeito na qualidade da DI do que situações em que a origem da contaminação é proveniente de falhas higiênicas na linha de processamento das mesmas, como foi o caso da contaminação do diluente.

CONCLUSÕES

Pêlos prepuciais compridos (>1,0 cm), a luva de coleta suja, líquido pingando pela mão do coletador para o interior do recipiente de coleta e a coleta com duração superior a sete minutos foram os fatores que aumentaram o grau de contaminação do ejaculado. A associação de duas ou mais falhas no procedimento de coleta aumentam o grau de contaminação do sêmen *in natura*. Ejaculados com maior contaminação (>220 UFC mL⁻¹) resultam em maior percentual de doses inseminantes com contaminação superior a 10 UFC mL⁻¹, nas 48 h de armazenamento, embora o grau de contaminação da dose possa não ser suficiente para afetar negativamente a motilidade espermática. Um maior grau de contaminação do diluente resulta em redução da qualidade das doses inseminantes (motilidade, motilidade progressiva, acrossomas normais) ao longo do armazenamento *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALTHOUSE, G.C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 374-378, 2008.
- ALTHOUSE, G.C.; KUSTER, C.E.; CLARCK, S.G.; WEISIGER, R.M. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 53, p. 1167-1176, 2000.
- ALTHOUSE, G.C.; LU, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 573-584, 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.

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.

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.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. In: SIMPOSIO INTERNAZIONALE DI ZOOTECCIA. 7., Milan, 1972. **Anais...** 1973, p. 125-139.

BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I. **Suinocultura em ação 2 – Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada**. Porto Alegre: Pallotti, 2005. 183p.

DIAS, C.P.; CASTAGNA, C.D.; REIS, G.R.; SIMONETTI, R.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; CARDOSO, M. Grau de contaminação bacteriana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização e coleta. **Arquivos da faculdade de veterinária da UFRGS**, v. 28, p. 32-40, 2000.

DIEMER, T.; WEIDNER, W.; MICHELMANN, H.W.; SCHIEFER, H.G.; ROVAN, E.; MAYER, F. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. **International Journal of Andrology**, v. 19, p. 271-277, 1996.

GALL, T. Boar stud employee management. In: MIDWEST BOAR STUD MANAGERS CONFERENCE, 2008a, Missouri. **Proceedings...** Missouri, 2008a.

GALL, T. Hygiene and Contamination in the Lab. In: MIDWEST BOAR STUD MANAGERS CONFERENCE, 2008b, Missouri. **Proceedings...** Missouri, 2008b.

GOLDBERG, A.M.G.; ARGENTI, L.E.; FACCIN, J.E.G.; PELLEGRINI, D.C.P.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; CARDOSO, M. Contaminação bacteriana da água em centro de difusão genética e suas conseqüências na dose inseminante. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 4., 2008, Curitiba. **Anais...** São Paulo: Animalworld, 2008, p. 229 – 231.

HANCOCK, J.L.; G.L.R. HOWELL. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v. 71, p. 664, 1959.

KUSTER, C.; ALTHOUSE, G.C. Sperm Agglutination of extended semen caused by gentamicin-resistant bacteria. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 1997, Quebec. **Proceedings...** Quebec: 1997, p.293-295.

MONGA, M.; ROBERTS, J.A. Spermagglutination by Bacteria: Receptor-Specific Interactions. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 2, p.151-156, 1994.

NESS, A.; BORST, L.; MADDOX, C.; PAYNE, B.; CLARK, S. Identification of water system biofilm bacteria and the negative effects on reproductive traits. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS, 2007, Florida. **Proceedings...** Florida: 2007, p. 47.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrossoma morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v. 34, n. 2, p. 278-283, 1972.

RILLO, M.S.; SHOKOUHI, V.; GARCÍA BOIX, E.; HERNÁNDEZ-GIL, R.; ROMERO, L. Contamination of semen doses and its possible relationship with the bacterial flora of the prepuce. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 15., 1998, England. **Proceedings...** England, 1998, p. 60.

SAS Institute INC. **SAS User's Guide: Statistical Analysis System**. Release 8.0, Cary, North Carolina, U.S.A., 2000.

SILVA, C.H.P.M.; LINS, A.P.; CRUZ, C.S.O.; GREENBERG, W.; STEWART, T. Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 4, p. 243-253, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Contagem total de microorganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicotrófilos e bolores e leveduras em placas. In:_____. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo:Varela, 1997. cap. 3, p. 20-29.

SIQUEIRA R.S. Enterobactérias. In: **Manual de microbiologia em alimentos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, MAARA e CTAA, 1995. cap. 10, p. 73-116.

TERLOUW, S.; SIMMET, C.; SCHLIMGEN, T.; SCHENK, J.; JAMES, E.; GUNDERSON, G.; DIDION, B.; DOBRINSKY, J. Comparison of AutoMate™ and the gloved-hand method for boar semen collection. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS. 2007, Florida. **Proceedings...** Florida: 2007, p. 315-318.

WABERSKI, D.; PETRUNKINA, A.M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Can external quality improve pig AI efficiency? **Theriogenology**, v. 70, p. 1346-1351, 2008.

WEITZE, K.F. Hygiene tips for good semen quality. **Pig International**, v. 38, n. 8, p. 14-16, 2008.

WOLLMMANN, E.B. **Variação nos parâmetros seminais em suínos destinados à inseminação artificial de acordo com a idade, época do ano, alojamento e coletador**. 2002. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coleta de um ejaculado com baixa contaminação bacteriana deve seguir um protocolo de contaminação mínima, procurando evitar, principalmente, o contato entre o líquido que escorre pela luva e o ejaculado. Entretanto, a obtenção de ejaculados com reduzido número de UFC, não é garantia de que as doses inseminantes estarão livres de agentes contaminantes, capazes de reduzir sua viabilidade ao longo do período de armazenamento e gerar possíveis problemas reprodutivos. A produção de doses inseminantes de alta qualidade microbiológica necessita de um cuidado rigoroso não apenas com a higiene da coleta, mas, principalmente, com o que diz respeito ao seu processamento. A contaminação da água pode ser proveniente de sua origem, dos sistemas de tratamento ou ainda dos locais de armazenamento. Já o diluente pode ser contaminado tanto nos locais de armazenamento como nos de preparação. A contaminação destes locais deve ser considerada mais importante que a da coleta, pois atuará em todas as DIs processadas e não apenas nas DIs produzidas por um ejaculado contaminado. Além disso, concentrações bacterianas capazes de produzir alterações de aglutinação, motilidade, pH e acrossoma, parecem ocorrer com mais facilidade quando a água ou o diluente encontram-se contaminados. Portanto, a produção de doses inseminantes com baixa contaminação, somente será possível com um rigoroso controle higiênico na linha de processamento, principalmente no que diz respeito à água e diluente, associados a um protocolo de contaminação mínima durante a coleta.

REFERÊNCIAS

- ALTHOUSE, G.C.; KUSTER, C.E.; CLARCK, S.G.; WEISIGER, R.M. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 53, p. 1167-1176, 2000.
- ALTHOUSE, G.C.; LU, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 573-584, 2005.
- BAILEY, J.L. Sperm Quality Tests: What are other species using? In: MIDWEST BOAR STUD MANAGERS CONFERENCE, 2008, Missouri. **Proceedings**. Missouri, 2008
- BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I. **Suinocultura em ação 2 – Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada**. Porto Alegre: Pallotti, 2005. 183p.
- BORTOLOZZO, F.P.; GOLDBERG, A.M.G.; WENTZ, I. Até onde é possível reduzir o número de espermatozoides na inseminação artificial intra-cervical em suínos sem comprometer a fertilidade? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36 (Supl 1), p. 17-26, 2008.
- COLENBRANDER, B.; FEITSMA, H.; GROOTEN, H.J. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement 48, p. 207-215, 1993.
- DIAS, C.P.; CASTAGNA, C.D.; REIS, G.R.; SIMONETTI, R.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; CARDOSO, M. Grau de contaminação bacteriana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização e coleta. **Arquivos da faculdade de veterinária da UFRGS**, v. 28, p. 32-40, 2000.
- FLOWERS, W.L. Water quality considerations for AI. **Pigs on Parade – Swine AI news bulletin from IMV**, v. 4, 1998.
- FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S.; DIXON, W.T. Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1324-1336, 2008.
- GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology** 63, 431-444, 2005.
- HAFEZ, E.S.E. Semen evaluation. In _____. **Reproduction in farm animals**. 6.ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. Cap. 19, p. 405-423.
- HANCOCK, J.L.; G.L.R. HOWELL. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v. 71, p. 664-665, 1959.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62. p. 143-172, 2000.
- KING, G.J.; MACPHERSON, J.W. A comparison of two methods for boar semen collection. **Journal of Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 563-565, 1973.
- KUSTER, C.; ALTHOUSE, G.C. Sperm Agglutination of extended semen caused by gentamicin-resistant bacteria. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 1997, Quebec. **Proceedings**. Quebec: 1997, p.293-295.
- LEVIS, D.G. Hazard analysis of critical control points in an on-farm artificial insemination laboratory. In: GEORGE A. YOUNG SWINE CONFERENCE, 1997, p. 58-74.

- LEVIS, D.G. Liquid boar semen production: Current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4, 1999, Maryland. **Proceedings**. Lawrence:Allen Press, p. 121-128. 2000.
- MARCHETTI, A.N. **Qualidade da água utilizada em laboratórios de centrais de inseminação artificial**. Curso de inseminação Artificial em suínos – Minitub e UFRGS. 2008.
- MONGA, M.; ROBERTS, J.A. Spermagglutination by Bacteria: Receptor-Specific Interactions. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 2, p.151-156, 1994.
- NESS, A.; BORST, L.; MADDOX, C.; PAYNE, B.; CLARK, S. Identification of water system biofilm bacteria and the negative effects on reproductive traits. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS, 2007, Florida. **Proceedings**. Florida: 2007, p. 47.
- RUIZ-SÁNCHEZ, A.L.; O'DONOGHUE,R.; NOVAK, S.; DYCK, M.K.; COSGROVE,J.R.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. **Theriogenology**, v. 66, p. 736-748, 2006.
- SCHEID, I.R.; WENTZ, I.; KICH, J.D. Toxicidade das luvas de coleta ao sêmen suíno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 7., 1995. Blumenau – SC. **Anais**. Concórdia EMBRAPA – CNPSA. P. 148. 1995.
- SILVA, C.H.P.M.; LINS, A.P.; CRUZ, C.S.O.; GREENBERG, W.; STEWART, T. Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 243-253, 2006.
- SPERM VISION® 3.5 USER'S MANUAL, 2006.
- Disponível em:< <http://www.minitube.com/Files%5CSpermVision35manuala.pdf>> Acesso em: 24 mar. 2008.
- TEJERINA, F.; BURANAAMNUAY, K.; SARAVIA, F.; WALLGREEN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assesment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1129-1138 2008.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia ambiental. In _____. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. cap. 27, p. 714-741.
- WEITZE, K.F. Transmissible diseases by artificial insemination in pigs. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, 15., 1996, Campo Grande. **Abstracts**. Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996. p. 1-7.
- WENTZ, I; VARGAS, A.J.V; BORTOLOZZO, F.P.; CASTAGNA, C.D. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego dessa biotécnica. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO DE SUÍNOS, 3., 2000, Flores da Cunha.