

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DURANTE O PROCESSAMENTO DO SÊMEN BOVINO

BETINA CAPELETTI¹; KARINA LEMOS GOULARTE², FLÁVIA VOLOSKI³, JOSIARA F. MENDES REDÜ⁴, KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS⁵; THOMAZ LUCIA JR.⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – betina.capeletti@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kgoularte@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fla_voloski@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – josiara.mds@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – tluciajr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é uma biotécnica que vem sendo utilizada de forma crescente na reprodução de animais domésticos, e permite a multiplicação do material genético do macho em larga escala (ASBIA, 2010). Apesar de auxiliar para que haja um melhor aproveitamento deste material, o processo de criopreservação do sêmen apresenta alguns limitantes, como danos à membrana celular e ao DNA, causados por fatores tais como os referentes a características químicas do diluente e formação de cristais de gelo no interior da célula (HUSSAIN, et al., 2011).

A presença de bactérias no sêmen está relacionada à diminuição da viabilidade espermática, em função de alterações do pH do meio, lesões diretas às células e por consumo de substrato pelos microrganismos. Isto foi relatado por MARTÍN, et al. (2015), que associaram alterações nas células espermáticas com a capacidade de redução da glicose por algumas espécies de *Mycoplasma*, inoculadas experimentalmente em ejaculados de caprinos. MARÍN, et al. (2011) encontraram relação diretamente proporcional entre concentrações elevadas de bactérias e a fragmentação do DNA espermático em ejaculados de touros.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina como requisito sanitário para a produção e comercialização de sêmen bovino congelado, a adição de antibióticos ao material. Houve o desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados, diminuindo a eficácia dos antimicrobianos no combate destes microrganismos (MADEIRA, et al., 2014). Este trabalho apresentou como objetivo isolar e identificar bactérias contaminantes em diferentes pontos do processamento do sêmen bovino, de forma a detectar as etapas críticas para a contaminação.

2. METODOLOGIA

O processo de coleta e congelamento do sêmen bovino foi acompanhado em um Centro de Coleta e Processamento de Sêmen localizado no Triângulo Mineiro – MG. Foram coletadas amostras em pontos considerados contaminantes em potencial ou críticos para a qualidade do produto final, como: vagina artificial (VA), sêmen puro (SP), diluente pré-diluição (DP), fração A do diluente de congelamento do sêmen (DA), fração B do diluente de congelamento do sêmen (DB), sêmen resfriado (SR), tubo flexível da máquina de envase (TF), sêmen envasado (SE) e sêmen congelado (SC).

As amostras da VA e do TF foram coletadas através de lavagem com 10 ml de água peptonada tamponada autoclavada. As avaliações das cargas microbianas no

SP, SR, SE, DP, DA e DB foram realizadas com as amostras puras ou após diluições destas em água peptonada tamponada autoclavada, quando necessário.

As amostras foram semeadas pelo método *pour plate* em ágar para contagem (PCA) e mantidas à 37°C por 72 horas (OIE, 2001). Após o período de incubação, as colônias com características morfológicas diferentes (cor e aspecto) foram avaliadas através da coloração de gram e congeladas em BHI com 20% de glicerol. Os inóculos foram transportados até a Universidade Federal de Pelotas, onde foram descongelados, reativados em BHI e avaliados quanto a coloração de gram para detectar alguma possível contaminação. Na sequência, as amostras foram identificadas quanto a espécie através do Vitek®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento de uma mesma espécie de bactéria em mais de um ponto de coleta mostra a provável permanência desta durante as etapas de produção das doses de sêmen para comercialização. Muitas das bactérias identificadas, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*, fazem parte da microbiota do animal ou podem estar presentes no ambiente (GENOVEZ, et al., 2010), sendo contaminantes em potencial.

É possível supor em qual fase do processamento ocorreu a contaminação, levando em conta em qual momento do processo foi isolado cada microrganismo. A maioria das bactérias encontradas na vagina artificial, como *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, também estavam presentes no sêmen envasado (Tabela 1), o que mostra que estes microrganismos podem manter-se viáveis durante o processamento do ejaculado.

A ausência de um microrganismo em um ponto inicial do processamento, como no sêmen puro por exemplo, e a sua presença no material final demonstra a contaminação durante o procedimento de diluição e envase do ejaculado. Algumas espécies foram isoladas apenas do sêmen envasado, como no caso de *Serratia* e *Aerococcus viridans* (Tabela 1), o que pode ser um indício de contaminação nos momentos finais do processo. Estes fatos sugerem que a ocorrência de um microrganismo pode resultar de um manuseio inadequado dos materiais utilizados na coleta, processamento e envase do sêmen.

Amostras de sêmen contaminadas com bactérias podem sofrer danos à membrana e ao DNA, bem como ter seus parâmetros de motilidade e vigor alterados (MORETTI, et al., 2008). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconiza um limite máximo de 5000 UFC/ml de sêmen processado. MADEIRA, et al. (2014) encontraram redução no número de unidades formadoras de colônia quando a coleta de sêmen em carneiros foi submetida a condições de higiene satisfatórias.

A aplicação de um programa de análise de perigos e pontos críticos de controle possibilita a implementação de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional e manuais de Boas Práticas de Processamento. Isso permite a padronização dos procedimentos realizados nas centrais de coleta e, fazendo-os de forma higiênica e sanitária, é possível reduzir as unidades formadoras de colônia no produto final (GOULARTE, 2014).

Sendo assim, tomando conhecimento das espécies de bactérias e dos locais onde estas estão contaminando o sêmen, é possível aplicar métodos viáveis de controle dos agentes, através da padronização do processo e estabelecimento de procedimentos de higienização dos materiais utilizados e dos manipuladores.

Tabela 1: Espécies de bactérias identificadas e sua frequência nos diferentes pontos de coleta.

Agente	Origem/Frequência dos isolados								
	VA	SP	DP	DA	DB	SR	TF	SE	SC
<i>Serratia</i>								1	
<i>Yersinia</i>			1					3	
<i>Escherichia coli</i>	2	4				2	1	3	
<i>Enterobacter</i>	2	3				1		1	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp cremoris	1	1							
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2	1					1	
<i>Staphylococcus hominis</i> ssp hominis		1							
<i>Enterococcus faecium</i>		1				1	1	3	
<i>Staphylococcus warneri</i>						1	1	4	
<i>Rhizobium radiobacter</i>						1		1	
<i>Staphylococcus sciuri</i>							1		
<i>Staphylococcus capitis</i>							1		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp dextranicum	1								
<i>Sphigomonas paucimobilis</i>	1								
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1			1	1	2	2	
<i>Pseudomonas luteola</i>								1	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1							
<i>Staphylococcus intermedius</i>		2					1		
<i>Aeromonas salmonicida</i>						1			
<i>Enterococcus gallinarum</i>						2			
<i>Aerococcus viridans</i>								1	

VA: vagina artificial; SP: sêmen puro; DP: diluente pré-diluição; DA: fração A do diluente de congelamento; DB: fração B do diluente de congelamento; SR: sêmen resfriado; TF: tubo flexível da máquina de envase; SE: sêmen envasado; SC: sêmen congelado.

4. CONCLUSÕES

A existência de bactérias nos materiais de coleta e durante o processamento e envase do sêmen demonstra que há necessidade de melhorar a higienização e a manipulação dos equipamentos e utensílios. O principal responsável pela contaminação é o manipulador e, sendo assim, é importante que se aplique métodos de educação sanitária, de forma a reduzir e evitar os impactos do manejo inadequado e da contaminação bacteriana nas amostras de sêmen.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Instrução Normativa nº 48, de 17 de junho de 2003. Somente poderá ser distribuído no Brasil o sêmen bovino ou bubalino coletado em centros de coleta e processamento de sêmen - CCPS, registrados no Ministério da agricultura pecuária e Abastecimento - MAPA, que cumprem os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no país. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária.

GENOVEZ, M. E., PINHEIRO, E. S., CARVALHO, A. F. **Agentes microbianos associados ao trato genital de touros**. Secretaria de Agricultura e Abastecimento – Instituto Biológico, São Paulo, 22 out. 2010. Comunicados Técnicos. Acessado em 26 out. 2016. Disponível em: http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=143.

GOULARTE, K. L. **Sistema de gestão da qualidade para Centros de Coleta e Processamento de Sêmen bovino: elaboração, implantação e impacto**. 2014. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

HUSSAIN, S. A., LESSARD, C., ANZAR, M. Quantification of damage at different stages of cryopreservation of endangered North American bison (*Bison bison*) semen and the effects of extender and freeze rate on the post-thaw sperm quality. **Animal Reproduction Science**, Saskatchewan, v. 129, p. 171 – 179, 2011.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Manual de Inseminação Artificial em Bovinos**. Uberaba, 2010.

MADEIRA, E. M., GOULARTE, K. L., PRADIEÉ, J., MONDADORI, R. G., LUCIA, T. Jr., BIANCHI, IV., VIEIRA, A. D., LEITE, F. P. L. The Use of Antibiotics in Cryopreservation of Ram Sperm. **International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports**, vol. 2014, 2014.

MARÍN, C. G., ROY, R., FERNANDEZ, C. L., DIEZ, B., CARABAÑO, M. J., FERNANDEZ, J. L., KJELLAND, M. E., MORENO, J. F., GOSALVES, J. Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. **Animal Reproduction Science**, Madrid, v. 123, p. 139 – 148, 2011.

MARTÍN, A. G., UC, N., VIEIRA, L. A., GADEA, J., CADENAS, J., SÁNCHEZ, A., FE, C. D. L. Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality. **Theriogenology**, Murcia, v. 83, p. 911-919, 2015.

MORETTI, E., CAPITANI, S., FIGURA, N., PAMMOLLI, A., FEDERICO, M.G., GIANNERINI, V., COLLODEL, G. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Siena, v. 26, p. 47–56, 2009.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Toma y Tratamiento del semen. **Código Zoosanitário Internacional**, França, v. 10, p. 315 – 323, 2001.