

Mário Mansour Pinheiro Bartha

**Análise Bacteriológica de Sêmen de Caititus (*Tayassu tajacu*)
Criados em Cativeiro**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador Profa. Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias

UNIVERSIDADE FEDERAL
RURAL DA AMAZÔNIA
BIBLIOTECA

Belém
2009

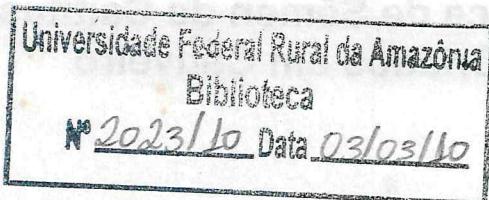
Biblioteca



20230029

Dissertação
636.4
B284
Ex. 02

mc. 44481



Este documento é de propriedade da Universidade Federal Rural da Amazônia e não pode ser reproduzido sem autorização.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA**

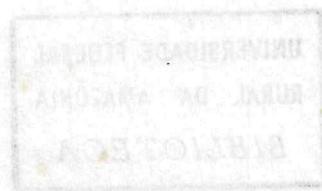
Bartha , Mário Mansour Pinheiro

Análise bacteriológica de sêmen de catitu (*Tayassu tajacu*) criado em cativeiro / Mário Mansour Pinheiro Bartha; orientadora Hilma Lúcia Tavares Dias – 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2009.

1. Suíno - Reprodução. 2. Sêmen - Análise. 3. Collared peccary. I. Título.

CDD – 22.ed. 636.4



mais
9003

Mário Mansour Pinheiro Bartha

**Análise Bacteriológica de Sêmen de Caititus (*Tayassu tajacu*)
Criados em Cativeiro**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Sanidade Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Hilma Dias

Nome: Profª. Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias

Titulação: Presidente da Banca

Instituição: UFPA

Natália Albuquerque

Nome: Drª. Natália Inagaki de Albuquerque

Titulação: Membro Titular

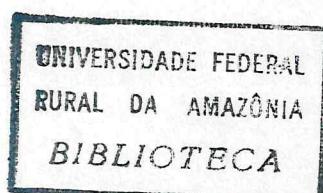
Instituição: EMBRAPA

Diva Anelie Guimarães

Nome: Profª. Dra. Diva Anelie Guimarães

Titulação: Membro Titular

Instituição: UFPA



Aos meus pais e a
minha esposa com
todo amor e
carinho.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter me dado forças quando já não as tinha.

Aos meus pais amados Mansour Simão e Iolanda Pinheiro e a minha esposa amada Josélia Pantoja Mansour pela dedicação e paciência que sempre tiveram comigo.

À tia Nadya Pantoja e vovó Josélia Pantoja pela força e incentivo.

À minha irmã Mariany e cunhados Rodrigo, Danielle e Fabíola pela força e incentivo.

Aos meus queridos sobrinhos Pedro Henrique e Murilo pela alegria de sempre.

À Toda a minha família, tios, primos e grandes amigos pela força e incentivo.

À Professora Hilma Lúcia pela orientação competente, conhecimento transmitido, conselhos, críticas enfim pela sua presença marcante.

Ao Professor Fernando Elias da Silva pela confiança de sempre.

À amiga Priscila Kahwage pelo companheirismo e amizade durante todo o tempo da realização desse trabalho.

À Professora Diva Anélie pela ajuda, paciência e compreensão durante as fases da pesquisa.

À Dra. Natália pela colaboração em ceder os animais para o experimento.

Ao Senhor Deoclécio pela colaboração e amizade durante a fase de coleta de material para o trabalho.

Aos amigo Israel Guedes, pela grande ajuda durante todas as etapas de realização deste trabalho.

Aos amigos, Alice Lima, Roberto Espinheiro, Alexandra, Hilma, Neto e Daniel pela colaboração nas análise e coletas dos dados do trabalho.

Aos funcionários do PRODOCAP – UFRA, pelas coletas de sangue de ovino que foram essenciais para realização das análises.

À CAPES-DGU pela ajuda financeira ao projeto nº 130/07 e ao CNPq

processo 474882/2006-3 CNPq.

Enfim agradeço a todos que de alguma forma acreditaram na minha capacidade e me ajudaram na realização de um sonho.

“As lágrimas de hoje, serão os
sorrisos de amanhã”

Autor Desconhecido.

RESUMO

Realizou-se a análise microbiológica de sêmen de 10 caititus machos criados em cativeiro no período de outubro de 2007 a janeiro de 2009, num total de 84 análises, com o objetivo de identificar a presença e freqüência de bactérias no mesmo, além de testar a sensibilidade de diferentes antimicrobianos frente aos microrganismos isolados. Nesse período, isolou-se um total de 225 colônias sendo 80 (35,6%) de *Streptococcus* sp., 72 (32%) *Staphylococcus* sp., 64 (28,4%) *Micrococcus* sp., 5 (2,2%) *Corynebacterium* sp. e 4 (1,8%) *Enterococcus* sp.. Nos testes de sensibilidade utilizando onze antibióticos destacaram-se a Gentamicina (92,8%), Amicacina (85,3) entre aqueles mais eficazes frente aos microrganismos isolados. Concluiu-se que apesar da freqüência e dos gêneros dos microrganismos isolados no sêmen a taxa reprodutiva dos animais não foi afetada uma vez que essas bactérias podem ser provenientes da flora normal ou do meio em que os animais vivem, recomendando-se os antimicrobianos mais eficazes contra os microrganismos isolados para serem adicionados no diluidor caso haja necessidade de resfriamento do sêmen desses animais.

Palavras-chave: Caititus, Sêmen, Microrganismos, Antimicrobianos.

ABSTRACT

Was held the microbiological analysis of semen from 10 catitus males reared in captivity from October 2007 to January 2009, in a total of 84 test, to identify the presence and frequency of bacteria in it, in addition to test the sensitivity of different antibiotics against the microorganisms isolated. During this period was isolated a total of 225 colonies, being 80 (35.6%) of *Streptococcus* sp., 72 (32%) *Staphylococcus* sp., 64 (28.4%) *Micrococcus* sp., 5 (2.2%), *Corynebacterium* sp. and 4 (1.8%) *Enterococcus* sp. In sensitivity 's test, using eleven antibiotics, highlighted to Gentamicin (92.8%), Amikacin (85.3) among those most effective against the microorganisms isolated. It was concluded that despite the frequency and genera of microorganisms isolated in semen the reproductive rate of animals was not affected, since these bacteria may be from the normal flora or make part the environment in which animals live, is recommending the most effective antimicrobial against the microorganisms isolated, to be added in dilutive if there is a need of cooling the semen of these animals.

Key-words: Caititu, Semen, Microrganisms, Antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	p.
FOTOGRAFIA 1 Animal adulto de caititu (<i>Tayassu tajacu</i>)	14
FOTOGRAFIA 2 Visualização das baias coletivas (36 m ²), no criatório	27
FOTOGRAFIA 3 Animal preso no pucá após ser capturado.	28
FOTOGRAFIA 4 Pesagem do animal em balança suspensa	28
FOTOGRAFIA 5 Administração intravenosa da associação acepromazina/quetamina,	29
FOTOGRAFIA 6 Animal isolado em recuperação da anestesia.	30
FOTOGRAFIA 7 Tricotomia ao redor do prepúcio do animal antes da coleta.	30
FOTOGRAFIA 8 Lavagem interna do prepúcio com solução fisiológica	31
FOTOGRAFIA 9 Limpeza do reto	31
FOTOGRAFIA 10 Eletroejaculador Boijektor 2001® adaptado para uso nos catitus	32
FOTOGRAFIA 11 Posicionamento do pênis dentro do becker pré-aquecido a 35ºC.	33
FOTOGRAFIA 12 Coleta da amostra de sêmen do meato uretral	34
FOTOGRAFIA 13 Acondicionamento dos suabes para transporte	34
GRÁFICO 1 Porcentagem de crescimento de colônias puras e mistas	39
FOTOGRAFIA 14 Prova da coagulase para identificação de <i>S. aureus</i>	40
FOTOGRAFIA 15 Prova da novobiocina para diferenciação do <i>S. saprophyticus</i>	40
FOTOGRAFIA 16 Prova da optoquinina para diferenciação de <i>S. pneumoniae</i>	41
FOTOGRAFIA 17 Prova da bacitracina para diferenciação de <i>S. pyogenes</i>	41
GRÁFICO 2 Média das colônias contadas nas diluições 10 ⁻⁴ e 10 ⁻⁵ para cada microrganismo isolado.	43
FOTOGRAFIA 18 Halos de sensibilidade e resistência bacteriana respectivamente.	44

LISTA DE TABELAS

		p.
TABELA 1	Microrganismos freqüentemente isolados do sêmen de diferentes espécies.	25
TABELA 2	Número e freqüência das coletas de ejaculados durante o período de outubro de 2007 a janeiro de 2009.	38
TABELA 3	Número e freqüência de bactérias isoladas do sêmen no período entre Outubro de 2007 a janeiro de 2009.	42
TABELA 4	Níveis de sensibilidade dos antibióticos testados frente aos Microrganismos presentes no ejaculado.	44
TABELA 5	Sensibilidade dos antibióticos frentes as bactérias isoladas do sêmen de catitus criados em cativeiro no período de outubro de 2007 a janeiro de 2009.	46

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO <i>Tayassu Tajacu</i>	14
2.1.1 Considerações Gerais	14
2.1.2 Biologia Reprodutiva do Caititu	16
2.2 ASPECTOS REPRODUTIVOS DO MACHO	17
2.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO SÊMEN	18
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 ANIMAIS	27
4.1.1 Captura	28
4.1.2 Protocolo de Anestesia	29
4.1.3 Preparo dos animais para a coleta	30
4.1.4 Protocolo de eletroestimulação	32
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DO SÊMEN	33
4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	34
4.3.1. Diluição das amostras	35
4.3.2 Técnica de contagem e estimativa de microrganismos no sêmen	36
4.3.3 Contagem de Microrganismos Gram-Positivos	36
4.4 ANTIBIOGRAMA	37
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5 RESULTADOS	38
6. DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

O caititu (*Tayassu tajacu*) é uma espécie que está adaptada a diversos ambientes existentes entre o sul dos EUA até o norte da Argentina. Este animal está entre os que apresentam maior potencial produtivo em cativeiro quando comparado com outros mamíferos da região Amazônica (SANTOS et al., 2000; MAYOR et al., 2006).

Em decorrência do grande interesse comercial pela espécie e o surgimento de diferentes tipos de manejo em cativeiro, que vai do semi-extensivo ao intensivo, estudos sobre a reprodução desses animais devem ser realizados com mais freqüência uma vez que a literatura sobre este assunto ainda é bastante escassa ou inexistente.

Um dos principais fatores determinantes em criações desses animais, tanto semi-extensiva como intensiva, constitui na identificação dos microrganismos causadores de problemas de fertilidade, uma vez que podem ser responsáveis por baixos índices produtivos tanto das fêmeas quantos dos machos em cativeiro.

Com o surgimento de biotécnicas avançadas, como o congelamento e resfriamento de sêmen e da fertilização *in vitro*, têm permitindo um rápido avanço genético além de significativa redução na transmissão de algumas doenças sexuais e na queda do desempenho reprodutivo de alguns animais domésticos.

Para tanto, busca-se melhorar a qualidade do sêmen de caititus utilizando-se meios para determinação da quantidade, gêneros e espécies de microrganismos presentes no ejaculado assim como sua resistência frente a determinados antimicrobianos freqüentemente utilizados em diluições de sêmen (GANGADHAR; RAO; SUBBIAH, 1986; RAMASWAMY, 1991; FUENTES; GUTIÉRREZ; GALINA, 1998).

A presença de contaminação bacteriana no ejaculado pode ser originária de uma infecção sistêmica ou do próprio sistema reprodutivo, assim como do contato do ejaculado com secreções prepuciais e com o meio ambiente.

Dessa forma, doenças causadas por bactérias como *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* subespécie *veneralis* e *Leptospira* sp., estão entre os microrganismos comumente relatados como causadores de infertilidade em machos e fêmeas, nos casos de abortamentos e queda nos índices de produtividade dos rebanhos, tanto em programas de monta natural quanto de reprodução assistida (DIAS et al., 2006).

Além dessas, uma grande quantidade de bactérias causadoras de diversos tipos de patogenicidade vêm sendo relatadas como responsáveis por problemas reprodutivos em animais, dentre as quais destacam-se: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter cloacae*, *Corynebacterium* sp., *Shigella sonnei*, *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp. e *Actinobacillus seminis* (GRANOUILLET, et. al., 1982; NÁREZ et al., 1999; LOMBARDO;THORPE, 2000; CORRÊA et al., 2001; PRADO;PÉREZ, 2005; SOUZA et al., 2006).

Alguns autores já relatam a presença desses microrganismos no sêmen de diferentes espécies, tais como: homem (GRANOUILLET, et al., 1982), onças (MORATO et al., 1998), ovinos (NÁREZ et al., 1999), andorinhas (LOMBARDO;THORPE, 2000), suínos (CORRÊA et al., 2001), bovinos (PRADO; PÉREZ, 2005), caprinos (SOUZA et al., 2006) e peixes (ISAÚ, 2006). Entretanto não existem relatos na literatura a respeito destes microrganismos presentes no sêmen de caititus.

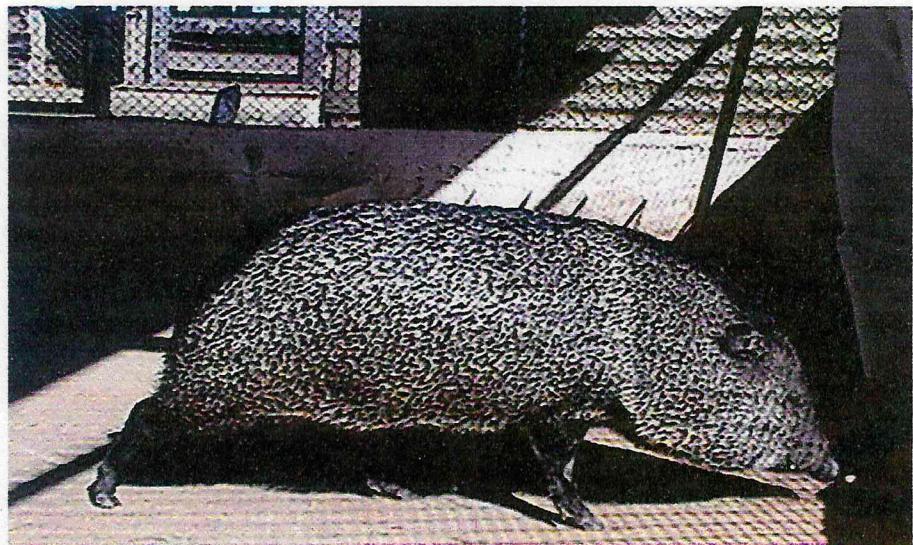
Portanto, para que seja possível realizar a aplicação de técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial e fertilização *in vitro*, e para obter conhecimento dos fatores físicos e ambientais que podem interferir na produtividade de animais silvestres criados em cativeiro é necessário pesquisar a presença de bactérias em sêmen fresco de caititus, assim como verificar a resistência das mesmas a diferentes antimicrobianos, contribuindo assim na avaliação da qualidade do sêmen desses reprodutores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO *Tayassu tajacu*

2.1.1 Considerações Gerais

O caititu (Fotografia 1) possui uma ampla distribuição geográfica, mas não uniforme. Essa espécie ocorre desde o sul dos Estados Unidos da América, por toda a América Central e do Sul (SOWLS, 1997).



Fotografia 1: Animal adulto de caititu (*Tayassu tajacu*)

Esta espécie vive em uma grande variedade de ambientes que vão desde florestas tropicais úmidas a desertos e regiões semi-áridas. Conseguem viver mesmo em áreas devastadas, desde que sejam preservados um pouco da vegetação original (SOWLS, 1997; NOGUEIRA-FILHO, 1999).

Em habitats naturais os grupos sociais são coesos e estáveis, contendo de 5 a 15 indivíduos de ambos os sexos e diferentes faixas etárias, existindo, entretanto

animais ou subgrupos que se desagregam em determinadas épocas. Por exemplo, no período das chuvas quando a vegetação fica densa e a defesa do grupo fica comprometida, voltando a reagrupar quando as adversidades cessarem (SOWLS, 1997).

A área de uso de um grupo varia de 143 a 685 ha em regiões tropicais, sendo proporcionais as necessidades energéticas acumuladas pelos diferentes indivíduos (ROBINSON; EISENBERG, 1985; TABER et al., 1993).

Em ambiente natural os grupos apresentam uma hierarquia linear, sendo uma das fêmeas dominantes sobre as demais e um macho dominante sobre todo o grupo (DUBOST, 2001).

O caititu em ambiente natural nas regiões tropicais tem uma atividade predominantemente diurna, porém no cativeiro, esse ritmo pode ser diferente devido principalmente às condições de manejo. Registros relatam que esses animais podem viver em ambiente natural entre oito a 10 anos e em cativeiro de 18 a 21 anos (SOWLS, 1997; NOGUEIRA-FILHO, 1999; VENTURIERI; LE PENDU, 2006).

No período após o nascimento o filhote de caititu alimenta-se exclusivamente do leite materno, passando a ingerir sólido gradativamente ao longo do tempo (SOWLS, 1997). Ao passar para alimentação sólida o caititu torna-se um animal onívoro, o que lhe permite o aproveitamento dos mais diversos alimentos, incluindo os fibrosos com auxílio do pré-estômago, sobras de legumes, frutos, pequenos vertebrados (como cobras), insetos, folhas, raízes e tubérculos, variando muito em função da disponibilidade (NOGUEIRA FILHO, 1999; ALBUQUERQUE, 2006).

Em cativeiro esses animais também se adaptam facilmente aos diferentes tipos de alimentação, sendo normalmente ofertado milho, mandioca, jerimum, casca de maracujá, banana, cana-de-açúcar cortada em pedaços pequenos, forragem, silagem de milho, silagem de sorgo e ração comercial de suínos (LE PENDU et al., 2002; ALBUQUERQUE, 2006).

A enorme capacidade adaptativa e a rusticidade dos caititus permitem aos indivíduos manterem o grupo em bom estado sanitário, porém ainda se desconhece o papel da desnutrição, da predação e das doenças infecto-parasitárias sobre as populações desses animais (MAYOR et al. 2006).

Rodrigues (2007) estudando a presença de parasitas gastrointestinais em 32 caititus criados em cativeiro na Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA), encontrou uma ocorrência de endoparasitas em 100% dos animais, sendo *Toxocara* sp. e *Entamoeba coli* em maior freqüência e *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Endolimax nana*, Oxiurídeo e *Strongyloides* sp. apenas quando registradas infecções múltiplas.

Em cativeiro, para se manter a sanidade adequada, deve-se manter a higiene dos recintos, evitarem criadouros superpovoados e separar os animais ao primeiro sinal de enfermidade. Além desses cuidados deve-se proceder a vermifugação periódica dos animais com vermífugo de amplo espectro (Comunicação Pessoal).

2.1.2 Biologia Reprodutiva do Caititu

Em condições naturais nas regiões tropicais, as fêmeas apresentam-se poliéstricas anuais, com cópulas e nascimentos o ano todo. O ciclo estral dura em média 23 dias, as fêmeas são receptivas em média por quatro dias sendo o período de gestação em torno de 145 dias, podendo nascer de um a quatro filhotes por parição (COSER JR., 2003; MAYOR et al., 2006).

As fêmeas de caititu criadas em cativeiro geralmente apresentam a primeira parição em torno de um ano e meio de vida, podendo variar em seis meses, com intervalos de parto médio de 196 dias e a presença de cio fértil sete dias após o parto. Em média, geram dois filhotes, mas podem ocorrer normalmente um ou três em igual proporção de machos e fêmeas (PINHEIRO et al., 2001; MAYOR et al., 2006).

Guimarães et al. (2006) estudando uma população de caititus em cativeiro, detectaram que os nascimentos ocorriam continuamente ao longo do ano, com a primeira parição ocorrendo em média aos um ano e seis meses de vida, sendo que a parição mais precoce foi observada com uma fêmea de um ano de idade.

Sowls (1997) relata que no cativeiro, o período de gestação e o número de filhotes são semelhantes ao encontrado em condições naturais, sendo observado

que a fêmea apresenta um cio de seis a 14 dias depois da parição. Quando uma fêmea entra neste período, os adultos do grupo exibem comportamentos bem específicos como: cheirar os órgãos sexuais, morder o pescoço, tentar montar na fêmea.

Durante o primeiro mês os filhotes são completamente dependentes do leite da mãe. O período de lactação é difícil de determinar, variando de acordo com o declínio da secreção do leite, no entanto já foram observados filhotes mamando depois de 74 dias de nascimento (SOWLS, 1997; NOGUEIRA-FILHO, 1999).

Segundo Mayor et al. (2006), os machos entre 10 e 11 meses de idade são capazes de realizarem a monta de forma efetiva, pois foi encontrado vestígio da produção de esperma aos 10 meses de idade assim como a diminuição dessa produção em torno dos sete anos de vida.

2.2 ASPECTOS REPRODUTIVOS DO MACHO

O sistema reprodutivo do macho é composto de uma variedade de diferentes estruturas incluindo os testículos, sistema dos ductos urogenitais e as glândulas acessórias. Os testículos têm como função primária a produção de espermatozoides e hormônios, sendo os espermatozoides produzidos nos túbulos seminíferos e os hormônios nas células de Leydig e Sertoli (LARS, 1995).

A espermatozogênese é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular, que ocorre nos testículos, pelo qual uma espermatozônia tronco é gradativamente diferenciada numa célula haplóide altamente especializada, o espermatozóide (COSTA; PAULA, 2004).

Desta forma os machos têm como função primordial produzir e ejacular espermatozoides viáveis, a fim de fertilizar os óvulos. Como tal, o estudo dos eventos relacionados ao sistema reprodutivo do macho, torna-se básico para obtenção de níveis adequados de produtividade (LIMA, 2007).

Costa e Paula (2005) estudando o sêmen de seis caititus criados em cativeiro, coletado através de eletroejaculação, com idades entre 10 e 18 anos, encontraram uma média de volume ejaculado total de $2,98 \pm 2,29$ mL, concentração média de $87 \pm 5,31 \times 10^6$ sptz/mL, volume do ejaculado por animal $3,11 \pm 0,9$ mL, motilidade de $48,76 \pm 5,95\%$, vigor $2,15 \pm 0,35$ e pH $7,23 \pm 0,15$.

2.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO SÊMEN

Atualmente, com o surgimento de biotécnicas avançadas, como o congelamento e resfriamento de sêmen e a fertilização *in vitro* tem-se permitindo um rápido avanço genético, além de significativa redução na transmissão de algumas doenças性uais e queda no desempenho reprodutivo de alguns rebanhos. Para tanto, se busca melhorar a qualidade desse sêmen utilizando-se meios para a determinação da quantidade, gênero e espécies de microrganismos presentes no ejaculado, assim como sua resistência frente a determinados antimicrobianos freqüentemente utilizados em diluidores de sêmen (GANGADHAR; RAO; SUBBIAH, 1986; RAMASWAMY, 1991; FUENTES; GUTIÉRRES; GALINA, 1998).

Em virtude da ocorrência de germes saprófitas e patogênicos em reprodutores sem sinais clínicos de afecções genitais, recomenda-se que além de exames clínicos sejam realizadas análises microbiológicas no sêmen desses animais, por constituir fator decisivo em programas de acasalamento com monta natural e inseminação artificial, para que medidas preventivas sejam adotadas com o objetivo de melhorar o índice de fertilidade do rebanho (SOUZA et al. 2006).

A flora bacteriana do aparelho reprodutor do macho pode conter uma grande variedade de agentes potencialmente patogênicos, entretanto, existem evidências de que o trato genital encontra-se relativamente livres de contaminação, não havendo indicação de que a presença de grande número de bactérias no ejaculado tenha origem nos órgãos do aparelho reprodutivo (GALL; WILSON; ALTHOUSE, 1998).

Desta forma, a presença de contaminação bacteriana no sêmen pode ser originária de uma infecção sistêmica ou restrita ao sistema reprodutivo, bem como do contato do ejaculado com as secreções prepuciais, pêlos, mãos do funcionário, contato indireto com aerossóis, contaminação dos materiais e equipamentos utilizados na coleta (fômites), diluição e acondicionamento do sêmen, apresentando-se assim como fases críticas para a qualidade bacteriológica do sêmen a coleta, manipulação e conservação do ejaculado (THIBIER; GUERIN, 2000).

Apesar da escassez sobre o assunto, alguns trabalhos têm relatado a presença de microrganismos no sêmen de várias espécies de animais domésticos, dentre os quais podemos destacar os bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Além dos animais silvestres como a andorinha, onça e peixe, não havendo até o momento nenhuma literatura relacionada à microbiologia de sêmen de caititus.

Alguns autores têm demonstrado que as enterobactérias, como a *Escherichia coli* e algumas bactérias gram-positivas, como *Streptococcus* sp., afetam de forma significativa a qualidade espermática, principalmente no que se refere à motilidade progressiva dos espermatozoides. A *E. coli*, quando em concentração de 10^6 UFC/mL no sêmen de bovinos e humanos causa queda significativa na motilidade espermática (DEL PORTO; DERRICK; BANNISTER, 1975; DIEMER et al, 1996).

No entanto, Bennermann et al., (2000) relatou que somente a partir de 5×10^7 UFC/mL de *E. Coli* em sêmen de suínos, a motilidade espermática e as extremidades acrossomais foram afetadas.

Jovicin, Pupavac e Veselinovin (1991) relataram que uma quantidade de 10, 500 e 1000 UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa* baixam a concentração de espermatozoides no sêmen à proporção de 36,3%, 31,3% e 27,7% respectivamente, além de danos acrossomais em espermatozoides vivos de 3,7%, 6,0% e 8,8% nesta ordem.

Porém, Edmondson, Tallman e Herman (1948) não encontraram qualquer correlação entre o número de bactérias presentes no sêmen bovino e o período de tempo que este apresentava células móveis. No entanto, observaram que fatores de patogenicidade bacteriana, como capacidade hemolítica, estavam relacionados a uma menor manutenção da motilidade espermática.

Isso pode ocorrer pela ação de toxinas bacterianas que alteram o pH, competindo pelo mesmo substrato com os espermatozóides, o que pode levar a defeitos estruturais na membrana desses últimos (BENNEMANN et. al., 2000).

Analizando microbiologicamente amostras de sêmen fresco e congelado de 50 touros utilizados em programas de inseminação artificial, clinicamente sadios, Prado e Pérez (2005) isolaram no sêmen fresco 68 cepas de cinco espécies bacterianas, patogênicas facultativas e patogênicas, dentre as quais se destacaram *E. coli*, *S. aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa*. Em outro momento, porém utilizando as mesmas amostras, desta vez congeladas, os autores encontraram crescimento bacteriano em apenas 20% dos meios, uma vez que foram adicionados antibióticos, de forma satisfatória no meio diluente, havendo assim uma diminuição da carga microbiana em relação ao sêmen fresco.

Hernández et al. (2002) realizando a análise microbiológica de 64 *pelets* de sêmen de bovinos, semeados em Agar sangue e meios seletivos, encontraram a presença de *Staphylococcus epidermidis*, *S.aureus*, *Enterobacter hafniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Serratia rubidae*, *S. liquefaciens*, *Bacillus sp.* e *P. aeruginosa*.

Em outro momento, Dias et al. (2006) conseguiu através da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) associada à eletroforese capilar isolar cepas de *Leptospira* sorovar Pomona em sêmen bovino contaminado experimentalmente, concluindo assim que a eletroforese capilar é uma valiosa ferramenta na detecção de *L. pomona*, por permitir rapidez e sensibilidade. Estas vantagens poderão no futuro, serem adicionadas aos métodos convencionais de detecção de patógenos no sêmen bovino, podendo vir a constituir um recurso a mais no diagnóstico de agentes infecciosos, visto que são difíceis de serem isolados nos meios convencionais.

Os micoplasmas, microrganismos presentes em bovinos têm apresentando resultados indicativos de que podem estar acarretando perdas econômicas significativas aos produtores rurais. Micoplasmas e ureaplasmas podem causar orquite, vesiculite seminal, balanopostite e epididimite em touros com consequente perda da qualidade seminal e capacidade de fertilização (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004).

No Canadá foi reportada por Ruhnke (1994) uma variação de 23% a 84% de touros positivos para *Ureaplasma diversum* em sêmen fresco. Nas amostras de muco prepucial e em secreção de uretra distal apresentaram uma variação de 29% a 100% de casos positivos, sendo que a presença de ureaplasmas nestes sítios geralmente não está associada a sinais clínicos.

Nárez et al. (1999), ao analisarem 17 amostras de sêmen e testículos de ovinos de seis rebanhos diferentes no México, conseguiram isolar duas cepas de *Brucella ovis* das amostras de testículo e duas cepas de *Actinobacillus seminis* das de sêmen, ao contrário de Gomes et al. (2001) que isolaram *Actinobacillus seminis* apenas em testículos de ovinos analisados no Rio Grande do Sul Brasil.

O *A. seminis* foi isolado tanto em carneiros que apresentavam orquite quanto em animais com infecções subclínicas, porém com presença de células inflamatórias no ejaculado (PUENTE-REDONDO, 2000).

Souza et al. (2006), ao analisarem 25 amostras de sêmen de caprino cultivadas a 37°C em Agar sangue 5% e Agar Levine, conseguiram isolar as bactérias *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *K. pneumoniae*, *Candida* sp., *Pseudomonas* sp., *E. cloacae*, *E. coli*, *Corynebacterium* sp., *Shigella sonnei*, *Streptococcus* sp. e *Micrococcus* sp, em variadas proporções.

Em centrais de inseminação artificial de suínos podem ser encontradas no ejaculado, em diferentes freqüências, *E. coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus* sp.; pois estas são estão usualmente presentes na flora do aparelho reprodutor dos machos suínos (CORRÊA et al., 2001).

Na Venezuela, foram avaliadas 226 amostras de sêmen fresco e diluído de reprodutores suínos utilizados em cinco granjas de produção, dos quais se isolaram uma ampla variedade de microrganismos da flora normal e patogênicos, ficando a *E. coli* com o maior número de isolamentos (PINEDA; SANTANDER et al., 2007)

Madec, Albina e Vannier (1994), em estudo realizado com 22 machos suínos de diferentes propriedades, examinaram 60 amostras de sêmen, nas quais se constatou a presença de *Micrococcus* sp., *E. coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp., *Brucella suis*, *Leptospira* sp. e *Micobacterium avium*, sendo consideradas contaminantes que podem estar tanto nos órgãos genitais quanto no trato urinário.

Investigando amostras de sêmen provenientes de plantéis de doadores de sêmen suínos, Althouse et al. (2000), isolaram em 66% das amostras apenas uma espécie de bactéria, sendo que nas demais houve o crescimento de duas ou mais espécies, das quais: *Alcaligenes xylosoxydans*, *Burkholderia cepacia*, *E. cloacae*, *E. coli*, *Serratia marcescens* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

Enquanto que Althouse e Lu (2005) analisaram durante um ano a bacteriologia de 250 amostras de sêmen de suínos, devido a grande perda de qualidade em decorrência de contaminação, e encontraram em 78 amostras a presença de *Enterococcus* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter iwoffii*, *E. coli*, *Pseudomonas* sp. e outras em menor quantidade.

Em outro estudo, 70 amostras de sêmen foram coletadas de 13 suínos com bons índices de fertilidade, porém encontrou-se a presença de *E. coli*, *Aerobacter* sp., *Proteus* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. e *Bordetella* sp., apresentando crescimento de 544 UFC/mL de sêmen (WALTZ et al., 1968).

A Clamidiose vem sendo relatada como causa de abortos e desordens reprodutivas em porcas, podendo também infectar o trato genital dos machos. Por haver pouco conhecimento sobre essa doença em suínos, Teankum et al. (2006), analisaram o sêmen de dois grupos desses animais. Um grupo da Suíça (42 animais) e outro grupo da Alemanha (39 animais), encontrando em 25 amostras do grupo suíço a presença de *Chlamydia psittaci* e em 10 amostras de sêmen do grupo alemão a presença de *Chlamydia suis*.

Em experimento realizado por Kozumplick (1975), utilizando duas formas de coleta, com e sem lavagem da região prepucial, e empregando a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de sêmen, concluiu que quando se realiza a lavagem da área ao redor do prepúcio reduz-se o número de microrganismos a níveis consideráveis.

Ao contrário dos vírus, cuja pesquisa e identificação no animal, sêmen e/ou ambiente está vinculada a um problema de saúde em curso ou potencial, bactérias são freqüentemente isoladas no sêmen suíno sem apresentar maior significado patológico (SHEID, 2000).

Diante disso, a importância de se analisar microbiologicamente o sêmen não se restringe apenas aos animais, uma vez que amostras de sêmen humano vêm sendo avaliadas a fim de se detectar a presença de microrganismos que causam esterilidade.

Assim, uma pesquisa realizada em dois grupos de homens com infertilidade (65 e 132 pacientes), ambos em laboratórios diferentes e constataram-se resultados bacteriológicos similares para as amostras de sêmen, onde se isolaram *Streptococcus* β-hemolítico, *S. viridans*, *Proteus* sp., *S. epidermidis*, *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Neisseria* sp., *E. coli*, *Corynebacter* anaeróbico tipo IV, Fungos e *Achromobacter*. Concluindo os autores que essas infecções poderiam ser de origem prostática em decorrência da grande quantidade de bactérias encontradas no sêmen (3000 UFC/mL) (GRANOUILLET, et. al., 1982).

Mogra et al. (1981), ao estudarem amostras de sêmen de 70 homens inférteis, encontram em 42,9% das amostras a presença de *Streptococcus fecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas pyocyanea* e *Streptococcus* β-hemolítico.

Enquanto Golshani et al. (2006), ao analisarem amostras de sêmen de 88 homens inférteis encontraram uma grande quantidade de bactérias de diversas espécies, porém as que apresentaram maior significância foram: *E. coli*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus* grupo B, *S. aureus* e *Enterococcus* sp.. Concluindo assim que a infecção do trato urogenital masculino poderia ser a causa de infertilidade.

Não obstante dos animais doméstico e do homem a análise microbiológica do sêmen dos animais silvestres também é de suma importância, pois a reprodução e a conservação de muitas espécies *in situ* e *ex situ* dependem da qualidade e higidez do sêmen.

Dessa forma, Isaú (2006), relatou a presença de bactérias gram-negativas como *Aeromonas* sp., *Citrobacter freundii* e *Enterobacter* sp., além de gram-positivas como *Bacillus* sp. *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. em sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) no rio Grande-MG.

Lombardo e Thorpe (2000), analisando 30 amostras de sêmen de Andorinha (*Delichon sp.*), encontraram em 19 indivíduos a presença de uma ou duas bactérias, dentre as quais algumas com potencial patogênico como *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Yersinia sp.* e outras nem tanto como *Lactobacillus sp.*

Estudando a aplicação do método de eletroejaculação em dez onças pintadas (*Panthera onca*), machos adultos, pertencentes a Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Morato et al. (1998) encontraram a presença de urina em duas das amostras de sêmen coletadas. Demonstrando desta forma que, neste tipo de colheita, pode haver contaminação do sêmen fazendo-se necessário uma análise microbiológica do ejaculado.

A monitoração bacteriológica periódica do sêmen, imediatamente após a coleta e em diferentes períodos do processamento e da conservação do ejaculado, é um procedimento recomendado para avaliação do grau de contaminação, principalmente nas centrais de inseminação artificial, indicando a necessidade de mudanças ou a correção dos procedimentos adotados, frente aos problemas com bactérias (ALTHOUSE; LU, 2005).

Embora não existam padrões que indiquem níveis máximos aceitáveis para a carga de contaminantes do sêmen ao longo do tempo, as centrais podem reconhecer a flora microbiana predominante e estabelecer seus próprios parâmetros para a monitoração da qualidade higiênica do trabalho com o sêmen (SCHEID, 2000). Para se evitar que o sêmen seja contaminado, medidas de higiene são necessárias uma vez que visa reduzir ao mínimo possível a pressão infectiva da flora bacteriana normalmente presente nos animais, porém não são capazes de eliminá-la totalmente, razão pela qual são adicionados antibióticos aos diluentes do sêmen.

Os antibióticos normalmente utilizados para esse fim apresentam ausência de espermatoxidase, devem possuir ação antibacteriana eficaz e preferencialmente de amplo espectro, sendo a gentamicina, penicilina/estreptomicina, neomicina e lincomicina/estreptomicina os tipos de antibióticos mais utilizados (CORRÊA et al., 2001).

Para Scheid (2000), o ejaculado, aparentemente, é pouco importante na disseminação das bactérias contaminantes do sêmen, uma vez que, por meio da

inclusão de uma combinação de antibióticos, pode-se prevenir a transmissão desses agentes bacterianos.

Porém, Pineda e Santander. (2007) ao isolarem diversas espécies de microrganismos em sêmen de suínos, encontraram uma ampla resistência dos mesmos em relação aos antibióticos comumente utilizados nos diluidores de sêmen.

O mesmo aconteceu com Souza et al. (2006) ao realizarem o antibiograma de 25 amostras de sêmen de reprodutores caprinos, utilizando penicilina (10mg), estreptomicina (10mg) e gentamicina (10mg), encontraram uma grande resistência em relação as bactérias presentes no sêmen, quando se usou uma associação de penicilina + estreptomicina, o que não aconteceu em relação à gentamicina. Resultados que divergiram do relatado por Althouse et al. (2000) que encontraram uma grande resistência bacteriana a este último antibiótico.

Com isto apesar da grande variedade de microrganismos encontrados no sêmen de diferentes espécies e dos mesmos apresentarem resistência aos mais variados tipos de antimicrobianos, algumas bactérias são isoladas em maior freqüência nas espécies estudadas como observado na tabela abaixo.

Tabela 1: Microrganismos freqüentemente isolados do sêmen de diferentes espécies.

Microrganismos	Animal Hospedeiro	Referência
<i>E. coli</i>	Bovino	Prado; Pérez, 2005
	Caprino	Souza et al., 2006
	Suíno	Corrêa et al., 2001
	Ave	Lombardo; Thorpe, 2000
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bovino	Prado; Pérez, 2005
	Homem	Golshani et al., 2006
<i>Staphylococcus</i> sp.	Bovino	Prado; Pérez, 2005
	Caprino	Souza et al., 2006
	Suíno	Waltz, 1968
	Peixe	Isaú, 2006
<i>Streptococcus</i> sp.	Caprino	Souza et al., 2006
	Suíno	Corrêa et al., 2001
<i>Micrococcus</i> sp.	Caprino	Souza et al., 2006
	Suíno	Madec et al., 1994
<i>Corynebacterium</i> sp.	Caprino	Souza et al., 2006
	Suíno	Waltz et al., 1968
<i>Enterococcus</i> sp.	Caprino	Souza et al., 2006
	Suíno	Althouse; Lu, 2005
	Peixe	Isaú, 2006
<i>Leptospira</i> sp	Suíno	Madec et al., 1994
<i>Chlamydia psittaci</i>	Suíno	Tankum et al., 2006
<i>Chlamydia suis</i>	Suíno	Tankum et al., 2006

Fonte: Pesquisa, 2009.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar qualitativamente e quantitativamente os agentes bacterianos presentes no sêmen de caititus obtidos pela eletroestimulação, no criatório científico da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA).

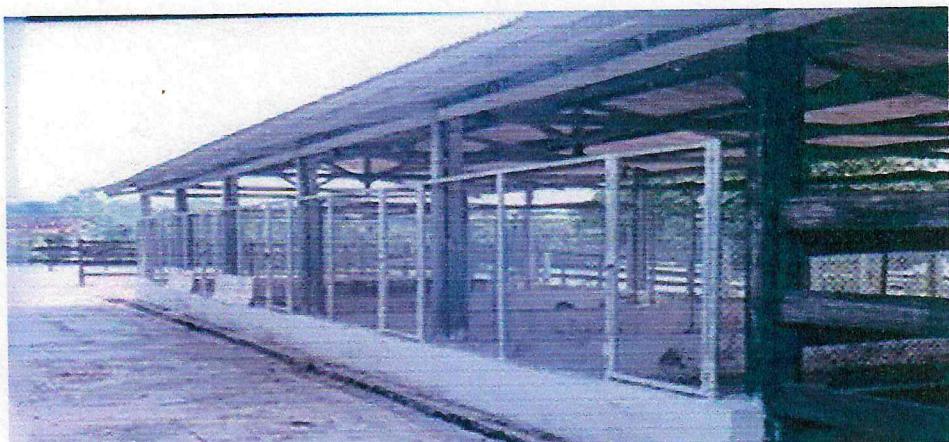
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a presença e freqüência de microrganismos presentes no sêmen de caititus coletados;
- Verificar se a presença e a freqüência de microrganismos no sêmen de caititus influenciam na reprodução desses animais;
- Testar a sensibilidade e resistência de antibióticos através de discos de antibiograma frente aos microrganismos isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

No período entre os meses de outubro de 2007 a janeiro de 2009 realizou-se avaliação microbiológica do sêmen de caititus em que foram utilizados 8 caititus machos adultos com idade de dois a dez anos e peso médio de $19,8 \pm 2,1$ kg, mantidos no criatório científico da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA) em 5 baias coletivas medindo 36 m^2 (Fotografia 2) em que cada baia podia abrigar até 11 indivíduos entre machos, fêmeas e filhotes. Os reprodutores encontravam-se clinicamente saudáveis, em bom estado nutricional e sexualmente maduros, era fornecida ração comercial para suínos a base de milho e soja (500g/animal), capim de diferentes espécies, frutas e água a vontade.



Fotografia 2: Visualização das baias coletivas (36 m^2) no criatório.

4.1.1 Captura

As coletas das amostras de sêmen eram realizadas em média a cada 15 dias, sendo que no dia da coleta o animal era capturado em sua baia de origem com auxílio de um puçá¹(Fotografia 3) sendo pesado logo em seguida (Fotografia 4) em dinamômetro suspenso com a finalidade de se calcular a dose de anestésico a ser usada e avaliar o ganho ou não de peso do animal durante o experimento.



Fotografia 3: Animal preso no puçá após ser capturado.



Fotografia 4: Pesagem do animal em dinamômetro suspenso.

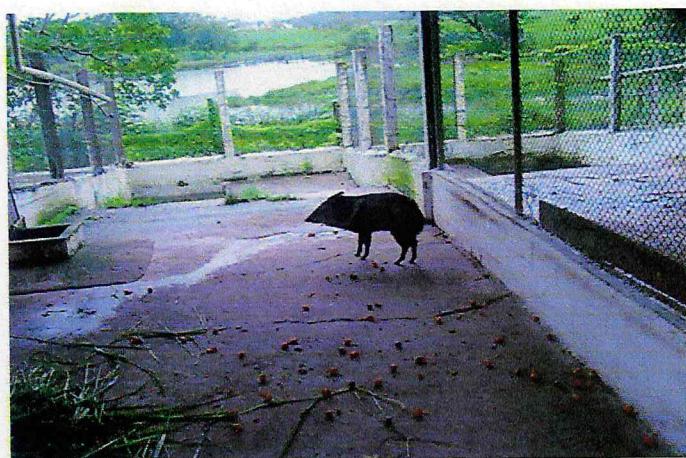
Puçá: rede utilizada na captura de animais, adaptada em suporte de ferro.

4.1.2 Protocolo de Anestesia

O protocolo de sedação utilizado para as coletas de sêmen, consistiu na administração de acepromazina (0,2 mg/kg IV), associada com cloridrato de quetamina (5 mg/kg IV) em uma mesma seringa (Fotografia 5). O tempo para sedação e analgesia (min.) foi dado pelo intervalo entre a aplicação da associação acepromazina/quetamina e ausência do reflexo interdigital e de movimentos voluntários de membros e cabeça. O tempo para sedação variou entre 3 a 5 minutos e, o tempo médio para o retorno dos animais à consciência foi de 40 a 60 minutos. Após este período era observado se o animal conseguia manter-se em estação e em seguida era mantido em uma baia separada de seu grupo para onde só retornava no dia seguinte (Fotografia 6).



Fotografia 5: Administração intravenosa da associação acepromazina/quetamina.



Fotografia 6: Animal isolado em recuperação da anestesia.

4.1.3 Preparo dos animais para a coleta

Após o animal entrar em estado de analgesia, o mesmo era retirado do puçá e colocado sobre uma mesa cirúrgica onde em seguida iniciava-se a tricotomia e lavagem (Fotografia 7) com água e sabão da região ao redor do prepúcio, minimizando-se possíveis contaminações. Além disso, também se realizava a lavagem interna do prepúcio com solução fisiológica previamente aquecida a 35°C massageando-o suavemente (Fotografia 8).



Fotografia 7: Tricotomia ao redor do prepúcio do animal antes da coleta.



Fotografia 8: Lavagem interna do prepúcio com solução fisiológica.

Concluída a lavagem seguia-se para a limpeza do reto (Fotografia 9) e, com auxílio de luvas e carbogel (gel para ultrassom) fazia-se limpeza do reto retirando-se o máximo possível de fezes acumuladas, objetivando assim facilitar a passagem dos estímulos elétricos para as inervações do trato reprodutor.

Exames andrológicos de medição e palpação dos testículos também eram feitos durante os procedimentos pré-colheita.

Concluindo esta etapa, dava-se início aos estímulos via retal utilizando-se os meios e o protocolo descrito a seguir.



Fotografia 9: Limpeza do reto.

4.1.4 Protocolo de eletroestimulação

A coleta das amostras foi realizada através da eletroestimulação retal utilizando um eletroejaculador (Boijkektor 2001[®], Comercial Barros Ltda., São Paulo-SP, Brasil) (Fotografia 10) utilizado em bovinos e adaptado para o caititu, com probe medindo 20 cm de comprimento por 1,9 cm de diâmetro, possuindo três tiras longitudinais de metal.

O protocolo consistiu na aplicação de $48,2 \pm 11,7$ estímulos de 12 volts, com 5 segundos de duração cada e, intervalos de 4 segundos entre estímulos. A média de tempo entre o início de estímulos elétricos e a ejaculação foi de $9 \pm 3,08$ minutos. Os animais não demonstraram sinais de desconforto ou dor e nem vocalizaram durante as coletas. O volume líquido dado pela fração clara mais a fração rica em células do ejaculado observado nesta pesquisa foi de $1,29 \pm 1,3$ mL.



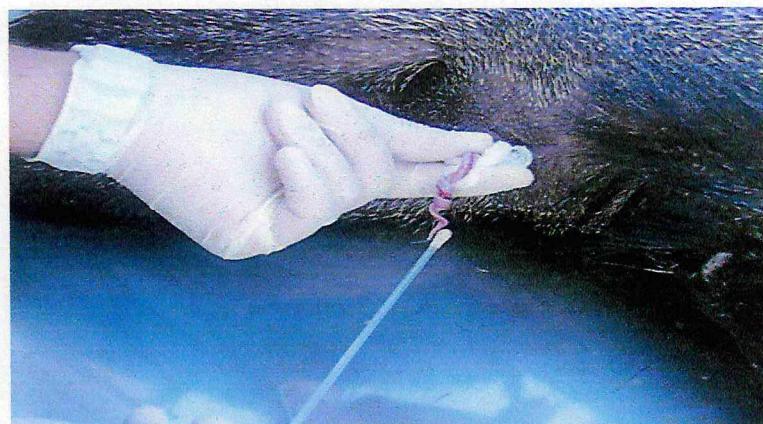
Fotografia 10: Eletroejaculador Boijkektor 2001[®] adaptado para uso nos caititus.

4.2 COLETAS DAS AMOSTRAS DO SÊMEN

Com o início dos estímulos elétricos, o animal desembainhava o pênis o qual era seguro com auxílio de uma gaze estéril e posicionado dentro de um Becker pré-aquecido a 35°C (Fotografia 11) onde era depositado o sêmen para as análises morfológicas. Em seguida, com o auxílio de suabes estéreis, o ejaculado era coletado diretamente do meato uretral (Fotografia 12) sendo um suabe introduzido em um tubo (15,0 x 1,0 cm) contendo Agar Brain-Heart Infusion–BHI (ACUMEDIA®), este é um meio não seletivo tradicionalmente utilizado para o pré-enriquecimento e/ou manutenção de microrganismos, o outro suabe foi colocado em um tubo (18,0 x 2,0 cm) contendo Meio de Transporte Stuart–Stuart (VETEC) (Fotografia 13), ambos foram acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável sendo imediatamente transportados para o Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades Animais – LIDEA, da Universidade Federal do Pará para a realização das análises microbiológicas.



Fotografia 11: Posicionamento do pênis dentro do becker pré-aquecido a 35°C.



Fotografia 12: Coleta da amostra de sêmen do meato uretral.



Fotografia 13: Acondicionamento dos suabes para o transporte.

4.3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

No laboratório, o suabe com a amostra de sêmen era retirado do tubo contendo o meio Stuart e introduzido diretamente em outro tubo (15 x 1 cm) com BHI, para que fosse feito um pré-enriquecimento da amostra coletada e, colocada

para incubar em estufa bacteriológica (modelo 002-CB; FANEN LTDA) durante 24 horas a 37°C.

A outra amostra transportada no meio BHI era cultivada imediatamente em placas de Petri contendo Agar Bacteriológico (MICRO MED), enriquecido com sangue desfibrinado de ovino a 5%, Agar Sabouraud 2% (MICRO MED) e Agar MacConkey (ACUMEDIA®). As placas cultivadas foram submetidas a análises em 24, 48 e 72 horas de incubação. Também se realizou o cultivo em condições de microaerofilia a 37°C durante 120 horas.

Decorrido o período de incubação, as colônias foram avaliadas quanto às características morfotintoriais utilizando a técnica de Gram, onde as bactérias classificadas como gram positivas foram submetidas A OUTRAS provas para sua identificação final.

Foram realizadas ainda testes de sensibilidade a bacitracina 5 μ g (LABORCLIN), novobiocina 5 μ g (LABORCLIN), optoquinina 5 μ g (LABORCLIN), além dos testes da coagulase e catalase.

4.3.1 Diluição das amostras

Para as diluições das amostras foram coletadas, com auxílio de alça de platina, três colônias de cada microrganismo identificado no sêmen, sendo em seguida depositadas em tubos (10 x 1,5 cm) com 1 mL de solução salina 0,9% estéril e homogeneizadas. Após a homogeneização das amostras, foram realizadas as diluições decimais seriadas até 10⁻⁵ (quinta potência), também em solução salina 0,9% estéril e, utilizadas para semeadura em meio Agar Contagem de Placas-M091 (HIMEDIA).

4.3.2 Técnica de contagem e estimativa de microrganismos no sêmen

As técnicas utilizadas para a realização da contagem dos microrganismos isolados no sêmen foi a da estimativa de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

4.3.3 Contagem de Microrganismos Gram-Positivos

Para cada microrganismo isolado do sêmen foi realizada separadamente a técnica de contagem de colônias em suspensões diluídas até 10^{-5} , semeadas em superfície e duplicatas em Agar para Contagem de Microrganismos. Nas placas foram colocados 1 μL das diluições correspondentes e espalhadas com alça de Drigalski para serem incubadas em estufa bacteriológica (Modelo 002 – CB; FNEM LTDA) a 37°C por 24 a 72 horas.

Foram consideradas, para a contagem, todas as colônias independentemente da coloração, forma e tamanho. Durante a contagem selecionou-se as placas que continham entre 30 e 300 colônias e, todas as colônias que foram contadas correspondiam aos seus respectivos gêneros: *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Enterococcus* sp. e *Corynebacterium* sp.

4.4 ANTIBIOGRAMA

Foram realizados antibiogramas das amostras bacterianas em Agar Mueller-Hinton-M173 (HIMEDIA), visando testar a sensibilidade *in vitro* frente à penicilina (10 mg), gentamicina (10 mg), ampicilina (10mcg), amicacina (30mcg), cefalotina (10mcg), cefotaxima (30mcg), ceftazidima (30mcg), ceftriaxona (30mcg), cloranfenicol (30mcg), eritromicina (15mcg) e tetraciclina (30mcg). A leitura foi realizada 24 horas após a incubação das placas a 37°C, procedendo-se à medição dos halos de inibição de crescimento dos microrganismos.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados analisados foram dispostos em tabelas de contingências com variáveis obtidas através de cultivo em culturas de bactérias, utilizando-se assim os testes do χ^2 (Qui-quadrado) para a comparação entre os resultados que foram expressos em termos de proporções e freqüências relativas.

As variáveis foram transformadas para atender as pressuposições da análise de variância, a ANOVA foi utilizada para a análise de variância em relação à sensibilidade dos diferentes antibióticos frente aos microrganismos isolados, a qual por ter sido satisfatória foi complementada com o Teste de Tukey.

5 RESULTADOS

Durante a condução do experimento, foi realizada em média $13 \pm 1,4$ coletas por animal, perfazendo-se um total de 104 coletas, sendo que em 84 (80,7%) o material obtido, apresentava-se em condições adequadas para as análises microbiológicas. Em 12 (11,5%) coletas os animais não responderam aos estímulos elétricos e, em 8 (7,8%) coletas, os ejaculados apresentaram-se contaminados por urina.

Tabela 2: Número e freqüência das coletas de ejaculados durante o período de outubro de 2007 a janeiro de 2009.

Coletas	n	%
Ejaculados analisados	84	80,7
Não respondeu aos estímulos	12	11,5
Ejaculado com urina	8	7,8
Total	104	100

Fonte: Resultados do experimento, 2009.

Do total de ejaculados examinados foram isoladas 225 bactérias gram-positivas, sendo que 135 (60%) apresentaram-se em culturas bacterianas puras e 90 (40%) em culturas bacterianas mistas com dois ou mais gêneros.

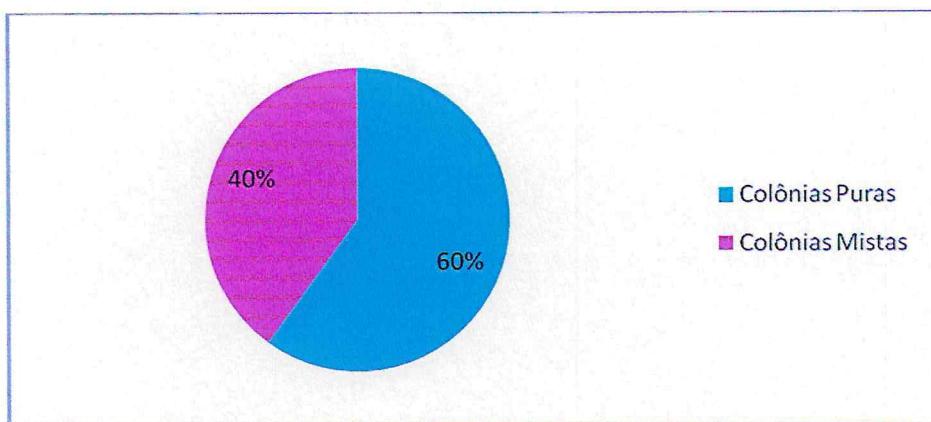


GRÁFICO 1: Porcentagem de crescimento de colônias puras e mistas.

Apesar dos suabes com as amostras obtidas também terem sido transportadas em meio Stuart, que é indicado para a manutenção de bactérias gram-negativas, não foi observado o crescimento de leveduras e de bactérias gram-negativas em nenhuma das amostras de sêmen coletadas durante o período da realização da pesquisa.

Após a identificação dos microrganismos pelo método da coloração de Gram, em que todas as bactérias apresentaram coloração azulada, sendo assim consideradas como positivas ao gram, realizaram-se algumas provas de sensibilidade com o intuito de realizar uma diferenciação presuntiva das bactérias dentro dos gêneros que foram isolados.

Inicialmente foi realizada a prova da catalase, a qual foi utilizada para separar os cocos gram-positivos em catalase-positiva ou catalase-negativa. Desta forma, os estafilococos e micrococos foram catalase-positivos, enquanto que os estreptococos, enterococos e corinebacterium foram identificados como catalase-negativos.

As provas da coagulase (Fotografia 15) concomitante com as provas da catalase auxiliam na diferenciação entre as espécies do gênero *Staphylococcus*, uma vez que o *S. aureus* apresentam-se como coagulase e catalase positivos, diferentemente dos demais do gênero.



Fotografia 14: Prova da coagulase para identificação de *S. aureus*.

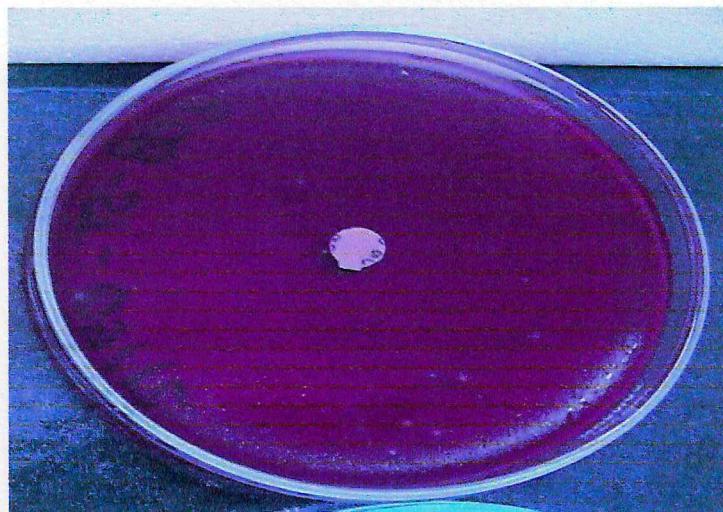
O teste da novobiocina (Fotografia 16) foi utilizado com a finalidade de se diferenciar presuntivamente o *Staphylococcus saprophyticus*, que se apresenta resistente à novobiocina, de outros estafilococos coagulase negativos que foram isolados nas amostras de sêmen. Dessa forma pôde-se presumir que não se tratava dessa espécie uma vez que todas as colônias que foram testadas foram sensíveis à novobiocina.



Fotografia 15: Prova da novobiocina para diferenciação do *S. saprophyticus*.

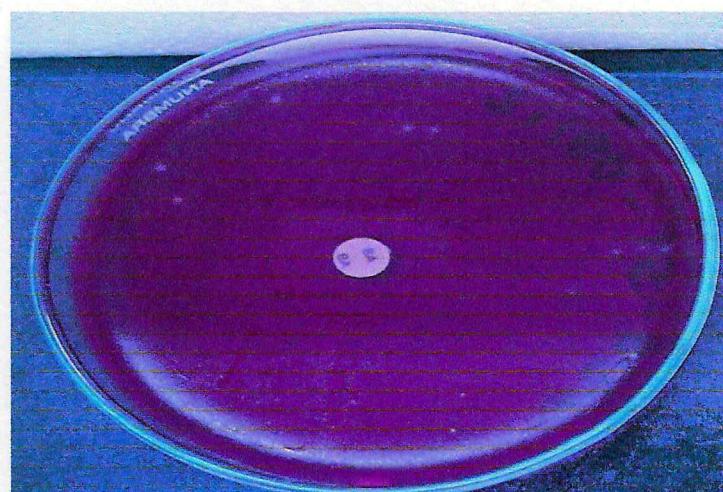
A optoquinina (Fotografia 17) foi utilizada com o objetivo de se diferenciar os estreptococos que cresceram em forma de *Streptococcus pneumoniae* (diplococos

pontiagudos), sensíveis a esse produto, de outras bactérias do gênero. Os resultados encontrados nos testes puderam mostraram que as bactérias isoladas para esse gênero não se tratavam do *S. pneumoniae*, pois em todas as placas testes pôde-se observar que havia resistência dos microrganismos inoculados em relação à optoquinina.



Fotografia 16: Prova da optoquinina para diferenciação de *S. pneumoniae*.

A bactracina (Fotografia 18) também foi um teste que auxiliou para a possível identificação de *S. pyogenes*, sendo este sensível à bacitracina, resultado que não foi encontrado levando-nos a presunção de que as bactérias isoladas no sêmen destes animais eram *Streptococcus sp.*



Fotografia 17: Prova da bacitracina para identificação de *S. pyogenes*.

Foram identificados cinco gêneros diferentes de bactérias isoladas no sêmen, destacando-se entre eles com maior freqüência o *Streptococcus* sp. (35,6%), *Staphylococcus* sp. (32%), *Micrococcus* sp. (28,4) e em menor, *Enterococcus* sp. (1,8%) e *Corynebacterium* sp. (2,2%).

Tabela 3: Número e freqüência de bactérias isoladas do sêmen coletado no período entre outubro de 2007 a janeiro de 2009.

Bactérias	Sêmen fresco	
	n	%
<i>Streptococcus</i> sp.	80	35,6
<i>Staphylococcus</i> sp.	72	32
<i>Micrococcus</i> sp.	64	28,4
<i>Corynebacterium</i> sp.	5	2,2
<i>Enterococcus</i> sp.	4	1,8
Total	225	100

Qui-quadrado =120,8933 ($P < 0,0001$)

Fonte: Fonte: Resultados do experimento, 2009.

Os testes estatísticos utilizados para avaliar a freqüência de crescimento dos microrganismos nas diferentes diluições (10^{-1} a 10^{-5}) revelaram que houve um decréscimo no número de bactérias encontradas quando a diluição era aumentada, revelando também não haver uma diferença significativa na média em relação ao crescimento entre os microrganismos contados. Assim como a técnica preconizava a contagem de placas com número de colônias entre 30 e 300 foi possível apenas a contagem dos crescimentos nas diluições 10^{-4} e 10^{-5} , uma vez que nas diluições mais baixas o número de colônias excedeu o limite de 300 UFC/mL.

Desse modo as médias de crescimento nas diluições a 10^{-4} foram de 175,5 UFC/mL para *Staphylococcus* sp., 139,5 UFC/mL *Streptococcus* sp., 88,5 UFC/mL *Micrococcus* sp., 125,5 UFC/mL *Enterococcus* sp. e 102,5 UFC/mL *Corynebacterium* sp., enquanto que para as diluições a 10^{-5} foram de 57,25 UFC/mL *Staphylococcus*

sp., 80,25 UFC/mL *Streptococcus* sp., 58,25 UFC/mL *Micrococcus* sp., 83,75 UFC/mL *Enterococcus* sp. e 66,0 UFC/mL *Corynebacterium* sp.

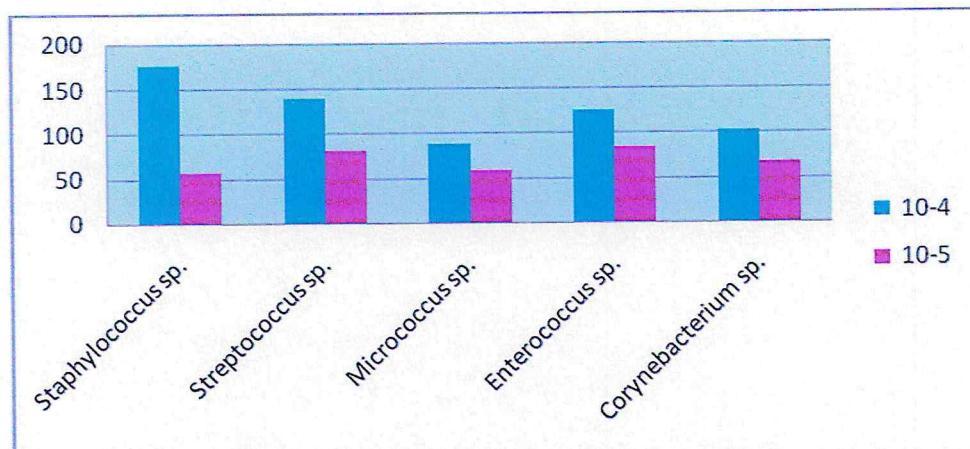
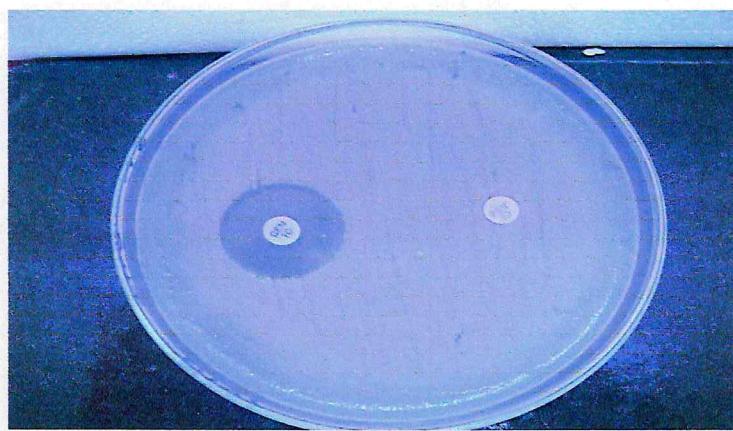


Gráfico 2: Média das colônias contadas nas diluições 10^{-4} e 10^{-5} para cada microrganismo isolado.

Nos testes de antibiogramas (Fotografia 20) realizados foram testados 11 tipos de antibióticos, todos de amplo espectro e alguns utilizados freqüentemente em diluidores de sêmen, dos quais se destacaram, no geral, com os maiores índices de sensibilidade a gentamicina (92,9%), amicacina (85,34%) e a cefotaxima (79,56%). Entre os que apresentaram uma sensibilidade intermediária estão a cefalotina (72,9%), ceftriaxona (72%), ampicilina (67,56%), cloranfenicol (67,56%), penicilina (64,90%) e eritromicina (61,34%).

Por fim a tetraciclina (44%) e a ceftazidima (11,56%) apresentaram os índices mais baixos de sensibilidade em relação aos microrganismos isolados no ejaculado.



Fotografia 18: Halos de sensibilidade e resistência respectivamente.

Tabela 4: Níveis de sensibilidade dos antibióticos testados frente aos microrganismos presentes no ejaculado.

Antibióticos	Sensibilidade		
	Alta	Média	Baixa
Gentamicina	92,90%		
Amicacina	85,34%		
Cefotaxima	79,56%		
Cefalotina		72,90%	
Ceftriaxona		72,00%	
Ampicilina		67,56%	
Cloranfenicol		67,56%	
Penicilina		64,90%	
Eritromicina		61,34%	
Tetraciclina			44,00%
Ceftazidima			11,56%

Fonte: Resultados do experimento, 2009.

Diante dos resultados apresentados na tabela 5, auxiliados pelos testes estatísticos, ANOVA e Teste Tukey, observou-se que cada uma das bactérias isoladas no experimento respondeu de forma diferenciada aos 11 antibióticos testados.

Desta forma, os *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. apresentaram maiores índices de sensibilidade quando foram expostos a cefalotina (70,8%; 77,5%), amicacina (88,8%; 90%) e gentamicina (88,8%; 95%), enquanto para *Micrococcus* sp. as drogas foram cefalotina (76,5%), ceftriaxona (73,4%), amicacina (75%) e gentamicina (93,75%).

Enquanto que os *Enterococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. apresentaram-se altamente sensíveis a um número maior de antibióticos, são eles a eritromicina (75%; 80%), cloranfenicol (100%; 80%), ceftriaxona (75%; 60%), amicacina (75%; 100%), ampicilina (75%; 100%), cefotaxima (100%; 100%), penicilina (100%; 100%) e gentamicina (100%; 100%).

Tabela 5: Sensibilidade dos antibióticos frente as bactérias isoladas do sêmen de caititus criados em cativeiro no período de outubro de 2007 a janeiro de 2009.

Bactérias	Grupo de Antibióticos Testados										
	TET	CFL	ERI	CLO	CRO	AMI	AMP	CTX	CAZ	PEN	GEN
<i>Staphylococcus sp.</i>	30	41,7	51	70,8	43	59,7	48	66,7	52	72,2	64
<i>Streptococcus sp.</i>	38	47,5	62	77,5	52	65,0	55	68,75	57	71,25	72
<i>Micrococcus sp.</i>	29	45,3	49	76,5	36	56,25	41	64,0	47	73,4	48
<i>Corynebacterium sp.</i>	1	20,0	1	20,0	4	80,0	4	80,0	3	60,0	5
<i>Enterococcus sp.</i>	1	25,0	1	25,0	3	75,0	4	100,0	3	75,0	3

Fonte: Resultados do experimento, 2009.

N = número de bactérias sensíveis

% = porcentagem em relação ao número de bactérias testadas.
 TET = Tetraciclina; CFL = Cefalotina; ERI = Eritromicina; CLO = Cloranfenicol;
 CRO = Ceftriaxona; AMI = Amicacina; AMP = Ampicilina; CTX = Cefotaxima;
 CAZ = Ceftazidima; PEN = Penicilina; GEN = Gentamicina.

6 DISCUSSÃO

O percentual de urina (7,8%) encontrado no ejaculado dos animais no presente experimento, foi superior ao relatado em trabalhos realizados em Minas Gerais com catetos, pois não foi relatada a ocorrência de urina no sêmen (COSTA; PAULA, 2005), São Paulo (3,7%) avaliando onça pintada (MORATO et al., 1999), porém foi inferior ao estudo realizado no Mato Grosso (25%) em quati (*Nasua nasua*) (VIANA et al., 2007). Isto pode ter ocorrido devido ao posicionamento da probe, pois em algumas vezes observou-se que a localização da mesma poderia estar estimulando o plexo urinário, além do número de coletas realizadas neste experimento também terem sido maiores que as realizadas pelos autores acima citados.

Em relação a contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro, observou-se crescimento acima de 300UFC/mL nas concentrações menos diluídas, resultado este diverge com o encontrado por Souza et al. (2006) em sêmen de caprinos e corrobora com o resultado analisado por Coelho (1976 apud SOUZA et al., 2006), Hernández et al. (2002) e Prado e Perez (2005) em bovinos.

Na contagem das UFC/mL realizadas neste trabalho em que a diluição final foi de 10^5 , não foi possível a associação entre o crescimento bacteriano nas diluições mencionadas com a alteração na motilidade dos espermatozoides, uma vez que a média da mesma manteve-se em torno de 60%, dados estes confirmados por Bennermann et al. (2000), os quais descrevem que algumas bactérias em concentrações de 5×10^5 UFC/mL não interferiram na motilidade dos espermatozoides e, por Prado e Pérez (2005) que relatam não haver nenhuma correlação entre a quantidade de bactérias e a fertilidade dos machos, sendo este último fator indiferente a abundância ou não de microrganismos no sêmen. Porém contrariam Pineda e Santander (2007) ao relatarem que um crescimento acima de 1×10^4 UFC/mL pode prejudicar a qualidade do sêmen.

Entre os microrganismos encontrados podemos destacar *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Micrococcus* sp., resultados estes que coincidem com os reportados tanto em sêmen congelado, como fresco de bovinos (HERNÁNDEZ et.

al., 2002; PRADO; PEREZ, 2005;), caprinos (Souza et al., 2006), suínos (WALTZ, 1968; MADEC et. al., 1994; CORRÊA et. al., 2001) peixe (ISAÚ, 2006) e homens (GRANOUILLET et al., 1982; GOLSHANI et al., 2006).

Além dessas bactérias também foram isoladas, em menor quantidade, *Enterococcus sp.* e *Corynebacterium sp.*, resultados que coincidem com Souza et al., (2006) avaliando o sêmen de caprinos, Waltz, 1968; Althouse e Lu (2005) em sêmen de suínos, Isaú (2006) em sêmen de piracanjuba e Granouillet, et al. (1982); Golshani et al. (2006) em sêmen de homens inférteis.

A simples presença desses microrganismos no sêmen pode não ter nenhum significado patológico, uma vez que estas bactérias podem ser encontradas usualmente no sêmen de reprodutores saudáveis não afetando assim o desempenho reprodutivo dos mesmos (SHEID, 2000; CORRÊA et al. 2001). Além disso, estes microrganismos podem estar presentes tanto nos órgãos genitais como no trato urinário dos animais, podendo também ser originários de infecções sistêmicas (MADEC et. al., 1994 apud BIANCH, 2006).

Outras fontes de contaminação do sêmen podem ser também provenientes de contato do ejaculado com secreções prepuciais, pêlos, mãos do manipulador, contato indireto com aerossóis, contaminação dos materiais e equipamentos utilizados na coleta (fômites), diluição e acondicionamento do sêmen (THIBIER; GUERIN, 2000), fatores estes que foram devidamente controlados durante as fases da coleta de sêmen para a realização deste experimento.

Apesar de grande parte dos microrganismos isolados no estudo comporem a microbiota, alguns deles são responsáveis por uma variedade de manifestações clínicas, sendo considerados importantes agentes infecciosos, tanto para os animais quanto para o homem (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008), manifestações estas que não foram observadas durante a condução do experimento.

Diante das diferentes possibilidades de contaminação expostas acima, presume-se que a origem mais provável das bactérias isoladas no presente estudo seja os animais, tendo como fonte secundária o meio ambiente.

Com relação à sensibilidade dos onze antimicrobianos utilizados, destacam-se com uma maior sensibilidade a Gentamicina, seguida da Amicacina e a Cefotaxima, resultados estes que ratificam os encontrados por Souza et al. (2006),

ao testar a eficiência da Gentamicina diante dos mesmos microrganismos isolados em sêmen de caprinos, além dos reportados por Hernández et al. (2002), que relata a eficiência da Amicacina às bactérias isoladas do sêmen de bovinos, porém divergem dos resultados encontrados por Althouse et al. (2000) e Hernández et al. (2002), que encontraram resistência bacteriana respectivamente em relação a gentamicina e a cefotaxima utilizada nos diluidores de sêmen de suínos e bovinos.

Por outro lado, a Tetraciclina, antibiótico bastante utilizado em diluidores e, a Ceftazidima, apresentou os menores índices de sensibilidade em relação às bactérias encontradas nos sêmen dos caititus.

Dentre os antibióticos testados os que apresentaram a maior eficácia, com níveis de sensibilidade elevados frente a todos os microrganismos isolados, foram a gentamicina e amicacina.

A sensibilidade individual de cada bactéria em relação aos antimicrobianos demonstrou mais uma vez que a gentamicina e a amicacina foram os mais eficientes, pois foram os únicos que mantiveram índices elevados de sensibilidade em todos os testes realizados.

Portanto, caso haja a necessidade de resfriamento do sêmen, dos animais deste experimento, esses dois antibióticos podem ser utilizados como primeira escolha para fazer parte do diluidor.

7 CONCLUSÕES

Na análise microbiológica do sêmen de caititus constatou-se que a grande parte das espécies identificadas no procedimento pode ser originária do sêmen destes animais, ficando o meio ambiente como fator secundário da contaminação.

A manutenção destas bactérias nas coletas sugere que as mesmas são resistentes às medidas de controle empregadas, porém a presença das mesmas no sêmen não interferiu na reprodução dos animais.

Caso essas bactérias venham a interferir na taxa de reprodução dos caititus, grande parte dos antibióticos testados nesse experimento pode ser utilizada como medida de controle, uma vez que se apresentaram eficazes frente às bactérias isoladas no sêmen desses animais.

Os dados apresentados neste trabalho contribuirão para a implementação de biotécnicas de reprodução de caititus criados captiveiro, além da preservação *in situ* e *ex situ* desses animais, uma vez que não existe na literatura nenhum trabalho realizado com identificação de microrganismos no sêmen desta espécie.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, N. I. Emprego do babaçu (*Orbignya phalerata*) como fonte energética para catetos (*Tayassu tajacu*). 2006, 80 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006

ALTHOUSE, G. C.; LU, K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 573-54, jan. 2005.

ALTHOUSE G. C. et. al. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 53, p. 1167-76, mar. 2000.

BENNEMANN, P.E. et. al. Motilidade Espermática e Integridade Acrossomal em Doses de Sêmen Suíno Refrigeradas e Inoculadas com *Escherichia coli* e *Sthaphylococcus aureus*. **Cienc. Rural**, v. 30, n. 2, p. 313-18. mar./abr. 2000.

BIANCHI, I. et al. Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno. **Rev Bras Reprod Anim.**, v.30, n.1, p.72-77, jan./jun. 2006.

CARDOSO, M. V.; VASCONCELLOS, S. A. Importância das micoplasmoses na fertilidade de touros. **Arq. Inst. Biol.**, v. 71, n. 2, p. 257-65, abr./jun. 2004.

CARVALHO, R.; CAGNOTO, D.G.; DANIEL, R. J. Aspectos Morfológicos dos Testículos e Funículos Espermáticos em Catetos. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 17, p. 178-78, 2000.

COELHO, N. M. Flora Bacteriana do prepúcio e sêmen de reprodutores *Bos Taurus*. 1976, 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1976.

CORRÊA M.N. et. al.. Inseminação artificial em suínos. Pelotas: Editora UFPEL, p. 181 2001.

COSER, R JR. et al. Parâmetros Reprodutivos em Função da Ordem de Parto em Catetos Criados em Cativeiro. **Caatinga**, v. 16, n. 1, p. 7-11, dez. 2003.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Coleta e Avaliação do Sêmen de Cateto (*Tayassu tajacu*). **Biota Neotrop.**, v.5, n. 2, p. 131-36, jul. 2005.

COSTA, D.S.; HENRY, M.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 1, p. 46-51, 2004.

DEL PORTO, G. B.; DERRICK, F. C. JR.; BANNISTER, E. R. Bacterial effect on sperm motility. **Urology**, v. 5, n. 5, p. 638-39, 1975.

DEUTSCH, L. A.; PUGLIA, L. R. R. **Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. Editora, Globo, Rio de J., 1988, 191p.

DIAS, F. E. F. et al.. Detecção de *Leptospira pomona* em sêmen bovino por eletroforese capilar fluorescente. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 394-99, set./dez. 2006.

DIEMER, T. et al. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 5, p. 271-77, 1996.

DUBOST, G. Behaviors of collared and white- lipped peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*) in relation to sexual receptivity of the female. **Acta Theriologica**. v. 46, n. 3, p. 305-18. 2001.

EDMONDSON, J.E., TALLMAN, K.L., HERMAN, H.A. Study of the types of bacterial in bovine semen and their effect upon motility. **Journal of Dairy Science**, v. 31, p. 681, 1948.

FUENTES, J. R. B.; GUTIÉRRES, E. P.; GALINA C. S. Comportamiento Reproductivo de Novillas *Bos taurus* X *Bos indicus* Inseminadas Artificialmente a estro Natural en el Tropico Seco de Costa Rica. **Vet. México**. v. 29, n.1, p. 57-66, 1998.

GANGADHAR, K.; RAO, A.; SUBBIAH, G. Bacterial and Fungal Type and Their Load in Frozen Semen of Buffalo Bull. **Indian Vet. Journal.** v. 63, n. 2, p. 48-53, 1986.

GALL, T. J., WILSON, M. E, ALTHOUSE, G. C. Quantification of bacteria in fractionated boar ejaculates. In: Swine Conference, 5, 1998, Minnesota. *Proceedings...* Minneapolis, Minesotta: The Conference, 1998. p.45.

GARCIA, G. W. et. al. The collared Peccary / Javelina / Sajino / Poco do Monte / Wild Hog / Pakira / Patira / Taitetu / Catete / Catto / Quenk [*Tayassu tajacu*, *Pecari tajacu*]. Booklet and Producers' Manual. Wildlife Farmers' and Producers' Booklet #2. 1 ed. Trinidad, Trinidad and Tobago, West Indies, 2005.

GOMES, M. J. P. et al. Epidimite ovina: Isolamento de *Actinobacillus seminis*, no RS-Brasil. **Arquivo da Faculdade de Veterinária-UFRGS.** v. 29, n. 1, p.55-58, fev. 2001.

GRANOUILLET, R et al. Study of the spermatic flora in infertile males. **Pathology Biologie.** v. 30, n. 1, p. 22 – 26 , jan. 1982.

GOLSHANI, M et al. Genital Tract Infection in Asymptomatic Infertile Man and its Effect on Semen Quality. **Iranian J. Publ. Health.** v.35, n. 3, p. 81-84, abr. 2006.

GUIMARÃES, D. A. et al. Manejo Reprodutivo e Produtivo do Caititu (*Tayassu Tajacu*) em Cativeiro. **Rev. Ciênc. Agrárias.** Belém, n. 43, jun. / jul. 2005.

HERNÁNDEZ, P. J. E. et al. Estudio Bacteriológico y Antibiograma de Semen Descongelado de Bovino. **Rev. Salud. Anim.** v. 24, n. 3, p. 191-97, set. 2002.

ISAÚ, Z. P. População Bacteriana, Motilidade Espermática e Fertilidade de Sêmen de Piracanjuba *Brycon Orbignyanus* (Valenciennes, 1849) Submetido ao Resfriamento.2006, 109 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Lavras, 2006.

JOVICIN, M.; PUPAVAC, V.; VESELINOVIN, S. Study of the Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on Bull Spermatozoa in vitro. **Veterinarski Glasnik.** v.45, n. 7, p. 453-55, jul. 1991.

KOZUMPLIK, J. Effect of standard of hygiene in the care for breeding boars and of the technic of semen collection on the number of pathogens in the boar ejaculate. **Vet. Med (Praha)**. v. 20, n.9, p. 519-25, set. 1975.

LARS, E. E. Fundamentals of veterinary reproductive endocrinology. Seminario de actualizacion en endocrinologia de la reproduccion. Facultad de Agronomia, Montevideo, Uruguay. p. 1-118, 1995.

LE PENDU, Y. et al. **Biometria do caititu (*Tayassu tajacu*) criado em cativeiro na Amazônia**. Anais do XX Encontro Anual de Etologia. Fabíola da Silva Albuquerque. Natal (Org.). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2002. p. 405.

LIMA, F. P. et al . Effect of adding calcium chloride on the spermatic quality and aminotransferase aspartate in cool swine semen. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1506-11, set./out. 2007.

LOMBARDO, M. P; THORPE, P.A. Microbes In Tree Swallow Semen. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 36, n. 3 p. 460-68, jul. 2000.

MADEC, F; ALBINA, E; VANNIER, P. Les agents infectieux dans le sperme de verrat. In: Association Francaise de Medecine Veterinaire Porcine, 4, 1994, Maisons-Alfort, France. *Proceedings...* Maisons-Alfort: AFMVP, 1994, 150p.

MALIGNO, M. A., et al.. Aspectos Macroscópicos e Morfométricos dos Testículos em Catetos e Queixadas. Biota Neotrópica. v. 4, n. 2, p. 1-13, ago. 2004.

MAYOR, P; et al. Reproductive performance of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Animal Reproduction Science**, v.102, n.1 p.88-97, nov. 2006.

MAYOR, A. P., FITA, D. S., BÉJAR, M. L. Sostentabilidad em La Amazonía y Cria de Animales Silvestres. 1 ed. Ira, Iquitos – Peru, 2007.

MOGRA, N. N. et al.. Non-specific seminal tract infection and male infertility: a bacteriological study. **J. Postgrad. Med**, v. 27, n. 2, p.99-104, 1981.

MORATO, R. G. et al. Semen collection and evaluation in the jaguar (*Panthera onca*). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 35, n. 4, set. 1998.

NÁREZ, G. M. et al. Epidimitis ovina: estudos bacteriológico y sorológico. **Vet. Mex.** v. 30, n. 4, p. 329-36, 1999.

NOGUEIRA FILHO, S. L. G. **Criação de cateto e queixada**. Viçosa: Centro de Produções Técnicas (CPT), 1999.

OLMOS, F. Diet of sympatric Brazilian caatinga peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*). **Journal of Tropical Ecology**, v.9, n. 2, p.255-58, 1993.

PINEDA, Y; SANTANDER, J. Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos em granjas porcina em Venezuela. **Zootecnia Tropical**. v. 25, n. 3, p. 173-77, jul. 2007.

PINHEIRO, M. J. P. et. al. Avaliação de Parâmetros Reprodutivos em Catetos (*Tayassu tajacu*) Criados em Cativeiro. **Caatinga**, v. 14, n. 1, p. 71-74, dez. 2001.

PRADO, E. A. S.; PÉREZ, R. M. Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v. 6, n. 10, p. 1-8, out. 2005.

PUENTE-REDONDO, V.A et al. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in Spain. **Journal of Comparative Pathology**. v.122, n.2, p. 217-22, fev. 2000.

RAMASWAMY, V. et al. Microbial Flora of Buffalo Frozen Semen and Their Antibioticogram. **Indian J. Animal Science**. v.61, n.8, p. 843-45, 1991.

ROBINSON J. G, EISENBERG J. F. Group size and foraging habits of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). **Journal of Mammalogy**, v. 66, n. 1, p. 153-55, 1985.

RODRIGUES, G. C. Endoparasitas ocorrentes em caititus (*Tayassu Tajacu*), pacas (*Agouti paca*) e cutias (*dasyprocta* sp.), criados em cativeiro no Estado do Pará. 2007, 40f. Trabalho de Conclusão de curso em Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2007.

RUHNKE, H.L. Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. Ames: Iowa State University Press, p.56-62, 1994.

SANTOS, T.C. et al . Vascularização dos ovários, tubas uterinas e útero em catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) e queixadas (*Tayassu pecari*, Link, 1795). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 37, n. 4, 2000.

SOUZA, A. F. et. al.. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Braz. J. Vet.**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 329-36, out. 2006.

SCHEID, I.R. Aspectos de biossegurança e higiene associados a inseminação artificial em suínos. On Line. Concórdia, 2000. Disponível em www.cnpsa.embrapa.br/abraves-sc/pdf/Memorias2000/5_Isabel.pdf. Acesso em 15/01/20089.

SCHEID, I. R; SILVEIRA, P.R.S. Uma análise da IA na suinocultura brasileira .**Suín. Cia**, v. 1, n. 1, p. 25-28, jan. 2002.

SONNER, J.B. et al. Aspectos macroscópicos e morfométricos dos testículos em catetos e queixadas. **Biota Neotropica**, v.4, n.2, p.1-13, ago. 2004.

SOWLS, L.K. **Javelinas and other Peccaries: Their Biology, Management, and Use**. 2 ed. University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 1997.

TABER, A .B., DONCASTER, C.P., NERIS, N.N., COLMAN, F.H. Ranging behavior and population dynamics of the Chacoan peccary, *Catagonus wagneri*. **Mammalia**. v. 58 p. 61-71. 1993.

TEANKUM, K. et al. Detection of chlamydiae in boar semen and genital tracts. **Veterinary Microbiology**. v. 116, n. 1, p. 149 – 157, ago. 2006.

THIBIER, M; GUERIN B. Higienic aspects of storage and use semen for artificial insemination. **Anim. Rep. Sci.** v.62, n.2, p.251, ago. 2000.

VENTURIERI, B; LE PENDU, Y. Padrões de atividades de caititus (*Tayassu tajacu*) em cativeiro. **Rev. etol.**, vol.8, nº.1, p.35-43, jun. 2006.

VIANA, C.T.R et al. Avaliação do método de eletroejaculação para obtenção e análise de sêmen de quatis (*Nasua nasua*) mantidos em cativeiro. **Acta Scientia Veterinariae.** v. 35, n. 2, p. 392-94, 2007.

WALTZ, F. A et al. Bacteriological Studies of Boar Semen. **Journal Animal Science.** v. 27, n. 5, p. 1357-62, 1968.

