

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

Franciane Batista¹, Gabriele Ramos¹, Paula Wildemann¹, André Thaller Neto¹,
Sandra Maria Ferraz¹, Eliana Knackfuss Vaz¹

¹ CAV-UDESC

Correspondência: Franciane Batista: batistafran@hotmail.com

RESUMO: A Inseminação Artificial é uma biotécnica da reprodução estabelecida e aplicada na suinocultura cujo objetivo é a maximização do uso dos ejaculados, mantendo e melhorando a eficiência reprodutiva. Entretanto, quando há contaminação bacteriana no sêmen, pode haver comprometimento da viabilidade espermática. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a contaminação bacteriana em ejaculados colhidos em centrais de inseminação artificial e relacionar com as características quantitativas e qualitativas dos ejaculados, além de testar a sensibilidade dos agentes isolados frente a diferentes antibióticos. Foi coletado sêmen suíno de três centrais de inseminação artificial em Santa Catarina. Essas amostras foram submetidas à análise microbiológica, onde foi realizado o isolamento, identificação, contagem bacteriana além dos antibiogramas. Estas amostras foram também avaliadas quanto à motilidade, vigor, aglutinação e concentração. Para esta avaliação foram utilizados dados fornecidos pela empresa. Foram realizados esfregaços das amostras de sêmen e corados com eosina-negrosina para a avaliação da morfologia espermática. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS. Houve isolamento de 17 diferentes gêneros bacterianos, entre os quais os mais frequentes foram *Staphylococcus* sp. *Proteus* sp. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., porém não houve uma correlação significativa ($P>0,05$) quando comparado o número de unidade formadora de colônia /mL do sêmen com motilidade, concentração e alterações morfológicas. Foi encontrado um efeito isolado do gênero *Staphylococcus* sp. $P(<0,05)$ provocando uma diminuição na motilidade dos espermatozoides. A maioria dos agentes bacterianos mostrou-se resistentes aos antibióticos testados.

Palavras-chave: antibiograma; bactérias; cachaço; sêmen

INFLUENCE OF BACTERIAL CONTAMINATION IN PIG SPERM PARAMETERS AND RESISTANCE PROFILE OF ISOLATED AGENTS

ABSTRACT: Artificial insemination is an established biotech and applied reproduction in pigs whose objective is to maximize the use of ejaculated, maintaining and improving reproductive efficiency. However, when there is bacterial contamination in semen, may be impaired for sperm viability. The aims of this study was to investigate the bacterial contamination in semen collected in artificial insemination centers and related to quantitative and qualitative qualities, and test the sensitivities of the isolates against different antibiotics. Boar semen was collected three artificial insemination centers in Santa Catarina. These samples were submitted to microbiological analysis, where we performed the isolation, identification, bacterial count beyond antibiograms. These samples were also evaluated for motility, vigor, concentration and agglutination. For this evaluation we used data provided by the company. Smears were prepared from semen samples and stained with eosin-negrosina for the evaluation of sperm morphology. The data were subjected to analysis of variance using the GLM procedure of SAS statistical package. The 17 different bacterial genera was isolated, among which the most frequent were *Staphylococcus* sp. *Proteus* sp. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. but there was a significant correlation ($P > 0.05$) when comparing the number of colony forming unit / mL of semen with motility, concentration and morphological changes. We found an isolated effect of the genus *Staphylococcus* sp. ($P < 0.05$) causing a decrease in sperm motility. Most bacterial pathogens proved resistant to antibiotics.

Key Words: antibiogram; bacteria; boar; semen

INTRODUÇÃO

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

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidos ejaculados de cachaços pertencentes a três centrais de inseminação artificial. As colheitas foram realizadas com o auxílio de manequim (Bortolozzo & Wentz, 2005) em diferentes épocas (central 1 em julho de 2010, central 2 em outubro de 2010 e central 3 em de março de 2011). Após a colheita, foi retirado uma alíquota (3mL) de sêmen e armazenado em

tubos cônicos com capacidade de 1,5 mL, essas amostras foram colocadas em caixas isotérmicas com gelo descartável e levadas ao laboratório de Bacteriologia do CEDIMA - CAV/UDESC, onde foram processadas em no máximo 12 horas. A quantidade de amostras colhidas nas diferentes centrais de inseminação artificial variou conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de amostras colhidas nas diferentes centrais de inseminação durante o período do experimento.

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

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

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

Os antibióticos foram selecionados de acordo com a maior utilização na suinocultura. Para bactérias Gram positiva foram: gentamicina (GEN), norfloxacina (NOR), rifampicina (RIF), tetraciclina (TET), doxicilina (DOX), florfenicol (FLF), vancomicina (VAN), ampicilina (AMP), ceftiofur (CTF), estreptomicina (EST), lincomicina (LIN) e penicilina (PEN). Para Gram negativas foram usados: cefalexina (CFE), trimetropim (TRI), ciprofloxacina (CIP),

bacitracina (BAC), enrofloxacina (ENO), neomicina (NEO), ceftiofur (CTF), ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), tetraciclina (TET), doxicilina (DOX) e cefalotina (CFL). As placas foram colocadas em estufa bacteriológica, da marca FANEM LTDA e modelo 002/2 à 37°C por 24 horas e após foi realizado a leitura. A zona de inibição de cada disco foi medida em milímetros com o auxílio de uma régua e comparada com uma tabela padrão de interpretação (Vermelho et al. 2006).

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

Foi realizado esfregaço das amostras de sêmen e corados com eosina-negrosina para a avaliação da morfologia espermática. Foram observados no mínimo 200 células espermáticas por lâmina em microscópio óptico de campo claro, marca ASKANIA, modelo RML com aumento mínimo de 1000X (Bortolozzo & Wentz, 2005).

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Tabela 2 - Amostras de sêmen colhidas nas diferentes centrais de inseminação durante o período do experimento, que apresentaram contaminação.

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

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

O método de colheita de sêmen foi o mesmo nas três centrais de inseminação artificial, sendo este o método da mão enluvada (Hancock & Hovel, 1959), mas apesar de tratar-se de um método altamente eficaz, quando não realizado de forma adequada pode favorecer a contaminação bacteriana.

Influência da contaminação bacteriana sobre os parâmetros espermáticos de suínos e perfil de resistência dos agentes isolados

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

Tabela 3 - Diferentes gêneros bacterianos isolados nas amostras de ejaculados colhidos nas centrais de inseminação durante o período do experimento.

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

Foi analisado o efeito das variáveis sempre comparando o número de UFC/mL com outra característica, conforme apresentado na tabela 4.

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

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

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

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

As doses inseminantes após grande período de armazenamento tendem a ter um aumento na população bacteriana devido à temperatura que deve ser armazenada. Preconiza-se que entre a coleta e o armazenamento das doses haja uma queda gradual e contínua de temperatura até alcançar o ponto de armazenamento entre 15 e 18°C de temperatura (Bortolozzo & Wentz, 2005). No entanto, essa temperatura

não é capaz de impedir o crescimento bacteriano, mesmo os diluentes possuindo em sua fórmula antibióticos nem sempre todos os gêneros bacterianos apresentam-se sensíveis ao mesmo. Segundo Rideout *et al.* (1982) com o aumento da população bacteriana, haverá uma competição maior entre bactérias e espermatozoides pelo mesmo substrato comprometendo a qualidade espermática.

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

diretamente das centrais de inseminação artificial e em muitas amostras analisadas havia diferentes gêneros bacterianos na mesma amostra e sabe-se que bactérias produzem metabólitos que podem ser tóxicos para outros microrganismos (Tortora *et al.*, 2000).

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

Influência da contaminação bacteriana sobre os parâmetros espermáticos de suínos e perfil de resistência dos agentes isolados

Tabela 5 - Bactérias isoladas e sua sensibilidade frente aos diversos antibióticos testados

BACTERIAS ISOLADAS	C	A	T	N	C	C	E	G	B	T	D	R	N	L	F	P	V	E
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	S	I	-	-	S	-	S	-	S	R	R	S	S	R	-	-	-
<i>Streptococcus</i> sp.	-	S	R	-	-	S	-	R	-	R	S	R	R	S	R	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	-	I	S	-	-	S	-	R	-	S	S	S	R	S	R	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
<i>Citrobacter</i> sp.	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	-
<i>Campylobacter</i> sp.	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
<i>Yersinia</i> sp.	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
<i>Serratia</i> sp.	R	R	R	S	R	I	S	I	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-
<i>Shigella</i> sp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-

R: resistente; I: intermediário; S: sensível

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

Dentre os gêneros bacterianos isolados a bactéria que se mostrou mais sensível aos antibióticos testados foi o *Campylobacter* sp., porém não houve grande frequência de isolamento desse gênero bacteriano. *Shigella* sp. e

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

CONCLUSÃO

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

espermatozóides em amostras que foram isoladas *Staphylococcus* sp.

REFERÊNCIAS

- ALTHOUSE, G.C.; KUSTER, C.E.; CLARK, S.G. et al. Field investigations of bacterial contaminations and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1167-1176, 2000.
- ALTHOUSE, G.C.; LU, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v.63, n.3, p.573-584, 2005.
- BIANCHI, I.; SCHAAF, S.; CORREA, K. E. et al., Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno. **Revista Brasileira Reprod. Anim.**, v.30, n.1-2, p.72-77, 2007.
- 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. Porto Alegre, 254 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BENNEMANN, P.E.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; et al. Motilidade espermática e integridade acrosomal em doses de sêmen suíno refrigeradas e inoculadas com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.313-318, 2000.
- BORTOLOZZO, F & WENTZ, I. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Ed. Pallotti, Porto Alegre, 2005.
- COLEBRANDER, B.; FEITSMA, H.; GROOTEN, H.J., et al. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl.48, p.207-215, 1993.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA, T. et al., **Inseminação artificial em suínos**. Ed: Marcio Nunes Corrêa, Pelotas – RS, p. 181. 2001
- GOLDENBERG, A.M. Fatores relacionados à contaminação bacteriana das doses inseminantes e suas consequências. **Suinocultura em Foco**, v.25, n.1, p.8-9, 2008.
- HANCOCK, J.L.; HOWELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v.71, p.664-665, 1959.
- OLIVEIRA, S.J. **Guia Bacteriológico Prático**, Ed. ULBRA, Canoas, RS. 2000.
- RIDEOUT, M.I.; BURNS, S.J.; SIMPSON, R.B. et al. Influence of bacterial products on the mobility of stallions spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.32, p.35-40, 1982.
- SAS Institute INC. **SAS User's Guide: Statistical Analysis System**. Release 8.0, Cary, North Carolina, U.S.A., 2000.
- SCHEID R. I. **Aspectos de biossegurança e de higiene associados à inseminação artificial em suínos**. Encontro técnico ABRAVES-SC, Concórdia, v.1, p.44-55. 2000.
- SOBESTIANSKY J, MATOS MPC. Doenças transmissíveis via sêmen. In: Simpósio Internacional de Reprodução e Inseminação Artificial de Suínos, 7, 2000, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2000. p.295-297.
- VAZ, E.K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n.2, p.147-150, 2009.
- VERMELHO, A.B. et al. **Práticas de microbiologia: antibiograma**. Rio de Janeiro. Guanabara, 2006.