

## ELABORAÇÃO DE UM PROGRAMA DE ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE (APPCC) PARA CENTRAIS DE PROCESSAMENTO DE SÊMEN BOVINO

BRUNA MION<sup>1</sup>; KARINA LEMOS GOULARTE<sup>2</sup>; THOMAZ LUCIA JUNIOR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [brunamion@veterinaria.med.br](mailto:brunamion@veterinaria.med.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [kgoularte@hotmail.com](mailto:kgoularte@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [Tomjr2004@yahoo.com.br](mailto:Tomjr2004@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é a biotécnica mais utilizada comercialmente (MOUSTACAS *et al.*, 2010), pois contribui com o ganho genético, além de evitar doenças transmitidas sexualmente (HUSSEIN *et al.*, 2008). No entanto, para ter sucesso na utilização dessa biotécnica deve ser mantida a qualidade do sêmen. Essa qualidade é afetada pela contaminação bacteriana, portanto esse tipo de prejuízo é considerado um dos pontos críticos na produção de doses inseminantes (GOLDBERG *et al.*, 2013).

O método de armazenamento das palhetas produzidas é em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C. Entretanto, a maioria dos microorganismos possui a capacidade de sobreviver nessas condições, uma vez que o sêmen é acondicionado em meios com a capacidade de estabilizar as células espermáticas nessa temperatura, o que favorece a estabilização dos microorganismos conjuntamente (BIELANSKI, 2012).

A contaminação das amostras seminais pode ser proveniente de infecções locais ou sistêmicas do macho doador de sêmen, assim como a introdução inadvertida de microorganismos durante a coleta, processamento ou armazenamento (BIELANSKI, 2007). Essa introdução pode estar relacionada com a contaminação da área da coleta, qualidade da água, contaminação de termômetros e pipetas (ALTHOUSE & LU, 2005), contaminação da vagina artificial, do diluente do sêmen, do nitrogênio líquido e frascos de armazenamento (THIBIER & GUERIN, 2000).

Os microorganismos presentes no ejaculado podem produzir endotoxinas que podem danificar a capacidade de fertilização dos espermatozoides (BOUSSEAU *et al.*, 1998). Além disso, podem diminuir a vida útil do ejaculado (YÁNIZ *et al.*, 2010), através do enfraquecimento de sua motilidade, causando adesão e aglutinação celular (WOLF *et al.*, 1993); e modificando sua morfologia, lesando peça intermediária, membrana plasmática e acrossoma (DIEMER *et al.*, 2000).

Devido a esses fatores torna-se importante a implantação de programas de controle da qualidade como o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), já utilizado nas indústrias alimentícia (Portaria N° 46, 1998), petroquímica e da aviação (WHO, N° 908, 2003). Esse sistema permite uma abordagem científica e sistemática de controle dos processos identificando e atuando sobre as etapas onde possam ocorrer perigos e situações críticas (Portaria N° 46, 1998). Logo, o mapeamento e o monitoramento de todas as etapas envolvidas no processamento do sêmen, através de programas como o APPCC, permitirão a sua correção, eliminação ou redução, o que favorecerá, ao final do processo, a obtenção de um produto de qualidade certificada.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o resultado da implantação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) em uma central de coleta e processamento de sêmen (CCPS) bovino.

## 2. METODOLOGIA

Realizou-se a coleta de material para quantificação microbiológica das etapas identificadas como potencialmente danosas para a qualidade do produto final. Para avaliar as possíveis fontes de contaminação para o sêmen, coletou-se amostra da vagina artificial (VA) e, em seguida, do sêmen puro (SP), sêmen resfriado (SR), sêmen envasado (SE), sêmen congelado/descongelado (SCD), diluente pré-diluição (DP), fração A do diluente (DA), fração B do diluente (DB) e do tubo flexível da máquina de envase (CAN). Essas amostras foram pré-definidas a partir da realização de algumas coletas para ajuste do trabalho no laboratório, identificando-se uma variação na contaminação durante o processamento do sêmen.

Para coletar amostra da vagina artificial e do tubo flexível da máquina de envase realizou-se lavagem dos mesmos com 10 mL de água peptonada tamponada autoclavada recolhendo o lavado em um frasco estéril (amostra  $10^0$ ) para posterior semeadura em ágar para contagem (PCA). Do sêmen puro, sêmen envasado e sêmen congelado/descongelado foram coletados 0,4 mL de cada diluindo-se em 3,6 mL de água peptonada tamponada autoclavada ( $10^{-1}$ ) realizando-se diluições subseqüentes com 1 mL dessa diluição em 9 mL de água peptonada tamponada ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ). As amostras do sêmen resfriado, do diluente pré-diluição, frações A e B do diluente foram utilizadas puras, sem diluição ( $10^0$ ) sendo coletadas e armazenadas em microtubos de 2 mL previamente autoclavados para posterior semeadura.

Foram utilizadas 10 rotinas de coleta de sêmen para avaliação da contaminação microbiológica, todas as amostras foram semeadas em duplicata, utilizando-se 0,5 mL em cada placa com aproximadamente 15 mL de Agar para contagem. Após, as placas foram mantidas em estufa a 37°C por 72 horas. Passado esse tempo, realizou-se a contagem das placas com as diluições que possuíam entre 30 e 300 unidades formadoras de colônia (UFC) (OIE, 2001). Para o cálculo da contaminação somou-se a contagem das duas placas (UFC) chegando-se a um valor por mL multiplicando-se em seguida pela diluição que permitiu a realização da contagem.

A partir da análise dos resultados encontrados com a coleta das amostras foram sugeridas algumas padronizações do processo com o objetivo de diminuir a contaminação encontrada antes da implantação do APPCC. Após a incorporação das novas práticas no CCPS foram realizadas novas coletas das amostras, conforme descrito anteriormente, para a comparação dos resultados.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 sumariza os resultados obtidos em UFC/mL nas diferentes amostras coletadas no período de pré-implantação e pós-implantação do programa.

**Tabela 1:** Contagem das UFC/mL dos diferentes locais de coleta antes da implantação e depois da implantação de um APPCC em um CCPS.

Amostra	Pré-implantação	Pós-implantação
Vagina artificial	81,1 ± 19,5 <sup>a</sup>	19,5 ± 19,5 <sup>b</sup>
Sêmen Puro	41.809,0 ± 19.811,0 <sup>a</sup>	9.828,9 ± 4.129,8 <sup>b</sup>
Diluyente P	115,0 ± 59,5 <sup>a</sup>	1.891,8 ± 849,9 <sup>a</sup>
Diluyente A	55,9 ± 27,9 <sup>a</sup>	2.439,4 ± 1.054,5 <sup>a</sup>
Diluyente B	78,0 ± 58,7 <sup>a</sup>	872,7 ± 652,2 <sup>a</sup>
Sêmen Resfriado	239,9 ± 107,6 <sup>a</sup>	1.491,0 ± 516,7 <sup>b</sup>
Tubo flexível	2,5 x 10 <sup>6</sup> ± 521.954,0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Sêmen envasado	1,2 x 10 <sup>6</sup> ± 659,1 <sup>a</sup>	1.726,1 ± 458,4 <sup>a</sup>
Sêmen congelado	23.289,0 ± 4.114 <sup>a</sup>	7.319,4 ± 3.454,7 <sup>b</sup>

A contaminação bacteriana diminuiu após a implantação do programa de APPCC na maioria dos locais selecionados para a coleta das amostras. Essa diminuição se deve às características do programa APPCC, que proporciona uma metodologia formal, estrutural, altamente específica, eficiente, com custo relativamente baixo e eficaz para identificar riscos físicos, químicos e biológicos (VILAR *et al.*, 2012).

Após a primeira avaliação da contaminação do processamento de sêmen foi sugerida a substituição do tubo flexível da máquina de envase, posteriormente a sua utilização, por tubos novos. Analisando os resultados, pode-se perceber que essa prática, embora simples, gera resultados eficientes, já que na segunda coleta não houve crescimento bacteriano.

A contaminação microbiológica apresentou valores superiores na avaliação da fração A e B do diluyente. Consequentemente, ocorreu aumento na contagem do diluyente P, por ser constituído pela união das frações A e B. A partir da diluição dos ejaculados com diluentes apresentando contaminação microbiológica, pôde-se verificar o aumento das UFC do sêmen resfriado. A contaminação bacteriana dos diluentes de sêmen é o mais grave problema para a inseminação artificial (HUSSEIN *et al.*, 2008), pois levam a contaminação das doses, diminuindo a vida útil e prejudicando a fertilidade (YÁNIZ *et al.*, 2010).

O aumento na contagem de UFC nos diluentes e sêmen resfriado foi identificado no decorrer do experimento e constatou-se que a causa desse aumento foi a ineficiência dos antibióticos utilizados na confecção desses meios. O uso prolongado de antimicrobianos pode ocasionar perda de seu potencial de ação devido ao desenvolvimento de resistência dos microrganismos presentes (JOHANSSON *et al.*, 2004). Portanto, a troca de princípio ativo deve ser recomendada, além da avaliação periódica da eficiência dos antibióticos utilizados.

#### 4. CONCLUSÕES

A implementação de um sistema APPCC em uma central de coleta e processamento de sêmen auxilia no controle das técnicas empregadas,

permitindo uma avaliação mais precisa das etapas do processo e garantindo a maior qualidade das doses de sêmen produzidas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTHOUSE, G. C., LU, K. C., 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**. USA. v.63, p. 573-584.
- BIELANSKI, A. 2007. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. **Theriogenology**. Canada, v. 68, p. 1-22.
- BIELANSKI, A. 2012. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. **Theriogenology**. Canada. v.77. p. 467-482.
- BOUSSEAU, S., BRILLARD, J. P., MARQUANT-LE GUIENNE, B., GUERIN, B., CAMUS, A., LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin diluents. 1998. **Theriogenology**. v. 50, p. 699-706.
- DIEMER, T., HUWE, P., MICHELMANN, H.W., MAYER, F., SCHIEFER, H.G., WEIDNER, W., 2000. Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. **Int. J. Androl**. v. 23, 178–186.
- GOLDBERG, A. M. G., ARGENTI, L. E., FACCIN, J. E., LINCK, L., SANTI, M., BERNARDI, M. L., CARDOSE, M. R. I., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F. P. 2013. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. **Research in Veterinary Science**. Brasil. v. 95, p. 362-367.
- HUSSEIN, Z. M., EL-TAYEB, T. A., EL-KERABY, F., HARITH, M. A., 2008. The effect of diode on the bacterial contamination of semen medium for artificial insemination. **Biologicals**. Egypt. v. 36, p. 303-307.
- JOHANSSON, A., GREKO, E., ENGSTRÖM, E. B., KARLSSON, M., 2004. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. **Veterinary Microbiology**. Sweden. v.99, p.251-257.
- MOUSTACAS, V.S., XAVIER, M.N., CARVALHO-JÚNIOR, C.A., COSTA, E.A., HENRY, M., SANTOS, R.L., 2010. Effect of extender supplementation with various antimicrobial agents on viability of *Brucella ovis* and *Actinobacillus seminis* in cryopreserved ovine semen. **Theriogenology**. Brasil. v.74. p. 1476–1481.
- THIBIER, M., GUERIN, B., 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**. France. v. 62, p. 233-251.
- VILAR, M, J., RODRIGUEZ-OTERO, J. L., SANJUAN, M. L., DIEGUEZ, F. J., VARELA, M., YUS, E., 2012. Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank the milk quality. **Trends in Food Science & Technology**. v.23, p. 4-12.
- WOLF, H., PANHANS, A., STOLZ, W., MEURER, M., 1993. Adherence of Escherichia coli to sperm: a mannose phenomenon leading to agglutination of sperm and E. coli. **Fertil. Steril**. v. 60, 154–158.
- YÁNIZ, J. L., MARCO-AGUADO, M. A., MATEOS, J. A., SANTOLARIA, P., 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. **Animal Reproduction Science**. Spain. v. 122. p. 142-149.