

R8704

ETUDE DE CERTAINES CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES DE LA SEMENCE DE VERRAT, UTILISEE EN INSEMINATION ARTIFICIELLE

F. MADEC

Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, Station de Pathologie Porcine, B.P. 9, 22440 PLOUFRAGAN
avec la collaboration technique de F. PABOEUF

I - INTRODUCTION

L'insémination artificielle offre en élevage porcin des perspectives fort intéressantes en ce qui concerne les possibilités de diffusion du progrès génétique. Il est également admis qu'elle permet de réduire le risque sanitaire en évitant le déplacement des reproducteurs d'un élevage à l'autre. Le risque se trouve alors limité à la diffusion des seuls contaminants véhiculés par la semence (THACKER, 1984). A cet égard les virus comme celui de la maladie d'Aujeszky sont le plus à redouter (VANNIER et GUEGUEN, 1979 ; MEDVECZKY et SZABO, 1981). En dépit des avantages incontestables de l'insémination artificielle, la technique a connu un essor assez différent selon les pays. Actuellement en France elle occupe une modeste place avec environ 6 à 7 % des accouplements (Bouglher, 1983). Le fait que les résultats de l'insémination artificielle dans les élevages "tout-venants" soient le plus souvent sensiblement inférieurs à ceux obtenus en saillie naturelle n'est peut être pas étranger à cette situation (Brandt et Glodek, 1985 ; Reed, 1984 ; Madec et Josse, 1984).

Toutefois on observe d'importantes variations selon les troupeaux et l'insémination artificielle donne d'excellents résultats dans certains élevages (Le Denmat *et al.*, 1983 ; Chatelier *et al.*, 1986). Récemment il a été démontré que la semence récoltée et préparée sur la ferme était sujette à des contaminations bactériennes, celles-ci pouvant se traduire défavorablement sur le résultat de l'accouplement (Madec, 1986). Il nous a donc semblé judicieux de conduire quelques observations supplémentaires sur le sujet.

II - MATERIEL ET METHODE

L'appréhension de la contamination bactérienne de la semence et de l'évolution de celle-ci dans le temps s'est déroulée en 2 phases :

- une étude préliminaire est conduite en février 1986 sur un nombre restreint de prélèvements. Elle fait suite à l'observation dans 2 élevages d'une relation entre l'utilisation d'une semence fortement souillée et la réduction du taux de mise bas chez les truies.
- une seconde étude réalisée en juin 1986 est destinée à poursuivre les observations sur un échantillon élargi sans toutefois se préoccuper des conséquences sur la fertilité.

1 - RÉALISATION DE L'ÉTUDE PRÉLIMINAIRE

Deux élevages dans lesquels l'éleveur est rompu à la méthode d'insémination artificielle avec collecte des verrats de la ferme ont été retenus. L'un d'entre eux comporte 250 truies et 10 verrats et le second environ 80 pour 3 verrats. La semence est collectée soit sur truie soit sur mannequin et aucune contrainte particulière n'est imposée à l'éleveur ni pour la récolte ni pour la préparation de la semence. Le matériel utilisé est celui de l'élevage, le dilueur correspond à la formule communément employée en France au moment du contrôle.

TABLEAU 1
COMPOSITION DU DILUEUR UTILISÉ POUR LA PRÉPARATION
DES DOSES D'INSÉMINATION (1)

Glucose anhydre	60 g
Citrate de Na, 2 H ₂ O	3,6 g
Bicarbonate de Na	1,2 g
E.D.T.A. (disodique)	3,7 g

(1) Le dilueur ne comporte pas d'antibiotique.

Le nombre de dilutions réalisées par éjaculat dépend du nombre de truies à inséminer sachant que pour nos examens 3 préparations conditionnées, prêtes à l'emploi ont été systématiquement récupérées.

Ainsi :

- un flacon est examiné au laboratoire de 1 à 3 heures après collecte (Ho)
- un flacon est examiné au laboratoire 24 heures après la collecte (H24)
- un flacon est examiné au laboratoire 48 heures après la collecte (H48).

Le transfert des flacons au laboratoire se fait à l'aide de boîtes isothermes. La conservation des doses 24 et 48 heures se fait également dans ces conditions. Le stockage se fait à la Station de Pathologie Porcine à une température voisine de 20°C (de 18 à 22°C) afin de se rapprocher des conditions observées dans les 2 élevages.

20 semences provenant de 8 verrats différents ont été examinées dans ces conditions (Ho, H24, H48). Au laboratoire, après homogénéisation de la semence, un prélèvement à l'öse (1) est réalisé à partir de chacun des flacons pour ensemencement sur boîtes de Pétri. Les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- Gélose Columbia + sang de mouton 5 % : Boîtes n°1 et 2
- Gélose Columbia + sang de mouton + A.N.C. (Acide Nalidixique, Colistine) : Boîte n°3.

Les boîtes n°1 et 3 sont incubées à 37°C, 48 heures en aérobiose alors que la boîte n°2 reste 3 jours à 37°C en anaérobiose - Pour les boîtes 1 et 3, un premier comptage est souvent réalisé à 24 heures.

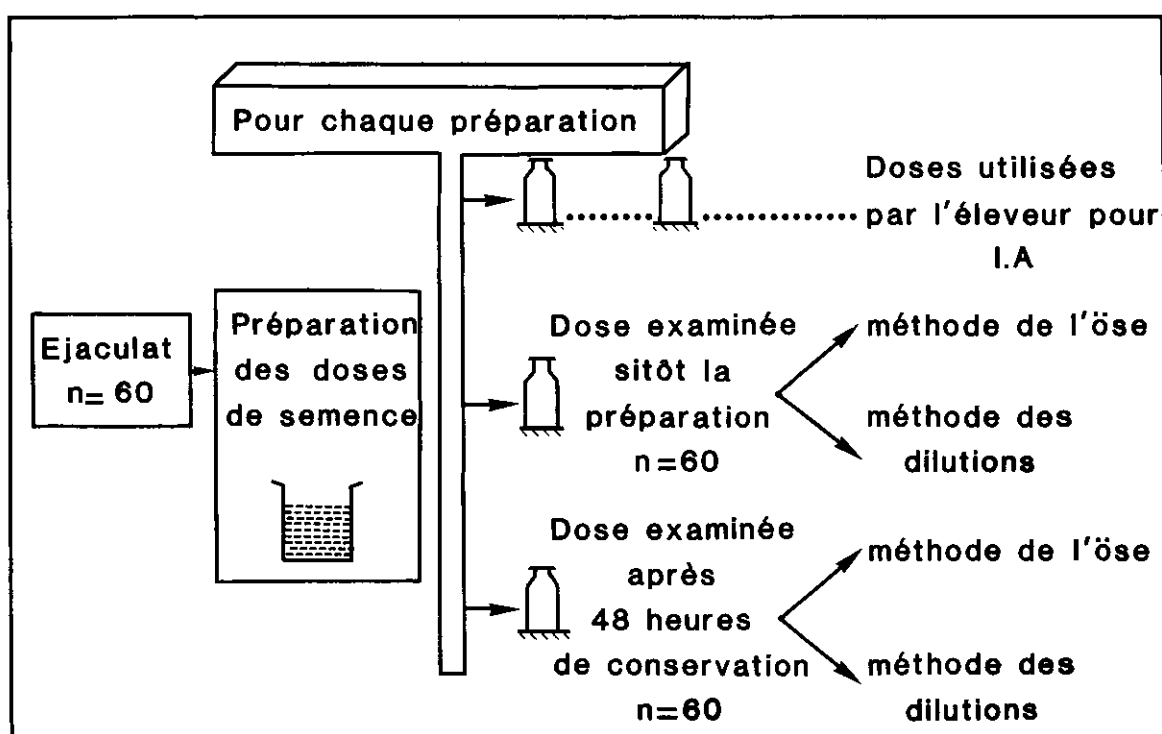
La méthode de l'öse, aux résultats reconnus plus approximatifs mais au coût modéré a été volontairement utilisée dans cette étude préliminaire. Après comptage des colonies, il est procédé à l'identification des germes selon les techniques habituelles.

(1) Öse : anse de platine.

2 - ÉTUDE SUR L'ÉCHANTILLON ÉLARGI

Les mêmes opérations de collecte et de préparation des doses ont été conduites sur un nouvel échantillon. 60 semences provenant de 4 élevages ont ainsi été examinées sitôt la préparation et après 48 heures de conservation à 18-22°C. Les semences ont été récoltées à partir de 22 verrats âgés de 10 mois à 4 ans. Les effectifs des semences collectées dans les élevages sont respectivement de 8, 10, 12 et 30. Contrairement à l'étude préliminaire, aucun examen n'est ici pratiqué à 24 heures (figure 1). En outre la contamination bactérienne a été appréciée en utilisant 2 méthodes en parallèle sur chacun des échantillons :

FIGURE 1
REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DES OPÉRATIONS SUR L'ÉCHANTILLON ÉLARGI



- la méthode de l'öse comme dans l'étude préliminaire,

- la méthode des dénombrements. Celle-ci correspond en fait à la technique classique de référence pour la numération des germes. Après homogénéisation, la semence soumise au test est diluée et un aliquote de chaque dilution est ensemencé sur boîtes de Pétri. Le milieu de culture utilisé est une gélose nutritive additionnée de T.T.C. (chlorure de triphenyl-tétrazolium, 0,4 ml d'une solution à 1 % stérilisée par filtration). Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C pendant 48 heures. Contrairement à la méthode de l'öse, l'inoculum ayant un volume connu, le résultat final s'exprime ici en nombre de colonies par ml de semence soumise au contrôle.

III - RESULTATS

1 - ÉTUDE PRÉLIMINAIRE

20 semences ont été observées sitôt la préparation, après 24 heures de conservation et au bout de 48 heures. Le tableau 2 rapporte les valeurs obtenues pour le comptage des colonies après ensemencement à l'anse de platine (méthode de l'öse).

TABLEAU 2
RÉSULTAT DU COMPTAGE DES COLONIES DE LA SEMENCE
UTILISÉE POUR L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE

Nombre de colonies : bornes de classes	Examen sitôt la préparation (H ₀)			Examen à 24 heures (H ₂₄)			Examen à 48 heures (H ₄₈)		
	≤ 50	50-300	> 300	≤ 50	50-300	> 300	50-300	> 300	
Nombre de doses	13	4	3	13	4	3	7	5	8

Dans les conditions des 2 élevages considérés, on observe une pollution assez fréquente de la semence, certaines de ces dernières étant particulièrement souillées (plus de 300 colonies⁽¹⁾). On observe une aggravation assez sensible de la situation après 48 heures de conservation. Les principaux germes isolés à H₀ sont dans l'ordre décroissant de fréquence : Microcoques, streptocoques, E. coli, Proteus, Bacillus et citrobacter. Les fréquences des différentes colonies à 48 heures ne sont que légèrement différentes. Ce sont ces résultats préliminaires qui nous ont incités à poursuivre les observations sur un échantillon plus large.

2 - ÉTUDE PRINCIPALE

2.1 - Le dénombrement par la méthode de l'öse

Les résultats figurent tableau 3. On constate une fréquence élevée de semences fortement contaminées ; sur 20 % des semences prêtes à l'emploi (en H₀), on obtient en effet plus de 300 colonies au comptage. La fréquence des préparations non ou faiblement souillées (< 50 colonies) étant de 52 % .

Au bout de 48 heures de conservation, la proportion de semences fortement souillées s'élève considérablement pour atteindre près des deux tiers des échantillons.

TABLEAU 3
RÉSULTAT DU COMPTAGE DES COLONIES DANS LA SEMENCE
EN UTILISANT LA MÉTHODE DE L'ÖSE

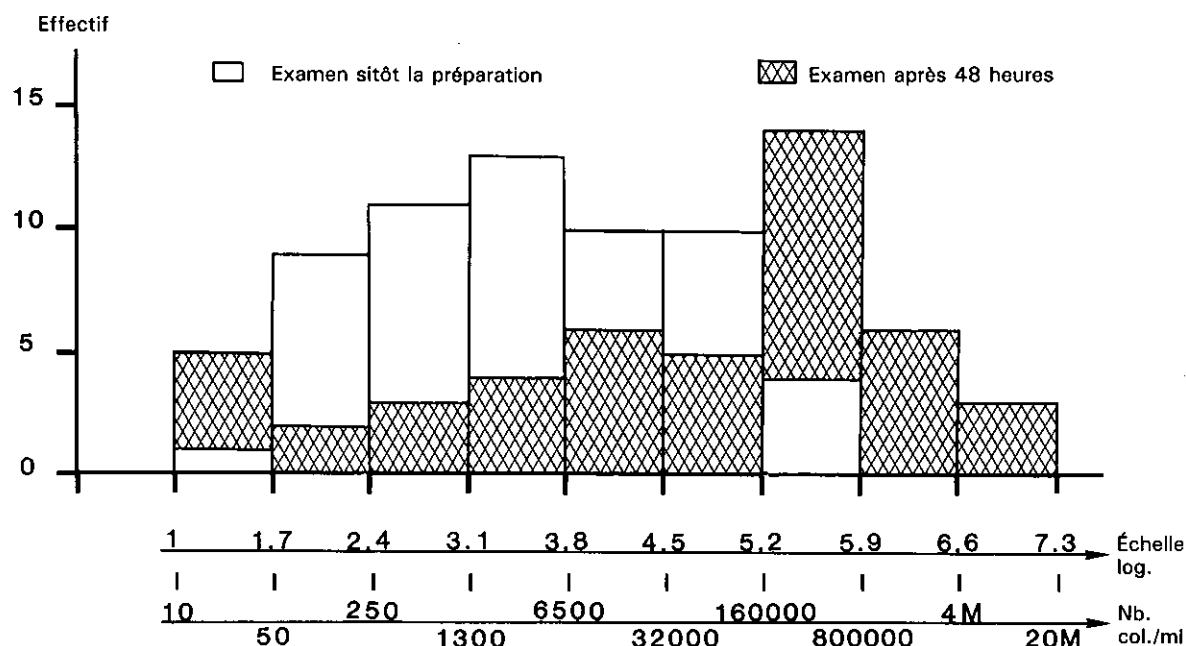
Nombre de colonies : bornes de classes	Examen sitôt la préparation (H ₀) n = 60			Examen après 48 heures de (H ₄₈) n = 60		
	≤ 50	50-300	> 300	≤ 50	50-300	> 300
Nombre de doses	31	17	12	14	8	38
%	52	28	20	24	13	63

2.2 - Le dénombrement par la méthode des dénombrements

La méthode des dénombrements est la technique de référence pour l'appréciation quantitative de la contamination bactérienne. Elle permet de rapporter la numération des colonies à une quantité donnée d'inoculum. Les résultats sont présentés figure 2.

(1) Cette borne a été retenue en raison des difficultés rencontrées pour le comptage des colonies sur les boîtes de Pétri au-delà de ce seuil.

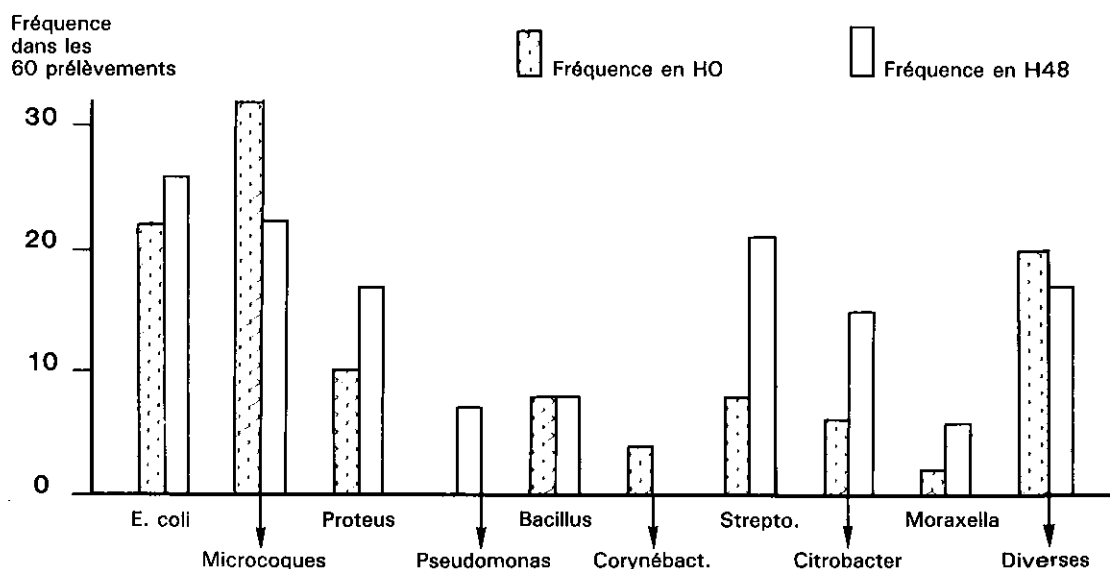
FIGURE 2
RÉSULTAT DU COMPTAGE DES COLONIES DANS LA SEMENCE
EN UTILISANT LA MÉTHODE DES DÉNOMBREMENTS
 (Nb. de germes/ml de semence prête à l'emploi, n = 60)



La population bactérienne des doses de semence venant d'être préparées est en moyenne de 3000 bactéries par ml. Mais on observe une variation considérable des valeurs autour de cette moyenne. Au bout de 48 heures de conservation on assiste à une prolifération microbienne se traduisant par un décalage des valeurs obtenues vers la droite du graphique. Une pullulation microbienne ($\geq 10^6$ germes par ml) apparaît dans 15 % des prélèvements. De telles concentrations ne sont jamais constatées en Ho.

Les principales espèces bactériennes identifiées sont par ordre décroissant de mise en évidence (figure 3) : microcoques, E. coli, Streptocoques, Proteus, citrobacter et diverses bactéries (entérobacter, achromobacter, acinetobacter ... staphylocoques).

FIGURE 3
PRINCIPALES ESPÈCES BACTÉRIENNES MISES EN ÉVIDENCE DANS LA SEMENCE
AU MOMENT DE LA PRÉPARATION ET APRÈS 48 HEURES DE CONSERVATION
 n = 60 semences



Le profil des différentes espèces isolées de la semence à 48 heures est assez voisin du profil initial. Certaines espèces prolifèrent particulièrement dans la semence : *Proteus*, *Streptococcus* (essentiellement *Streptococcus* du groupe D) et *Citrobacter*. En outre on a pu observer qu'en cas de prolifération bactérienne il n'est pas fréquent d'observer un envahissement des milieux de culture par une seule espèce et les contaminants multiples sont la règle (80 % des cas).

2.3 - Comparaison des deux méthodes d'estimation de la contamination

Des corrélations ont été calculées entre les séries de valeurs obtenues avec les deux techniques de comptage utilisées. Les coefficients r obtenus sont de 0,72 pour la numération à H_0 et de 0,80 après 48 heures de conservation, les deux coefficients s'avérant significatifs. On peut ainsi considérer que la méthode de l'öse, moins coûteuse, permet une première appréciation de la pollution de la semence. Une échelle des correspondances dans les résultats est délicate à établir. On peut cependant noter que des comptages supérieurs à 50 colonies par la méthode de l'öse correspondent assez régulièrement à plus de 10^4 germes par ml de semence. Les semences considérées plus haut comme fortement souillées (> 300 colonies) correspondant quant à elles à plus de 10^5 germes/ml.

2.4 - Etude de quelques relations

Il existe une relation entre le degré de pollution initiale et le nombre de colonies observées après 48 heures de conservation ($r = 0,56$ pour la méthode de l'öse, $r = 0,60$ pour celle des dilutions). Toutefois, il n'a pas été possible d'établir un seuil au-delà duquel la pullulation bactérienne est inévitable à 48 heures. Ce dernier est sans doute fonction de la nature de la flore séminale initiale.

Les 5 semences fortement souillées ($> 10^5$ germes/ml) lors du premier examen (H_0) se recrutent dans un seul élevage. Le déséquilibre des effectifs provenant des différents troupeaux ne permet cependant pas de conclure à un effet "élevage".

L'étude des caractéristiques de la semence de chacun des verrats au cours des prélèvements successifs n'a été envisagée que lorsque 4 collectes ont été réalisées sur le même animal. Sur 5 verrats ainsi considérés on n'observe pas une bonne répétabilité, la semence pouvant être soit très fortement souillée soit très faiblement au cours des collectes et examens successifs (tableau 4). Par ailleurs aucune relation claire n'est observée avec l'âge des verrats.

TABLEAU 4
CARACTÉRISTIQUES DES PRÉPARATIONS SUCCESSIVES
DE SEMENCES ISSUES D'UN MÊME VERRAT

	N° des verrats	1	2	3	4	5
Nombre de germes/ml (semence avant conservation)	Prélèvement n° 1	20 000	280 000	15 000	12 000	1 200
	Prélèvement n° 2	105 000	60 800	8 200	27 000	251 000
	Prélèvement n° 3	5 800	6 100	2 500	20 800	4 000
	Prélèvement n° 4	3 800	700 000	400	600	400

IV - DISCUSSION

Les caractéristiques de la semence des verrats ont depuis longtemps préoccupé les zootechniciens. Le volume et la composition de l'éjaculat sont en effet sujets à des fluctuations et celles-ci peuvent

peuvent se répercuter sur les performances des animaux (du Mesnil du Buisson *et al.*, 1974 ; Kennedy et Wilkins, 1984 ; Paquignon *et al.*, 1984 ; Singleton et Shelby, 1972). En France, dans le domaine plus particulier de l'insémination artificielle, des recommandations ont été formulées permettant de valoriser au mieux la technique (Ulhen, 1983 ; I.T.P., 1985). Sa mise en oeuvre requiert en effet le respect de règles de base y compris en matière de conservation des doses préparées (Bariteau *et al.*, 1984).

De précédentes observations ont permis de montrer le risque encouru lors de l'utilisation d'une semence souillée. C'est ainsi que suite à l'insémination artificielle de cochettes S.P.F. élevées dans des conditions expérimentales, on a pu observer des manifestations d'anorexie et d'hyperthermie transitoires dans les heures suivant l'opération (Cariolet, 1986). Les animaux concernés, inséminés avec de la semence fortement contaminée par un germe assez banal du groupe *Serratia* sont revenus en oestrus. Il est probable que la nature du germe dominant introduit dans l'utérus intervienne sur l'apparition ou non de problèmes. Néanmoins, d'autres travaux réalisés dans des conditions du "terrain" mettent l'accent sur le rôle négatif de la microflore séminale dans son ensemble, du moins lorsque celle-ci devient trop importante (Dubiel *et al.*, 1981). Les conséquences sur le résultat de l'accouplement sont d'ailleurs d'autant plus à redouter que le réceptacle utérin est lui-même dans un état sanitaire précaire consécutivement par exemple à des séquelles de métrites puerpérales (Madec, 1986).

Nos résultats mettent en relief la possibilité d'une pollution sévère de la semence préparée pour l'insémination artificielle. Des valeurs supérieures à 10^5 germes par ml de semence ont été obtenues dans 8 % des cas. Si la microflore de la semence a fait l'objet de plusieurs investigations de la part des microbiologistes la comparaison des résultats s'avère délicate, la plupart des auteurs s'étant cantonnés à l'étude de l'éjaculat et non de la semence diluée et conditionnée pour l'utilisation. Pour du sperme, des valeurs variant de quelques unités à plus de 100 000 germes par ml sont citées (Dubiel *et al.*, 1981 ; Kozumplik, 1975 ; Dagnal et Jones, 1985). Au-delà de l'étude de la numération des contaminants, les spécialistes se sont intéressés à la nature de ces derniers. Si certaines bactéries revêtent une importance particulière (brucellose..), la plupart des bactéries ont pour caractéristique d'être à pouvoir pathogène facultatif. Ainsi a-t-on pu isoler des coliformes, streptocoques, staphylocoques ou autres corynébactéries (Waltz *et al.*, 1968 ; Tamuli *et al.*, 1984). Ces observations vont dans le sens de nos résultats. La plupart des germes isolés sont en effet des hôtes habituels tant des voies génitales mâles et femelles que de l'environnement des animaux. Outre Manche, des auteurs insistent néanmoins sur les possibilités, lors de l'accouplement, d'une contamination des truies par certains germes associés aux infections urogénitales comme *Corynebacterium suis* (Dagnall et Jones, 1985).

L'objectif de la présente étude n'étant pas d'inventorier de manière exhaustive la microflore séminale, des moyens limités ont été consacrés aux recherches du laboratoire. De tels travaux conduits par ailleurs, ont permis de montrer à la fois la grande variété des espèces présentes et une relative similitude entre la microflore de la semence et celle de certains sites anatomiques comme le diverticulum du prépuce (Foley *et al.*, 1971 ; Dagnall et Jones, 1985). Une relation entre le niveau de pollution de la semence et l'hygiène est ainsi fortement suspectée. L'hypothèse est encore renforcée par la mise en évidence le plus souvent d'une microflore composite peu compatible avec une infection vraie des voies génitales mâles. Le rôle de la propreté des animaux au moment de la collecte du sperme a d'ailleurs été souligné (Kozumplik, 1975). Cet auteur assiste à une réduction sensible du niveau de contamination de la semence après un nettoyage strict du verrat avant la collecte et le respect simultané des règles d'hygiène lors des manipulations successives de la semence.

CONCLUSIONS

Dans les conditions de la pratique en élevage, les doses de semence utilisées en insémination artificielle peuvent être le siège d'une contamination microbienne. Cette contamination peut à son tour compromettre le résultat de l'insémination. Il est donc prudent de procéder à des examens bactériologiques périodiques de la semence que l'on se propose d'utiliser.

La semence préparée pour l'insémination est un milieu propice à la multiplication bactérienne. Une pullulation est à redouter au bout de 48 heures de conservation, lorsque la préparation initiale est souillée.

BIBLIOGRAPHIE

- BARITEAU F., BUSSIERE J., COUROT M., PAQUIGNON M. (1984). Journées Rech. Porcine en France, **16**, 173-180.
- BOUGLER J. (1983). I.A. et amélioration génétique : bilan et perspectives. Toulouse, 23-24 nov., Colloques de l'INRA.
- BRANDT H. Von, GLODEK P. (1984). Züchtungskunde, **56** (1), S, 27-35.
- CARIOLET R. (1986). L'insémination artificielle en élevage porcin intensif. Aspects techniques et hygiène. Bull. Lab. Vet., (22) 1-6.
- CHATELIER C., LE DENMAT M., ULHEN J.C. (1986). Insémination à la ferme. Techniporc, s/s presse.
- DAGNALL J.R., JONES J.E.T. (1985). Proceedings 5th Intern. Cong. on Animal Hygiene. Hannover, 10-13rd sept., Vol. I, 412-416.
- DUBIEL A., STANCZYK J.F., KROLINSKI J. *et al.* (1981). Medycyna Weterynaryjna, **37**, 486-489.
- FOLEY C.W., ZEHMER R.B., SHOTTS E.B., WILLIAMS D.J. (1971) Am. J. Vet. Res., **32**, 1447-1450.
- I.T.P. (1985). Insémination artificielle porcine. Plaquette éditée par l'I.T.P., 149 rue de Bercy, Paris, 22 pages.
- KENNEDY B.W., WILKINS J.N. (1984). Can. J. Anim. Sci., **64**, 833-843.
- KOZUMPLIK J. (1975). Veterinarni Medicina (Praha), **20**, 519-525.
- LE DENMAT M., DAGORN J., VAUDELET J.C. (1983). Proceedings 34th Annual Meeting E.A.A.P., Madrid, 3-6th oct., 750-751.
- MADEC F., JOSSE J. (1984). Application d'une méthode d'étude sanitaire globale à la prévention des troubles de la fécondité chez les truies en élevage intensif. Document Station de Pathologie Porcine, B.P. 9, 22440 PLOUFRAGAN, 59 pages.
- MADEC F. (1986). Approche épidémiologique des troubles de la fécondité chez la truie en élevage intensif. Thèse - ENSAR - Univ. Rennes I - 111 pages.
- MEDVECZKY I., SZABO I. (1981). Acta. Vet. Acad. Sci. Hungaricae, **29**, 29-35.
- Du MESNIL DU BUISSON F., MILLANVOYE B., BARITEAU F., LEGAULT C. (1974). Journées Rech. Porcine en France, **6**, 63-69.
- PAQUIGNON M., NOWAK R., SIGNORET J.P. (1984). Techniporc, **7** (4), 7-16.
- REED H.C.B., MARCHESI M.G., JONES D.W. (1984). 10th Intern. Cong. on Anim. Reprod. and A.I. June 10-14, Vol. III, brief communications paper n° 379, 3 pp.
- SINGLETON W.L., SHELBY D.R. J. Anim. Sci., **34**, 762-766.
- TAMULI M.K., SHARMA D.K., RAJKONWAR C.K. (1984). Indian Vet. J., **61**, 858-861.
- THACKER B.J., LARSEN R.E., JOO H.S., LEMAN A.D. (1984). J. Am. Vet. Med. Assoc., **185**, 511-516.
- ULHEN J.C. (1983). L'élevage porcin, **126**, 28-35.
- VANNIER P., GUEGUEN E. (1979). Rec. Med. Vet., **152**, 509-516.
- WALTZ F.A., FOLEY C.W., HERSCHLER R.C. *et al.* (1968). J. Anim. Sci., **27**, 1357-1362.