



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE ANTIBACTERIANOS NA QUALIDADE ESPERMÁTICA E NA  
MICROBIOTA DO SÊMEN OVINO**

**GABRIELA DE OLIVEIRA FERNANDES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 67/2012**

**BRASÍLIA/DF**  
**ABRIL DE 2012**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE ANTIBACTERIANOS NA QUALIDADE ESPERMÁTICA E NA  
MICROBIOTA DO SÊMEN OVINO**

**Aluno: Gabriela de Oliveira Fernandes**

**Orientador: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 67/2012**

**BRASÍLIA/DF**  
**ABRIL DE 2012**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FERNANDES, G.O. **Efeito de antibacterianos na qualidade espermática e na microbiota do sêmen ovino.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 75p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando a reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pela autora à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. A autora e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de Mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citadas as fontes.

### FICHA CATALOGRÁFICA

FERNANDES, G. O. **Efeito de antibacterianos na qualidade espermática e na microbiota do sêmen ovino.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE ANTIBACTERIANOS NA QUALIDADE ESPERMÁTICA E NA  
MICROBIOTA DO SÊMEN OVINO**

**GABRIELA DE OLIVEIRA FERNANDES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS,  
COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR**

---

**JAIRO PEREIRA NEVES, Doutor (UnB)  
(ORIENTADOR)**

---

**IVO PIVATO, Doutor (UnB)  
(MEMBRO INTERNO)**

---

**RAFAEL GIANELLA MONDADORI, Doutor (UFPel)  
(MEMBRO EXTERNO)**

**BRASÍLIA/DF, 25 de Abril de 2012**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Neusa Oliveira e Ivan Fernandes;

Ao meu irmão Gustavo Fernandes e aos demais familiares que sempre acreditaram e torceram pelo meu sucesso e crescimento profissional;

Ao meu orientador e amigo Professor Dr. Jairo Pereira Neves que acreditou no meu trabalho, muito obrigada por essa oportunidade acadêmica, pelas conversas, aprendizado e conselhos dados durante este período;

Aos amigos de pós-graduação Diogo Leal, Darliane Castro e Nathália Hack pelo convívio, amizade e ajuda durante os experimentos.

Ao amigo e colega Thiago da Silva pela sua fundamental ajuda para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e convívio durante esses anos, o meu sincero agradecimento.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Veterinária da UnB, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, em especial a Professora Dra. Simone Percmanis que disponibilizou o uso da estrutura e equipamentos do seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores e funcionários da Fazenda Experimental Sucupira pertencente a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial ao pesquisador Dr. Alexandre Floriani Ramos pela sua disponibilidade e colaboração para a efetuação deste trabalho e também à pesquisadora Dra. Margot Alves Nunes Dode pela disponibilização do uso do laboratório e sugestões experimentais;

A professora Dra. Concepta McManus pela disponibilidade e ajuda na realização das análises estatísticas.

A família Manzoni por serem minha família em Brasília, dando total apoio e carinho nesse momento da minha vida acadêmica, estando presente em todos os momentos, o meu muito obrigada;

A família Carvalho pela amizade, carinho e compreensão nessa etapa de minha vida;

Ao programa de pós-graduação da UnB (Ciências animais) pela oportunidade, a CAPES pela bolsa de estudo e ao CNPq pelo auxílio financeiro para desenvolver este trabalho.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	XIII
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivo Geral	2
1.2 Objetivos Específicos	4
1.3 Hipóteses	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Bactérias presentes no sêmen	5
2.2 Controle do crescimento bacteriano	6
2.3 Efeito das bactérias nas células espermáticas	8
2.4 Avaliações do sêmen	8
2.5 Processo de criopreservação do sêmen	9
2.6 Avaliação da membrana plasmática	9
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO 2	15
1 RESUMO	16
2 ABSTRACT	17
3 INTRODUÇÃO	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Período experimental e local do experimento	20
4.2 Animais experimentais	20
4.3 Coleta do Sêmen	20
4.4 Análise do sêmen	21
4.5 Análise bacteriológica	21
4.6 Análise estatística	22
5 RESULTADOS	23
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÕES	29
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 3	32
1 RESUMO	33
2 ABSTRACT	34
3 INTRODUÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Período experimental e local do experimento	37
4.2 Animais experimentais	37
4.3 Coleta do sêmen	38
4.4 Análise bacteriológica	38
4.5 Análise do sêmen	38
4.5.1 Processo de criopreservação do sêmen	39
4.5.2 Descongelamento das amostras	39

4.5.3 Avaliação das amostras descongeladas	39
4.6 Análise estatística	40
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÕES	44
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO 4	48
1 RESUMO	48
2 ABSTRACT	49
3 INTRODUÇÃO	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 Período experimental e local do experimento	52
4.2 Animais experimentais	52
4.3 Coleta do sêmen	52
4.4 Análise bacteriológica	53
4.5 Análise do sêmen	53
4.5.1 Processo de criopreservação do sêmen	54
4.5.2 Descongelamento das amostras	54
4.5.3 Avaliação das amostras descongeladas	54
4.6 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	56
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	62

## RESUMO

Diversas bactérias são identificadas nas amostras de sêmen ovino e algumas podem apresentar efeitos negativos na sua qualidade. Assim, os objetivos deste trabalho foram: identificar e quantificar a microbiota do sêmen fresco ovino, avaliar o uso prévio do higienizante Kilol-L<sup>®</sup> e testar a sensibilidade das cepas bacterianas frente ao antibiograma; avaliar o efeito do uso dos antibióticos ceftiofur e gentamicina, em diferentes concentrações, no meio diluidor TRIS-gema-glicerol, nos parâmetros de avaliação do sêmen e da contaminação bacteriana; avaliar o efeito da adição de diferentes antibióticos e combinações no meio de criopreservação do sêmen, avaliando a qualidade e viabilidade do mesmo antes e depois da criopreservação. No *capítulo 2* foram avaliados 24 ovinos machos da raça Santa Inês, aptos à reprodução, sendo eles agrupados em dois grupos de sistemas de criação, um a pasto (n=12) e outro em confinamento (n=12). Os resultados microbiológicos indicaram que do total de 120 ejaculados, 99 tiveram crescimento bacteriano correspondendo a 82,5% das amostras. Os gêneros bacterianos mais isolados foram *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* Dos antibióticos testados, a gentamicina foi 100% eficaz para *Bacillus spp.* e *E. coli*. O Ceftiofur foi eficaz para todas as bactérias isoladas, exceto com a amostra de *Rodococcus equi*. O uso do antisséptico Kilol-L<sup>®</sup> na concentração 1:250 reduziu o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) do ejaculado sem prejudicar a qualidade seminal. No *capítulo 3*, foram selecionados dois grupos: ceftiofur e gentamicina. Os tratamentos do grupo ceftiofur foram: sem antibióticos, 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml, e os tratamentos do grupo gentamicina foram: sem antibiótico, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml e 500µg/ml. Não houve diferença entre os tratamentos nos dois grupos quanto à motilidade espermática, isolamento bacteriano e UFC/ml. A utilização dos antibióticos ceftiofur e gentamicina, em diferentes concentrações no meio de criopreservação, não diferiram do meio sem antibiótico nos parâmetros seminais e bacteriológicos. No *capítulo 4*, foi analisado o efeito da adição de



diferentes antibióticos na criopreservação de sêmen ovino, avaliando-se a qualidade e viabilidade antes e depois da criopreservação. Os ejaculados foram submetidos aos seguintes tratamentos: sem antibiótico, associação de penicilina-estreptomicina (100.000UI-100mg/ml), ceftiofur (10µg/ml), gentamicina (50µg/ml) e a associação de gentamicina-tilosina-lincomicina-espectinomicina (250-50-150-300µg/ml). Os tratamentos utilizados não apresentaram diferença ( $p>0,05$ ) quando comparados com a quantidade total de bactérias presentes, cepas bacterianas isoladas e motilidade das células espermáticas. Os principais gêneros bacterianos isolados foram *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* Tais resultados indicam que a adição de antibióticos não é necessária, no meio diluidor, quando medidas higiênicas e de assepsia são previamente utilizadas ao processo de criopreservação do sêmen ovino.

**Palavras-chave:** Antibióticos; bactérias; criopreservação; ovinos; sêmen.

## ABSTRACT

Several bacteria are identified in semen samples and some present a negative effect on their quality. The objectives of this study were to identify and quantify the fresh semen sheep microbiota, evaluating the previous use of sanitizing Kilol-L<sup>®</sup> and test the bacterial strains against antibiogram; evaluate the effect of antibiotic therapy with ceftiofur and gentamicin, in different concentrations in the diluter medium with tris-gem-glycerol, in parameter of semen evaluation and bacterial contamination; evaluate the effect of addition different antibiotics and combinations in the semen cryopreservation medium, assessing the quality and viability of the sample before and after cryopreservation. In chapter 2 were evaluated 24 Santa Inês male sheep, able to reproduce, and they were grouped into two breeding systems, one on pasture (n = 12) and another confined (n = 12). The microbiological results indicated that the total of 120 ejaculates, 99 had bacterial growth representing 82.5% of the samples. The most frequently isolated bacterial genus were *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.* and *Streptococcus spp.* Both antibiotics tested, gentamicin was 100% effective for *Bacillus spp.* and *E. coli*. The Ceftiofur was effective for all isolates, except with the sample *Rodococcus equi*. The use of antiseptic Kilol-L<sup>®</sup> at a concentration of 1:250 reduced the number of colony forming units (CFU/ml) of the ejaculate without affecting the semen quality. In chapter 3, we selected two groups: ceftiofur and gentamicin. The ceftiofur treatments groups were: without antibiotics, 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml and 100µg/ml, and gentamicin treatments group were: without antibiotic, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml and 500µg / ml. There was no difference between treatments in the two groups in terms of sperm motility, bacterial isolation and CFU/ml. The use of the ceftiofur antibiotic and gentamicin at different concentrations in the cryopreservation medium not differ from the antibiotic-free medium in semen and bacteriological parameters. In chapter 4, we analyzed the effect of different antibiotic addition in the cryopreservation of ram semen, evaluating the quality and viability before and after

cryopreservation. The ejaculates were submitted to the following treatments: no antibiotic, combination of penicillin-streptomycin (100.000UI-100mg/ml), ceftiofur (10µg/ml), gentamicin (50µg/ml) and combination of gentamicin, tylosin, lincomycin-spectinomycin (250 -50-150-300µg/ml). The treatments showed no difference ( $p > 0.05$ ) when compared with the total amount of bacteria, bacterial strains isolated and sperm cells motility. The major bacterial strains isolated were *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.* and *Streptococcus spp.* These results indicate that the addition of antibiotics is not necessary in the diluter medium, when hygienic and aseptic measures are previously used in the sheep semen cryopreservation process.

**Key-words:** Antibiotics, bacterial, cryopreservation, sheep semen.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Porcentagem das cepas bacterianas isoladas do sêmen de ovinos da raça Santa Inês criados a pasto e confinado.....24
- Tabela 2 - Antibiograma das 132 cepas bacterianas isoladas do sêmen de ovinos, da raça Santa Inês, em manejo a pasto e confinado.....24
- Tabela 3 - Média das avaliações do sêmen fresco de ovinos da raça Santa Inês, criados a pasto e confinado.....25

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

CASA: análise do sêmen auxiliada pelo computador

GTLS: gentamicina+tilosina+lincomicina+espectinomicina

h: hora

IA: inseminação artificial

g: grama

l: litro

ml: mililitro

mg: miligrama

n: número de animais

OIE: organização mundial de saúde animal

PCA: agar contagem padrão

PBS: tampão fosfato-salino

ROS: espécies reativas de oxigênio

SAS: sistema de análise estatística

TRIS: hidroximetil aminometano

UFC: unidade formadora de colônia

UI: unidades internacionais

°C: grau Celsius

®: marca registrada

µg: micrograma

µl: microlitro

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira encontra-se em expansão, principalmente na produção de carne, mesmo com o crescimento da produção o país ainda importa grande parte de produtos para abastecer seu mercado interno. Devido a essa crescente demanda os rebanhos brasileiros continuam a ser explorados economicamente, com utilização crescente de técnicas de manejo que visam o aumento da produtividade.

Para atender essa demanda, dentre as biotecnologias da reprodução, a criopreservação do sêmen como uma etapa da I.A, vem se tornando uma tecnologia de mais fácil acesso pelo criador (Maxwell & Watson, 1996). A criopreservação do sêmen ovino vem ganhando destaque, por proporcionar uma melhor utilização dos reprodutores, beneficiando a reprodução de animais de importância no setor agropecuário e de características desejáveis de produção. Entretanto a criopreservação ainda é um processo em que mesmo utilizando os atuais protocolos parte das células espermáticas não sobrevivem, resultando em uma marcante redução na fertilidade (Valcárcel et al., 1997). A motilidade espermática é, ainda, considerada como um dos principais parâmetros de avaliação da função espermática.

A qualidade do ejaculado, pode limitar o sucesso reprodutivo de um reprodutor (Skau & Folstad, 2003). Estas bactérias podem ser oriundas da monta natural ou I.A, podendo também prejudicar a função reprodutiva da fêmea (Andrabi et al., 2001). A maior parte da contaminação geralmente é oriunda do sistema urinário, sendo as infecções geniturinárias responsáveis por 15% dos casos de infertilidade nos machos (Pellati et al., 2008).

A qualidade do sêmen e a presença de bactérias na espécie bovina são mais conhecidas, tanto que a adição de antibióticos nos diluentes é realizada com a tradicional associação penicilina-estreptomicina, após Almquist et al. (1949), comprovarem que essa associação tem uma atividade antibacteriana eficaz com pouco efeito tóxico (Andrabi et al., 2001).

Os principais gêneros bacterianos isolados nos ejaculados de diversas espécies são *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella*

*pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter cloacae.*, *Shigella sonnei*, *Micrococcus spp.*, *Actinobacillus seminis* e *Escherichia coli* (Derivaux, 1967; Raghavan et al., 1971; Coelho, 1976; Rodrigues et al., 1999; Yániz et al., 2010). O principal efeito, negativo, que estes micro-organismos causam na qualidade do sêmen é no parâmetro da motilidade dos espermatozoides, além de comprometerem a função acrossomal e danos ultraestruturais (Diemer et al., 2000).

Sabe-se que mesmo adotando medidas higiênicas indicadas durante a coleta e o processamento do sêmen, sempre haverá a presença de micro-organismo no ejaculado, tendo seu potencial desfavorável para a conservação do sêmen e eventualmente sobre a fertilidade (Ramos, 1996; Catena et al., 1999). A ausência de micro-organismos no sêmen é inalcançável tanto pela população de micro-organismos ambientais quanto por patógenos específicos, sendo eles virais ou bacterianos (Thibier, 2004).

Em carneiros, a coleta de sêmen é realizada habitualmente com a vagina artificial. A mucosa do pênis e prepúcio, o local da coleta, os equipamentos utilizados e o próprio profissional podem estar previamente contaminados. Para minimizar esses efeitos, antibióticos são adicionados ao diluente (Salamon & Maxwell, 2000).

Muitos antibióticos possuem efeito negativo para a sobrevivência espermática e a escolha dos princípios ativos é limitada. Uma alternativa para a inclusão de antibióticos nos meios de criopreservação seria evitar seu uso indiscriminado, visto que esta prática contribui para o aumento da resistência bacteriana, mesmo utilizando uma pequena quantidade de antibióticos (Morrell & Wallgren, 2011).

## **1.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi identificar a microbiota do sêmen ovino e avaliar seus efeitos na viabilidade espermática, bem como, avaliar a ação de antibacterianos.

## **1.2 Objetivos Específicos**

Identificar e quantificar as bactérias presentes no sêmen de carneiros criados em diferentes sistemas de criação;



Testar, *in vitro*, a sensibilidade das bactérias isoladas frente a diferentes antibióticos;

Verificar o efeito do uso do higienizante Kilol-L<sup>®</sup>, na cavidade prepucial dos carneiros, e seu efeito no crescimento bacteriano e qualidade seminal;

Verificar a melhor concentração (dose/resposta) de antibióticos e sua ação sobre a célula espermática;

Identificar a associação de antibióticos mais eficazes para ser utilizada no meio diluidor do sêmen ovino.

### **1.3 Hipóteses**

Os ejaculados dos carneiros criados em confinamento apresentam um maior número de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) em relação aos carneiros mantidos a pasto;

A utilização prévia da solução de Kilol-L<sup>®</sup> na cavidade prepucial irá reduzir a carga bacteriana em carneiros criados em ambos os sistemas de criação;

A associação penicilina-estreptomicina é menos eficaz que as demais combinações;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Bactérias presentes no sêmen

A maioria das bactérias presentes no ejaculado são saprófitas, como as dos gêneros *Micrococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Bacillus spp.* e *Corynebacterium spp.* e outras que são ocasionalmente patogênicas, como *Actinomyces pyogenes bovis*, *Corynebacterium pyogenes bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os machos aptos à reprodução, além dos exames clínicos, devem também submeter-se as análises microbiológicas do sêmen, não só por medida preventiva, como também para melhorar os índices de fertilidade do rebanho, pois é conhecida uma diversidade de micro-organismos no sêmen dos reprodutores (Coelho, 1976). Nas diversas espécies animais, a mucosa prepucial apresenta bactérias comensais que são normalmente inofensivas para o macho.

Em contraste, as infecções uterinas causadas pelas bactérias são frequentemente associadas com repetidos serviços de monta natural, sendo uma causa comum de infertilidade adquirida (Jarvinen & Kinyon, 2010). É bem conhecido o fato de ocorrer contaminação por bactérias que são transferidas entre machos e fêmeas durante o coito e essas bactérias podem causar infecção uterina se não forem controladas pelos mecanismos de defesa do organismo (Jarvinen & Kinyon, 2010).

O ejaculado pode ser contaminado por micro-organismos presentes no próprio sêmen, por bactérias localizadas na mucosa peniana e prepucial. A contaminação do sêmen pode ocorrer durante o processo da manipulação, como exemplo nas instalações, nos equipamentos utilizados, principalmente a mucosa utilizada na vagina artificial, o copo coletor, a gema de ovo ou o leite utilizado no diluidor. As palhetas utilizadas para o envase do

sêmen, o nitrogênio líquido utilizado na criopreservação e principalmente o profissional são também pontos críticos para contaminação do sêmen.

## **2.2 Controle do crescimento bacteriano no sêmen**

A lavagem intraprepucial com produtos antissépticos é realizada nos bovinos, para reduzir a carga bacteriana prepucial (Rodrigues et al., 1999). Para controlar o crescimento bacteriano, no sêmen é utilizada a associação de penicilina-estreptomicina nos diluidores do sêmen bovino e bubalino.

A I.A é considerada mundialmente como um meio eficaz para prevenir e controlar a transmissão de doenças venéreas, ao mesmo tempo em que permite a troca de material genético superior. Cabem as boas práticas e procedimentos específicos da produção de sêmen para minimizar o nível de contaminação do sêmen pelos micro-organismos, com isso, os consumidores esperam que as centrais de I.A produzam e comercializem sêmen congelado livre de contaminantes (Bartlett et al., 1976).

Os antibióticos podem ser utilizados profilaticamente, tanto na medicina veterinária quanto na humana, para prevenir doenças bacterianas, como o uso de antibióticos no diluidor de sêmen durante a preparação das doses para a I.A, com o objetivo de controlar o crescimento de bactérias que estão presentes no ejaculado (Morrell & Wallgren, 2011). Os antimicrobianos são componentes utilizados para controlar a contaminação de bactérias patogênicas e oportunistas no sêmen de diferentes espécies. Dependendo da escolha do antibiótico e do tipo de bactéria existente, o controle microbiológico apresenta limitações (Althouse et al., 2010).

A crescente resistência bacteriana aos antibióticos necessita de mais estudos. Não há nenhum procedimento ou antisséptico universal para combater de modo absoluto a contaminação por bactérias (Bielanski, 2007). Alguns componentes terapêuticos ou antissépticos somente são efetivos contra um determinado tipo de micro-organismo, por exemplo, antibióticos para bactérias, mas não para vírus, assim como lavagens de tripsina para os vírus. Outros procedimentos, como lavagens podem ser efetivas contra um grupo ou ambos. Alguns desses procedimentos podem não remover ou inativar o agente completamente, porém reduzem a carga microbiana (Bielanski, 2007).

Em geral, qualquer agente ou combinação de agentes adicionados a diluentes de sêmen, com a proposta de suprimir o crescimento microbiano deve ter algumas características como ser efetivos contra micro-organismos na concentração ideal, não serem

tóxicos ao sêmen em relação a sua fertilidade e viabilidade, não interagir de forma desfavorável com outras substâncias presentes no meio diluidor (Bielanski, 2007).

Micro-organismos ambientais podem contribuir para a contaminação do sêmen, da mesma forma que as bactérias saprófitas do prepúcio, do macho hígido, compreendem diversas espécies que podem se associar ao sêmen, algumas dessas podem se comportar como bactérias oportunistas (*Pseudomonas aeruginosa*) e se tornar um risco para a fêmea inseminada. Também se deve mencionar que o sêmen pode ser contaminado por micro-organismos presentes no nitrogênio líquido quando esse é criopreservado em palhetas mal vedadas ou pela passagem das células espermáticas pelo epidídimo, ducto deferente e uretra (Russell et al., 1997; Brock, 1998; Schiewe, 1998; Bielanski et al., 2000; Bielanski, 2007).

Almquist et al. (1949), foram os primeiros pesquisadores a proporem que contaminantes bacterianos no sêmen de bovinos, devem ser controlados pela adição de antibióticos. Os primeiros experimentos mostraram que a penicilina, a estreptomicina e a polimixina isoladamente não foram eficazes para controlar o crescimento bacteriano, porém não apresentaram efeito adverso na viabilidade espermática. Além disso, a adição de antibióticos e sulfanilamidas no sêmen de touros com baixa fertilidade aumentou a taxa de concepção em 10-15% (Foote & Bratton, 1950).

Nos últimos anos, inúmeros antibióticos têm sido avaliados para determinar seu efeito nas doses de sêmen de touros. Vale ressaltar que diversos antibióticos, como por exemplo, a flurofamida, a aureomicina e a oxitetraciclina e particularmente agentes fúngicos como anfotericina B, nistatina, micostatina são espermicidas (Eaglesome et al., 1992).

O efeito inibitório do glicerol na atividade antibiótica na criopreservação tem sido relatado (Eaglesome et al., 1992). Esta observação resultou na prática de adicionar antibióticos no sêmen de carneiros na porção sem glicerol, com o objetivo de melhorar o controle de *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Haemophilus somnus* e *C. fetus subsp. venerealis*. O tratamento comumente consta de uma associação de gentamicina, tilosina, lincomicina e espectinomicina.

O sêmen de suínos requer atenção especial no controle microbiológico, pois frequentemente permanece armazenado no diluente por até sete dias antes da sua utilização para a I.A. A bacteriospermia em suínos é comumente encontrada e pode afetar a qualidade espermática. A adição adequada de antibióticos prolonga a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides. As classes mais utilizadas de antibióticos no sêmen de suínos são os aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos, lincosamidas e macrolídeos. (Althouse & Lu, 2005).

### 2.3 Efeito das bactérias nas células espermáticas

Muitos estudos tratam sobre o impacto da infecção do trato genital de machos reprodutores, entretanto, ainda existem controvérsias sobre o efeito das bactérias na qualidade do ejaculado (Haidl, 1990). Segundo Sanocka et al. (2003), a *E. coli*, *U. urealyticum* e *S. aureus*, influenciam negativamente a qualidade do sêmen e a fertilidade dos machos. Esses micro-organismos no trato genital do macho induzem estresse oxidativo e atraem citocinas pré-inflamatórias.

Segundo Diemer et al. (2003), a *E. coli* é a principal bactéria que interfere na motilidade das células espermáticas e que linfócitos e monócitos não tem efeito neste parâmetro. Outros autores mostram por microscopia eletrônica a múltipla adesão da *E. coli* nas células espermáticas, causando danos ultraestruturais e na morfologia da célula espermática. Bartoov et al. (1991), sugerem que a população de *E. coli*, possui certas propriedades de virulência com potencial de aderir na célula espermática e colonizar outros tecidos alvos do trato genital masculino.

Estudos em suínos mostram que a presença da *E. coli* isolada ou com outra bactéria gram negativa tem uma influência importante na aglutinação do sêmen do espermatozóide suíno, afetando negativamente o número de leitões nascidos (Martín et al. 2010).

Poucos estudos sobre o efeito da bactéria na célula espermática, na espécie ovina, são descritos na literatura. Madeira (2011), isolou do sêmen de reprodutores ovinos da raça Crioula Lanada, os gêneros bacterianos, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Bacillus spp.* Neste estudo o uso da enrofloxacina e a associação de gentamicina-tilosina-lincomicina-espectinomicina foram eficazes frente às bactérias isoladas, mas a enrofloxacina quando utilizada em altas concentrações reduziu a motilidade das células espermáticas.

### 2.4 Avaliações do sêmen

A análise de rotina de uma partida de sêmen consiste na avaliação da motilidade, morfologia e concentração dos espermatozóides. A motilidade é a avaliação do movimento cinético das células espermáticas, podendo ser estimada subjetivamente ou pelo sistema de análise computadorizada (CASA), sendo seu resultado expresso em porcentagem total de espermatozóides móveis. Atualmente o sistema CASA tem sido utilizado para obter uma avaliação mais precisa e objetiva da cinética dos espermatozóides (Mortimer, 1997). A

motilidade é o parâmetro avaliado de forma rotineira, com a intenção de ser correlacionada com a fertilidade, mas sabe-se que o somatório de avaliações de outras características espermáticas podem prever a real fertilidade das células espermáticas (Chacón et al., 2001), visto que *in vivo* as células espermáticas ainda passam pelo processo de capacitação e reação acrossômica, ambos necessários para a fecundação (Lonergan et al., 1994).

## **2.5 Processo de criopreservação do sêmen**

O processo de criopreservação causa danos nas células espermáticas, sendo que a queda na motilidade após esse processamento é aceitável, mas seu mecanismo ainda é desconhecido. Maxwell & Watson (1996), sugerem que a criopreservação seleciona apenas algumas células viáveis, restando uma pequena população, porém fértil.

Segundo Celeghini (2005), as mudanças morfológicas dos espermatozoides ocorrem devido às alterações na temperatura e na osmolaridade do meio, alterando a composição dos lipídeos das membranas celulares, durante o processo de criopreservação. As mudanças ocorridas nas membranas durante a criopreservação causam danos a motilidade, além de danos bioquímicos e na sua estrutura (Maxwell & Watson, 1996).

## **2.6 Avaliação da membrana plasmática**

A avaliação da estrutura e funcionalidade da integridade da membrana espermática é importante para prever a viabilidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides (Vazquez et al., 1997). Estudos mostram que se as membranas estiverem intactas, mas biologicamente inativas, a fecundação não ocorrerá (Tartoglioni & Ritta, 2004). As membranas plasmáticas são responsáveis pelo mecanismo de manutenção de gradiente do equilíbrio osmótico, no qual qualquer dano estrutural leva a quebra da homeostase seguido de morte celular. Por esse motivo, a integridade da membrana plasmática é fundamental para a sobrevivência dos espermatozoides e para a manutenção da sua capacidade fertilizante (Celeghini, 2005).

O tradicional método de avaliação da integridade da membrana plasmática é realizado por esfregaços corados com corante supravital eosina (1%)-nigrosina (5%), na proporção 1:1 (sêmen: corante), sendo a lâmina corada e contadas 200 células. Seu resultado é dado pela proporção de vivos e mortos, sendo os espermatozoides mortos corados, pois o corante penetra na membrana plasmática lesada e liga-se aos ácidos nucleicos. (Swanson &

Bearden, 1951). No entanto este teste mensura a estrutura e não a funcionalidade das membranas plasmáticas dos espermatozoides.

Por isso, para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática o teste hiposmótico (HOST) é realizado, pois nas células espermáticas com as membranas bioquimicamente ativas haverá a entrada de água até que atinja seu equilíbrio osmótico. Por esse motivo, a membrana plasmática se expande. Como a membrana da cauda dos espermatozoides são mais frágeis do que a região da cabeça, os flagelos tem a capacidade de dobrarem/enrolarem, indicando que as membranas encontram-se íntegras e com funcionalidade (Jeyendran et al., 1984; Fuse et al., 1993; Vasquez et al., 1997).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMQUIST, J. O.; GLANTZ, P. J.; SHAFFER, H. E. The effect of a combination of penicillin and streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. **Journal Dairy Science**. v. 32, p. 543-548, 1949.
- ALTHOUSE, G. C.; LU, K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**. v. 63, p. 573-584, 2005.
- ALTHOUSE, G. C.; SKAIFE, J.; LOOMIS, P. Prevalence and types of contaminant bacteria in extended, chilled equine semen. **Theriogenology**. v. 63, p. 224-225, 2010.
- ANDRABI, S. M. H.; AHMAD, N.; ABBAS, A.; et al. Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal Bull semen. **Pakistan Veterinary Journal**. v. 21, p.166-169, 2001.
- BARTLETT, D. E.; LARSON, L. L.; PARKER, W. G. et al. Specific pathogen free (SPF) frozen semen: a goal? **In: Proc 6<sup>th</sup> Tech Conf Artif Insem Reprod**, NAAB, p. 11-22, 1976.
- BARTOOV, B.; OHAD, E.; NITZAN, Y.; et al. Virulence characteristics of male genital tract Escherichia coli isolated from semen of suspected infertile men. **Andrologia**. v. 23, p. 387-394, 1991.
- BIELANSKI, A.; NADIN-DAVIS, S.; SAPP, T.; et al. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**. v. 40, p. 110-116, 2000.
- BIELANSKI, A.; Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. **Theriogenology**. v. 68, p. 1-22, 2007.
- BROCK, K. Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. **In: Manual of international Embryo Transfer Society. USA: IETS**. Illinois. p. 135-139, 1998.
- CATENA, M.; CABODEVILA, J. Evaluación de semen bovino congelado Taurus. **In: Simpósio Internacional de Reproducción Bovina**. p. 18-31, 1999.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.



CHAGÓN J. Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the tropics. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 36, p. 91-99, 2001.

COELHO, N. M. **Flora bacteriana do prepúcio e sêmen de reprodutores Bos Taurus**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Escola de veterinária, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 56p, 1976.

DERIVAUX, J. **Fisiología de la reproducción y inseminación artificial de los animales domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1967, 416p.

DIEMER, T.; HUWE, P.; MICHELMANN, H. W.; et al. Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. **International Journal of Andrology**. v. 23, p. 176-186, 2000.

DIEMER, T.; HUWE, P.; LUDWIG, M.; et al. Influence of autogenous leukocytes and *Escherichia coli* on sperm motility parameters in vitro. **Andrologia**. v. 35, p. 100-105, 2003.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M.; STEWART, R. B. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II. *Haemophilus sommus*, *Mycoplasma spp* and *Ureaplasma spp*, *Chlamydia*; Pathogens and semen contaminants; Treatment of Bull semen with antimicrobial agents. **Vet Bull**, v. 62, p. 887-910, 1992.

FOOTE, R. H.; BRATTON, R.W. The fertility of bovine semen in extenders containing sulfamylamide, penicillin, streptomycin and polymyxin. **Journal Dairy Science**. v. 33, p. 544-547, 1950.

FUSE H.; OHTA S.; SAKAMOTO M.; et al. Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water. **Archives of Andrology**. v.30, p. 111-116, 1993.

Haidl, G. Macrophages in semen are indicative of chronic epididymal infection. **Archives of Andrology**. v.25, p.5-11, 1990.

JARVINEN, J. A.; KINYON, J. M. Preputial microflora of llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*). **Small Ruminant Research**. v. 90, p. 156-160, 2010.

JEYENDRAN R. S.; VAN DER VEN H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**. v.70, p. 219-225, 1984.

LONERGAN P.; KOMMISRUD, E.; ANDRESEN, O. Use of semen from a bull heterozygous for the 129 translocation in an IVF program. **Theriogenology**. v. 41, p. 1379-1384, 1994.

MADEIRA, E. M. **Eficácia da inclusão de antibióticos em diluente para criopreservação de sêmen ovino e sua influência na viabilidade espermática**. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)- Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 35p, 2011.

MARTÍN, L. O. M.; MUÑOZ, E. C.; BEECKMANS, S.; et al. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. **Animal Reproduction Science**. v. 120, p.95-104, 2010.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent process in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p. 55-65, 1996.

- MORRELL, J. M.; WALLGREN, M. Removal of bacteria from boar ejaculates by single layer centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. **Animal Reproduction Science**. v. 123, p. 64-69, 2011.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**. v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
- PELLATI, D.; MYLONAKIS, I.; BERTOLONI, G.; et al. Genital tract infections and fertility and infertility. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 140, p. 3-11, 2008.
- RAGHAVAN, R.; NILAKANTAN, P. R.; UPPAL, P. K. Studies on the bacteriology of bovine genital tract. **Indian Veterinary Journal**, v. 25, n.3, p. 779-783, 1971.
- RAMOS, J. Contaminación microbiana del semen bovino congelado. **Revista Universidade La Salle**. v.1, p.17-20, 1996.
- RODRIGUES, A. L. R.; BICUDO, S. D.; LOPES, C.A.M. Sensibilidade de bactérias do sêmen de touros Nelore (*Bos Indicus*) em central de inseminação artificial frente a antibióticos utilizados em meio diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 25, n. 3, p. 267-268, 1999.
- RUSSELL, P. H.; CURRY, M. R.; WATSON, P. F. The potential transmission of infectious agents by semen packaging during storage for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**. v. 47, p. 337-342, 1997.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**. v. 62, p. 77-111, 2000.
- SANOCKA, D.; FRACZEK, M.; KURPISZ, M. Male genital tract inflammation: the role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant enzymatic substances in seminal plasma. **Journal Andrology**. v. 24, p. 448-455, 2003.
- SCHIEWE, M. General Hygiene and quality control practices in a embryo production laboratory. In: **Manual of international Embryo Transfer Society. USA: IETS**. Illinois. p. 93-103, 1998.
- SKAU, P. A.; FOLSTAD I. Do bacterial infections cause reduced ejaculate quality? A meta-analysis of antibiotic treatment of male infertility. **Behavioral Ecology**. v. 14, p. 40-47, 2003.
- SWANSON, E.W.; BEARDEN, H.J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.10, p. 981-987, 1951.
- TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**. v. 62, p. 1245-1252, 2004.
- THIBIER, M. Reproductive Biotechnologies and Risks of Disease Spreading. **International Society for Animal Hygiene**. France. p.111-116, 2004.
- VALCÁRCEL, A.; de las HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; et al. Assessment of acrossomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 299-309, 1997.

VASQUÉZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ P.; et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**. v. 47, p. 913-922, 1997.

YÁNIZ, J.L.; MARCO-AGUADO, M. A.; MATEOS, J. A., et al. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. **Animal Reproduction Science**. v. 9, p.122-142, 2010.

## **CAPÍTULO 2**

**Identificação de bactérias presentes no sêmen de ovinos em diferentes sistemas de criação e o efeito do uso de Kilol-L<sup>®</sup> sobre as bactérias e parâmetros espermáticos.**

## 1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar as bactérias do sêmen fresco ovino, avaliar o uso do higienizante Kilol-L<sup>®</sup> antes da coleta do sêmen e testar a sensibilidade das cepas bacterianas frente ao antibiograma. Foram selecionados 24 ovinos machos, clinicamente sadios, com idade média de 4 anos, aptos à reprodução, da raça Santa Inês, sendo eles agrupados em dois sistemas de criação: a pasto (n=12) e confinamento (n=12). Os resultados microbiológicos indicaram que do total de 120 ejaculados, 99 tiveram crescimento bacteriano correspondendo a 82,5% das amostras. Os gêneros bacterianos isolados com maior frequência foram *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Listeria spp.* e *Escherichia coli*. Dos antibióticos testados, a amicacina e a gentamicina foram 100% eficaz para *Bacillus spp.* e *E. coli*. O ceftiofur foi efetivo para todas as bactérias isoladas, exceto a *Rodococcus equi*. Os *Streptococcus spp.* foram todos sensíveis a ampicilina e eritromicina e os *Staphylococcus spp.* foram todos sensíveis a gentamicina. Os *Corynebacterium spp.* foram sensíveis a todos os antibióticos testados. O uso do antisséptico Kilol-L<sup>®</sup> na concentração 1:250 reduziu o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) do ejaculado sem prejudicar a qualidade seminal. Esses resultados indicam que a utilização do higienizante Kilol-L<sup>®</sup> é recomendado antes da coleta do sêmen, para reduzir a quantidade bacteriana do ejaculado. Dos antibióticos testados, o ceftiofur e gentamicina foram os mais efetivos frente às cepas bacterianas isoladas, mostrando que a utilização desses no meio diluidor do sêmen ovino é uma alternativa para controlar o crescimento bacteriano.

**Palavras-chave:** Bactérias; higienizante; sêmen; sensibilidade

## 2 ABSTRACT

The objective of this study was to identify and quantify bacterial from fresh sheep semen, evaluate the use of sanitizing Kilol-L<sup>®</sup> prior to semen collection and test the sensitivity of bacterial strains against antibiotics. Were selected 24 Santa Inês rams clinically healthy, with 4 years old, able to reproduce, and they were grouped into two systems: on pasture (n=12) and confined (n=12). The microbiological results indicated that the total of 120 ejaculates, 99 had bacterial growth representing 82.5% of the samples. The most frequently isolated bacteria were *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, and *Streptococcus spp.* From the tested antibiotics, ampicillin and gentamicin were 100% effective for *Bacillus spp.* and *E. Coli*. Ceftiofur was effective for all isolates except for *Rodococcus equi*. The *Streptococcus spp.* were all susceptible to ampicillin and erythromycin and *Staphylococcus spp.* were all sensitive to gentamicin. The *Corynebacterium spp.* were sensitive to all antibiotics tested. The use of antiseptic Kilol-L<sup>®</sup> at a concentration of 1:250 reduced the number of Colony Forming Units (CFU/mL) from ejaculate without damage in the semen quality. These results indicated the use of sanitizer is recommended prior to semen collection, to reduce the amount of bacterial presents in the ejaculate. From the tested antibiotics, ceftiofur and gentamicin were more effective against the isolated bacterial strains, showing that the use of ram diluter medium is effective in controlling bacterial growth.

**Key-Words:** Bacterial; sanitizer; semen; sensitivity.

### 3 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são contaminantes importantes de muitos fluidos orgânicos, incluindo o sêmen de animais e humanos. A contaminação microbiológica é um importante parâmetro a ser considerado no controle de qualidade do sêmen tanto para inseminação artificial (I.A) quanto para sistemas de monta natural (Martín et al., 2010).

Existem duas principais fontes de contaminação seminal, uma de origem do doador e outra de origem diversa. A primeira pode ser originada das fezes, fluidos prepuciais, secreções respiratórias, pele, pelos e contaminação humana, já a segunda pode provir da água, copos coletores, equipamentos e deficientes condições de higiene (Althouse & Lu, 2005).

Em machos mamíferos, a uretra é parte comum do sistema urinário e genital, conseqüentemente a contaminação do sêmen, pode se originar de ambos os sistemas. Bactérias infectando o trato urinário expressam fatores de virulência que permitem a colonização, dano tecidual, provocando bacteriúria assintomática, cistite ou pielonefrite (Johnson, 1991).

Ao longo dos anos, pesquisas vêm sendo realizadas para identificar os agentes que podem ser transmitidos através do sêmen, assim como os pontos críticos da produção do mesmo. Dessa maneira, o sêmen utilizado na I.A não deve oferecer riscos de transmissão de enfermidades, mas mesmo com as centrais de I.A adotando sistematicamente medidas higiênicas para a manipulação e preparo do sêmen, a presença de bactérias não será evitada, mesmo que sejam utilizados antibióticos no meio diluidor (Jiménes & Robayo, 2004; Althouse & Lu, 2005).

Segundo Diemer et al. (1996), os micro-organismos tem efeito deletério na função espermática, tanto diretamente alterando a estrutura destas células como afetando a motilidade ou promovendo uma reação acrossomática prematura e indiretamente por estimular a produção de anticorpos. A interação da bactéria *Escherichia coli* com os espermatozoides tem sido estudada em todas as espécies (Aurox et al., 1991), pois sabe-se

que ela possui efeito espermicida, além de provocar um decréscimo na motilidade das células espermáticas e também de aumentar a aglutinação das células espermáticas, interferindo na longevidade espermática e na fertilidade do rebanho.

A motilidade progressiva é um importante parâmetro na avaliação dos espermatozoides, pois é um indicativo da sua vitalidade, a qual está diretamente relacionada com sua viabilidade (Flowers, 1996). A aglutinação das células espermáticas tem sido correlacionada com a alta incidência de contaminação bacteriana. Apesar da existência de novos e potentes antibióticos a resistência aos mesmos tem sido observada nas diferentes amostras de sêmen de varias espécies.

Este trabalho teve por objetivo identificar e quantificar as bactérias e os parâmetros espermáticos do sêmen de ovinos fresco, mantidos em sistemas a pasto e confinamento, além de avaliar o uso do Kilol-L<sup>®</sup> (Quinabra, São Paulo, Brasil) na cavidade prepucial, antes da coleta do sêmen e verificar a sensibilidade das cepas bacterianas, isoladas frente ao antibiograma.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Período experimental e local do experimento

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental Sucupira pertencente à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e no Laboratório de Microbiologia Veterinária pertencente a UnB, ambos localizados em Brasília-DF, durante os meses de janeiro a maio de 2011.

### 4.2 Animais experimentais

Foram selecionados 24 ovinos machos, clinicamente sadios, com escore corpóreo 3 (1-5), com idade média de 4 anos, aptos à reprodução com características espermáticas acima dos padrões mínimos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998), da raça Santa Inês e alojados na Fazenda Experimental Sucupira.

Para a realização do experimento os animais foram distribuídos em dois grupos de 12, sendo um grupo em sistema de confinamento (água *ad libitum*, feno Tifton, silagem de milho, sal mineral e ração Supra<sup>®</sup> para ovinos) e o outro grupo a pasto (pastagem Tifton, silagem de milho, sal mineral e água *ad libitum*). Todos os animais foram coletados quinzenalmente até completarem cinco repetições.

### 4.3 Coleta do sêmen

No total foram coletados 120 ejaculados, 60 dos animais confinados e 60 dos animais a pasto, pelo método de vagina artificial (Evans & Maxwell, 1987). Todo o material utilizado para a coleta foi previamente esterilizado.

Nas duas primeiras coletas de todos os carneiros foi realizada uma higienização do prepúcio externamente utilizando solução salina 0,9% e sabão neutro e nas três últimas,

com auxílio de uma piceta, foi utilizado, o higienizante, Kilol-L<sup>®</sup> (Quinabra, São Paulo, Brasil) na cavidade prepucial, na concentração 1:250, conforme recomendado pelo fabricante.

Cada ejaculado foi separado em duas alíquotas, uma para a análise do sêmen e outra para avaliação bacteriana.

#### **4.4 Análise do sêmen**

Os parâmetros seminais avaliados foram: volume, motilidade, vigor e concentração.

- O volume foi observado pela marcação do copo coletor, expresso em mililitros (ml). Para a motilidade uma alíquota de 10 $\mu$ l de sêmen foi sobreposto a lâmina, coberta por uma lamínula, ambas aquecidas previamente a 37°C para posterior avaliação no microscópio óptico em um aumento de 200x, sendo estimado o percentual de células espermáticas móveis. O vigor foi avaliado subjetivamente juntamente com a motilidade. A concentração foi realizada pela contagem do número de espermatozóides na câmara de Neubauer, para isso, o sêmen foi diluído em solução de formol-salina a 10% na proporção de 1:400 (20 $\mu$ l de sêmen em 8ml de solução).

#### **4.5 Análise bacteriológica**

Cada amostra do ejaculado foi colocada individualmente em um tubo tipo *ependorf* autoclavado e mantida sob refrigeração até o Laboratório de Microbiologia Veterinária da UnB para realização da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) e identificação das colônias bacterianas.

Para a contagem bacteriana total, 100 $\mu$ l do sêmen puro foi diluído em 9,9ml de solução salina estéril, onde 1ml da diluição da amostra do sêmen foi usada na diluição 1/10. Cada amostra foi distribuída em placas petri para a adição do agar padrão para contagem (PCA, Himedia<sup>®</sup>) e incubadas a 37°C por 24h.

As amostras do sêmen foram semeadas em agar sangue ovino 5% e incubadas a 37°C por 24 e 48h para verificação do crescimento bacteriano. Amostras com crescimento tiveram suas características observadas e classificadas em gram positivas ou negativas e se cocos ou bastonete, pelas características morfotintoriais. Testes complementares foram realizados até a identificação da bactéria, por exemplo: catalase, fermentação/oxidação, oxidase, descarboxilase, indol, motilidade e urease.

Para a realização do antibiograma, foi utilizado o método de difusão por disco, para isso, as colônias bacterianas identificadas foram previamente inoculadas em caldo Muller-Hinton (Himedia<sup>®</sup>) e incubadas a 37°C até atingirem a turbidade de 0,5 da escala de McFarland. Após, um swab estéril foi utilizado para semear na superfície do agar Muller-Hinton (Himedia<sup>®</sup>), em placa petri, seguido da distribuição dos discos impregnados de antibióticos. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas até sua leitura sendo interpretado o halo de inibição após esse tempo. As bactérias então foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes.

#### **4.6 Análise estatística**

Foi realizado análise de variância (ANOVA), com auxílio do programa estatístico SAS (*Statistical Analyses System*, versão 9.0, 2002), considerando diferença estatística quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Os resultados microbiológicos indicaram que do total de 120 ejaculados, 99 tiveram crescimento bacteriano correspondendo a 82,5% das amostras. Os gêneros bacterianos isolados com maior frequência foram *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.*

No grupo confinado foram isoladas 93 cepas bacterianas enquanto que no grupo a pasto foram identificadas 39. O gênero bacteriano mais frequentemente identificado no grupo confinado foi o *Bacillus spp.* (23,65%), enquanto nos animais a pasto foi o *Staphylococcus spp.* (46,15%) (Tabela 1).

Houve diferença ( $p < 0,05$ ) quando comparado o local em que os animais estavam alojados com as bactérias isoladas, sendo que *E. coli*, *Bacillus spp.* e *Listeria spp.*, significativos nos animais confinados quando comparando com o grupo a pasto.

Foi realizado antibiograma de todas as bactérias identificadas totalizando 132 amostras. Dos nove antibióticos testados (Tabela 2), *in vitro*, as bactérias foram mais sensíveis aos antibióticos ceftiofur (98,48%), seguido da gentamicina (93,18%) e menos sensíveis a penicilina (55,30%).

Dos antibióticos testados a amicacina e a gentamicina foram 100% efetivas para *Bacillus spp.* e *Escherichia coli*. O Ceftiofur foi efetivo para todas as bactérias isoladas, exceto a *Rodococcus equi*. Os *Streptococcus spp.* foram sensíveis a ampicilina e eritromicina e os *Staphylococcus spp.* foram sensíveis a gentamicina. Os *Corynebacterium spp.* foram sensíveis a todos os antibióticos testados.

Houve diferença ( $p < 0,05$ ), entre a contagem bacteriana total e o tipo de limpeza adotado antes da coleta do sêmen tendo o grupo Kilol-L<sup>®</sup> a menor contagem. Não houve diferença entre os grupos e o tipo de limpeza adotado antes da coleta do sêmen quando avaliado a motilidade, vigor e concentração das células espermáticas. As avaliações dos parâmetros do sêmen fresco estão expressas na tabela 3.

Tabela 1 - Porcentagem das cepas bacterianas isoladas do sêmen de ovinos da raça Santa Inês criados a pasto e confinados.

<b>Bactérias isoladas</b>	<b>Confinado (%)</b>	<b>Pasto (%)</b>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	3,22	12,82
<i>Bacillus spp.</i>	23,65 <sup>a</sup>	2,56 <sup>b</sup>
<i>Corynebacterium spp.</i>	17,21	12,82
<i>Enterobacter spp.</i>	-	2,56
<i>Escherichia coli</i>	9,68 <sup>c</sup>	7,70 <sup>d</sup>
<i>Listeria spp.</i>	10,75 <sup>e</sup>	5,13 <sup>f</sup>
<i>Staphylococcus spp.</i>	18,28	46,15
<i>Streptococcus spp.</i>	17,21	7,70
<i>Rodococcus equi</i>	-	2,56

<sup>a,b</sup> letras minúsculas diferentes na mesma linha, para *Bacillus spp.*, diferem (p<0,05).

<sup>c,d</sup> letras minúsculas diferentes na mesma linha, para *Escherichia coli*, diferem (p<0,05).

<sup>e,f</sup> letras minúsculas diferentes na mesma linha, para *Listeria spp.*, diferem (p<0,05).

Tabela 2 - Antibiograma das 132 cepas bacterianas isoladas do sêmen de ovinos da raça Santa Inês em manejo a pasto e confinados.

<b>Antibióticos</b>	<b>Resistente %</b>	<b>Intermediário %</b>	<b>Sensível %</b>
Amicacina (30µg)	12,88	0,76	86,36
Ampicilina (10µg)	25,76	3,79	70,45
Ceftiofur (30µg)	0,76	0,76	98,48
Estreptomicina (10µg)	17,43	6,82	75,75
Eritromicina (15µg)	15,91	12,13	71,96
Gentamicina (10µg)	4,54	2,28	93,18
Lincomicina (2µg)	21,21	0,76	78,03
Penicilina (10µg)	41,66	3,04	55,30
Polimixina B (300µg)	2,28	12,88	84,84

Tabela 3 – Média das avaliações do sêmen fresco de ovinos da raça Santa Inês, criados a pasto e confinados.

	<b>Confinado</b>		<b>Pasto</b>	
	Sem Kilol-L <sup>®</sup>	Kilol-L <sup>®</sup>	Sem Kilol-L <sup>®</sup>	Kilol-L <sup>®</sup>
<b>UFC/ml</b>	6812,50 <sup>a</sup>	4344,44 <sup>a</sup>	4746,66 <sup>a</sup>	1651,11 <sup>b</sup>
<b>olome (ml)</b>	1,40	1,31	1,05	1,13
<b>Motilidade (%)</b>	66,66	65,55	65,83	65,18
<b>Vigor (1-5)</b>	3,50	3,38	3,25	3,51
<b>Concentração (x10<sup>6</sup>/ml)</b>	2680,00	2981,11	2474,16	2478,52

<sup>a,b</sup> letras minúsculas diferentes na mesma linha, para UFC/ml, diferem (p<0,05).

## 6 DISCUSSÃO

A contaminação bacteriana do sêmen de ovinos ocorre durante a coleta e seu processamento. Para minimizar a presença de bactérias no ejaculado, a utilização de um higienizante, como o utilizado neste experimento (kilol-L<sup>®</sup>) é recomendado antes da coleta, na concentração 1:250. Neste experimento obteve-se uma significância ( $p < 0,05$ ) na redução de quantidade bacteriana total do ejaculado, quando se utilizou o higienizante.

Bactérias são componentes presentes no ejaculado da maioria das espécies. Diversos estudos em suínos relatam que a concentração bacteriana é superior a  $10^9$  UFC/ml (Tamuli et al., 1984; Althouse et al., 2000) e que em bovinos a média está em torno de 200.000/ml (Almquist et al., 1949). Poucos estudos que tratam da interação entre as bactérias e os espermatozóides são encontrados na literatura científica. Em sistemas de monta natural o ejaculado com presença bacteriana parece ter pouco efeito na fecundidade.

A UFC/ml presente no ejaculado é um valioso indicador das normas de higiene adotadas na coleta do sêmen. Nas condições em que o experimento foi realizado observou-se uma média de  $6,7 \times 10^3$  UFC/ml, enquanto que Yániz et al. (2010), observaram nos ejaculados comerciais de ovinos uma concentração superior a  $10^8$  UFC/ml. Já em estudos de Prado et al. (2005), com sêmen fresco de bovinos 74% das amostras tiveram  $\leq 1 \times 10^4$  UFC/ml. O código de recomendação da OIE a respeito da produção do sêmen bovino recomenda que a contagem bacteriana não deva exceder  $5 \times 10^3$  UFC/ml.

Independentemente do local da coleta as principais bactérias encontradas no sêmen fresco de ovinos hígidos foram: *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, os mesmos encontrados em ovinos por Yániz et al. (2010), caprinos por Souza et al. (2006), bovinos por Prado et al. (2005), bubalinos por Akhter et al. (2008), suínos por Althouse & Lu (2005) e equinos por Bristol (1991).

A *Escherichia coli* está presente frequentemente nos ejaculados de suínos, equinos e humanos. Esta bactéria no ejaculado é prejudicial, pois possui efeito inibitório na motilidade das células espermáticas bem como provoca aglutinação e danos ultra-estruturais na membrana dos espermatozóides. Neste estudo, foi isolado *E. coli*, porém nenhuma amostra

teve alteração nos parâmetros avaliados do sêmen. O fato de não ter sido observado alterações no sêmen corrobora com estudos de Althouse et al. (2000), os quais estabeleceram que o efeito deletério da bactéria *E. coli* é concentração-dependente.

As cepas isoladas de *E. coli*, foram todas resistentes a lincomicina e penicilina e todas sensíveis a gentamicina, amicacina e ceftiofur, o mesmo relatado por Drummond (2011). Já os isolados de *E. coli* em sêmen de suínos por Althouse et al. (2000) foram resistentes a oito dos dez antibióticos testados e sensíveis a ceftiofur e eritromicina.

Segundo Althouse & Lu (2005), os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos, popularmente usada nos diluentes para o sêmen de suínos, seguido dos  $\beta$ -lactâmicos e lincosamidas. Em sêmen bovino o uso da tradicional associação dos antibióticos penicilina-estreptomicina continua sendo utilizada, mesmo sabendo que bactérias anteriormente sensíveis podem ter se tornado resistente a esses antibióticos (Andrabi et al., 2001; Hansan et al., 2001).

Uma alternativa de combinação de antibióticos foi a associação de gentamicina, tilosina, lincomicina e espectinomicina (GTLS), adicionados no meio diluidor dos bovinos e testada primeiramente por Shin et al. (1988). Esta associação foi ao mesmo tempo mais eficiente para eliminar bactérias como *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma* e *Campylobacter spp.* e também não teve efeito negativo para a qualidade do sêmen e fertilidade (Andrabi et al., 2001; Shin et al., 1988).

Akhter et al. (2008) realizaram estudos comparando a associação penicilina-estreptomicina com a GTLS no sêmen de búfalos, onde concluíram que a associação de GTLS é mais eficaz que a penicilina-estreptomicina no controle bacteriológico, mas que ambos são eficientes na preservação da qualidade do sêmen por 3 dias a 5°C. Yániz et al. (2010), identificaram em seu estudo que 13% das bactérias identificadas foram simultaneamente resistentes a penicilina e estreptomicina, sendo a associação de antibióticos comumente utilizada no meio diluidor do sêmen ovinos.

Nesse estudo, dos nove antibióticos testados, o ceftiofur e a gentamicina foram os que apresentaram maior eficiência às cepas bacterianas isoladas do sêmen ovino, o que corrobora com os achados de Yániz et al. (2010), mas ainda seu efeito na função espermática necessita de maiores estudos.

Estudos com sêmen de caprinos, demonstraram que o uso da gentamicina na concentração de 13,3mg/ml é eficaz para controlar o crescimento bacteriano sendo indicado para o processo de criopreservação (Souza et al., 2006). Em ejaculados equinos a concentração de gentamicina de 50 $\mu$ g/ml foi tão eficaz quanto de 500 $\mu$ g/ml, na redução do



crescimento bacteriano, entretanto nenhuma concentração eliminou por completo o crescimento bacteriano (Varner et al., 1998).

A associação de gentamicina com amicacina é eficaz na eliminação de bactérias com crescimento aeróbico do sêmen equino, enquanto que a penicilina potássica (eficaz para bactérias anaeróbicas) associada com a amicacina obteve uma melhor resposta na motilidade e ação antibacteriana do sêmen equino, do que se usadas separadamente (Varner et al., 1998).

Estudo realizado com sêmen de ovinos indica que dos grupos testados (sem antibiótico, GTLS, penicilina-estreptomicina, ceftiofur e enrofloxacin) foram eficazes para a redução da carga microbiana, mas a enrofloxacin e a GTLS foram mais eficazes quando comparados aos demais grupos. A única observação quanto ao uso da enrofloxacin é que houve redução na motilidade espermática, principalmente quando utilizada em altas concentrações (Madeira, 2011).

## 7 CONCLUSÕES

É possível observar que os animais do grupo confinado apresentaram um aumento da presença de *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Escherichia coli* em relação aos animais do grupo à pasto.

Todas as bactérias *E.coli*, isoladas neste experimento, foram resistentes aos antibióticos lincomicina e penicilina enquanto que as do gênero *Corynebacterium spp.* foram sensíveis a todos os antibióticos testados.

O uso do antisséptico Kilol-L<sup>®</sup>, na concentração 1:250, reduz o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) do ejaculado sem prejudicar a qualidade seminal, independentemente do local em que os animais estavam durante o período experimental.

O ceftiofur e a gentamicina foram os antibióticos mais efetivos frente às cepas bacterianas isoladas, mostrando que a utilização desses é eficaz no controle do crescimento bacteriano dos ejaculados.

A adequada higienização dos equipamentos utilizados para a coleta, o local em que os animais são coletados e a prévia higienização prepucial dos carneiros é determinante para minimizar a contaminação bacteriana nos ejaculados.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTER S.; ANSARI, M. S.; ANDRABI, S. M. H.; et al. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 43, p. 272-278, 2008.
- ALMQUIST, J. O.; GLANTZ, P. J.; SHAFFER, H. E. The effect of a combination of penicillin and streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. **Journal Dairy Science**. v. 32, p. 543-548, 1949.
- ALTHOUSE, G.C., KUSTER, C.E., CLARK, S.G., et al. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**. v. 53, p. 1167-1176, 2000
- ALTHOUSE, G. C.; LU, K.G.; Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**. v. 63, p. 573-584, 2005.
- ANDRABI, S. M. H.; AHMAD, N.; ABBAS, A.; et al. Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal Bull semen. **Pakistan Veterinary Journal**. v. 21, p. 166-169, 2001.
- AUROUX, M. R.; JACQUES, L.; MATHIEU, D. et al. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: na *in vitro* study in man with *Escherichia coli*. **International Journal of Andrology**. v. 14, p. 264-270, 1991.
- BRISTOL, F. Bacterial flora of the reproductive tract in stallions. **Theriogenology**. p. 171-173, 1991.
- CBRA. 1998. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colegio Brasileiro de Reprodução Animal. 2º Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p.
- DIEMER, T.; WEIDNER, W.; MICHELMAN, H. W.; et al. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. **International Journal of Andrology**. v. 19, p. 271-277, 1996.
- DRUMMOND, V. O. **Detecção de genes de enterotoxinas, caracterização bioquímica e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de suíno hígdos do Distrito Federal**. Dissertação de mestrado – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia de Medicina Veterinária, 2011.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Austrália: Star Printery Pty Ltd, 194p, 1987.

- FLOWERS, W. L. Common issues associated with on-farm A.I. use. Proc. Allen D. Leman Swine Conference. University of Minnesota, US, pp. 69-73, 1996.
- HASAN, S.; ANDRABI, S. M. H.; AHMAD N.; et al. Effects of a new antibiotic combination on post-thaw motion characteristics and membrane integrity of buffalo and sahiwal Bull spermatozoa and on the bacteriological quality of their semen. **Pakistan Veterinary Journal**. v. 21, p. 6-12, 2001.
- JIMÉNEZ, C.; ROBAYO, I.; Bioseguridad em el procesamiento del semen bovino. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**. v. 10, 2004.
- JOHNSON, J. R. Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 4 p. 80-128, 1991.
- MADEIRA, E. M. **Eficácia da inclusão de antibióticos em diluente para criopreservação de sêmen ovino e sua influência na viabilidade espermática**. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)- Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 35p, 2011.
- MARTÍN, L. O. M.; MUÑOZ, E. C.; BEECKMANS, S.; et al. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. **Animal Reproduction Science**. v. 120, p. 95-104, 2010.
- 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. 10, 2005.
- SHIN, J. S.; LEIN, H. D.; PATTEN, H.V.; et al. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. **Theriogenology**. v. 29, p. 577-591, 1988.
- SOUZA, A. F.; GUERRA, M. M. P.; COLETO, Z. F.; et al. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n.3, p. 329-336, 2006.
- TAMULI, M. K.; SHARMA, D. K, RAJKONWAR, C. K. Studies on the microbial flora of boar semen. **Indian Veterinary Journal**. v. 61, p. 858-861, 1984.
- VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M.; THOMPSON, J. A.; et al. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**. v. 50, p. 559-573, 1998.
- YÁNIZ, J.L.; MARCO-AGUADO, M. A.; MATEOS, J. A., et al. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. **Animal Reproduction Science**. v. 9, p. 122-142 , 2010.

### **CAPÍTULO 3**

**Ceftiofur e gentamicina na criopreservação do sêmen ovino.**

## 1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de ceftiofur e gentamicina, na criopreservação do sêmen ovino, avaliando os parâmetros do sêmen e contaminação bacteriana. Foram selecionados oito ovinos, aptos à reprodução, sendo eles divididos em dois grupos, quatro para o grupo ceftiofur e quatro para gentamicina. Os tratamentos do grupo ceftiofur foram: sem antibiótico, 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml e 100µg/ml, e os tratamentos do grupo gentamicina foram: sem antibiótico, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml e 500µg/ml. Houve diferença significativa com o efeito congelamento do sêmen na variável motilidade, entre os dois grupos. Não houve diferença entre os tratamentos nos dois grupos quanto à motilidade das células espermáticas, bactérias isoladas e quantidade de unidades formadoras de colônias. Nas condições em que o experimento foi realizado, a utilização dos antibióticos ceftiofur e gentamicina, em diferentes concentrações no meio de criopreservação, não diferiram do sêmen criopreservado sem o uso dos antibióticos, nos parâmetros seminais e bacteriológicos. Esses resultados indicam que a adição desses antibióticos nas concentrações testadas não se faz necessária no meio diluidor.

**Palavras-Chave:** Ceftiofur; congelamento; dose-resposta; gentamicina.

## 2 ABSTRACT

The objective of this work was evaluate the effect of different concentrations of ceftiofur and gentamicin in the ram semen cryopreservation, evaluating the semen parameters and bacterial contamination. Were selected eight rams, able to reproduce, and they were divided into two groups four for the ceftiofur group and other four for gentamicin group. The ceftiofur treatments groups were, without antibiotic, 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml and 100µg/ml, and gentamicin treatment were without antibiotic, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml and 500µg/ml. There were significant differences with freezing effect in the semen about motility variable between the two groups. There was no difference between treatments in both groups for sperm cells motility, isolated bacterial and the amount of colony forming units. In this experiment conditions, the use of ceftiofur and gentamicin antibiotics in different concentrations in cryopreservation medium not differ from cryopreserved sperm without use of antibiotics concerning semen and bacteriological parameters. These results indicate that the addition of these antibiotics in the tested concentrations is not necessary in the diluter medium.

**Key-words:** Ceftiofur; freezing; dose response; gentamicin.

### 3 INTRODUÇÃO

Atualmente, a técnica da criopreservação do sêmen ovino tem conquistado grande importância e o sêmen congelado tem sido cada vez mais empregado na inseminação artificial (I.A). O controle bacteriológico do sêmen fresco e congelado, em ovinos, é pouco citado na literatura. Sabe-se que o prepúcio dos machos apresenta uma variedade de bactérias comensais ou potencialmente patogênicas que contaminam o ejaculado.

A adição de antibióticos é recomendada para minimizar esta contaminação bacteriana durante o processo de criopreservação do sêmen. Diferentes antibióticos têm sido testados, mas poucas pesquisas têm mostrado o efeito do crescimento bacteriano na qualidade do sêmen (Corona & Cherchi, 2006).

O impacto da infertilidade do macho na eficiência reprodutiva é significativo, devido ao macho servir a um grande número de fêmeas, seja por monta natural ou pela I.A. A infertilidade ou subfertilidade de machos é geralmente observada pelo decréscimo na taxa de parição ou aumento na taxa do retorno ao estro das fêmeas (Tsakmakidis, 2010).

A presença de bactérias nos ejaculados pode afetar diretamente as funções do macho, causando aglutinações que prejudicam a motilidade espermática, reduzindo a habilidade da reação do acrossoma e causando alterações na morfologia celular a fertilização (Diemer et al., 1996; Moretti et al., 2009). As bactérias também podem afetar indiretamente pela produção de toxinas (Morrell & Geraghty, 2006). Os isolados bacterianos mais frequentes no sêmen de ovinos são *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis* e *Staphylococcus aureus* (Yániz et al., 2010).

Além da disseminação de doenças, a presença de micro-organismos no sêmen criopreservado pode por em risco este germoplasma, pelo decréscimo na capacidade fertilizante, qualidade e viabilidade (Viveiros et al., 2010). Alguns autores colocam em evidência que nenhum antibiótico é completamente eficaz contra o crescimento bacteriano, nas amostras de sêmen (Varner et al., 1998; Pickett et al., 1999). Por estas razões é importante conhecer a microbiota presente no sêmen criopreservado, visto que os micro-organismos



podem sobreviver mesmo em nitrogênio líquido por um longo período, além de serem carregados para junto com o germoplasma (Clément et al., 1995; Bielanski et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de diferentes concentrações dos antibióticos ceftiofur e gentamicina, na criopreservação de sêmen ovino, avaliando os parâmetros seminais e contaminação bacteriana antes e depois da criopreservação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Período experimental e local do experimento

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental Sucupira pertencente à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e no Laboratório de Microbiologia Veterinária pertencente à Universidade de Brasília-UnB, ambos localizados em Brasília-DF, durante os meses de julho a setembro de 2011.

### 4.2 Animais experimentais

Foram selecionados oito ovinos, machos, da raça Santa Inês aptos à reprodução com características espermáticas mínimas acima dos padrões mínimos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).

Os ovinos foram divididos em dois grupos cada um com cinco tratamentos. Cada grupo foi composto de quatro ovinos (n=4). Foi coletado um ejaculado por semana até completarem-se três coletas de cada animal.

O grupo 1 consistiu na adição do antibiótico ceftiofur (Cef-50<sup>®</sup>) ao meio diluidor do sêmen ovino para sua criopreservação. Os tratamentos foram: ausência do antibiótico, ceftiofur (10µg/ml), ceftiofur (25µg/ml), ceftiofur (50µg/ml) e ceftiofur (100µg/ml).

O grupo 2 consistiu na adição do antibiótico gentamicina (Gentamax<sup>®</sup>) ao meio diluidor do sêmen ovino para a sua criopreservação. Os tratamentos foram: ausência do antibiótico, gentamicina (50µg/ml), gentamicina (100µg/ml), gentamicina (250µg/ml) e gentamicina (500µg/ml).

### 4.3 Coleta do sêmen

No total foram coletados 24 ejaculados, 12 do grupo ceftiofur e 12 do grupo gentamicina, pelo método de vagina artificial (Evans & Maxwell, 1987). Cada ejaculado foi aliquotado ao mesmo tempo para os cinco tratamentos, totalizando 120 amostras de ambos os grupos. Todos os materiais utilizados para a coleta do sêmen foram previamente esterilizados.

### 4.4 Análise bacteriológica

Alíquotas dos ejaculados fresco tanto do grupo ceftiofur quanto da gentamicina foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Veterinária para a verificação da contagem bacteriana total (UFC/ml) e do crescimento bacteriano em agar sangue ovino 5%, sendo incubadas a 37°C por 24 e 48h.

Para a contagem bacteriana total, 100µl do sêmen foi diluído em 9,9ml de solução salina estéril. Após 1ml da diluição foi transferido para uma placa petri e então adicionado o agar padrão para contagem (PCA, Himedia<sup>®</sup>), sendo incubado por 24 horas a 37°C.

Uma pequena quantidade de sêmen foi estriada em agar sangue ovino 5% e incubadas a 37°C por 24 e 48h para verificar o crescimento bacteriano. Amostras que tiveram crescimento foram observadas quanto as suas características e classificadas em gram positivas ou negativas e se cocos ou bastonete, pelas características morfotintoriais. Testes complementares foram realizados até a identificação das bactérias como, por exemplo: catalase, fermentação/oxidação, oxidase, descarboxilase, indol, motilidade e urease.

### 4.5 Análise do sêmen

Os ejaculados foram avaliados e incluídos neste estudo quando os seguintes critérios mínimos foram alcançados: volume entre 0,5 e 2 ml; concentração espermática de  $2 \times 10^9$  espermatozoides/ml, motilidade espermática acima de 70% e anormalidade espermática não superior a 20%. Para a avaliação da integridade das membranas plasmáticas foram realizados esfregaços em lâminas pré aquecidas a 37°C com sêmen fresco (20µl) já misturado ao corante eosina-nigrosina (20µl), para sua posterior visualização sob imersão, no microscópio óptico e contadas 200 células. Para a avaliação da funcionalidade das membranas o sêmen foi adicionado a um meio hipotônico na intenção de alcançar o equilíbrio osmótico.

Durante a reação endosmótica, os flagelos se dobram/enrolam no interior das membranas plasmáticas, sendo contadas 200 células.

#### **4.5.1 Processo de criopreservação do sêmen**

- Os ejaculados foram diluídos no meio TRIS-gema-glicerol (Evans & Maxwell, 1987), nos seus respectivos grupos e tratamentos, após o cálculo do número de doses dos ejaculados assim como o volume total necessário para proceder-se à diluição, considerando que cada dose possuía  $100 \times 10^6$  espermatozoides, envasados em palhetas de 0,25ml.

- Após o envase iniciou-se o processo de criopreservação, sendo as palhetas primeiramente refrigeradas na temperatura de 5°C por 2h, sendo então transferidas para uma caixa térmica onde permanecem por 20 minutos no vapor do nitrogênio (-80°C/-120°C) e após imersas no nitrogênio líquido (-196°C), raquiadas e armazenadas em botijões criogênicos até seu descongelamento.

#### **4.5.2 Descongelamento das amostras**

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, sendo a dose acondicionada em tubos tipo *ependorfs* de 1,5ml previamente aquecidos e mantidos a 37°C.

#### **4.5.3 Avaliação das amostras descongeladas**

Duas palhetas foram descongeladas, sendo uma para a avaliação do sêmen e outra para a análise bacteriológica.

Após o descongelamento, o sêmen foi diluído com PBS até obter-se uma amostra com aproximadamente  $48 \times 10^6$  espermatozoides/ml para a avaliação da motilidade utilizando a Análise Computadorizada do Sêmen Assistida (CASA), utilizando o *hardware* IVOS (Sistema Visual de Integração Óptica) versão 12.3 da empresa Hamilton Thorne Biosciences com o *software Animal Breeders*, configurado com o *setup* recomendado pelo fabricante para sêmen ovino.

Uma alíquota de 10µl da diluição foi disposta na câmara de Makler® previamente aquecida a 37°C, para a análise da motilidade pelo sistema CASA. Os campos

foram selecionados manualmente, sendo avaliados três campos, pois achados de Varner et al., (1991) concluíram que não há diferença significativa entre as avaliações de três e sete campos, observando a inexistência de bolhas ou artefatos (Sousa, 2002).

Além da avaliação da motilidade, pelo sistema CASA, também foi realizado a avaliação da morfologia do sêmen e integridade da membrana plasmática.

Para a análise bacteriológica, cada palheta descongelada foi colocada individualmente em um microtubo tipo *ependorf* e mantida sob refrigeração. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Veterinária para a realização da contagem bacteriana total (UFC/ml) e identificação do crescimento bacteriano da mesma maneira que as amostras do sêmen fresco.

#### **4.6 Análise estatística**

Foi realizado análise de variância (ANOVA), com auxílio do programa estatístico SAS (*Statistical Analyses System*, versão 9.0, 2002), considerando diferença estatística quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Os parâmetros seminais dos ejaculados dos carneiros seguiram o recomendado pelo CBRA (1998).

Nos grupos ceftiofur e gentamicina os tratamentos utilizados não foram significativos ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros da motilidade das células espermáticas, nos gêneros bacterianos isolados e na quantidade de unidades formadoras de colônia.

Os gêneros bacterianos isolados das doses seminais antes da criopreservação e depois do descongelamento foram os mesmos, exceto no grupo do ceftiofur que após a criopreservação teve crescimento do gênero *Actinomyces spp.*

O efeito congelamento do sêmen foi significativo no parâmetro motilidade das células espermáticas. O grupo ceftiofur teve média na motilidade das células espermáticas antes da criopreservação de 72,5 % e após descongelamento de 51% e o grupo gentamicina teve respectivamente antes e depois da criopreservação 73,5% e 53,56% na motilidade das células espermáticas.

O efeito congelamento no grupo ceftiofur reduziu o crescimento do gênero *Streptococcus spp.* e no grupo gentamicina reduziu o crescimento dos gêneros *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *E. coli*, e *Streptococcus spp.* O efeito congelamento não interferiu na quantidade de unidade formadora de colônias.

## 6 DISCUSSÃO

O decréscimo da motilidade pelo efeito congelamento já era esperado, visto que as células espermáticas sofrem dano celular, mesmo em protocolos eficientes de criopreservação. Por esse motivo, células espermáticas com o limiar de 30% de motilidade são consideradas aptas após o descongelamento do sêmen segundo critério do CBRA (1998).

Madeira (2011) utilizou a concentração de 25 $\mu$ g/ml de ceftiofur no meio diluidor do sêmen ovino, não obtendo diferença no parâmetro motilidade das células espermáticas quando comparada ao grupo controle (sem antibiótico) e as avaliações referentes a morfologia, integridade de membrana, também não mostraram diferença entre os tratamentos, o que corrobora com este estudo.

Neste trabalho, a quantidade bacteriana total, não foi significativa entre os tratamentos, corroborando com o trabalho de Madeira (2011), que também não verificou diferença entre os tratamentos, quando utilizaram o antibiótico ceftiofur.

Em um estudo com sêmen de equinos, Varner et al. (1998), utilizaram o antibiótico ceftiofur (1000 $\mu$ g/ml) e não obtiveram diferença no parâmetro motilidade espermática quando comparado com o grupo controle, o mesmo encontrado neste experimento.

Squires & McGlothlin (1980), quando utilizaram a gentamicina na concentração de 1000 ou 2500 $\mu$ g/ml, obtiveram uma baixa motilidade após trinta minutos de exposição frente ao antibiótico. O fato de utilizarem uma alta concentração do antibiótico pode ter influenciado neste resultado discordando deste estudo.

Maria et al. (2006a), observaram nas doses de sêmen da espécie de peixe *Brycon orbignyanus* contendo gentamicina na concentração de (0,25mg/ml) não mantiveram a motilidade por longos períodos se comparados com palhetas sem antibiótico, levando a conclusão que a população bacteriana no sêmen de *Brycon orbignyanus* não é sensível a gentamicina na concentração testada.

As amostras bacterianas do sêmen do *Brycon orbignyanus*, citadas por Viveiros et al. (2010), foram suscetíveis a gentamicina e não afetaram a motilidade das

células espermáticas quando utilizada em concentrações de 0,01-1mg/ml, o mesmo encontrado neste estudo, no entanto, quando utilizada em altas concentrações (0,5-1mg/ml), afetaram a taxa de fertilização se comparada com as concentrações diluídas até 0,1mg/ml. A adição de gentamicina no sêmen de *Brycon orbignyanus*, promoveu um controle do crescimento bacteriano por oito dias de armazenamento em refrigeração.

Estudos mostram que a associação de gentamicina com amicacina é mais eficaz na eliminação de bactérias aeróbicas. Clément et al. (1995), mostraram que a gentamicina é o melhor antibiótico para ser utilizado para controlar o crescimento bacteriano em sêmen de equinos quando comparado com o grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, assim como a concentração de 50 $\mu$ g/ml foi efetiva para a redução do crescimento bacteriano da mesma forma que a de 500 $\mu$ g/ml, o mesmo achado neste estudo.

Varner et al. (1998), adicionaram no sêmen de equinos gentamicina na concentração de 1mg/ml, não obtendo diferença ( $p>0,05$ ) quando comparado ao grupo controle (sem antibiótico) na variável motilidade das células espermáticas, corroborando com nosso estudo.



## **7 CONCLUSÕES**

As concentrações utilizadas dos antibióticos ceftiofur e gentamicina e a ausência de antibióticos no meio de criopreservação do sêmen ovino, não teve diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos, tanto nos parâmetros seminais quanto nos bacteriológicos, indicando que não é necessária a adição desses antibióticos no meio de criopreservação do sêmen ovino.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIELANSKI, A.; BERGERON, H., LAU, P. C. K.; et al. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**. v. 46, p. 146-152, 2003.
- CBRA. 1998. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio brasileiro de Reprodução Animal. 2º Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p.
- CLÉMENT, F.; VIDAMENT, M.; GUÉRIN, B. Microbial contamination of stallion semen. *Pratice Veterinary Equine*. **Biology of Reproduction Mono**. v. 1, p. 779-786, 1995
- CORONA, A.; CHERCHI, R. Characterization of bacteria in fresh semen of stallions during the breeding season. **Animal Reproduction Science**. v. 94, p. 85-88, 2006.
- DIEMER, T.; WEIDNER, W.; MICHELMAN, H. W.; et al. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. **International Journal of Andrology**. v. 19, p. 271-277, 1996.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats**. Austrália: Star Printery Pty Ltd, 194p, 1987.
- MADEIRA, E. M. **Eficácia da inclusão de antibióticos em diluente para criopreservação de sêmen ovino e sua influência na viabilidade espermática**. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)- Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 35p, 2011.
- MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* semen, na endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**. v. 26, p. 298-306, 2006a.
- MORETTI, E.; CAPITANI, S.; FIGURA, N.; et al. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. v. 26, p. 46-56, 2009.
- MORREL, J. M.; GERAGHTY, R. M. Effective removal of equine arteritis vírus from stallion semen. **Equine Veterinary Journal**. v. 38, p. 224-229, 2006.
- PICKETT, B. W.; VOSS, J. L.; JONES, R. L. Control of bacterial in stallions and their semen. **Equine Veterinary Journal**. v. 19, p. 424-469, 1999.
- SOUSA, D. B. **Viabilidade do sistema Equitainer na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas analyses computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação**

**artificial**. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista. Botucatu. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 103p. 2002.

SQUIRES, E. L.; McGLOTHLIN, D. G. Antibiotic treatment of stallion's semen. **Theriogenology**. v. 50 p. 64-73, 1980.

TSAKMAKIDIS, I. A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research**. v. 92, p. 126-130, 2010.

VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; BLANCHARD, T. L.; et al. Diseases and Management of Breeding Stallions. **American Veterinary Publications**. p. 257-263, 1991.

VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M.; THOMPSON, J. A.; et al. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**. v. 50, p. 559-573, 1998.

VIVEIROS, A. T. M.; FIGUEIREDO, H. C.P.; MARIA, A. N. Gentamicin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. **Journal of the World Aquaculture Society**. v. 41, p.57-65, 2010.

YÁNIZ, J.L.; MARCO-AGUADO, M. A.; MATEOS, J. A., et al. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. **Animal Reproduction Science**. v. 9, p. 122-142, 2010.

## **CAPÍTULO 4**

**Ação de antibióticos no diluidor do sêmen ovino e seus efeitos na qualidade espermática.**

## 1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da adição de diferentes antibióticos no meio de criopreservação do sêmen ovino, avaliando a qualidade e a viabilidade do mesmo antes e depois da criopreservação. Foram selecionados quatro ovinos machos da raça Santa Inês aptos à reprodução. Os ejaculados foram submetidos a cinco tratamentos, sendo eles; sem a adição de antibiótico, associação de penicilina-estreptomicina (100.000 UI-100mg/ml), ceftiofur (10µg/ml), gentamicina (50µg/ml) e a associação de gentamicina-tilosina-lincomicina-espectinomicina (250-50-150-300µg/ml). Os principais gêneros bacterianos isolados foram *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.* e *Staphylococcus spp.* Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos, nos parâmetros avaliados de motilidade das células espermáticas, unidades formadoras de colônia e gêneros bacterianos isolados, indicando que seguindo a metodologia deste trabalho, o uso de antibióticos no meio diluidor do sêmen ovino não é necessário.

**Palavras-chave:** Bactérias; congelamento; espermatozóide; ovinos.

## 2 ABSTRACT

The objective of this study was evaluate the effect of different antibiotics addition in the ram semen cryopreservation medium, evaluating the quality and viability of the sample before and after cryopreservation. We selected four Santa Inês rams able to reproduce. Ejaculates were submitted to five treatments: without antibiotic addition, penicillin-streptomycin combination (100.000UI-100mg/ml), ceftiofur (10µg/ml), gentamicin (50µg/ml) and gentamicin-tylosin-lincomycin-spectinomycin association (250-50-150-300µg/ml). The major isolated bacterial genus were *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.* and *Staphylococcus spp.* there was no difference ( $p>0,05$ ) between treatments in motility oh the sperm cells, colony forming nits and isolates bacterial genus, indicating that the following methodology of this work, the use of antibiotics in the ram semen extender medium is not required.

**Key-words:** Bacterial; freeze; sperm; ram.

### 3 INTRODUÇÃO

A ovinocultura, nos últimos anos, vem despertando maior interesse de produtores e órgãos governamentais. Com o crescimento da procura e da produção da carne ovina, tem crescido também o interesse em se intensificar a exploração econômica desta espécie. O atual cenário da ovinocultura mostra que esta atividade está em franca expansão em praticamente todo o país, expandindo-se para regiões onde antes não havia tradição na sua exploração.

A inseminação artificial (I.A) é a primeira geração de biotecnologias da reprodução, sendo utilizado no campo há mais de 60 anos e seu futuro está baseado na biosegurança. Mundialmente a I.A é aceita como um meio de prevenir e controlar a transmissão de doenças venéreas específicas e ao mesmo tempo permite uma troca de genética superior.

Atualmente, buscam-se práticas e procedimentos na produção de sêmen que contribuam para a redução do nível de contaminação. As centrais de coleta têm como objetivo fornecer o sêmen congelado livre de contaminantes, pois o mesmo ao ser criopreservado permite que ocorra um melhor controle sanitário, considerando que exames sanitários dos machos doadores são exigidos, pois um único ejaculado produz muitas doses de sêmen, aumentando assim o risco da disseminação de patógenos.

Nos animais, diversas bactérias são identificadas nas amostras de sêmen criopreservadas e certas bactérias apresentam efeitos negativos na qualidade do sêmen durante o armazenamento em baixa temperatura (Althouse et al., 2000; Akhter et al., 2008). Não somente o método de coleta, mas os equipamentos utilizados, as pessoas envolvidas no processo de manipulação do sêmen até o envasamento, são responsáveis pela contaminação da amostra durante o processo de refrigeração e congelamento (Kendrick, 1975; Coelho, 1976; Rodrigues, 1998).

Para minimizar esses efeitos, antibióticos são utilizados nos diluidores de sêmen para prevenção do crescimento bacteriano (Salamon & Maxwell, 2000). Ao mesmo

tempo deve-se cuidar para não ocorrer resistência aos antibióticos pelas bactérias (Diemer et al., 1996; Ronald & Prabhakar, 2001).

Algumas bactérias são deletérias para os espermatozóides. A bactéria que causa maior dano é a *Escherichia coli*, considerando que ela reduz a motilidade espermática através da adesão e aglutinação causando danos morfológicos na peça intermediária, membranas plasmáticas e acrossoma (Wolff et al., 1993; Diemer et al., 2000).

Alguns micro-organismos que anteriormente eram sensíveis a associação penicilina-estreptomicina, podem ter adquirido resistência a esses antibióticos. Uma alternativa de antibióticos é a associação de gentamicina, tilosina, lincomicina e espectinomicina (GTLS), já testadas em sêmen de bovinos por Shin et al. (1988). Esta combinação promove uma maior eficácia na eliminação de bactérias como *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Ureaplasmas*, *Haemophilus somonus*, *Campylobacter fetus subsp. veneralis* (Shin et al., 1988). Além disso, após o descongelamento das doses do sêmen bovino, não houve evidência de danos na qualidade do sêmen ou na fertilidade (Shin et al., 1988; Andrabi et al., 2001).

Neste estudo, os antibióticos testados foram: a tradicional associação penicilina-estreptomicina, a associação GTLS recomendada pela OIE e pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o ceftiofur e a gentamicina por serem os antibióticos mais eficazes frente às cepas bacterianas isoladas anteriormente. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito desses antibióticos quando adicionados ao meio diluidor do sêmen ovino, avaliando a qualidade e viabilidade do sêmen antes e depois da criopreservação.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Período experimental e local do experimento**

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental Sucupira pertencente à EMBRAPA Recursos Genéticos e no Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade de Brasília - UnB, ambos localizados em Brasília-DF, durante os meses de setembro a novembro de 2011.

### **4.2 Animais experimentais**

Foram utilizados 4 ovinos machos, da raça Santa Inês, aptos à reprodução com características espermáticas acima dos padrões mínimos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998), da raça Santa Inês, hípidos e alojados na fazenda experimental Sucupira.

Os carneiros foram coletados três vezes, com intervalo semanal entre elas, sendo cada ejaculado submetido a cinco tratamentos. Os tratamentos consistiam da adição de antibióticos ao meio diluidor do sêmen ovino para sua criopreservação. Os tratamentos foram assim caracterizados: ausência de antibiótico, associação de penicilina (100.000 UI)/estreptomicina (100mg/ml), ceftiofur (10µg/ml), gentamicina (50µg/ml) e a associação de gentamicina (250µg/ml) - tilosina (50µg/ml) - lincomicina (150µg/ml) - espectinomicina (300µg/ml).

### **4.3 Coleta do sêmen**

No total foram coletados 12 ejaculados, pelo método de vagina artificial (Evans & Maxwell, 1987). Cada ejaculado foi aliqotado ao mesmo tempo nos cinco tratamentos,

totalizando 60 amostras. Todo o material utilizado para a coleta do sêmen foi previamente esterilizado.

#### 4.4 Análise bacteriológica

Alíquotas dos ejaculados fresco tanto do grupo ceftiofur quanto da gentamicina foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Veterinária para a verificação do contagem bacteriana total (UFC/ml) e do crescimento bacteriano em agar sangue ovino 5%, sendo incubadas a 37°C por 24 e 48h.

Para a contagem bacteriana total, 100µl do sêmen foi diluído em 9,9ml de solução salina estéril. Após, 1ml da diluição foi transferida para a placa petri e então adicionou-se o agar padrão para contagem (PCA, Himedia<sup>®</sup>), sendo incubado por 24 horas a 37°C.

Uma pequena quantidade de sêmen foi estriada em agar sangue ovino 5% e incubadas a 37°C por 24 e 48h para verificar o crescimento bacteriano. Amostras que tiveram crescimento foram observadas quanto as suas características e classificadas em gram positivas ou negativas e se cocos ou bastonete, pelas características morfotintoriais. Testes complementares foram realizados até a identificação das bactérias, por exemplo: catalase, fermentação/oxidação, oxidase, descarboxilase, indol, motilidade e urease.

#### 4.5 Análise do sêmen

Após as coletas do sêmen, os seguintes parâmetros espermáticos foram avaliados:

- O volume do ejaculado foi observado pela marcação do copo coletor, expresso em mililitros (ml). Para a avaliação da motilidade (0-100%) e vigor (0-5) uma alíquota de 10µl de sêmen, *in natura*, foi sobreposto a uma lâmina coberta por uma lamínula, ambas aquecidas previamente a 37°C para posterior avaliação no microscópio óptico em aumento de 200x, sendo estimado o percentual de células espermáticas móveis. Os ejaculados com motilidade igual ou superior a 70% foram criopreservados tendo sua concentração espermática processada. Para a realização da concentração, o número de espermatozóides foram contados com o auxílio da câmera de Neubauer, sendo o sêmen previamente diluído em solução de formol-salina a 10% na proporção de 1:400 (20µl de sêmen em 8ml de solução). Para a avaliação da integridade da membrana plasmática foram realizados esfregaços em

lâminas pré aquecidas a 37°C do sêmen fresco (20µl) juntamente com o corante eosina-nigrosina (20µl), para posterior visualização, sob imersão, no microscópio óptico e contado 200 células. Para a avaliação da funcionalidade das membranas plasmáticas foi realizado o teste hiposmótico (HOST) conforme Jeyendran et al., 1984.

#### **4.5.1 Processo de criopreservação do sêmen**

Os ejaculados foram diluídos no meio TRIS-gema-glicerol, com seus respectivos tratamentos, após o cálculo do número de doses do ejaculado assim como o volume total necessário para proceder à diluição, considerando que cada dose continha  $70 \times 10^6$  espermatozóides/ml e envasados em palhetas de 0,25ml.

Após o envase das palhetas iniciou-se o processo de resfriamento pelo método tradicional (refrigerador). Nesse método, o sêmen permaneceu, após envasado, por 2h em refrigeração a 5°C. A congelação foi realizada em uma caixa térmica onde permanecem 20 minutos no vapor do nitrogênio (-80°C/ -120°C) e após as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido (-196°C), raquiadas e armazenadas em botijões criogênicos até seu descongelamento.

#### **4.5.2 Descongelamento das amostras**

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, e o sêmen acondicionado em tubos tipo *ependorf* de 1,5ml previamente aquecidos e mantidos a 37°C.

#### **4.5.3 Avaliação das amostras descongeladas**

Descongelaram-se duas palhetas sendo uma para a análise do sêmen e outra para a análise bacteriológica.

Para a análise do sêmen, após o processo de descongelamento, cada dose foi diluída em PBS até obter uma amostra com aproximadamente  $48 \times 10^6$  espermatozóides/ml para a avaliação da motilidade utilizando a Análise Computadorizada do Sêmen Assistida (CASA), utilizando o *hardware* IVOS (Sistema Visual de Integração Óptica) versão 12.3 da empresa Hamilton Thorne Biosciences constituído com o *software* Animal Breeders, configurado com o *setup* recomendado pelo fabricante para carneiros.

Uma alíquota de 10µl da amostra a ser analisada foi disposta na câmara de Makler® previamente aquecida a 37°C. Os campos foram selecionados manualmente, sendo avaliados três campos, pois achados de Varner et al. (1991) concluíram que não há diferença significativa entre as avaliações de três e sete campos, observando a inexistência de bolhas ou artefatos. Além da avaliação da motilidade pelo sistema CASA, foi também avaliado a morfologia das células espermáticas assim como a integridade e funcionalidade das membranas plasmáticas.

Para a análise bacteriológica, cada palheta descongelada foi colocada individualmente em um tubo tipo *eppendorf* e mantida sob refrigeração. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Veterinária para posterior realização da contagem bacteriana total (UFC/ml) e identificação do crescimento bacteriano, adotando o mesmo protocolo das amostras do sêmen fresco.

#### **4.6 Análise estatística**

Foi realizada análise de variância (ANOVA), com auxílio do programa estatístico SAS (*Statistical Analyses System*, versão 9.0, 2002), considerando diferença estatística quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos utilizados no sêmen dos ovinos quando comparados com a quantidade total de bactérias presente (UFC/ml), cepas bacterianas isoladas e motilidade das células espermáticas.

O efeito congelamento foi significativo nos parâmetros da motilidade das células espermáticas, tendo uma média de 75% antes da criopreservação e de 55,43% após o descongelamento das amostras.

Nas amostras do sêmen fresco foram isoladas os gêneros bacterianos *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*, além do crescimento de leveduras. Já nas amostras do sêmen depois do descongelamento foram isolados *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* e leveduras.

## 6 DISCUSSÃO

O uso do sêmen congelado apresenta inúmeros benefícios como o melhor aproveitamento dos reprodutores, facilidade no comércio e transporte do material genético, permitindo assim a introdução de novas linhagens nos rebanhos com uma maior segurança sanitária. Os procedimentos de congelamento e descongelamento do sêmen envolvem mudanças de temperatura, gerando danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais, sendo mais severos nos espermatozóides ovinos do que nos bovinos (Salamon & Maxwell, 1995; Watson, 1995). Mesmo adotando atuais protocolos de criopreservação 40-50% das células espermáticas não sobrevivem (Watson, 2000), sendo o mesmo encontrado neste trabalho.

Os isolados bacterianos encontrados nos ejaculados dos ovinos neste experimento, provavelmente provém do processo de coleta e processamento, pois os gêneros bacterianos identificados são comumente presentes no ambiente. Por esse motivo, pode-se considerar o uso de antibióticos como sendo uma possível estratégia para controlar o crescimento bacteriano no sêmen ovino.

O controle do crescimento bacteriano geralmente é realizado com a adição de antibióticos de amplo espectro no meio diluidor. Atualmente, a maioria dos diluentes utilizados no processo de criopreservação do sêmen contém a associação de penicilina-estreptomicina, mas pouco se sabe de seu efeito nas células espermáticas dos ovinos.

No entanto, Yániz et al. (2010) relatam que a *E. coli* é a bactéria mais frequentemente resistente a penicilina e estreptomicina o que torna a qualidade do sêmen criopreservado duvidosa, quando utilizada nos diluentes do sêmen, pois esta bactéria possui efeito inibitório na motilidade e também é responsável pela aglutinação das células espermáticas. Por esses motivos são necessários mais estudos a respeito dos efeitos de diversos antibióticos na função espermática.

Yániz et al. (2010), utilizando gentamicina no diluente de sêmen de ovinos na concentração de 0,25 e 0,5g/l, não obtiveram diferenças do grupo controle quando avaliado os parâmetros de motilidade e viabilidade espermática, o mesmo achado neste experimento. Já o

uso da gentamicina no sêmen de equinos reduziu os parâmetros da motilidade quando utilizada uma concentração de 1g/l (Aurish & Sperser, 2007).

Quando a concentração do antibiótico gentamicina foi utilizada dentro do intervalo de 200-500mg/ml, em diferentes espécies, foi considerado suficiente para inibir a atividade antimicrobiana (Akhter et al., 2008). Em diluentes de sêmen equino, Varner et al. (1998) utilizaram como tratamento gentamicina (1mg/ml), espectinomicina (1mg/ml), penicilina (1000UI/ml) e ceftiofur (1000µg/ml) todos esses tratamentos não interferiram na motilidade das células espermáticas quando comparado ao grupo controle, corroborando com nosso estudo.

Todos os isolados bacterianos que Althouse et al. (2000) identificaram foram resistentes a gentamicina, provavelmente por este antibiótico ter sido utilizado mais comumente nos diluentes do sêmen suíno, podendo sugerir a existência de algum grau de resistência bacteriana. Recentemente o ceftiofur tem sido incluído nos diluentes de sêmen suíno, mas seus efeitos ainda precisam ser avaliados.

Yániz et al. (2010), detectaram que as bactérias isoladas em seu experimento foram sensíveis aos antibióticos ceftiofur e gentamicina, sendo uma boa alternativa para a tradicional associação penicilina-estreptomicina no meio diluidor do sêmen ovino.

Em experimento realizado por Madeira (2011) com sêmen de ovinos utilizando diferentes tratamentos (sem antibiótico, GTLS, penicilina-estreptomicina, ceftiofur e enrofloxacina) nos diluidores do sêmen, observaram que a enrofloxacina foi o tratamento que obteve a menor motilidade das células espermáticas quando comparada entre os tratamentos, os demais tratamentos não diferiram do grupo controle. Nas condições em que este trabalho foi realizado, também não se observou diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos no parâmetro motilidade das células espermáticas.

As bactérias isoladas neste experimento foram semelhantes às encontradas por Madeira (2011). Os antimicrobianos testados no experimento de Madeira (2011) reduziram a carga bacteriana, tendo a associação de GTLS e a enrofloxacina a ação mais efetiva.

Akhter et al. (2008), concluíram que o uso de GTLS é mais efetivo do que a associação de penicilina-estreptomicina para o controle bacteriano em sêmen de búfalos, mas quanto a eficiência na preservação da célula espermática ambos foram igualmente eficazes por três dias a 5°C. Varner et al. (1998), quando compararam a associação penicilina-amicacina com o ceftiofur e o grupo controle (sem antibióticos), não houve diferença significativa, na motilidade das células espermáticas, semelhantes aos nossos achados.

## **7 CONCLUSÕES**

Nas condições em que o experimento foi realizado, não houve diferença entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), tanto nos parâmetros seminais quanto nos bacteriológicos do sêmen de ovinos da raça Santa Inês. Neste sentido, utilizando a metodologia deste trabalho, quanto aos cuidados de coleta e processamento do sêmen, o uso de antibióticos poderá ser suprimido.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTER S.; ANSARI, M. S.; ANDRABI, S. M. H.; et al. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 43, p. 272-278, 2008.
- ALTHOUSE, G. C.; KUSTER, C. E.; CLARK, S. G.; et al. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**. v. 53, p. 1167-1176, 2000.
- ANDRABI, S. M. H.; AHMAD, N.; ABBAS, A.; et al. Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal Bull semen. **Pakistan Veterinary Journal**. v. 21, p. 166-169, 2001.
- AURICH, C., SPERGSER, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v. 67, p. 912-918, 2007.
- CBRA. 1998. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colegio brasileiro de Reprodução Animal. 2º Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p.
- COELHO, N. M. **Flora bacteriana do prepúcio e sêmen de reprodutores Bos Taurus**. 1976. 56p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1976.
- DIEMER, T.; WEIDNER, W.; MICHELMANN, H. W.; et al. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. **International Journal of Andrology**. v. 19, p. 271–277, 1996
- DIEMER, T, WEIDNER, W, MICHELMANN, H. W.; et al. Escherichia coli- induced alterations of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v. 23, p. 178-186, 2000.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats**. Australia: Star Printery Pty Ltd, 194p, 1987.
- JEYENDRAN R. S.; VAN DER VEN H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**. v.70, p. 219-225, 1984.
- KENDRICK, J. W. Microbiological contamination of bovine semen. **Theriogenology**, v. 4, p. 125-129, 1975.

- MADEIRA, E. M. **Eficácia da inclusão de antibióticos em diluente para criopreservação de sêmen ovino e sua influência na viabilidade espermática.** Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)- Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 35p, 2011.
- RODRIGUES, A. L. R. **Avaliação das floras aeróbia e anaeróbia facultativa prepucial e seminal de touros *Bos indicus* submetidos a higienização intraprepucial em central de inseminação artificial.** 1998. 86p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1998.
- RONALD, B. S. M.; PRABHAKAR, T. G. Bacterial analysis of semen and their antibiogram. **Indian Veterinary Journal.** v. 71, p. 829-831, 2001.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen: causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science.** v. 38, p. 77-111, 1995.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science.** v. 62, p. 77-111, 2000.
- SHIN, J. S.; LEIN, H. D.; PATTEN, H.V.; et al. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. **Theriogenology.** v. 29, p. 577-591, 1988.
- VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; BLANCHARD, T. L.; et al. Diseases and Management of Breeding Stallions. **American Veterinary Publications.** p. 257-263, 1991.
- VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M.; THOMPSON, J. A.; et al. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology.** v. 50, p. 559-573, 1998.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development.** v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science.** v. 61, p. 481-492, 2000.
- WOLFF, H., PANHANS, A.; et al. Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. **Fertility and Sterility.** v. 60, p. 154-158, 1993.
- YÁNIZ, J. L.; MARCO-AGUADO, M. A.; MATEOS, J. A., et al. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. **Animal Reproduction Science.** v. 9, p. 122-142, 2010.

## **CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O trabalho permite observar que as principais bactérias encontradas no ejaculado do sêmen de ovinos são de origem ambiental e que a maioria das cepas bacterianas ainda não demonstram resistência aos antibióticos testados. Observou-se também que quando são adotadas medidas de higiene durante a coleta e processamento das amostras, o uso de antibióticos é desnecessário.