ALBUQUERQUE,I.R.R., et al. Microbiologia em sêmen caprino congelado submetido a estresse térmico. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 23, Ed. 272, Art. 1819, Dezembro, 2014.

PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Microbiologia em sêmen caprino congelado submetido a estresse térmico

Microbiology in goat semen frozen submitted to heat stress

Ítalo Reneu Rosas Albuquerque[1]; Edisio Oliveira de Azevedo[2]; Evanildo de Franca e Silva[3]; Jose Andreey de Almeida Telles[3]; Glayciane Costa Gois[1*]; Dalysson Yehudi Coura Assis[1]

[1] Alunos do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFPB/CCA, Areia-PB. Av. Dos Rodoviários – Derba – Senhor do Bonfim/BA CEP 48970-000. Telefone: 74-3541-1042 Fax: 74-3541-1016. Email italoreneu@hotmail.com; glayciane_gois@yahoo.com.br

[2] Professor Adjunto – Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária – Campus de Patos/UFCG

3 Graduado em Medicina Veterinária UFCG/Patos-PB

*Autor para correspondência.

Resumo: Este trabalho teve como objetivo analisar a qualidade microbiológica do sêmen congelado de 16 caprinos reprodutores das raças Boer, Pardo Alpina, Moxotó e Anglo nubiano, submetidos ao estresse térmico. As 38 amostras de sêmen foram coletadas com auxilio de vagina artificial, acondicionadas em tubos de ensaio contendo solução salina glicerinada a 50% e semeadas diretamente em meios específicos para pesquisa de bactérias. Não houve

crescimento de *Mycoplasma* spp., mas *Staphylococcus* coagulase negativa e *Micrococcus sp* foram isolados em 16 das 38 amostras cultivadas.

Palavras-Chave: caprinocultura, diagnostic, *Staphylococcus* spp.

Abstract: This study aim to examine the microbiological sperm quality of 16 Boer goat breeds, Pardo Alpino, Moxotó and Anglo nubiano, submitted to heat stress. The 38 semen samples were collected with the use of artificial vagina, put into test tubes, containing glycerinated saline to 50% and sown directly into specific environment to research bacteria. There was no growth of *Mycoplasma* spp.,but negative coagulase *Staphylococcus* and *Micrococcus* sp. were isolated in 16 of 38 samples grown.

KEY WORDS: goats, diagnosis, *Staphylococcus* spp.

INTRODUÇÃO

O rebanho caprino do Brasil é constituído por 10.401.449 cabeças, sendo que 93% são criados na Região Nordeste. O sistema produtivo predominante nesta região é o semiextensivo, explorados principalmente para produção de carne e pele.

Independentemente do objetivo da criação, a caprinovinocultura tem se expandido em todos os Estados brasileiros, contribuindo para o desenvolvimento sócio-econômico do País e em particular do Nordeste. Em razão de sua importância econômica e social, a caprinovinocultura requer atenção cuidadosa para que possa contribuir de forma mais apropriada para o desenvolvimento regional. Entretanto, desafios de diversas ordens estão presentes e necessitam ser superado.

De forma geral, a caprinocultura no Nordeste tem sido desenvolvida em um sistema de criação semi-extensivo ou extensivo. Neste último, os animais pastam livremente na caatinga, muitas vezes em conjunto com animais de

várias propriedades. A caprinocultura representa uma das principais atividades econômicas das áreas mais secas e a venda de animais vivos e/ou de peles constitui fonte adicional de recursos para obtenção de produtos não produzidos na propriedade.

É prática comum na região, o empréstimo de reprodutores para cruzamento com fêmeas de vizinhos, o que pode permitir a disseminação de agentes patógenos entre os rebanhos. Neste sentido, a saúde reprodutiva dos machos constitui fator decisivo para programas de reprodução, principalmente quando utilizados na monta natural.

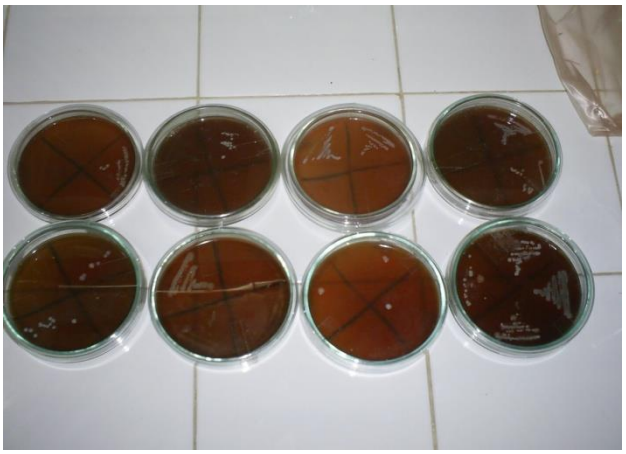
Análises microbiológicas do sêmen devem ser adotadas com o objetivo de evitar a transmissão de microrganismos, melhorando os índices de fertilidade dos rebanhos, pois há uma variedade de microorganismos que podem interferir na esfera reprodutiva de caprinos. Apesar disso, poucos trabalhos relatam a microbiota genital de caprino, sendo, portanto, o objetivo principal deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 38 amostras de 4 raças caprinos das raças Boer, Parda Alpina, Moxotó e Anglo nubiano submetidos a estresse térmico. As amostras foram coletadas com auxílio de vagina artificial, em tubos de ensaio estéreis contendo solução salina glicerinada com antibiótico (penicilina 2000 ui) a 50% e armazenadas em microtubos estéreis e transferidas imediatamente ao Laboratório de Vacinas e Diagnóstico da UFCG, onde foram armazenadas a –20°C até o momento do processamento. Alíquotas das amostras foram semeadas em meio Hayflick modificado para pesquisa de *Mycoplasma* spp como descrito por Azevedo et al. (2006).

Para as demais bactérias, as amostras foram semeadas individualmente em placas contendo ágar-sangue contendo 5% de sangue ovino desfibrinado e em placas com ágar MacConkey. Os cultivos foram incubados por 24-48 horas, a 37º C, fazendo-se então a leitura e interpretação de aspectos morfológicos das

colônias e ausência ou presença de hemólise. Para a identificação das bactérias realizou-se coloração de gram e provas bioquímicas como descritas Quinn (2005).



Figuras 1: *Staphylococcus* spp. em ágar sangue ovino 5%, **2**: Cultivo de *Staphylococcus* spp. *Micrococcus* sp. em ágar sangue ovino 5%.

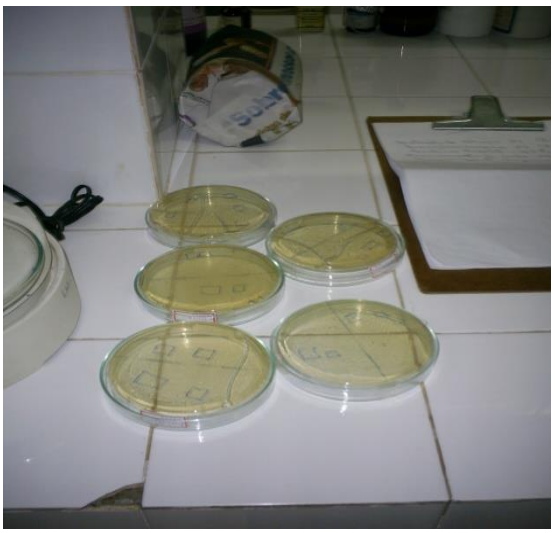


Figura 3: Placas com meio Hayflick

Figura 4: Estufa bacteriológica

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão relacionados os agentes etiológicos isolados no exame bacteriológico de 38 amostras. Destas, 16 (42,1%) apresentaram crescimento de bactérias.

Não houve crescimento de *Mycoplasma* spp em nenhuma das amostras testadas. Este resultado indica que os animais estudados pode ser destinados a reprodução, não demonstrando ainda um problema reprodutivos entre o rebanho. Os micoplasmas mais freqüentemente encontrados nas vias urogenitais causando lesões e infertilidades são: *Mycoplasma bovigenitalium* que produz vaginites com descarga mucopurulenta, e também vesiculite e epidemite em touros (SAED & AL-AUBAIDI, 1983). Diminui a motilidade dos espermatozóides e aumenta o numero de mortos entre os mesmos (HOLZ-MANN et al., 1982; JURURMANOVA AND STERBOVA, 1977). O *M. bovigenitalium* e *Ureaplasma* spp foram os microrganismos desta família mais comumente isolados do prepúcio dos machos e de amostra de sêmen (TRICHARD & JACOBSZ, 1985).

Tabela 1 **-** Distribuição dos agentes etiológicos isolados no exame bacteriológico de sêmen congelado caprino submetido a estresse térmico na UFCG campus - Patos.

Microrganismo	Positivo	
	N	%
Staphylococcus coagulase negativo	13	34,2
Microrcoccus sp	3	7,9
Mycoplasma spp	0	0
Total	16	42,1

Alguns animais infectados não apresentam grandes modificações no sêmen, nem sintomas clínicos da infecção, mas continuam eliminando os microrganismos, constituindo uma importante fonte de infecção para as fêmeas (TRICHARD AND JACOBSZ, 1985; TRUSCOTT AND ABBREO, 1977). *M. bovis*

causa severas formas de endometrites, salpingintes e salpingoperitonites; localizam-se nos ovidutos, causando esterilidade temporária ou permanente (KIRCHOFF, 1982). *Ureoplasma* spp. causa severa hiperemia vulvar e granulações vaginais com descargas vaginais purulentas (RUHNKE et al., 1978). Resultado semelhante aos obtidos neste trabalho foi relatado por Baczynska et al., (2006) quando pesquisaram *Mycoplasma* spp. no sêmen de eqüinos.

O isolamento de *Staphylococos* cogulase negativo e *Micrococcus* spp. obtidos neste trabalho, diferem dos apresentados segundo Souza (apud DERIVAUX, 1967), que constatou a presença de *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. em sêmen de bovinos e búfalos aparentemente sadios.

Um achado interessante observado neste trabalho foi à ausência de bactérias da família *Enterobacteriaceae*. O sêmen pode ser contaminado no momento da colheita, pois a vagina artificial é o método que proporciona maior contaminação quando comparado ao de massagem das vesículas seminais (SOUZA, 2006). Os equipamentos utilizados na colheita, bem como os funcionários que manejam os animais e o processo de manipulação do sêmen são mecanismos que podem levar à contaminação do sêmen segundo Souza (apud KENDRICK et al., 1975; MARIONOV et al., 1974; RIEK et al. 1980). Esta contaminação pode ser também influenciada pela falta de higienização da pele e mucosas dos animais ou dos tratadores que manipulam os instrumentos e animais.

CONCLUSÃO

M*ycoplasma* spp*.* não é ainda um problema em sêmen dos animais estudados.

Staphylococcus coagulase negativo e *Micrococcus* sp. foram os únicos microrganismos isolados nas 38 amostras utilizadas.

Novos estudos devem ser realizados para monitoramento da microbiota do trato reprodutivo de animais destinados à reprodução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R. et al. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Braz. J. Microbiol.*, v.37, p.576-581, 2006.

BACZYNSKA A, FEDDER J, SCHOUGAARD H, CHRISTIANSEN G. Prevalence of mycoplasmas in the semen and vaginal swabs of Danish stallions and mares. **Vet. Microbiol**. v.121, n. 1-2, p.138-43, 2006.

BANERJEE, M.; SINGHI, N.; GUPTA, P.P. Isolation of Mycoplasmas and Acholeplasmas from pneumonie lesions in sheep and goats in India. **Zbl. Vet. Med. B.,** n. 26, p. 689-695. 1979.

BEARDEN HJ, FUQUAY JW. Semen collection. *In*: Bearden HJ, Fuquay JW. (Ed.). *Applied animal reproduction*. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p.147-157.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; POUMARAT, F. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. **Rev. Sci. Tech. OIE,** v. 16, p. 848-873, 1997.

CARDOSO, V., M. ***Mycoplasma bovis*, *M*. *bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum* em touros. Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico**. São Paulo- SP. 2003 89f . Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

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

CORRÊA MN, Meincke W, Lucia T, Deschamps JC. (Ed.). *Inseminação artificial em suínos*. Pelotas: Printpar, 2001.

COTTEW, G.S.; WATSON, W.A.; ARISOY, F.; ERDAG, O.; BUCKLEY, L.S. Differentiation of *Mycoplasma agalactiae* from the other Mycoplasmas of sheep and goats. **J. Comp. Path.,** v. 78, p. 275-282, 1968.

DARZI, M. M.; SOOD, N.; GUPTA, P. P.; BANGA, H. S. The pathogenicity and pathogenesis of Mycoplasma capricolum subsp. capripneumoniae (F38) in the caprine mammary gland. **Vet. Res. Commun.** v. 22, n. 3, p. 155-165, 1998.

EAGLEASOME, M.D.; G ARCIA, M.M.; S TEWART, R.B. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen: Part II: *Haemoplilus somnus, Mycoplasma* spp. And *Ureaplasma* spp., *Chlamydia.* Pathogens and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. ***Vet. Bul***., v.62, n.9, p.887-910., 1992.

FLATSCHER, J.; HOLZMANN, A. Genital diseases in bulls: importance of artificial insemination- control measures. In:CONFERENCE OF THE OFFICE INTERNATIONAL DESEPIZOOTIES, REGIONAL COMISSION FOR EUROPE, 10, 1984. Viene, **Anais**. Viene, 1994, p. 893- 402.

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

GALL TJ, WILSON ME, ALTHOUSE GC. Quantification of bacteria in fractionated boar ejaculates. *In*: Swine Conference, 5, 1998, Minnesotta. *Proceedings*... Minneapolis, Minesotta: The Conference, 1998. p.45. Resumo

JURMANOVA, K.; STERBOVA, J. Correlation between impaired spermatozoan motility and mycoplasma finding in bull semen. **The Vetrerinary Record**, V. 100, p. 157-158, 1977.

HOLZMANN, A. *et. al*. Ejakulartveranderungen bei Stieren mit positiviem Mykoplasmennachwein. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin* 29:710-715, 1982.

HUFFMAN,E.M.; CHRISTENSEN, V.; HIRD, D.; JASPER, D. Epidemiology of bovine genital ureaplasma infection. Proceedings of the Society of theriogenology, p. 67-71, 1986.

QUINN, P. J. *et al*. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, 2005, 512p

KENDRICK, J. W. et al. Microbiological contamination of bovine semen. **Theriogenology**, v. 4, p. 125 –129, 1975.

KIRKBRIDE, C. A. Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma infections of bovine genitalia. The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice,V. 3, p. 575-591, 1987.

LORTON, S. P.; SULLIVAN, J. J.; BEAN, B.; KAPROTH, M.; KELLGREN, H.; MARSHALL, C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen, 3. Evalution of fertility. Theriogenology, V. 29, n. 3, p. 609-614, 1988.

MADANAT A., ZENDULKOVÁ, D.; POSPÍŠIL, Z. Contagious agalactiaof sheep and goats. A review. **Acta Vet. Brno.,** v. 70, p. 403-412, 2001.

RIET-CORREA, F.; SHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. Doenças de Ruminantes e Eqüinos. São Paulo: Varela, 2001.

RIEK, P. M.; PICKETT, B. W.; CREIGHTON, K. A. Sources of bacterial contamination in frozen bovine semen: a survey. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION OF ANIMAL BREEDERS, 15, 1980. USA, 1980. **Proceedings**... USA, p. 40-44.

MARIONOV, P.; BOHNELL, H. Hygienic conditions of material for freezing bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 57, p. 701-711, 1974.

MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A . B. A.; et al. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.5, n.1, p.107-118. 1999.

MILLER, R.B.; CHELMONSKA SOYTA, A.; SMITS, B.; FOSTER, R.; ROSENDAL, S. Ureaplasma diversum as a cause of reproductive disease in cattle. The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, V. 10. p . 479-490, 1994.

NASCIMENTO, E. R.; D'ANGELIS, F. H. F.; NASCIMENTO, M. G. F.; RESENDE, Q. A. Isolamento de micoplasmas de touros provenientes de um rebanho com problemas reprodutivos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, V. 20, n. 4, p. 158-160, 1998.

RUHNKE, H.L. & ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN , L. (Ed.). *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis* . Iowa: Iowa State University Press, 1994. p.141- 155.

RAE, D.O; CHENOWETH, P.J.; BROWN, M. B. Ureaplasma infection in the bovine. Archives of STD HIV Research, V. 7, p. 239-243, 1995.

RAGHAVAN, R.; NILAKANTAN, P. R.; UPPAL, P. K. Studies on the bacteriology of bovine genital tract. **Indian Veterinary Journal**, v. 48, n. 8, p. 779-783, 1971.

RODRIGUES, A. L. R.; BICUDO, S. D.; LOPES, C.A.M. Sensibilidade de bactérias do sêmen de touros Nelore (Bosindicus) em central de inseminação artificial frente a antibióticos utilizados em meios diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 267- 268, 1999.

RODRIGUEZ F.; RAMIREZ, G.A.; RAMIREZ, A.S.; BALL, H.J.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; FERNANDEZ, A. Immunohistochemical detection of Mycoplasma agalactiae in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from naturally and experimentally infected goats. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.** v. 49, n. 5, p. 226-229, 2002.

RUHUKE, H.L. *et al*. Isolation of ureoplasma from bovine granular vulvitis. *Can. J. Comp. Med*. 42:151-155, 1978.

SCHMIDTS-WINKLER, **Hand disinfection in health care**, Hamburg: Bode Chemie GmbH, 1998.

SAED, O. and AL-AUBIDI, J.M. Infertility in heifers caused by pathogenic of *Mycoplasma bovigenitalium*. *Cornell Vet*. 73:125-130, 1983

SOUZA, Andréia Fernandes ; GUERRA, Maria Madalena Pessoa ; COLETO, Zoraide Fernandes ; MOTA, R. A. ; SILVA, Leonildo Bento Galiza da ; LEÃO, Ana Emília Duarte de Souza ; NASCIMENTO SOBRINHO, Eliezer Silva Do . Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 43, p. 329-336, 2006.

STALHEIM, O.H.V. & STONE, S.S. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *Bovis* from arthritic cattle in Iowa and Nebraska. **J. Clin. Microbiol.,** v. 2, n. 3, p. 169-172, 1976.

TERAZAKI, M. H. F.; CAMPOS, S. G.; LIBERAL, M. H. T.; YIDA, O.; KOSSINI, A. J. Micoplasmose bovina: Isolamento em sêmen diluído e tratado com antimicrobianos inespecíficos. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, V. 14, n. 2, p. 147-152, 1991.

THACKER BJ, LARSEN RE, JOO HS, LEMAN AD, SWIGUEGUEN B. The diseases transmissible with artificial insemination. J Am Vet Med Assoc, v.185, p.511-516, 1984.

TRICHARD, C.J.V. and JACOBSZ, E.P. Mycoplasmas recovered from bovine genitalia, aborted fetuses and plascentas in the Republic of South Africa. *Onderstpoort J. Vet*. Res. 52:105-110,1985.