

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS
TRÓPICOS (PPGSPAT) - MESTRADO
MONALYSE KEVELYN BORGES DE OLIVEIRA

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DO SÊMEN DE TOUROS TABAPUÃ
MICROBIOLOGICAL STUDY OF TABAPUÃ BULL SEMEN

UBERABA, MG

2022

MONALYSE KEVELYN BORGES DE OLIVEIRA

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DO SÊMEN DE TOUROS TABAPUÃ

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Scoton Igarasi

UBERABA, MG

2022

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Oliveira, Monalyse Kevelyn Borges de.

O4e Estudo microbiológico do sêmen de touros tabapuã. / Monalyse Kevelyn Borges de Oliveira. – Uberaba, 2022.
46 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Scoton Igarasi.

1. Tabapuã (Zebu) – Melhoramento genético. 2. Bovino – Melhoramento genético. 3. Bovino. 4. Bovinocultura. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD: 636.08245

MONALYSE KEVELYN BORGES DE OLIVEIRA


ESTUDO MICROBIOLÓGICO DO SÊMEN DE TOUROS TABAPUÃ

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.


Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 22/02/2022


BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos - Orientador
Universidade de Uberaba



Prof.ª Dr.ª Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Universidade de Uberaba



Prof.ª Dr.ª Roberta Torres de Melo
Universidade Federal de Uberlândia

Aos meus avós Ovidio, Floripes, Tarcisio e Maria Sebastiana, exemplos de conduta e caráter. Aos meus pais Humberto e Susana, pelo apoio incondicional aos meus sonhos. Aos meus irmãos e ao meu noivo, por toda compreensão e estímulo que recebi nessa fase.

A vocês dedico essa conquista!

AGRADECIMENTOS

Sou grata, primeiramente, a **Deus** por me proporcionar essa oportunidade de estudo e crescimento profissional, por guiar meus caminhos e conferir a capacidade de concluir esse projeto.

Agradeço a meus **familiares, amigos e colegas de trabalho** pelo encorajamento e mensagens de incentivo, durante todo o desenvolvimento do mestrado.

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos** por todo apoio, dedicação e paciência. Sempre disposto a ajudar durante todas as etapas do projeto, um exemplo de ser humano e excelente profissional.

Ao meu coorientador **Prof Dr. Maurício Scoton Igarasi** por toda ajuda e conhecimento transmitido.

À **Médica Veterinária Mariluce Mazedo de Araújo** por sua disponibilidade, atenção e carinho, sempre disposta a auxiliar nos diversos desafios que surgiram nesse projeto.

À toda equipe da **Central Uberaba Genética Ltda**, sou grata pelo acolhimento, disposição e por todo auxílio prestado durante o período do meu aprendizado.

À equipe do **Laboratório de Microbiologia da Universidade de Uberaba**, excelentes profissionais, que auxiliaram intensamente na realização desse experimento.

À **Universidade de Uberaba (UNIUBE)**, por permitir a realização dos experimentos em suas dependências e por fornecer toda a segurança necessária em tempos de pandemia.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo financiamento do projeto na modalidade TAXA – PROSUP, meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

- Figura 1:** Perfil microbiológico de amostras de sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba-MG..... 31
- Figura 2:** Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados nas amostras de sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba – MG34

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1:** Aspectos macroscópicos e microscópicos de amostras do sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba-MG.....29
- Tabela 2:** Descrição dos agentes microbianos isolados e identificados nas amostras do sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba-MG.....30
- Tabela 3:** Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados nas amostras de sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba – MG33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

-	Negativo
%	Porcentagem
+	Positivo
µL	Microlitros
°C	Graus Celsius
ABCZ	Associação Brasileira de Criadores de Zebu
ABCT	Associação Brasileira dos Criadores de Tabapuã
ANOVA	Análise de Variância
AS	Ágar Sangue
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
BHI	Brain Heart Infusion
BRCAST	Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana
BVD	Diarreia Viral Bovina
CA	Canadá
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CCPS	Centros de Coleta e Processamento de Sêmen
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
GTA	Guia de Transporte Animal
H	Horas
MA	Manitol
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MC	MacConkey
mL	Mililitros
n°	Número
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NHC	Não houve crescimento bacteriano
OIE	World Organization for Animal Health
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal
RS	Rio Grande do Sul
SIM	Sulfeto, Indol, Motilidade

sp.	Espécie
spp.	Espécies
TSA	Teste de Sensibilidade Antimicrobiano
TSI	Triple Sugar Iron
x	Vezes

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
Resumo.....	12
Abstract.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Raça Tabapuã.....	15
2.2 Patógenos presentes no ejaculado bovino.....	15
2.3 Medidas sanitárias.....	16
2.4 Análises Microbiológicas.....	17
• Meios de cultivo bacteriano.....	17
• Características morfotintoriais.....	17
• <i>Staphylococcus</i> sp. / <i>Streptococcus</i> sp.....	18
• <i>Corynebacterium</i> sp.....	18
• Fermentadores de Glicose: Enterobactérias.....	19
• Não Fermentadores de Glicose: <i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Acinetobacter</i> sp.....	19
2.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO II.....	24
Resumo.....	24
Abstract.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Local e animais avaliados.....	26
Coleta das amostras de sêmen bovino.....	27
Processamento e análise microbiológica.....	28
Análise Estatística.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

ANEXO I.....	37
--------------	----

CAPÍTULO I

Estudo Microbiológico do sêmen de touros Tabapuã

Microbiological study of Tabapuã bull semen

Resumo

A comercialização de sêmen bovino está em constante expansão, o que intensifica a produção bem como a exportação desse produto e movimenta a economia nacional. Nesse âmbito, o controle sanitário é indispensável para o sucesso dessas práticas. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os aspectos microbiológicos do sêmen *in natura* de touros da raça Tabapuã, identificar os microrganismos presentes nas amostras e realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) das bactérias isoladas. Foram utilizados cinco touros da raça Tabapuã, destes foram coletados quatro ejaculados, pelo método de vagina artificial, com intervalo entre as coletas de sete dias. Os ejaculados foram analisados quanto a motilidade, vigor, concentração, pH e volume espermático. Alíquotas de sêmen foram acondicionadas em meios de cultivo microbiano. As colônias bacterianas foram quantificadas e identificadas por análise morfotintorial (coloração de Gram) e provas de identificação dos isolados bacterianos. Para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram utilizados: gentamicina (10µg); estreptomicina (10µg); e penicilina (10µg). As análises convencionais do sêmen bovino resultaram em motilidade espermática entre 19% a 47,5%, vigor espermático entre 1,75 a 3,0, concentração espermática entre 576,75 x10⁶/mL a 1898 x10⁶/mL, pH entre 6,0 a 6,7 e volume do ejaculado entre 4,65 mL a 6,25 mL. Dentre as 20 amostras de sêmen coletadas, 33 microrganismos de 9 gêneros distintos foram isolados e identificados. Destes destacamos os gêneros *Citrobacter* sp. (3,03%); *Corynebacterium* sp. (3,03%); *Enterobacter* sp. (9,09%); *Escherichia* sp. (9,09%); *Klebsiella* sp. (9,09%); *Providencia* sp. (3,03%); *Pseudomonas* sp. (12,12%); *Staphylococcus* sp. (45,46%) e *Streptococcus* sp. (6,06%). Quanto ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, entre 13 microrganismos, o antibiótico gentamicina apresentou 100% de efetividade, seguido do antibiótico estreptomicina (38,5%). O antibiótico penicilina apresentou apenas 7,7% dos microrganismos sensíveis ao fármaco em questão. Diante disso, podemos concluir que foi possível observar e identificar os agentes microbianos presentes nas amostras de sêmen e que a maioria dos microrganismos apresentaram sensibilidade ao antibiótico gentamicina, bem como resistência ao antibiótico penicilina.

Palavras-chave: Microbiologia; Ejaculado; Bovinos; Antimicrobianos.

Abstract

The commercialization of bovine semen is constantly expanding, which intensifies the production as well as the export of this product and moves the national economy. In this context, sanitary control is essential for the success of these practices. This study aimed to determine the microbiological aspects of *in natura* semen of Tabapuã bulls, identify the microorganisms present in the samples and perform the antimicrobial susceptibility test (TSA) of the isolated bacteria. Five bulls of the Tabapuã breed were used, of which four ejaculates were collected, using the artificial vagina method, with an interval between collections of seven days. The ejaculates were analyzed for motility, vigor, concentration, pH and sperm volume. Semen aliquots were placed in microbial culture media. Bacterial colonies were identified by morphotintorial analysis (Gram stain) and identification tests of bacterial isolates. For antimicrobial susceptibility tests, the following was used: gentamicin (10µg); streptomycin (10µg); and penicillin (10µg). Conventional analyzes of bovine semen resulted in sperm

motility between 19% to 47.5%, sperm vigor between 1.75 and 3.0, sperm concentration between $576.75 \times 10^6/\text{mL}$ to $1898 \times 10^6/\text{mL}$, pH between 6.0 to 6.7 and ejaculate volume between 4.65 ml to 6.25 ml. Among the 20 semen samples collected, 33 microorganisms of 9 different genera were isolated and identified. From these we highlight the genera *Citrobacter* sp. (3.03%); *Corynebacterium* sp. (3.03%); *Enterobacter* sp. (9.09%); *Escherichia* sp. (9.09%); *Klebsiella* sp. (9.09%); *Providencia* sp. (3.03%); *Pseudomonas* sp. (12.12%); *Staphylococcus* sp. (45.46%) and *Streptococcus* sp. (6.06%). As for the antimicrobial susceptibility test, among 13 microorganisms, the antibiotic gentamicin showed 100% effectiveness, followed by the antibiotic streptomycin, with 38.5%. The antibiotic penicillin presented only 7.7% of the microorganisms sensitive to the drug in question. Therefore, we can conclude that it was possible to observe and identify the microbial agents present in the semen samples and that most microorganisms showed sensitivity to the antibiotic gentamicin, as well as resistance to the antibiotic penicillin.

Keywords: Microbiology; Ejaculated; Bulls; Antimicrobials.

1. INTRODUÇÃO

Frequentemente a comercialização do sêmen bovino ocorre após a análise de características do ejaculado como concentração espermática, motilidade, vigor e defeitos morfológicos, aspectos tradicionalmente avaliados porém, que não garantem a total confiabilidade do material. As variações presentes entre os ejaculados refletem diretamente na qualidade espermática. Análises referentes a integridade e funcionalidade da célula espermática como a avaliação da membrana plasmática, acrossoma e função mitocondrial, permitem direcionar a análise do ejaculado com maior precisão (CELEGHINI et al. 2017).

Um parâmetro importante e normalmente negligenciado entre as avaliações de sêmen bovino é a contaminação microbiológica do ejaculado. As diversas etapas de manuseio do ejaculado favorecem a contaminação por agentes bacterianos oportunistas nos equipamentos de coleta, diluidores e no sêmen a fresco (MITRA et al. 2016; GOULARTE et al. 2020; REDA et al. 2020).

A presença de contaminantes microbianos como bactérias, vírus, protozoários e fungos, afetam a qualidade da célula espermática e permitem a propagação de enfermidades entre os rebanhos, o que causa prejuízos diretos e indiretos ao produtor. A determinação de protocolos sanitários e implantação de testes diagnósticos proporcionam um controle sanitário adequado (MITRA et al. 2016; GIVENS, 2018).

A linha de trabalho é bastante ampla e não se considera que tenham sido estabelecidas todas as possibilidades de identificação das possíveis formas de contaminação do ejaculado. Na delimitação do problema, o grupo de pesquisa se defronta com fatores que estabelecem limites para a determinação do seu projeto, e neste caso faz alguns recortes que circunscrevem o âmbito de nosso estudo. Apesar da existência de múltiplos protocolos e meios de cultivo microbiológico, optamos por seguir alguns protocolos já apresentados na literatura e fazer os devidos ajustes para a pesquisa.

A objetivo desse trabalho é o de identificar possíveis contaminantes patogênicos (bactérias) presentes no sêmen de touros da raça Tabapuã. Desta forma poder analisar e identificar os microrganismos, bem como realizar o teste de sensibilidade a antibióticos utilizados rotineiramente (penicilina, estreptomicina e gentamicina) . A literatura registra estudos em diversas espécies com delineamentos variados, que tem por finalidade a identificação de microrganismos presentes no sêmen. Assim, este estudo busca identificar algumas bactérias presentes na flora seminal de touros da raça tabapuã e testar a sensibilidade destas com antibióticos de rotina na reprodução animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Raça Tabapuã

De acordo com a Associação Brasileira dos Criadores de Tabapuã (2018), a raça é resultado de diversos cruzamentos entre gado mocho nacional e gado indiano. Em 1907, no estado de Goiás, iniciou-se os cruzamentos, com sucesso e consolidação da raça na década de 40. Em 1943, a família Ortenblad determinou cruzamentos que permitiram desenvolver um rebanho com melhores qualidades, com predominância da coloração branco-acinzentada do Nelore e a ausência de chifres, como gado mocho. Em 1970 o Ministério da Agricultura classificou o Tabapuã como um “tipo” de raça zebuína e, após dez anos de registros genealógicos feitos pela Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ), o Tabapuã foi reconhecido como raça. Trata-se de um neozebuino formado após a criação do Brahman e Indubrasil, sendo o primeiro entre os neozebuínos com planejamento específico, a maior conquista da zootecnia brasileira dos últimos cem anos.

A raça é reconhecida como o único “zebu brasileiro”, devido aos cruzamentos raciais que a originaram. Apresentam precocidade ao primeiro parto, habilidade materna e altos índices de fertilidade, bem como boa produção leiteira. Consequentemente os bezerros apresentam desempenho superior a outras raças e um reflexo positivo financeiramente para o produtor rural. A docilidade facilita o manejo e bem-estar dos animais, apresentam bom ganho de peso e acabamento de carcaça, com rendimento de carcaça superior a 54%, em comparação a outras raças zebuínas (ABCT, 2018).

2.2 Patógenos presentes no ejaculado bovino

Nos Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS), a obtenção do sêmen bovino requer critérios durante sua realização, a fim de evitar a presença de contaminantes patogênicos como vírus, bactérias e protozoários. Estes agentes podem afetar a fertilidade dos touros e desenvolver doenças reprodutivas no rebanho (GIVENS, MARLEY, 2008).

É importante ressaltar a impossibilidade de uma amostra seminal ser totalmente livre de agentes bacterianos, devido ao método de coleta como também o processamento do material (GIVENS, MARLEY, 2008). Existe uma flora bacteriana comumente encontrada no sêmen de bovinos saudáveis, que nessas condições não desenvolvem doenças, os chamados agentes oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. (SMOLE et al., 2010).

Além dos agentes bacterianos acima citados, existem outras enfermidades que podem ser transmitidas no ejaculado bovino como pelo Herpesvírus Bovino I, Diarreia Viral Bovina, Leucemia Bovina, Língua Azul e Febre Aftosa. Há também os agentes *Tritrichomonas fetus*, *Campylobacter fetus veneralis*, *Brucella abortus*, *Leptospira sp.*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis* e *Neospora caninum* que exigem atenção das Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen, para a admissão de novos touros e controle dos animais residentes (GIVENS, MARLEY 2008; GIVENS 2018). Diante destes desafios, são necessárias políticas para controle sanitário que envolvam todas as etapas de coleta, transporte, processamento e armazenamento do sêmen bovino (REDA et al., 2020).

2.3 Medidas sanitárias

Segundo a Instrução Normativa 48/2003, são estabelecidas medidas sanitárias para garantir a qualidade do sêmen bovino produzido, bem como sua comercialização no território brasileiro. Os requisitos sanitários mínimos contemplam a implantação de pré-quarentena, quarentena, monitoramento do rebanho residente e adição de antibióticos ao processamento do sêmen (BRASIL, 2003).

Na pré-quarentena os animais ingressam na CCPS após apresentação da Guia de Transporte Animal (GTA) e laudos negativos de Brucelose e Tuberculose com validade de 60 dias. Na quarentena, os animais permanecem em isolamento durante o período mínimo de 28 dias, para realização de novos testes para as doenças: Brucelose, Tuberculose, Campilobacteriose Genital Bovina, Tricomonose e Diarreia Viral Bovina (BVD) (BRASIL, 2003).

O monitoramento do rebanho residente ocorre anualmente, com a realização dos testes diagnósticos para as doenças Brucelose, Tuberculose, Campilobacteriose Genital Bovina, Tricomonose. Animais com resultados positivos são isolados do rebanho e reavaliados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio de testes pareados preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e confirmação da positividade exige a destruição de todas as amostras de sêmen produzidas por este animal dentro da CCPS (BRASIL, 2003).

Um protocolo sanitário comum na rotina da Centrais de Reprodução, é o uso de misturas de antibióticos incluídas ao sêmen, como forma preventiva ou corretiva diante de contaminações bacterianas advindas de erros prévios no processamento do material. Conforme a legislação do MAPA, as associações de antibióticos são incluídas para cada mililitro de sêmen

congelado. Segundo a normativa, é recomendado o uso de lincomicina e espectinomicina em associação com gentamicina e tilosina ou penicilina e estreptomina (BRASIL, 2003).

Deve-se ressaltar que há relatos de resistência bacteriana no sêmen bovino com o uso dos antibióticos penicilina, tilosina e lincomicina em concentrações inibitórias mínimas recomendadas pela legislação internacional (GOULARTE et al., 2020; KILBURN et al., 2013). Isto evidencia a necessidade de investigação da eficiência dos antibióticos comumente utilizados nas Centrais de Reprodução.

2.4 Análises Microbiológicas

Através da Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003, são oficializados os métodos de análises microbiológicas dos produtos de origem animal. As descrições destas análises são divididas entre bactérias de morfologia cocos (*Staphylococcus* sp / *Streptococcus* sp.) e bacilos (Enterobactérias / *Pseudomonas* sp. / *Acinetobacter* sp.)

- **Meios de cultivo bacteriano**

A escolha dos meios de cultivo bacteriano está vinculada com o possível patógeno presente no material a ser estudado. Os meios de cultivo ágar-sangue e ágar MacConkey são rotineiramente utilizados e propiciam o crescimento da maioria dos patógenos, após incubação por 24 - 48 horas a 37°C em ambiente de aerobiose (QUINN et al., 2005).

É importante ressaltar a necessidade da inoculação do material nas placas de cultivo pela técnica de esgotamento, que visa o crescimento de colônias isoladas no meio sólido. A identificação dos microrganismos é realizada de maneira presuntiva, de acordo com suas características morfotintoriais e meios de cultivo seletivos para identificação microbiológica (QUINN et al., 2005).

- **Características morfotintoriais**

Existem colorações diferenciais que permitem a identificação de bactérias de maneira distinta. Diante do crescimento bacteriano, a coloração de Gram pode classificar as bactérias entre os grupos de gram-positivas e gram-negativas (TORTORA et al., 2012).

- ***Staphylococcus sp. / Streptococcus sp.***

Os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* são microrganismos frequentemente encontrados em infecções superficiais da pele, e se adaptam as condições deste local por meio de mecanismos invasivos, como produção de enzimas e toxinas. Pertencem ao grupo de bactérias gram-positivas e são identificadas por meio das provas de catalase e coagulase (TORTORA et al., 2012).

Os microrganismos identificados como cocos gram positivos são submetidos a prova de catalase. Esta prova envolve a utilização de peróxido de hidrogênio 3% e observação da formação de bolhas de ar, evento que permite a identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus*. Não havendo formação de bolhas, o teste é negativo, o que direciona a identificação de microrganismos do gênero *Streptococcus* (BRASIL, 2013).

Uma segunda avaliação, prova coagulase, tem o intuito de verificar se o microrganismo possui capacidade aglutinante, a coagulase livre, característica das *Staphylococcus aureus*, que produzem uma enzima que coagula a fibrina presente no sangue dos organismos invadidos. Em tubos de ensaio é adicionado 0,5 mL de plasma de coelho e uma alçada da colônia em análise, os tubos são incubados a 37°C durante 24h. A formação de coágulo após incubação confirma a presença de *Staphylococcus* coagulase +. Amostras que não coagulam são identificadas como *Staphylococcus spp* (TORTORA et al., 2012).

- ***Corynebacterium sp.***

Microrganismos do gênero *Corinebacterium* são Gram-positivos de característica morfológica predominantemente cocóide. São bactérias catalase-positivas, oxidase-negativa, anaeróbicas facultativas. São considerados patógenos oportunistas, frequentemente encontrados no trato urinário de bovinos, podendo ocasionar cistite e pielonefrite (QUINN et al., 2005).

Os procedimentos diagnósticos para identificação desses microrganismos contemplam a análise microscópica direta das colônias coradas pela técnica de Gram que apresentam pleomorfismo corineforme típico. Presença de crescimento microbiano em ágar sangue e ausência de crescimento em ágar MacConkey, além de testes específicos para identificação de forma presuntiva, como a redução de nitrato, produção de urease e a presença ou ausência de hemólise (QUINN et al., 2005).

- **Fermentadores de Glicose: Enterobactérias**

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* apresentam morfologia de bacilos e característica tintorial como gram-negativos, são oxidase-negativos e anaeróbicos facultativos. Apresentam crescimento em ágar MacConkey, com fermentação de lactose e por consequência à produção de ácido as colônias apresentam coloração rosa. Colônias não-fermentadoras de lactose utilizam de peptonas do meio e o torna alcalino, com coloração pálida (QUINN et al., 2005).

Os testes bioquímicos comerciais estão disponíveis como meios de diferenciação das enterobactérias. Tubos contendo os meios TSI (Triple Sugar Iron), Citrato de Simmons, Fenilalanina, SIM (Sulfeto, Indol, Motilidade), Ureia e Lisina são exemplos de uma associação de reações bioquímicas capazes de identificar as colônias estudadas. Preconiza-se o uso de uma alçada do microrganismo por tubo, estes incubados a 37°C por 24 horas. A identificação bioquímica dos bacilos gram negativos é realizada por meio de tabelas padronizadas de kits comerciais (QUINN et al., 2005).

- **Não Fermentadores de Glicose: *Pseudomonas* sp. / *Acinetobacter* sp.**

Pseudomonas spp. são microrganismos de ocorrência na água, solo e plantas. Deve-se ressaltar a presença de *Pseudomonas aeruginosa* na superfície da pele, em mucosas e nas fezes (QUINN et al., 2005). Já *Acinetobacter* spp colonizam mucosas, pele e trato gastrointestinal, (ROCHA et al., 2008).

No caso dos microrganismos que não apresentaram fermentação de glicose, recomenda-se a incubação dos mesmos em ágar cetrimide a 37°C por 24 horas. A escolha deste meio de cultivo é justificável por sua capacidade de identificação qualitativa de bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. (ALONSO et al., 2020).

2.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para prever o antibiótico mais eficiente no tratamento de enfermidades, existem testes *in vitro* como o de disco-difusão, método criado por *Kirby-Bauer* e rotineiramente utilizado em laboratórios de diagnóstico. Utiliza-se discos de papel-filtro impregnados com antibióticos em determinadas concentrações que são estrategicamente depositados em ágar inoculado com a bactéria a ser avaliada (QUINN et al., 2005).

A princípio deve-se produzir uma suspensão das colônias em tubos contendo solução salina 0,9% com padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland. Com auxílio de *swab* estéril, as suspensões são inoculadas uniformemente em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton. Discos contendo os antimicrobianos são distribuídos nas placas com distanciamento entre os mesmos. As placas devem ser incubadas em estufa a 37°C em condições de aerobiose por 18 horas. Os halos formados ao redor dos discos, chamados zonas de inibição, são mensurados em milímetros para constatação da sensibilidade ou resistência bacteriana, por meio de comparação com medidas internacionalmente determinadas pelo BRCast (antigo NCCLS). A utilização de antibióticos constatados como sensíveis apresenta sucesso quando a droga atinge níveis terapêuticos nos tecidos do organismo afetado e soluciona a infecção causada pelo agente bacteriano (QUINN et al., 2005; TORTORA et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Analisar os parâmetros microscópicos e o perfil microbiológicos de amostras de sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba-MG.

3.2 – Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar as características gerais de motilidade, vigor, concentração, pH e volume do sêmen de touros Tabapuã.

3.2.2 Isolar e Identificar os microrganismos presentes nas amostras de sêmen colhidas por vagina artificial de touros Tabapuã.

3.2.3 Realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) das bactérias isoladas.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, B.; FERNÁNDEZ-BARAT, L.; DI DOMENICO, E.G.; MARÍN, M.; CERCENADO, E.; MERINO, I.; PABLOS, M.; MUÑOZ, P.; GUEMBE, M. **Characterization of the Virulence of Pseudomonas Aeruginosa Strains Causing Ventilator-Associated Pneumonia.** BMC Infectious Diseases, v.20, n.1, p.40-45, 2020.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica Módulo V.** Brasília, DF, 2013. 93p.
- BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - BINAGRI - SISLEGIS. **Instrução Normativa 48/2003.** Brasília, DF, 2003, 4p.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; RODRIGUEZ, S.A.F.; SANTOS, F.B.; ALVES, M.B.R.; OLIVEIRA, B.M.M. **Impacto Da Qualidade Do Sêmen Sobre a Fertilidade a Campo Em Bovinos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.4, n.1, p.40–45, 2017.
- GIVENS, M.D. **Review: Risks of Disease Transmission through Semen in Cattle.** The Animal Consortium, v.12, n.1, p.165-171, 2018.
- GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. **Pathogens That Cause Infertility of Bulls or Transmission via Semen.** Theriogenology, v.70, n.3, p.504-507, 2008.
- GOULARTE, K.L.; VOLOSKI, F.L.S.; REDÚ, J.F.M.; FERREIRA, C.E.R.; VIEIRA, A.D.; DUVAL, E.H.; MONDADORI, R.G.; LUCIA, T. **Antibiotic Resistance in Microorganisms Isolated in a Bull Semen Stud.** Reproduction in Domestic Animals, v. 55, n. 3, p. 318-324, 2020.
- HISTÓRIA da Raça Tabapuã. **ABCT / Associação Brasileira da Raça Tabapuã**, 2018. Disponível em: <<https://tabapua.org.br/raca-tabapua/historia-da-raca/>> Acesso em: 29 dez. 2021.
- KILBURN, C.; ROOKS, D.J.; MCCARTHY, A.J.; MURRAY, R.D. **Antimicrobial Resistance in Some Gram-Negative Bacteria Isolated from the Bovine Ejaculate.** Reproduction in Domestic Animals, v.48, n.3, p.525-528, 2013.
- MITRA, J.; CHOWDHURY, S.; PANDA, S.; CHAKRABORTY, M.; SINGHA, A. **Microbiological Evaluation of Bovine Frozen Semen Samples in West Bengal , India.** Exploratory Animal and Medical Research, v.6, n.2, p.185-191, 2016.
- QUINN, P.J; MARKEY, B.K; CARTER, M.E; DONNELLY, W.J.C.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas.** 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- REDA, A.A.; ALMAW, G.; ABREHA, S.; TADEG, W.; TADESSE, B. **Bacteriospermia and Sperm Quality of Cryopreserved Bull Semen Used in Artificial Insemination of Cows in South Wollo Zone, Ethiopia.** Veterinary Medicine International, p.1-11, 2020.
- ROCHA, L. A.; VILELA C. A. P.; CEZÁRIO R. C.; ALMEIDA A. B.; FILHO P. G. **Ventilator-Associated Pneumonia in an Adult Clinical-Surgical Intensive Care Unit of a**

Brazilian University Hospital: Incidence, Risk Factors, Etiology, and Antibiotic Resistance. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v.20, n.1, p.80-85, 2008.

SMOLE, I.; THOMANN, A.; FREY, J.; PERRETEN, V. **Repression of Common Bull Sperm Flora and in Vitro Impairment of Sperm Motility with Pseudomonas Aeruginosa Introduced by Contaminated Lubricant.** Reproduction in Domestic Animals, v.45, n.4, p.737-742, 2010.

TORTORA, GERARD J; FUNKE, BERDELL R.; CASE, CHRISTINE L. **Microbiologia.** 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CAPÍTULO II

Prevalência de microrganismos no sêmen de touros Tabapuã

Prevalence of microorganisms in the semen of Tabapuã bulls

Resumo

A comercialização de sêmen bovino está em constante expansão, o que intensifica a produção bem como a exportação desse produto e movimenta a economia nacional. Nesse âmbito, o controle sanitário é indispensável para o sucesso dessas práticas. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os aspectos microbiológicos do sêmen *in natura* de touros da raça Tabapuã, identificar os microrganismos presentes nas amostras e realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) das bactérias isoladas. Foram utilizados cinco touros da raça Tabapuã, destes foram coletados quatro ejaculados, pelo método de vagina artificial, com intervalo entre as coletas de sete dias. Os ejaculados foram analisados quanto a motilidade, vigor, concentração, pH e volume espermático. Alíquotas de sêmen foram acondicionadas em meios de cultivo microbiano. As colônias bacterianas foram quantificadas e identificadas por análise morfológica (coloração de Gram) e provas de identificação dos isolados bacterianos. Para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram utilizados: gentamicina (10µg); estreptomicina (10µg); e penicilina (10µg). As análises convencionais do sêmen bovino resultaram em motilidade espermática entre 19% a 47,5%, vigor espermático entre 1,75 a 3,0, concentração espermática entre 576,75 x10⁶/mL a 1898 x10⁶/mL, pH entre 6,0 a 6,7 e volume do ejaculado entre 4,65 mL a 6,25 mL. Dentre as 20 amostras de sêmen coletadas, 33 microrganismos de 9 gêneros distintos foram isolados e identificados. Destes destacamos os gêneros *Citrobacter* sp. (3,03%); *Corynebacterium* sp. (3,03%); *Enterobacter* sp. (9,09%); *Escherichia* sp. (9,09%); *Klebsiella* sp. (9,09%); *Providencia* sp. (3,03%); *Pseudomonas* sp. (12,12%); *Staphylococcus* sp. (45,46%) e *Streptococcus* sp. (6,06%). Quanto ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, entre 13 microrganismos, o antibiótico gentamicina apresentou 100% de efetividade, seguido do antibiótico estreptomicina (38,5%). O antibiótico penicilina apresentou apenas 7,7% dos microrganismos sensíveis ao fármaco em questão. Diante disso, podemos concluir que foi possível observar e identificar os agentes microbianos presentes nas amostras de sêmen e que a maioria dos microrganismos apresentaram sensibilidade ao antibiótico gentamicina, bem como resistência ao antibiótico penicilina.

Palavras-chave: Microbiologia; Ejaculado; Bovinos; Antimicrobianos.

Abstract

The commercialization of bovine semen is constantly expanding, which intensifies the production as well as the export of this product and moves the national economy. In this context, sanitary control is essential for the success of these practices. This study aimed to determine the microbiological aspects of *in natura* semen of Tabapuã bulls, identify the microorganisms present in the samples and perform the antimicrobial susceptibility test (TSA) of the isolated bacteria. Five bulls of the Tabapuã breed were used, of which four ejaculates were collected, using the artificial vagina method, with an interval between collections of seven days. The ejaculates were analyzed for motility, vigor, concentration, pH and sperm volume. Semen aliquots were placed in microbial culture media. Bacterial colonies were identified by morphotintorial analysis (Gram stain) and identification tests of bacterial isolates. For

antimicrobial susceptibility tests, the following was used: gentamicin (10µg); streptomycin (10µg); and penicillin (10µg). Conventional analyzes of bovine semen resulted in sperm motility between 19% to 47.5%, sperm vigor between 1.75 and 3.0, sperm concentration between 576.75 x10⁶/mL to 1898 x10⁶/mL, pH between 6.0 to 6.7 and ejaculate volume between 4.65 ml to 6.25 ml. Among the 20 semen samples collected, 33 microorganisms of 9 different genera were isolated and identified. From these we highlight the genera *Citrobacter* sp. (3.03%); *Corynebacterium* sp. (3.03%); *Enterobacter* sp. (9.09%); *Escherichia* sp. (9.09%); *Klebsiella* sp. (9.09%); *Providencia* sp. (3.03%); *Pseudomonas* sp. (12.12%); *Staphylococcus* sp. (45.46%) and *Streptococcus* sp. (6.06%). As for the antimicrobial susceptibility test, among 13 microorganisms, the antibiotic gentamicin showed 100% effectiveness, followed by the antibiotic streptomycin, with 38.5%. The antibiotic penicillin presented only 7.7% of the microorganisms sensitive to the drug in question. Therefore, we can conclude that it was possible to observe and identify the microbial agents present in the semen samples and that most microorganisms showed sensitivity to the antibiotic gentamicin, as well as resistance to the antibiotic penicillin.

Keywords: Microbiology; Ejaculated; Bulls; Antimicrobials.

INTRODUÇÃO

A comercialização de sêmen bovino está em constante expansão, o que intensifica a produção bem como a exportação desse produto e movimentam a economia nacional. Segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), no 1º semestre de 2021 foram comercializadas 12.071.376 doses de sêmen no mercado brasileiro, uma variação superior de 35,7% em comparação ao ano de 2020. Foram coletadas 9.450.015 doses de sêmen de touros com aptidão para corte nesse período e exportadas 149.085 destas doses. Esses dados elucidam o crescimento da produção e exportação do sêmen bovino na pecuária brasileira (INDEX ASBIA, 2021).

A avaliação andrológica é primordial para o sucesso da produção de doses de sêmen. Critérios mais rigorosos e atualizados nas avaliações macroscópicas e microscópicas do exame andrológico resultam na classificação de touros com maior potencial reprodutivo (DINIZ et al., 2021).

O aspecto sanitário também deve ser considerado dentre as avaliações andrológicas. Diversos microrganismos já foram detectados em ejaculados de touros, e a provável causa dessas contaminações está vinculada a agentes bacterianos oportunistas presentes nos equipamentos, nos diluidores e no sêmen a fresco (GOULARTE et al., 2020).

Os microrganismos frequentemente identificados em ejaculados de touros saudáveis de centrais de inseminação artificial são *Aerococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia* spp., *Leuconostoc* spp., *Staphylococcus* spp. (GOULARTE et al., 2020),

Corynebacterium spp. (REDA et al., 2020), *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Anthracoïd* spp., *Streptococcus* spp (MITRA et al., 2016).

Parâmetros de motilidade, vigor espermático e aspectos morfológicos normais são negativamente influenciados pela presença de contaminantes bacterianos. Portanto, protocolos sanitários devem ser implantados durante todas as etapas de manipulação do sêmen, desde a coleta, transporte, processamento e armazenamento, a fim de se evitar a contaminação desse material e a disseminação de patógenos entre os rebanhos (REDA et al., 2020).

O desenvolvimento de estudos descritivos da flora bacteriana nos ejaculados, bem como a realização periódica de testes de sensibilidade a antimicrobianos são indispensáveis para direcionar medidas corretivas e preventivas, no controle de qualidade sanitária do sêmen comercializado (GOULARTE et al., 2020).

Este trabalho objetivou determinar as características gerais e os aspectos microbiológicos de amostras de sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba, isolar e identificar os microrganismos presentes nas amostras e realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) das bactérias isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

O Projeto foi submetido ao comitê de ética em experimentação Animal – Processo nº 011/2021, sendo considerado aprovado (Anexo I).

Local e animais avaliados

Foram utilizados cinco touros da raça Tabapuã, hípidos, com idade entre 3 e 8 anos, peso médio de 800 kg, escore corporal de quatro a cinco, oriundos de Central de Coleta de sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba, durante o segundo semestre/2021. Os animais eram mantidos em piquetes individuais com sombreamento natural e/ou artificial, cama de areia, área de pastagem, cocho e bebedouro. O fornecimento de concentrado e volumoso era realizado duas vezes ao dia e o consumo de água e suplemento mineral *ad libitum*.

Para admissão dos animais na Central, os mesmos permaneceram isolados durante 28 dias em condição de quarentena para realização dos exames exigidos pela Instrução Normativa Nº48/2003 (BRASIL, 2003). Foi realizada a pesquisa de antígenos das enfermidades Tricomonose e Campilobacteriose por quatro repetições com intervalo de 7 dias. Também

foram realizados os exames para Brucelose e Tuberculose conforme preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), Instrução Normativa N°10/2017 (BRASIL, 2001), além da pesquisa do antígeno da Diarreia Viral Bovina (BVD). Os animais que apresentaram resultado negativo em todos os testes foram considerados aptos para coleta e comercialização do sêmen.

Coleta das amostras de sêmen bovino

As coletas de sêmen foram realizadas em piquete sombreado na presença de fêmea no cio, a lavagem do prepúcio foi realizada com solução composta por detergente neutro 1% e solução salina, posteriormente foi feito o enxague com água corrente.

O método de eleição para obtenção dos ejaculados foi a vagina artificial, conforme protocolo da Central de Sêmen. Tanto as vaginas artificiais quanto as mucosas que as compõem eram enxaguadas em água corrente, lavadas com detergente neutro, novamente enxaguadas e permaneciam de molho por 30 minutos em solução de CB30[®] na proporção 1:3000. Posteriormente eram dispostas na secadora até a secagem completa para uso.

Foram realizadas quatro coletas de sêmen de cada animal, com intervalo entre as coletas de sete dias, com respeito ao descanso dos touros. Os ejaculados eram imediatamente encaminhados ao Laboratório da Central para análise de motilidade, vigor, concentração, pH e volume espermático. Foram utilizados no presente experimento ejaculados com motilidade maior ou igual 30%, vigor maior ou igual a dois, e concentração maior ou igual a 600×10^6 /mL, por ejaculado. Estes parâmetros foram aceitos com enfoque no perfil bacteriano das amostras, independente da qualidade de comercialização do ejaculado.

Parte do ejaculado foi mantido *in natura* para determinação da concentração espermática e pH. Posteriormente, a amostra foi diluída em diluente Tryladil[®] (1:50) para avaliação microscópica dos parâmetros de motilidade e vigor.

Para o procedimento microbiológico, com auxílio de chama em bico de Bunsen e ponteira estéril, uma alíquota de 100µL de sêmen *in natura* foi acondicionada em tubo plástico tipo Falcon[®] estéril contendo 5 mL de meio caldo BHI (Brain Heart Infusion).

Estes tubos eram mantidos a temperatura entre 10°C e 5°C para envio ao Laboratório de Microbiologia da Universidade de Uberaba.

Processamento e análise microbiológica

No Laboratório de Microbiologia da Universidade de Uberaba, os tubos de meio BHI contendo as amostras de sêmen eram acondicionados em estufa a 37°C em condições de aerobiose durante 24 horas. O material era então semeado nos meios sólidos de cultivo ágar com 5% de sangue de ovino desfibrinado (Ágar sangue), Manitol e MacConkey em capela de fluxo laminar (Veco®). As placas em triplicata foram mantidas em estufa (Fanem®) para cultivo bacteriológico a 37°C em condições de aerobiose por um período de 48 horas.

As leituras do crescimento microbiano foram realizadas com 24h e 48h após incubação. As colônias eram avaliadas de acordo com suas características microscópicas, mediante características morfotintoriais (coloração de Gram), e provas de identificação presuntiva por meios de cultivo.

A coloração de Gram, consistiu na avaliação das colônias por meio de microscopia óptica (100X) com óleo de imersão, conforme determinado por metodologia de Hans Cristian Joaquim Gram, em 1884. A presença de coloração roxa indicou microrganismos gram positivos, enquanto bactérias de coloração rosa foram identificadas como gram negativas (MARTINS et al., 2001).

Colônias de cocos gram positivos foram submetidas a prova de catalase, para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus*. Este resultado positivo direcionou a uma segunda avaliação, a prova coagulase, a presença de coagulabilidade permite identificar as bactérias como *Staphylococcus* coagulase positiva. Testes negativos na avaliação catalase identificou microrganismos do gênero *Streptococcus* (BRASIL, 2013).

Colônias de bastonetes gram positivos foram submetidas aos testes de Motilidade, Ureia, TSI, Sulfeto, meio Bile esculina e ausência de hemólise, para confirmação do gênero *Corynebacterium sp.* (BRASIL, 2013).

Por fim, um conjunto de testes com meios de cultivo para identificação presuntiva dos isolados bacterianos foram aplicados para bastonetes gram negativos, para a classificação de microrganismos fermentadores de glicose (Enterobactérias) e os não fermentadores de glicose (*Pseudomonas spp / Acinetobacter spp*). As provas em análise envolveram os meios: Sulfeto, Indol, Motilidade (SIM), Ureia, TSI, Citrato de Simmons, Fenilalanina, Lisina e meio Cetrimide, de acordo com os resultados, foi possível identificar os gêneros bacterianos por meio de tabelas preconizadas pela legislação (BRASIL, 2013).

Os microrganismos isolados e identificados nos dois últimos ejaculados foram então utilizados para a realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos: gentamicina,

estreptomicina e penicilina, conforme método criado por *Kirby-Bauer* em 1966. A escolha destes antibióticos foi vinculada ao uso rotineiro nas Centrais de coleta de sêmen (BRASIL, 2005).

Análise estatística

Os dados obtidos da avaliação prévia dos ejaculados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) ($p > 0,05$). Os dados microbiológicos foram submetidos a análise estatística descritiva, com a apresentação na forma de tabelas e gráficos de frequências.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mediante a coleta dos 20 ejaculados, os mesmos foram mantidos *in natura* para determinação do volume, concentração espermática e pH. Posteriormente, a amostra foi diluída em diluente Tryladil[®](1:50) para avaliação microscópica dos parâmetros de motilidade e vigor espermático, a média aritmética e desvio padrão dos dados obtidos estão descritos abaixo na Tabela 1.

Tabela 1: Aspectos macroscópicos e microscópicos de amostras do sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba-MG.

Parâmetros avaliados	Touro 1	Touro 2	Touro 3	Touro 4	Touro 5
Volume (mL)	6,25 ± 3,4	5,33 ± 1,4	5,63 ± 1,2	4,90 ± 1,7	4,65 ± 0,2
Concentração espermática/mL	1330	1898	576,75	1067,25	814,5
(x10⁶)	±	±	±	±	±
Motilidade espermática (%)	461,65 ^a	1030,5 ^a	418,65 ^b	448,26 ^a	467,87 ^a
Motilidade espermática (%)	38,75±22,5 ^a	47,5±11,9 ^a	19±22,2 ^b	46,25±6,3 ^a	40±21,6 ^a
Vigor (0 a 5)	2,5 ± 1	3 ± 0	1,75 ± 0,95	3 ± 0	2,75 ± 0,5
pH	6,3 ± 0,6	6 ± 0	6,7 ± 0,3	6,2 ± 0,3	6,5 ± 0,5

ANOVA $p > 0,05$ para todos os parâmetros avaliados

De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, ejaculados com enfoque na comercialização, precisam apresentar motilidade maior que 50% e vigor acima de 3, os ejaculados coletados nesse estudo apresentaram resultados divergentes ao padrão comercial, mas foram analisados microbiologicamente, para a determinação do perfil microbiano do sêmen bovino da raça Tabapuã, o que é justificável.

Após a identificação dos isolados bacterianos, entre as 20 amostras de sêmen coletadas, 14 apresentaram crescimento bacteriano duplo, 5 amostras apresentaram crescimento bacteriano único e 1 amostra não apresentou crescimento bacteriano, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Descrição dos agentes microbianos isolados e identificados nas amostras do sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba-MG.

	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Touro 1	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Streptococcus</i> sp
	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>Klebsiella</i> sp	<i>Citrobacter</i> sp	NHC
Touro 2	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	NHC
	<i>Escherichia</i> sp	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>Enterobacter</i> sp	<i>Providencia</i> sp
Touro 3	<i>Streptococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp
	<i>Klebsiella</i> sp	<i>Klebsiella</i> sp	<i>Escherichia</i> sp	<i>Pseudomonas</i> sp.
Touro 4	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Corinebacterium</i> sp	NHC
	NHC	<i>Escherichia</i> sp	NHC	NHC
Touro 5	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp
	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>Enterobacter</i> sp	<i>Enterobacter</i> sp	NHC

Abreviações: NHC: Não houve crescimento bacteriano.

Dos 20 ejaculados coletados, 33 microrganismos de 9 gêneros distintos foram isolados e identificados. Trata-se dos gêneros *Citrobacter* sp. (3,03%); *Corynebacterium* sp. (3,03%); *Enterobacter* sp. (9,09%); *Escherichia* sp. (9,09%); *Klebsiella* sp. (9,09%); *Providencia* sp.

(3,03%); *Pseudomonas* sp. (12,12%); *Staphylococcus* sp. (45,46%) e *Streptococcus* sp. (6,06%), conforme Figura 1.

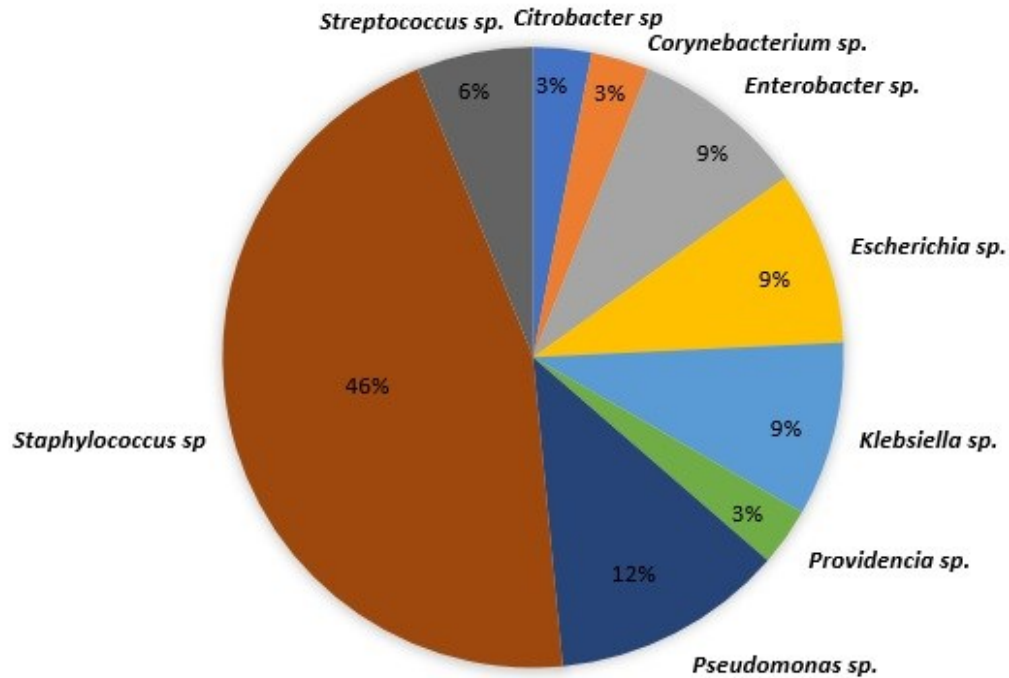


Figura 1: Perfil microbiológico de amostras de sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba-MG.

De acordo com a OIE (2010) não há definição do limite máximo aceitável de Unidades Formadoras de Colônias por mL de sêmen coletado, porém, orienta quanto às boas práticas de higiene nos centros de coleta e tratamento de sêmen, a fim de controlar a microbiota do trato reprodutivo masculino e a transmissão de doenças para as fêmeas. A Organização Mundial de Saúde Animal determina os espaços das instalações, manejo dos animais, procedimentos e manipulação do ejaculado no laboratório de processamento do sêmen, além dos cuidados de higiene necessários aos touros das centrais antes da coleta do material.

Um estudo desenvolvido por Goularte e colaboradores (2020) utilizou ejaculados de touros da região sudeste do Brasil, a fim de descrever os microrganismos presentes nas etapas de processamento do sêmen. Eles avaliaram as vaginas artificiais, sêmen a fresco, diluidores, a gema de ovo, o sêmen resfriado, os tubos flexíveis de preenchimento das palhetas e o sêmen envasado. Muitos dos gêneros dos microrganismos identificados pelos pesquisadores condizem com os isolados durante este estudo. Entre eles destacam-se, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Leuconostoc*, *Sphigomonas* e *Staphylococcus* em amostras coletadas da vagina

artificial. Ao avaliarem o sêmen a fresco, os mesmos microrganismos foram detectados, com exceção do microrganismo do gênero *Sphigomonas*, e identificação do gênero *Aerococcus*. Vale ressaltar que o método de vagina artificial também foi utilizado no presente trabalho, e a prevalência de 46% do gênero *Staphylococcus* sugere a influência direta do método de coleta por vagina artificial no grau de contaminação dos ejaculados examinados.

Dentre os estudos de sêmen na veterinária, principalmente entre grandes animais, foi desenvolvido um estudo por Al-Kass e colaboradores (2019) que avaliou 25.512 amostras de sêmen de 2.308 equinos, no período de 10 anos. O microrganismo *Taylorella equigenitalis* foi detectado, bem como os patógenos *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* beta hemolíticos e *Pseudomonas aeruginosa*. Estes três últimos gêneros de bactérias foram também identificados no presente estudo, apesar de demonstrarem baixo percentual entre as amostras analisadas, prevalência de 9%, 6% e 12%, respectivamente.

Entre os animais de produção, há estudos que avaliaram a diversidade de bactérias seminais de suínos, por meio de sequenciamento genômico, os autores revelaram uma prevalência dos gêneros *Pseudomonas* (34,41%) e *Lactobacillus* (19,93%) entre as 120 amostras testadas (ZHANG et al. 2020). O perfil traçado no presente trabalho evidenciou a prevalência de apenas 12% do gênero *Pseudomonas*, e não foram identificados microrganismos do gênero *Lactobacillus*.

Uma avaliação microbiológica de palhetas de sêmen congelado de touros foi realizada em centrais de sêmen na Índia por Mitra e colaboradores (2016), neste trabalho foi observado que o perfil bacteriano é semelhante ao detectado no presente estudo. Uma vez que foram identificadas as bactérias *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp. e *Streptococcus* spp.

Deve-se ressaltar que a presença destes contaminantes após o congelamento do sêmen é preocupante, e permite discussão a respeito da qualidade e eficiência dos antibióticos utilizados nos diluentes do sêmen para o congelamento deste material. Diante disso, o presente estudo avaliou a sensibilidade microbiana frente a antibióticos comumente utilizados nas centrais de sêmen bovino.

Todos os gêneros isolados e identificados durante o experimento foram utilizados para a realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, com exceção do gênero *Klebsiella* sp. por apresentar reduzido crescimento nas placas de cultivo. Os agentes microbianos foram classificados como sensíveis, intermediários e resistentes aos antibióticos testados (Tabela 3).

Tabela 3: Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados nas amostras de sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba - MG.

Bactérias isoladas	Antibióticos		
	Gentamicina (10µg)	Estreptomicina (10µg)	Penicilina (10µg)
<i>Citrobacter</i> sp.	(S)	(R)	(R)
<i>Corynebacterium</i> sp.	(S)	(S)	(R)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(S)	(R)	(R)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	(S)	(S)	(R)
<i>Escherichia coli</i>	(S)	(I)	(R)
<i>Providencia rettgeri</i>	(S)	(S)	(R)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(S)	(R)	(R)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(S)	(R)	(R)
<i>Staphylococcus</i> sp.	(S)	(R)	(R)
<i>Staphylococcus</i> sp.	(S)	(S)	(R)
<i>Staphylococcus</i> sp.	(S)	(R)	(R)
<i>Staphylococcus</i> sp.	(S)	(R)	(R)
<i>Streptococcus</i> sp.	(S)	(S)	(S)

Abreviações: S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente.

Dentre os 13 microrganismos avaliados, foi apresentada uma efetividade de 100% entre as amostras testadas ao antibiótico gentamicina. O antibiótico estreptomicina apresentou 53,8% de microrganismos resistentes, 38,5% de microrganismos sensíveis e 7,7% de microrganismos com efeito intermediário ao antibiótico estudado.

Com relação ao antibiótico penicilina, 92,3% dos microrganismos testados apresentaram resistência ao antibiótico, com apenas 7,7% dos microrganismos sensíveis ao fármaco em questão, observe a Figura 2.

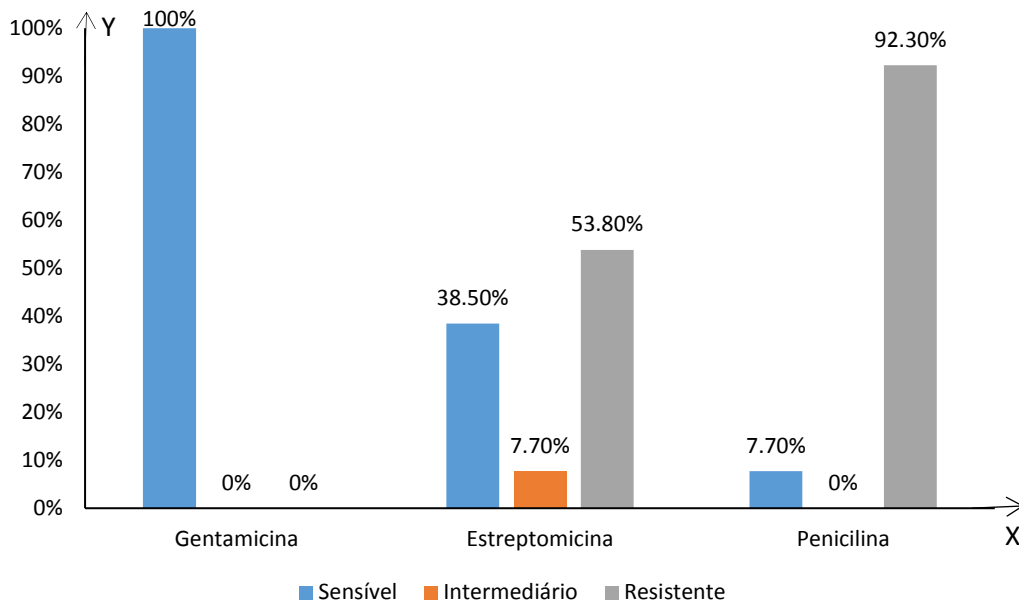


Figura 2: Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados nas amostras de sêmen *in natura* coletadas por vagina artificial de touros Tabapuã adultos, doadores de sêmen, mantidos em Central de Coleta de Sêmen no Triângulo Mineiro, cidade de Uberaba - MG.

No estudo desenvolvido por Goularte e colaboradores (2020) das 174 amostras de sêmen cultivadas, 135 microrganismos foram identificados como pertencentes a 25 gêneros diversos. Entre estes gêneros, 22 foram submetidos ao teste de sensibilidade antimicrobiana, o que correspondeu a 55 microrganismos. Todos os microrganismos foram resistentes ao antibiótico penicilina (100%), para o antibiótico gentamicina, as bactérias apresentaram sensibilidade de 76,4% e para o antibiótico estreptomicina, uma sensibilidade de 7,3% entre os microrganismos testados. Isto corrobora com os dados obtidos no presente estudo. Kilburn e colaboradores (2013) também observaram resultados positivos com o uso do antibiótico gentamicina entre amostras de sêmen *in natura*.

CONCLUSÃO

Dentre as amostras avaliadas, foi possível identificar nove gêneros de microrganismos, foram em maioria sensíveis ao antibiótico gentamicina, eficiência de 100%. Já para o antibiótico penicilina, 92,3% dos microrganismos foram resistentes, o que evidenciou a ineficiência desse antibiótico no controle microbiano dos ejaculados.

REFERÊNCIAS

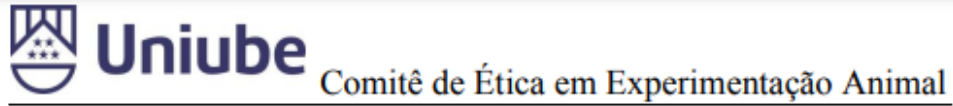
- AL-KASS, Z.; ERIKSSON, E.; BAGGE, E.; WALLGREN, M.; MORRELL, J.M. **Bacteria Detected in the Genital Tract, Semen or Pre-Ejaculatory Fluid of Swedish Stallions from 2007 to 2017**. Acta Veterinaria Scandinavica, v.61, n.1, p.4-9, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica Módulo V**. Brasília, DF, 2013. 93p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Normas de Desempenho Para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana. 15º Suplemento Informativo**. Brasília, DF, v.25, 2005, 177p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - BINAGRI - SISLEGIS. **Instrução Normativa 48/2003**. Brasília, DF, 2003, 4p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - **Instrução Normativa 10/2017**. Brasília, DF, 2001, 4p.
- DINIZ, J.H.W.; TEIXEIRA A.C.B.; RIVEROS, J.A.N.; PERES, R.F.G.; FONSECA, D.Q.; CUNHA, E.C.R.; VILELA, V.M.T.; SILVA, D.F.; LEO, A.M.P. **The Importance of Updated Criteria in Breeding Soundness Examination of Commercial Nellore Bulls for the Herd Reproductive Improvement**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia., v. 73, n. 2, p. 285-292, 2021.
- GOULARTE, K.L.; VOLOSKI, F.L.S.; REDÚ, J.F.M.; FERREIRA, C.E.R.; VIEIRA, A.D.; DUVAL, E.H.; MONDADORI, R.G.; LUCIA, T. **Antibiotic Resistance in Microorganisms Isolated in a Bull Semen Stud**. Reproduction in Domestic Animals, v. 55, n. 3, p. 318-324, 2020.
- INDEX ASBIA / Associação Brasileira de Inseminação Artificial, 1º Semestre / 2021, Universidade de São Paulo: ASBIA, 2021. Disponível em: <www.asbia.org.br>. Acesso em 29 ago. 2021.
- KILBURN, C.; ROOKS, D.J.; MCCARTHY, A.J.; MURRAY, R.D. **Antimicrobial Resistance in Some Gram-Negative Bacteria Isolated from the Bovine Ejaculate**. Reproduction in Domestic Animals, v.48, n.3, p.525-528, 2013.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA 2013. Disponível em: <www.cbra.org.br> Acesso em 01 out. 2021.
- MITRA, J.; CHOWDHURY, S.; PANDA, S.; CHAKRABORTY, M.; SINGHA, A. **Microbiological Evaluation of Bovine Frozen Semen Samples in West Bengal , India**. Exploratory Animal and Medical Research, v.6, n.2, p.185-191, 2016.
- MARTINS, C.R.F.; FERREIRA, J.A.P.S.; SIQUEIRA, L.F.G.; FERREIRA, L.A.P.; BAZZO, M.L; FRANCHINI, M.; BERRO, O.J.; VALLE, S. Ministério da Saúde. **Técnica de Coloração de GRAM**. Brasília, DF, 2001, 67p.

OIE. **Word organization for animal health.** Terrestrial Animal Health Code. 13^a ed., Paris: OIE 2010. Disponível em: <<https://www.oie.int/>>. Acesso em 29 dez. 2021

REDA, A.A.; ALMAW, G.; ABREHA, S.; TADEG, W.; TADESSE, B. **Bacteriospermia and Sperm Quality of Cryopreserved Bull Semen Used in Artificial Insemination of Cows in South Wollo Zone, Ethiopia.** Veterinary Medicine International, p.1-11, 2020.

ZHANG, J.; LIU, H.; YANG, Q.; LI, P.; WEN, Y.; HAN, X.; LI, B.; JIANG, H.; LI, X. **Genomic Sequencing Reveals the Diversity of Seminal Bacteria and Relationships to Reproductive Potential in Boar Sperm.** Frontiers in Microbiology, v.11, p.1-16, 2020.

ANEXO I



Ofício CEEA-009/2021

Uberaba, 5 de agosto de 2021

Ilmo. Prof.

André Belico de Vasconcelos

Assunto: Encaminha processo nº 011/2021, sobre o protocolo de projeto de pesquisa "Estudo microbiológico do sêmen de touros tabapuã".

Prezado (a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido a avaliação do CEEA-UNIUBE, em reunião no dia 02/07/2021, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Joly F. Aguiar de Bittencourt".

Prof. Joly F. Aguiar de Bittencourt

Coordenadora do CEEA-UNIUBE