

# Análise microbiológica de sêmen bovino pós-descongelamento

*Microbiological analysis of bovine semen post-thawing*

RODRIGO ANTÔNIO GONÇALVES

Discente do curso de Medicina Veterinária - UNIPAM  
E-mail: rodrigoag@unipam.edu.br

JULIANA BORGES PEREIRA

Professora orientadora - UNIPAM  
E-mail: julianabp@unipam.edu.br

---

**Resumo:** Análises microbiológicas do sêmen devem ser adotadas com o objetivo de se verificar a presença de microrganismos patogênicos, melhorando-se os índices de fertilidade dos rebanhos. O objetivo geral deste estudo foi verificar a presença de microrganismos no sêmen de bovino pós-descongelamento. Para isso, o material foi transportado em um botijão com nitrogênio líquido a 196°C abaixo de zero, para o laboratório de Microbiologia do UNIPAM. No laboratório, foram avaliadas 10 diferentes amostras de palhetas de sêmen pós-descongelamento. Foram encontrados fungos filamentosos em cinco amostras de *Escherichia coli* em duas amostras. Entretanto, não foram encontrados *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas* nem leveduras em nenhuma amostra. Diante disso, fica evidente a importância de se garantir a qualidade sanitária do sêmen industrializado, uma vez que esses microrganismos podem causar desequilíbrio reprodutivo em animais destinados à reprodução.

**Palavras-chaves:** Microbiologia. Reprodução animal. Sêmen.

**Abstract:** Microbiological analyzes of semen should be adopted to check the presence of pathogenic microorganisms and improve the fertility rates of the herds. The general objective of this study was to verify the incidence of microorganisms in bovine semen after thawing. For this purpose, the material was transported, to the microbiology laboratory of UNIPAM, in a tank of liquid nitrogen at 196°C below zero. In the laboratory, ten different samples of thawed semen stalks were examined. Filamentous fungi were found in five samples and *Escherichia coli* in two samples. However, no *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, or yeasts were found in any sample. Therefore, it is obvious how important it is to ensure the sanitary quality of industrially produced semen, as these microorganisms can cause a reproductive imbalance in animals intended for reproduction.

**Keywords:** Microbiology. Animal reproduction. Semen.

---

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial, sendo o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. O valor bruto da produção desses dois segmentos,

estimado em R\$ 67 bilhões, aliado à presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidencia a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país. Além disso, desde 2004, o rebanho bovino assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países. Proporciona o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos: as cadeias produtivas da carne e leite (MAPA, 2016).

Nesse sentido, a produção de sêmen congelado nas centrais de reprodução é uma ferramenta importante para a pecuária brasileira, mas o processo de coleta do sêmen pode influenciar nas características biológicas do ejaculado (VASCONCELOS, 2018). O processamento de sêmen bovino, especificamente a manipulação do sêmen refrigerado, para utilização na inseminação artificial em tempo fixo (IATF), tem sido utilizado com índices satisfatórios. Além disso, a utilização do sêmen refrigerado deve ser restrita à própria fazenda, não podendo ser comercializado ou coletado em central de processamento de sêmen, atendendo todas as exigências sanitárias (BORGES-SILVA *et al.* 2015; 2016). Para Strom, Rota e Linde-Forsberg (1997), ao se desenvolverem técnicas para criopreservação de sêmen, o objetivo é minimizar os danos causados aos espermatozoides durante a congelação, visando a um maior número de células espermáticas viáveis após a descongelação.

Diferentes meios diluidores têm sido testados e utilizados para a criopreservação do sêmen, como aqueles à base de glicina-gema, leite desnatado, tampão tris e o diluidor à base de água de coco. Além desses relacionados, muitas empresas desenvolvem seus próprios diluidores como o Triladyl, Laichipos 478, Biociphos W482 e o CLONE (OLIVEIRA, 2003). De acordo com a concentração bacteriana existente em um ejaculado, os espermatozoides podem sofrer alterações morfológicas e/ou funcionais, e as fêmeas podem sofrer com doenças severas no trato reprodutivo. Sendo assim, a coleta de sêmen para inseminação artificial, um procedimento não estéril, apresenta diversos gêneros bacterianos no ejaculado (YÁNIZ *et al.*, 2010).

Na pesquisa de Jubb, Kennedy e Palmer (1979) sobre a microbiota do sêmen e prepúcio de bovinos e búfalos aparentemente saudáveis, constatou-se a presença de bactérias, como *Bacillus* sp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus* sp. Esses microrganismos podem contaminar o sêmen dos animais domésticos. Em estudos com carneiros, foram observadas lesões escrotais palpáveis, que não envolvem os testículos ou o epidídimo, detectando-se microrganismos como *Yersinia pseudotuberculosis* em cultura do material proveniente dessas lesões que, geralmente, são observadas no alto do escroto e prontamente distinguidas das lesões epididimais causadas por *Brucella ovis* e *Actinobacillus seminis*.

O exame clínico e a análise microbiológica do sêmen permitem a prevenção de doenças, além de melhorar o índice reprodutivo, visto que alguns animais reprodutores podem ser assintomáticos e apresentarem bactérias patogênicas no sêmen (COELHO, 1976). A análise microbiológica do sêmen permite a identificação de microrganismos patogênicos que possam interferir na qualidade do ejaculado, sendo um exame de fundamental importância para se garantir o aumento da capacidade reprodutiva (SOUZA *et al.*, 2006). Além do mais, o sêmen de boa qualidade é importante para o sucesso da técnica de inseminação artificial, por isso seu processamento deve garantir ao máximo a preservação dos espermatozoides.

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de fungos leveduriformes e filamentosos, *Escherichia coli*, *Estafilococos sp.* e *Pseudomonas sp.* no sêmen bovino pós- descongelamento.

#### 4 REVISÃO TEÓRICA

No Brasil, a ficha sanitária do animal é regida pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual obedece às normas sanitárias internacionais do Código Zoossanitário dos Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Ademais, a Divisão de Fiscalização de Material Genético Animal (DMG/DFIP), possui a competência de coordenar, promover e acompanhar a fiscalização da produção, processamento, comércio de importação e exportação de material biológico animal. Por sua vez, a ação coordenada pela DMG se baseia na lei nº 6.446, de 5/10/1977, a qual dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias do sêmen destinado à IA em animais domésticos. A instrução normativa nº 48 de 17/07/2003 determina que somente poderá ser produzido, comercializado e distribuído no Brasil o sêmen bovino ou bubalino coletado em centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS) e registrado no MAPA. Assim, o sêmen bovino ou bubalino coletado em centros de coleta e processamento de sêmen deve cumprir os requisitos sanitários mínimos (BRASIL, 2010).

Estudos com bovinos necessitam de mais pesquisas e experimentos controlados, para comparações e validações deles. Pode-se notar essa necessidade, quando é avaliada a taxa de prenhes, comparando-se o sêmen congelado e refrigerado, sabendo-se a concentração espermática utilizada (BUCHER *et al.*, 2009), o tipo de palheta, a composição do diluidor (VERBERCKMOES *et al.*, 2005), o tempo e temperatura utilizados, o processo de refrigeração e de utilização das palhetas (se aquece ou não antes da IATF (Inseminação artificial por tempo fixo), o protocolo hormonal, a quantidade de touros e fêmeas, o efeito touro mesmo com sêmen refrigerado. Ou seja, muitos são os fatores que devem ser levados em conta quando se comparam os estudos na área. O que todos têm em comum é a ferramenta da IATF e sua avaliação prévia dentro dos padrões do Manual do CBRA (Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal) (CBRA, 2013).

A sanidade reprodutiva dos machos constitui fator decisivo para programas de acasalamento utilizando monta natural ou inseminação artificial. Porém, todos os potenciais patógenos para a fêmea bovina também o são para o macho e, em muitas situações específicas, o touro pode comportar-se como portador assintomático, reservatório e potencial transmissor do microrganismo para a fêmea, particularmente por meio do sêmen, constituindo-se em infecções venéreas. Nesse sentido, todas as ações de gestão sanitária para o controle e profilaxia de doenças infecciosas da reprodução em fêmeas bovinas devem ser também realizadas nos touros. Dessa forma, Coelho (1976) recomenda que, além de exame clínico, sejam realizadas análises microbiológicas do sêmen, para que medidas preventivas sejam adotadas com o objetivo de se melhorar o índice de fertilidade do rebanho, em virtude da ocorrência de grande variedade de germes saprófitas e patogênicos no sêmen de reprodutores bovinos, sem sinais clínicos de afecções genitais.

Além do mais, quando o animal permanece em decúbito esternal, a mucosa peniana expõe-se a microrganismos presentes nas fezes e no solo, que podem proliferar-se na cavidade do prepúcio e uretra, atingindo o sêmen no momento da colheita do ejaculado. Patógenos como *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma diversum*, *Campylobacter fetus subsp. venerealis* e *Campylobacter fetus subsp. fetus*, *Tritrichomonas foetus*, *Histophilus somni* e alguns vírus ainda podem ser transmitidos sexualmente. A contaminação do sêmen pode ocorrer por via descendente, destacando-se microrganismos como *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Campylobacter fetus subsp. fetus*, *Chlamydophila* spp., o que se relaciona com baixos índices de produtividade e com perdas econômicas (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2005).

#### 4.1 MICRORGANISMOS

Microrganismos como bactérias, vírus, protozoários e até mesmo micotoxinas produzidas por fungos podem causar distúrbios reprodutivos de origem infecciosa em bovinos, sendo considerados, portanto, de causa multi-etiológica. Estudos verificaram a presença de microrganismos ubiqüitários na cavidade prepucial de touros. Entre esses microrganismos estão *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterium* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp. e alguns fungos filamentosos e leveduriformes (BARCELOS *et al.*, 2009).

A *Escherichia coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa que se encontra normalmente no trato gastrointestinal inferior dos organismos (CARDOSO *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado que enterobactérias, como *Escherichia coli*, apresentam efeito direto sobre a motilidade progressiva da célula espermática (AUROUX *et al.*, 1991; DIEMER *et al.*, 1996). Porto, Derrick e Bannister (1975) observaram que a concentração de  $10^6$  *E. coli*/mL de sêmen causa queda significativa na motilidade espermática. Por outro lado, Edmondson, Tallman e Herman (1948) não encontraram qualquer correlação entre o número de bactérias presentes no sêmen bovino e o período de tempo que este apresentava células móveis. Eles observaram que fatores de patogenicidade bacteriana, como capacidade hemolítica, estavam relacionados a uma menor manutenção da motilidade espermática.

*Estafilococos* sp. é uma bactéria Gram-positiva que pode ser encontrada no sistema genital dos bovinos, a qual afeta, de forma significativa, a qualidade espermática, principalmente no que se refere à motilidade (RIDEOUT; BURNS; SIMPSON, 1982; AUROUX *et al.*, 1991; DIEMER *et al.*, 1996). Isso pode ocorrer pela ação de toxinas bacterianas (SONE *et al.*, 1982), alteração do pH, competição pelo mesmo substrato (RIDEOUT; BURNS; SIMPSON, 1982) ou pela ação direta, levando a defeitos estruturais na membrana da célula espermática (DIEMER *et al.*, 1996). Todavia, dados relacionados ao efeito da contaminação bacteriana sobre a integridade acrossomal são escassos. O acrossoma é parte fundamental no processo de fertilização, e qualquer alteração presente pode inibir a capacidade fecundante do espermatozoide.

*Pseudomonas* sp. é uma bactéria Gram-negativa, baciliforme e aeróbia. Seu ambiente de origem é o solo, porém vive em ambientes hostis (BRUZAROSKI *et al.*, 2017). Estudos realizados por Bamba e Sone (1981), com sêmen de javali, mostraram que

a penicilina, apesar de controlar o crescimento bacteriano com menos eficácia, auxilia na manutenção da sobrevivência espermática durante o armazenamento a 15°C. Corroborando isso, Sone (1982) relatou que o controle de diversas espécies de *Pseudomonas* é praticamente ineficaz perante ação da penicilina e estreptomicina.

Coelho (1976) e Rodrigues, Bicudo e Lopes (1999) evidenciaram que *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* sp. e *Bacillus* spp. são sensíveis à associação de penicilina G potássica (1.000.000 UI/mL) e estreptomicina (1 mg/ mL). Esse relato diverge de Spinosa, Górnaiak e Bernardi (1999), ao constatarem que a penicilina não é eficaz contra *Staphylococcus*. Coelho (1976) ressalta que *Corynebacterium pyogenes* e *Streptococcus* spp, encontrados na flora do sêmen bovinos, são sensíveis a esses antibióticos, enquanto *Staphylococcus* spp, *Proteus* sp, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosas* e leveduras apresentam resistência a esses agentes antimicrobianos.

Fungos leveduriformes e filamentosos são microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas. As colônias filamentosas podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas, constituídas fundamentalmente por elementos multicelulares em forma de tubo, as hifas (SILVA JÚNIOR, 2002). Dessa forma, a detecção prévia de microrganismos e patogênicos no sêmen de reprodutores pode favorecer um melhor índice reprodutivo de fertilidade no plantel. Assim, é recomendado que, além do exame clínico e andrológico do touro, como motilidade, vigor e integridade física da membrana, sejam realizados exames de análises do líquido seminal, podendo ser uma avaliação da microbiota do sêmen (SOUZA *et al.*, 2006; FERNANDES; SILVEIRA; GUIMARÃES, 2011).

## 5 METODOLOGIA

Neste estudo, foram avaliadas 10 (dez) diferentes amostras de palhetas de sêmen pós-descongelamento de touros holandeses geneticamente provados, provenientes de centrais de coleta do Alto Paranaíba- MG. O material foi transportado pelo fornecedor em um botijão com nitrogênio líquido a 196 °C abaixo de zero, para o laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, onde foram realizadas as análises microbiológicas. O sêmen presente na palheta foi descongelado em banho maria, sob a temperatura de 35 °C a 37 °C por 30 segundos (MPHAPHATHI *et al.*, 2012). Foram avaliados os parâmetros de presença de fungos filamentosos e leveduras, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosas*.

Para o isolamento de fungos, foram feitas estrias em duplicatas de placas de Petri, contendo Ágar Batata Dextrose (PDA). Em seguida, foram incubadas a 25 °C, por 72 horas, em posição invertida. Para se verificar a presença de *E. coli*, foi utilizado o método de estrias em placas contendo o meio de cultura Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), incubadas a 35/37 °C, por 24/48 horas, em posição invertida. As colônias formadas no EMB foram submetidas à coloração de Gram, para determinação de bacilos Gram negativos e, posteriormente, provas bioquímicas, Tríplice Açúcar e Ferro (TSI), Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) e Citrato-Simmons (CS).

Para se verificar a presença de *Staphylococcus aureus*, foi utilizado o mesmo método, em placas contendo o meio de cultura Ágar Sal Manitol (SM), incubadas a 35/37

°C, por 24/48 horas, em posição invertida. As colônias típicas formadas pelos microrganismos no meio SM foram identificadas com a realização da coloração de Gram. Para os cocos Gram positivos, foram realizadas provas de identificação de gênero, sendo realizados a prova da catalase e o teste de coagulase.

Para a identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, foram realizadas estriadas com alça bacteriológica em placas com meio de cultura Cetrimida (CM), incubadas em estufas bacteriológicas a 36 °C por 24/48 horas. Feito isso, foi observada a presença de colônias verdes azuladas fluorescentes em câmara escura na intensidade de luz UV 328-210 nm, o que indica uma provável presença de *Pseudomonas aeruginosa*. Por fim, foi realizada a técnica de coloração de Gram e, posteriormente, a observação da lâmina em microscópio óptico para a identificação dos microrganismos.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises microbiológicas foram realizadas em todas as amostras para identificar a presença de possíveis bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Os resultados das análises confirmaram a presença de fungos filamentosos em cinco amostras analisadas, e nenhuma levedura foi detectada no sêmen pós-descongelamento, conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1:** Presença de fungos filamentosos e leveduriformes no sêmen pós-descongelamento de touros holandês geneticamente provados, proveniente de centrais de coleta do Alto Paranaíba - MG

Amostra	Fungos Filamentosos	Leveduras
Amostra 1	P	A
Amostra 2	P	A
Amostra 3	P	A
Amostra 4	P	A
Amostra 5	P	A
Amostra 6	A	A
Amostra 7	A	A
Amostra 8	A	A
Amostra 9	A	A
Amostra 10	A	A

**Valor de Referência:** Ausente

Abreviaturas: P: presença; A: ausência.

Fonte: dados de pesquisa, 2021.

Não foi detectada, em nenhuma das amostras testadas, a presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas*, conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2:** Presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas* no sêmen pós-descongelamento de touros holandês geneticamente provados, proveniente de centrais de coleta do Alto Paranaíba - MG

<b>Amostra</b>	<b><i>Staphylococcus</i></b>	<b><i>Pseudomonas</i></b>
Amostra 1	A	A
Amostra 2	A	A
Amostra 3	A	A
Amostra 4	A	A
Amostra 5	A	A
Amostra 6	A	A
Amostra 7	A	A
Amostra 8	A	A
Amostra 9	A	A
Amostra 10	A	A
<b>Valor de Referência:</b> Ausente		

Abreviaturas: P: presença; A: ausência.

Fonte: dados de pesquisa, 2021.

Já no meio de cultura Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), foi detectada a presença de *Escherichia coli* nas amostras 9 e 10. Esses resultados estão demonstrados na tabela 3.

**Tabela 3:** Presença de *Escherichia coli* no sêmen pós-descongelamento de touros holandeses geneticamente provados, proveniente de centrais de coleta do Alto Paranaíba - MG

<b>Amostra</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>
Amostra 1	A
Amostra 2	A
Amostra 3	A
Amostra 4	A
Amostra 5	A
Amostra 6	A
Amostra 7	A
Amostra 8	A
Amostra 9	P
Amostra 10	P
<b>Valor de Referência:</b> Ausente	

Abreviaturas: P: presença; A: ausência.

Fonte: dados de pesquisa, 2021.

De acordo com Genovez, Scarcelli e Carvalho (2011), os microrganismos ubiqüitários na cavidade prepúcial de touros são: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterium* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Proteus Vulgaris*, *Micrococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., alguns fungos e leveduras. Isso pode explicar a presença de fungos filamentosos nas cinco amostras analisadas do sêmen bovino e a presença de *Escherichia coli* em duas amostras. Diante disso, o sêmen pode ser contaminado por agentes patogênicos nos

testículos ou no percurso destes pelo epidídimo, canal deferente e uretra, em razão da competição pelos nutrientes naturais do sêmen. Deve-se ressaltar que a contaminação por microrganismos pode ocorrer também no momento da coleta, no transporte e durante os procedimentos laboratoriais. (FERNANDES; SILVEIRA; GUIMARÃES, 2015).

Ademais, embora existam controvérsias quanto à interferência de bactérias ubíquas na qualidade do sêmen e na sua capacidade fertilizante, sob certas condições, bactérias oportunistas podem migrar pelo trato genital de touros, causando uretrite, vesiculite seminal ou epididimite, alterando significativamente a capacidade fecundante do sêmen decorrente de intensa reação inflamatória e de patologias no espermatozoide (ALFIERI; ALFIERI, 2017).

Os microrganismos podem competir pelo uso de nutrientes naturais no sêmen e infectar as fêmeas que recebem esse sêmen contaminado, resultando em baixas taxas de concepção e altas taxas de mortalidade embrionária ou aborto (GENOVEZ *et al.*, 1999). Esses patógenos podem atingir o prepúcio e o sêmen por vias ascendentes, muitas vezes devido a doenças sexualmente transmissíveis, como campilobacteriose genital bovina e tricomoníase bovina, ou a exposição a microrganismos externos. Por outro lado, a contaminação do sêmen pode ocorrer por via descendente devido a doenças sistêmicas específicas do sistema reprodutivo. Os mais importantes são brucelose, leptospirose, micoplasmose, clamídia, histobacteriose, IBR, BVD e língua azul (GENOVEZ; SCARCELLI; FACIOLLI, 2011).

Neste estudo, não foi detectada a presença de *Staphylococcus* sp. nem *Pseudomonas* sp. no sêmen bovino. Porém, no estudo de Monteiro (2021) considerou-se que *Staphylococcus* pode ter ação deletéria no sêmen devido à produção de exotoxinas. A ação de linhagens produtoras de plasma coagulase, como *Staphylococcus aureus*, pode levar à redução do número de espermatozoides, supressão da motilidade, alteração na morfologia e capacidade de fertilização. Por outro lado, a presença de *Pseudomonas* sp. no sêmen bovino pode estar relacionada com fontes exógenas. Nas etapas pós coleta, estes microrganismos são comumente produtores de biofilmes, podendo colonizar vaginas artificiais ou materiais usados na higienização.

Já na pesquisa de Souza *et al.* (2006) com sêmen caprino, o exame microbiológico realizado no sêmen fresco constatou a presença de 10 diferentes espécies de bactérias e um tipo de levedura; 72,0 e 64,0% das amostras apresentaram *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* sp, respectivamente. Todavia, também foram encontrados *Klebsiella pneumoniae* (8,0%), *Candida* sp. (12,0%), *Pseudomonas* sp. (12,0%), *Enterobacter cloacae* (16,0%), *Escherichia coli* (20,0%), *Corynebacterium* sp. (24,0%), *Shigella Sonnei* (28,0%), *Streptococcus* sp. (32,0%) e *Micrococcus* sp. (32,0%). O achado de *Escherichia coli* corrobora os resultados encontrados neste estudo.

Collares, Giehl e Kratz (2017), ao avaliarem o sêmen de suínos, identificaram bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp. *Bacillus* spp. *Micrococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.) e Gram-negativas (*Klebsiella* spp. *Proteus* spp. *Serratia* spp. *Burkholderia* spp. e *Escherichia coli*), essas últimas com uma média de frequência de 62% para o reprodutor Landrace (linhagem I) e 66% para o MS115 (linhagem II). Entretanto, é válido ressaltar que as amostras não apresentaram efeito significativo para a análise de



regressão quanto à motilidade e vigor espermáticos ao longo do tempo para as duas linhagens.

A indefinição do papel das bactérias ubíquas da microbiota do prepúcio na capacidade fertilizante do sêmen e a possibilidade de causar infecção em fêmeas bovinas alteraram as recomendações atuais da OIE sobre a coleta, higiene e manuseio de “*in natura*” e industrializados. A quantidade limite de microrganismos por mL de sêmen aceitável para uso em inseminação artificial não é mais definida. Por outro lado, a contaminação bacteriana presente no sêmen usado rotineiramente para inseminação artificial tem demonstrado limitar o sucesso da técnica de fertilização *in vitro* (FIV), principalmente no momento da cocultura. Pequenas quantidades de agentes ubíquos, de microbiota autóctone ou mesmo de agentes oportunistas são claramente multiplicadas nas condições utilizadas na FIV (CARVALHO *et al.*, 2012).

Dessa forma, ao se utilizar a inseminação artificial, é importante controlar efetivamente o número de microrganismos presentes no prepúcio e região perineal do touro, no ambiente de coleta e preparo do sêmen, para que a desqualificação possa ser evitada, além de garantir a biossegurança da vaca e do rebanho da produtividade e comercialização nacional e internacional (THIBIER; GUERIN, 2000).

Para garantirem a qualidade sanitária do sêmen industrializado, os centros de IA têm adotado procedimentos como isolamento de microrganismos em meio de cultura, cultura de células, inoculação em animais suscetíveis ou detecção indireta por meio de técnicas sorológicas, como soroneutralização, fixação de complemento, imunofluorescência indireta, hemaglutinação, imunodifusão, além da quarentena clássica e controle de todos os lotes de sêmen que incluem isolamento de bactérias, protozoários e vírus. Essas técnicas, no entanto, apresentam limitações, principalmente de ordem prática, decorrentes da sua complexidade, da infraestrutura necessária à sua execução ou da lentidão dos procedimentos laboratoriais necessários à detecção e caracterização de agentes patogênicos. Por outro lado, também existem limitações de sensibilidade e especificidade. Por essas razões, nos últimos anos, intensificou-se a busca por técnicas mais rápidas, precisas e confiáveis, possibilitando o diagnóstico de doenças infecciosas com nível de sensibilidade e especificidade semelhante ou superior aos procedimentos convencionais, cujos resultados são dados no mesmo dia (BARCELOS *et al.*, 2015).

## 7 CONCLUSÃO

Foram encontrados fungos filamentosos em cinco amostras e *Escherichia coli* em duas amostras. Entretanto, não foram encontrados *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas* nem leveduras em nenhuma amostra. Diante disso, fica evidente a importância de se garantir a qualidade sanitária do sêmen industrializado, uma vez que microrganismos podem causar desequilíbrio reprodutivo em animais destinados à reprodução.

## REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A. A; ALFIERI, A. F. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S. l.], v. 41, n. 1 p. 133-139, 2017.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet Sci**, [S. l.], v. 7, p. 145-173, 1987.
- AUROUX, M. R. *et al.* Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in-vitro study in man with *Escherichia coli*. **International Journal of Andrology**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 264-270, 1991.
- BAMBA, K.; SONE, M. Factors affecting the quality of boar semen stored by means of dialysis. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 62, p. 193-197, 1981.
- BARCELOS, V. B. *et al.* **Agentes infecciosos no sêmen de touro**. 2015. Disponível em: <https://revistacultivar.com.br/artigos/agentes-infecciosos-no-semen-de-touro>.
- BARCELOS, V. B. *et al.* **Agentes infecciosos no sêmen de touro**. 24 set. 2009. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nupeec/files/2018/01/5-Agentes-infecciosos-no-s%C3%AAsen-de-touros.pdf>.
- BORGES-SILVA, J. C.; SILVA, M. R.; MARINHO, D. B.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, D. C.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MOURÃO, G. B.; SARTORI, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Reproduction Fertility and Development**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 1004-1008, jun. 2016.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA**. 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.
- BRUZAROSKI, S. R. *et al.* Psicrotóxicos e *Pseudomonas spp.* em leite cru refrigerado. **Uniciências**, Londrina, v. 21, n. 1, p. 12-16, 2017.
- BUCHER A. *et al.* Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, [S. l.], v. 71, n. 7, p.1180-1185, 2009.
- COLLARES, B. B.; GIEHL, D. Z.; KRATZ, L. R. Qualidade e contaminação bacteriana de sêmen suíno com o uso de dois diluentes. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - SIEPE, 9., 2017, Santana do Livramento. Anais [...], Santana do Livramento, 2017. Disponível em: [https://guri.unipampa.edu.br/uploads/evt/arq\\_trabalhos/13350/seer\\_13350.pdf](https://guri.unipampa.edu.br/uploads/evt/arq_trabalhos/13350/seer_13350.pdf).

CARDOSO, A. L. S. P *et al.* Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descavado. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 19-22, jan./jun. 2001.

CARVALHO, A. F. *et al.* Validação de nova proposta de espermocultura quantitativa aplicada a sêmen industrializado de touros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 83-90, 2012.

CARVALHO, T. B. **A importância do Brasil na produção de carne bovina**. 26 fev. 2018. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/opinio-cep/a-importancia-do-brasil-na-producao-mundial-de-carne-bovina.aspx>

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.

COLÉGIO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

DIEMER, T. *et al.* Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. **International Journal of Andrology**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 271-277, 1996.

EDMONDSON, J.; TALLMAN, K. L.; HERMAN, H. A. Study of the types of bacterial in bovine semen and their effect upon motility. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 31, p. 681, 1948.

FERNANDES, L. S.; SILVEIRA, C. O.; GUIMARÃES, J. D. Contaminantes do sêmen: uma análise microbiológica. *In*: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ACADÊMICA. **Anais III SIMPAC**, v. 3, n. 1, p. 181-186, Viçosa - MG. jan./dez. 2011.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; CARVALHO, A. F. Agentes microbianos associados ao trato genital de touros. **Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 1-3, 2011.

GENOVEZ, M. E. *et al.* Avaliação bacteriológica de sêmen *in natura* industrializado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 403-405, 1999.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 2. ed. New York: Academic Press, 1979.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Animal**. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>.

MPHAPHATHI, M. L. *et al.* Comparison of slow freezing and vitrification methods for Venda cockerel's spermatozoa. **Open Journal of Animal Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 204-210, 2012.

MONTEIRO, F. N. B. **Boas práticas aplicadas à colheita do semen bovino influenciam nos parâmetros espermáticos**. 2021. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2021.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Terrestrial animal health code. **Bovine and small ruminant semen**. 2005. 14. ed. Disponível em: [http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_chapitre\\_3.2.1.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_3.2.1.htm).

OLIVEIRA, E. C. S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino**. 2003, 61 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

PORTO, G. B. D.; DERRICK, F. C. J. R, BANNISTER, E. R. Bacterial effect on sperm motility. **Urology**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 638-639, 1975.

RIDEOUT, M. I.; BURNS, S. J.; SIMPSON, R. B. Influence of bacterial products on the motility of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], Suppl. 32. p. 35-40, 1982.

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 meios diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 267-268, 1999.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5. ed. São Paulo: Varela, 2002.

SOUZA, A. F. *et al.* Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 329-336, 2006.

SONE, M. Effects of various antibiotics on the control of bacterial in boar semen. **The Veterinary Record**, [S. l.], v. 111, p. 11-14, 1982.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, [S. l.], v. 48, p. 247-256, 1997.

THIBIER, M.; GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, [S. l.], v. 62, p. 233-251, 2000.

VASCONCELOS, A. B. *et al.* Aspectos microbiológicos do sêmen de bovinos mantidos em central de reprodução animal. **Vet. Not.**, [S. l.], p. 43-56, 2018.

VERBERCKMOES, S. *et al.* Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 912-922, 2005.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fert Dev**, [S. l.], v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

YÁNIZ, J. L. *et al.* Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 C. **Animal reproduction science**, [S. l.], v. 122, n. 1-2, p. 142-149, 2010.