

EFEITO DO USO DE DIFERENTES ANTIBIÓTICOS NO DILUENTE DE SÊMEN OVINO NO CONTROLE DO CRESCIMENTO BACTERIANO

MION, Bruna¹; MADEIRA, Elisângela; PRADIEE, Jorgea; VIEIRA, Arnaldo²; BIANCHI, Ivan².

¹Universidade Federal de Pelotas, Medicina Veterinária; ²Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Patologia Animal.

E-mail: brunamion@veterinaria.med.br

Site: <http://www.ufpel.edu.br/fvet/repropel-pigpel/>

1 INTRODUÇÃO

A presença de bactérias tem ação prejudicial sobre a dose inseminante (YÁNIZ *et al.*, 2010), podendo ocasionar adesão e aglutinação celular, diminuindo a motilidade espermática (WOLF *et al.*, 1993), além de causar danos à membrana, acrossoma e mitocôndrias do espermatozoide (DIEMER *et al.*, 2000). Além disso, a contaminação bacteriana pode competir pela utilização dos nutrientes do diluente e ainda causar problemas infecciosos a fêmea, resultando em baixas taxas de concepção e altas taxas de mortalidade embrionária ou até mesmo abortamento (GENOVEZ *et al.*, 1999). A adição de antibióticos ao sêmen foi uma das técnicas que possibilitou o aumento do potencial de fertilidade da dose inseminante (AKHTER *et al.*, 2007).

Os antibióticos utilizados por tempo indeterminado, mesmo que em pequenas quantidades, podem propiciar a ocorrência de níveis consideráveis de resistência microbiana (JOHANSSON *et al.*, 2004). Penicilina e estreptomicina são os antimicrobianos frequentemente utilizados nos diluentes para ovinos (SALAMON & MAXWELL, 2000). Entretanto, foi relatada ineficiência contra bactérias como *Staphylococcus sp.* (SPINOSA *et al.*, 1999), *Proteus sp.*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, algumas leveduras (COELHO, 1976), *Corynebacterium*, *Brucella*, *Mycobacterium* e *Mycoplasma* (SHIN *et al.*, 1988). Portanto, outros antibióticos, como a cefalosporina e gentamicina, têm sido introduzidos na composição dos diluentes de sêmen (SOUZA *et al.*, 2006).

O objetivo desse estudo foi avaliar a adição de diferentes antibióticos e suas associações, em diferentes concentrações, na composição de diluente para a criopreservação de sêmen ovino sobre o controle bacteriológico dos ejaculados.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram utilizados 25 ejaculados, coletados através de vagina artificial, de cinco carneiros da raça Crioula Lanada que ficavam alojados nas instalações do Biotério Central da UFPel, recebendo suplementação concentrada e tendo acesso a pastagem nativa, sal mineral e água *ad libitum*. Os ejaculados foram combinados em um *pool* que foi dividido nos seguintes tratamentos:

- **Controle:** Sem antibiótico;
- **GTLS:** 500 µg/ml de gentamicina; 100 µg/ml de tilosina; 300 µg/ml de lincomicina e 600 µg/ml de espectinomicina;
- **GTLS-50:** 250 µg/ml de gentamicina; 50 µg/ml de tilosina; 150 µg/ml de lincomicina e 300 µg/ml de espectinomicina;

- **GTLS-25:** 375 µg/ml de gentamicina; 75 µg/ml de tilosina; 225 µg/ml de lincomicina e 450 µg/ml de espectinomicina;
- **GTLS+25:** 625 µg/ml de gentamicina; 125 µg/ml de tilosina; 375 µg/ml de lincomicina e 750 µg/ml de espectinomicina;
- **GTLS+50:** 750 µg/ml de gentamicina; 150 µg/ml de tilosina; 450 µg/ml de lincomicina e 900 µg/ml de espectinomicina;
- **PENESTREP:** 500 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina;
- **PENESTREP-50:** 250 µg/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina;
- **PENESTREP-25:** 375 µg/ml de penicilina e 75 µg/ml de estreptomicina;
- **PENESTREP+25:** 625 µg/ml de penicilina e 125 µg/ml de estreptomicina;
- **PENESTREP+50:** 750 µg/ml de penicilina e 150 µg/ml de estreptomicina;
- **CEFT:** 50 µg/ml de ceftiofur sódico;
- **CEFT-50:** 25 µg/ml de ceftiofur sódico;
- **CEFT-25:** 37,5 µg/ml de ceftiofur sódico;
- **CEFT+25:** 62,5 µg/ml de ceftiofur sódico;
- **CEFT+50:** 75 µg/ml de ceftiofur sódico;
- **ENRO:** 1000 µg/ml de enrofloxacinina;
- **ENRO-50:** 500 µg/ml de enrofloxacinina;
- **ENRO-25:** 750 µg/ml de enrofloxacinina;
- **ENRO+25:** 1250 µg/ml de enrofloxacinina;
- **ENRO+50:** 1500 µg/ml de enrofloxacinina.

Para cada tratamento foram congeladas três palhetas (0,25 mL). As unidades formadoras de colônias (UFC) foram quantificadas a partir de amostras de 0,25mL coletadas no momento da constituição do *pool*, ao final do período de estabilização a 5°C e após o descongelamento do sêmen. Em cada momento foram realizadas semeaduras em duplicata das amostras em ágar BHI e incubadas a 37 °C por 48 h. Ao final do período de incubação foram consideradas as placas, que continham de 30 a 300 colônias (NCCLS, 2003), para a contagem das UFC.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os tratamentos reduziram a carga microbiana em comparação com o tratamento sem antibiótico (**CONTROLE**) no sêmen resfriado. Entretanto, apenas os tratamentos à base de **ENRO**, **GTLS** e suas variações e ainda **PENESTREP+50** foram diferentes estatisticamente do controle ($p < 0,05$). O uso associado de vários princípios ativos amplia o espectro de ação, uma vez que cada antimicrobiano tem um mecanismo de atuação diferente.

A combinação mais utilizada, penicilina e estreptomicina, apenas diferiu estatisticamente do controle no tratamento com o dobro da concentração recomendada. O que evidencia que seu uso deverá ser bastante cauteloso, já que a utilização excessiva em subdosagens poderá gerar microrganismos resistentes a estas drogas, diminuindo o efeito bactericida (HASAN *et al.*, 2001).

No trabalho realizado por Azawi (2011), comparando a associação de penicilina e estreptomicina, com gentamicina, tetraciclina, lincomicina e cefalosporina, a utilização desse último antibiótico apresentou melhores efeitos no controle do crescimento bacteriano no sêmen ovino. Esse dado não foi encontrado no nosso estudo, em que todos os tratamentos a base de ceftiofur não apresentaram

diferença estatística em comparação com o controle. Essa divergência de dados pode ter ocorrido pela concentração superior do antimicrobiano no trabalho realizado por Azawi (1000 µg/ml), em comparação com os tratamentos utilizados nesse estudo (25 µg/ml, 37,5 µg/ml, 50 µg/ml, 62,5 µg/ml e 75 µg/ml). Entretanto, não podemos afirmar que a quantidade utilizada do fármaco é proporcional ao seu potencial de ação, já que em nossos resultados, dentro de um mesmo grupo, não houve diferença estatística entre as diferentes concentrações de cada antibiótico. Esse fator é dependente de algumas variáveis, como a quantidade inicial de bactérias, o fármaco utilizado, o princípio ativo e suas associações e a ausência de resistência pelos microorganismos.

Resultados de Shin *et al.* (1988) e Hasan *et al.* (2001) indicaram que o uso concomitante dos antibióticos, gentamicina, tilosina, lincomicina e espectinomicina têm um espectro mais amplo no controle microbiano em sêmen bovino congelado, quando comparado com associação de penicilina e estreptomicina. Esse resultado não foi evidenciando no presente trabalho, pois no sêmen descongelado as contagens bacterianas foram iguais para todos os tratamentos, não apresentando diferença quando comparadas ao controle. O que nos leva a acreditar que o processo de criopreservação diminuiu a contagem bacteriana, a qual não ultrapassa os níveis recomendados pela OIE de 3000 UFC/mL nas doses de sêmen processadas. Esse resultado pode ser explicado pela quantidade de crioprotetor utilizada não ser favorável às bactérias. Para que haja sobrevivência bacteriana seria necessária uma quantidade 15% superior de crioprotetor (HUBÁLEK, 2003).

4 CONCLUSÃO

Para doses de sêmen refrigeradas a 5º C, os tratamentos a base de GTLS, ENRO e PENSTREP+50 são os que apresentam melhores efeitos no controle da contaminação. Entretanto, em doses criopreservadas, a adição de antibióticos torna-se desnecessária. Contudo, como o controle bacteriológico é dependente de vários fatores, é necessária a avaliação periódica da contaminação bacteriana das doses a serem utilizadas para a inseminação artificial, verificando a necessidade da adição ou não de antimicrobianos aos meios diluidores.

5 REFERÊNCIAS

AKHTER, S., SAJJAD, S.M.H., ANDRABI, N., ULLAH, M., QAYYUM. Effect of antibiotics in extender on fertility of liquid buffalo bull semen. **Pakistan Vet. J.**, Pakistan, v. 27, p. 13-16, 2007.

ANDRABI, S.M.H., AHMAD, N., ABBAS, A., ANZAR, M. Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and sahiwal bull semen. **Pakistan Vet. J.**, v. 21, n. 4, p?, 2001.

AZAWI, O.I., ISMAEEL, M.A. Influence of addition of different antibiotics in semen diluent on viable bacterial count and spermatozoal viability of Awassi ram semen. **Vet. World.** v. 5, p.75-79, 2011.

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

DIEMER, T., HUWE, P., MICHELMANN, H.W., MAYER, F., SCHIEFER, H.G., WEIDNER, W. Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. **Int. J. Androl.** v. 23, p.178–186, 2000.

GENOVEZ, M.E., SCARCELLI, E., PICONE, A.B.. Avaliação de dois métodos de coleta de muco prepucial no diagnóstico da campilobacteriose genital bovina. **Biológico.** v. 52, p. 7-11, 1986.

HASAN, S., ANDRABI, S.M.H., MUNEER, R., ANZAR, M., AHMAD, N. Effects of a new antibiotic combination on post-thaw motion characteristics and membrane integrity of buffalo and sahiwal bull spermatozoa and on the bacteriological quality of their semen. **Pakistan Vet.**, v. 21, p?, 2001.

HUBÁLEK, ZDENEK. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology.** v. 46, p. 205–229, 2003.

JOHANSSON, A., GREKO, E., ENGSTRÖM, E. B., KARLSSON, M. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. **Veterinary Microbiology.** Sweden. v.99, p.251-257, 2004.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science.** v. 62, p. 77-111, 2000.

SHIN, S.J., LEIN, D.H., PATTEN, V.H., RUHNKE, H.L. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1- Control of Mycoplasmas, Ureaplasmas, Campylobacter fetus subsp. venerealis and Haemophilus somnus. **Theriogenology.** v. 29, p. 577-592, 1988.

SOUZA, Andréia Fernandes, GUERRA, Maria Madalena Pessoa, COLETO, Zoraide Fernandes, MOTA, Rinaldo Aparecido, SILVA, Leonildo Bento Galiza, LEÃO, Ana Emília Duarte de Souza, SOBRINHO, Eliezer Silva do Nascimento. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.** v. 43, n. 3, p. 329-336, 2006.

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

YÁNIZ, Jesús Luis, MARCO-AGUADO, María Angeles, MATEOS, José Angel, SANTOLARIA, Pilar. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. **Animal Reproduction Science.** Spain. v. 122. p. 142-149, 2010.

WOLF, H., PANHANS, A., STOLZ, W., MEURER, M. Adherence of Escherichia coli to sperm: a mannose phenomenon leading to agglutination of sperm and E. coli. **Fertil. Steril.** v. 60, p. 154–158, 1993.