

TATIANA BARRIONUEVO GOTTI

**AVALIAÇÃO DE TRÊS PROTOCOLOS ANTIBIÓTICOS NA QUALIDADE DO
SÊMEN BOVINO QUANTO AO SEU EFEITO SOBRE A MICROBIOTA
AUTÓCTONE E NA DESTRUÇÃO DA *Leptospira* spp. SOROVARES Hardjo
(estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705)**

SÃO PAULO

2006

TATIANA BARRIONUEVO GOTTI

Avaliação de três protocolos antibióticos na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Margareth Élide Genovez

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

ef
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
18/12/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1829
FMVZ

Gotti, Tatiana Barrionuevo

Avaliação de três protocolos antibióticos na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajtino e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705) / Tatiana Barrionuevo Gotti. – São Paulo : S Tatiana Barrionuevo Gotti, 2006.

88 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Margareth Élide Genovez.

1. Leptospirose. 2. Sêmen bovino. 3. Protocolos de antibióticos. 4. Microbiota autóctone. I. Título.




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de emprego de associações antibióticas na qualidade do sêmen bovino de raças azebuadas e européias e na destruição da *Leptospira spp.* sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705)", Protocolo nº504/2004, utilizando 8 bovinos, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Margareth Elide Genovez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of antibiotic associations applied in bovine semen quality of zebuine and european breeds to *Leptospira spp.* serovars Hardjo (strain Hardjoprajitno and Hardjobovis) and Wolffi (strain 3705) destruction" protocol number 504/2004, utilizing 8 bovines, under the responsibility of Prof^a Dr^a Margareth Elide Genovez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 30 de julho de 2004


Prof^a Dr^a Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Gotti, Tatiana Barrionuevo

Título: Avaliação de três protocolos antibióticos na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: 28 / 02 / 2008

Banca Examinadora

Prof. Dr. MARCELYN ELLIJE GONÇALVES

Assinatura: 

Instituição: INSTITUTO BIOLÓGICO

Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. Silvia Arruda das Concelhos

Assinatura: 

Instituição: FMVZUSP

Julgamento: aprovada

Prof. Dr. Raul José Silva Gini

Assinatura: 

Instituição: UNESP-JABOTICABA

Julgamento: aprovada

DEDICATÓRIA

Dedico esta vitória aos meus exemplos
de vida, Pai João e Mãe Angela, aos
meus irmãos Regina, Renato e
Sérgio e ao meu mais que
amante, marido, amigo.....Daniel

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

- Agradeço em primeiro lugar a Deus, Nossa Senhora Aparecida e São Longuinho que sempre guiaram meus passos e acalmaram minhas ansiedades nesta jornada.
- À Dra. Margareth Élide Genovez, mais que uma orientadora, uma amiga, uma mãezona nas horas de aflição, agradeço por ter me apresentado e ensinado o mundo da pesquisa, seu fascínio e seus desafios e principalmente a paixão pelas “leptospiras”.
- Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcelos, pelo apoio, amizade e incentivo durante este percurso.
- Às pesquisadoras do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico agradeço todo o carinho: Dra. Eliana Scarcelli Pinheiro por toda ajuda na análise microbiológica e Dra. Rosa Maria Piatti, pela análise de clamidíose, e pelo convívio, por estarem sempre dispostas a ajudar a solucionar os problemas.
- À Dra. Lília Márcia Paulin pela análise de brucelose e ainda pelos ensinamentos de vida e por alegrar meus dias com todas as suas cantorias matinais.
- À Dra. Maristela Vasconcelos Cardoso pela amizade e análise de micoplasmose
- Às Dras. Edviges Maristela Pituco e Líria Hiromi Okuda, pela atenção e realização das análises para IBR, BVD e Neosporose.
- Ao Dr. Sérgio Santos de Azevedo por todo apoio estatístico indispensável para a realização deste projeto.
- Ao médico veterinário e amigo Felipe Pereira Viana por toda a acolhida, paciência e enorme auxílio nas tarefas de campo e na realização da técnica de integridade de membrana.
- Ao Prof. Dr. Frederico Ozanan Papa, do Departamento de Radiologia e Reprodução Animal da UNESP de Botucatu-SP, pela possibilidade de realização da técnica de integridade de membrana.
- Ao médico veterinário César Horbach, pela acolhida e permissão para a realização do presente trabalho.

- Às colegas Ismara e Izildinha da Central de Inseminação Artificial que auxiliaram nos exames andrológicos.
- À PqC e amiga Simone Miyashiro pelo enorme auxílio na análise estatística, mas sobretudo pelos conselhos científicos, pelo exemplo de competência profissional, por toda amizade e força, desde quando éramos estagiárias na graduação.
- À PqC Vanessa Castro que me ajudou com os cultivos das leptospiros e a SAM , mas mais que tudo, minha comadre-amiga pra toda a vida, pela amizade sincera, companheirismo, paciência, sempre conseguindo me acalmar e me alegrar, deixando a vida sempre mais leve.
- À Carol (Paraíba) por estar ao meu lado sempre e principalmente no auxílio à realização deste experimento. Uma amiga pra vida inteira. Muito obrigada por alegrar minha vida!
- Às meninas do laboratório: Solange, Fabíola, e Wanessinha pela convivência nas horas de descontração.
- A PqC e amiga Alessandra Nassar pela excelente convivência, incentivo e amizade.
- A Mariazinha e a Anterinha, por todo o carinho, atenção e ensinamentos.
- A CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado.
- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP pelo financiamento do projeto
- À Jéssica que apesar do rápido convívio além da ajuda braçal, pela amizade agora conquistada.
- Aos meus pais, João e Angela, por todo esforço, dedicação, paciência e ensinamentos durante todo o meu caminho, e que melhor que quaisquer outras pessoas souberam conciliar com tamanha harmonia colo e repreensão.
- Ao meu marido, Daniel, que sempre me apoiou e me incentivou nesta empreitada, sempre procurando me mostrar qual seria o melhor caminho.
- Aos meus irmãos: Regina, Renato e Sérgio e aos meus cunhados Marcelo e Thais e Tia Irene, que sempre estiveram ao meu lado.
- Aos meus Avós Carmem e Emílio (*in memoriam*); João e Benedita (*in memoriam*) os responsáveis pelo presente da minha vida: minha família.

- A todos os meus tios, tias, primos e primas, que apesar da grande família, sempre estarão guardados em meu coração.
- Aos meus oito sobrinhos maravilhosos (Leandro, Renan, Gabriela, Thábata, Bruno, Matheus, Matheuzico e Giovana), mesmo com poucos anos de vida, consegue me ensinar e mostrar muitas lições de coragem, amor e caridade.
- As minhas amigas de infância, por toda a vida, Sheila e Adriana, pelas longas conversas, autenticidade, pelos momentos sérios e divertidos que passamos juntas.
- Aos amigos Brigit, Luís, Celso, Vivi, Maurício pela presença durante todo este tempo e carinho.
- A mais nova amiga Fabiana, na qual pude descobrir quais os verdadeiros valores de uma amizade, onde pude aprender a nunca desistir, pois SEMPRE poderia estar pior.

RESUMO

RESUMO

GOTTI, T. B. **Avaliação de três protocolos antibióticos na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705).** [Evaluation of three antibiotic protocols on the quality of the bovine semen regarding to its effect on the autoctone microbiota and on the destruction of the *Leptospira* spp. serovars Hardjo (strains Hardjoprajitno and Hardjobovis) and Wolffii (strain 3705)]. 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Considerando-se que a leptospirose pode ser transmitida pela inseminação artificial e a existência de possíveis falhas na Instrução Normativa vigente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA, quanto ao controle desta enfermidade em touros em serviço reprodutivo em Centrais de Inseminação Artificial -CIA, e ainda pelas baixas taxas na FIV em vista da presença de microbiota autóctone no sêmen industrializado, o presente trabalho propôs avaliar: 1-a microbiota autóctone presente nas amostras de muco prepucial e sêmen quanto a sazonalidade e a idade (<4 e ≥ 4 anos) de touros de uma CIA; 2-o efeito do tratamento com protocolos antibióticos adicionados ao extensor: A - gentamicina (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tilosina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); lincomicina (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), espectinomicina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$); B - penicilina (500 UI), estreptomomicina (500 UI), lincomicina (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), espectinomicina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$); C1- sulfato de amicacina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$); C2 - sulfato de amicacina (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e C3 - sulfato de amicacina (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a microbiota presente nas amostras de sêmen; 3-o efeito dos protocolos de antibióticos (A, B, C1, C2, C3) sobre espermatozóide através do teste de integridade de membrana.; 4-o efeito bactericida dos protocolos A, B e C2 adicionados ao extensor, sobre o sêmen experimentalmente contaminado com *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis)

e Wolffii (estirpe 3705), pelo cultivo microbiológico e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), comparando-as entre si. Das amostras de sêmen e muco prepucial de oito touros de uma CIA, observou-se correlação entre os gêneros bacterianos detectados no cultivo bacteriológico das amostras de muco prepucial e sêmen na mesma colheita, não houve diferença entre a microbiota quanto à idade dos animais e a sazonalidade das colheitas; os protocolos antibióticos (A, B, C1, C2, C3) não interferiram na integridade de membrana citoplasmática dos espermatozoides; protocolos A e C3 mostraram maior redução na microbiota do sêmen, embora sem significado estatístico; PCR foi mais sensível que o cultivo na detecção de *Leptospira* spp. de amostras de sêmen experimentalmente contaminadas, entretanto a diminuição na frequência de resultados positivos na PCR, em amostras de sêmen contaminadas com três estirpes de *Leptospira* spp e tratadas com os protocolos A, B ou C2, está relacionada a fatores intrínsecos da técnica e não ao efeito bactericida dos antibióticos empregados. O cultivo bacteriológico revelou baixa sensibilidade no isolamento de estirpes de *Leptospira* spp em sêmen experimentalmente contaminado com 10^6 bactérias/mL. A transmissão de leptospiros pelo sêmen industrializado de touros doadores em CIA é principalmente dependente da concentração de leptospiros excretadas no momento da colheita. A PCR confirma ser uma ferramenta fundamental na detecção da presença de leptospiros no sêmen de touros doadores em Centrais de Inseminação Artificial, devendo ser empregada em pelo menos duas colheitas na quarentena, e posteriormente no monitoramento do animal.

Palavras-chave: Leptospirose. Sêmen bovino. Protocolos de antibióticos. Microbiota autóctone.

ABSTRACT

ABSTRACT

GOTTI, T. B. **Evaluation of three antibiotic protocols on the quality of the bovine semen regarding to its effect on the autoctone microbiota and on the destruction of the *Leptospira* spp. serovars Hardjo (strains Hardjoprajitno and Hardjobovis) and Wolffii (strain 3705).** [Avaliação de três protocolos antibióticos na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705)]. 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Considering that leptospirosis can be transmitted by the artificial insemination route and the existence of possible fails on current Normative Instruction of the Ministerio de Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA, for the control of this disease in bulls in reproductive service in Artificial Insemination Centers-AIC, and still for the low rates due to the presence of autoctone microbiota in the industrialized semen affecting the production of embryos by in vitro fertilization, the present study aimed to evaluate the autoctone microbiota presented in preputial mucus and semen samples according to season (falls and dry) and bull ages (<4 and \geq 4 years) from the AIC; the effect of the treatment with antibiotic protocols added to the semen extensor: A- gentamicine (250 μ g/mL), tilosine (50 μ g/mL); lincomicine (150 μ g/mL); espectinomicine (300 μ g/mL; B- penicillin (500 UI); estreptomycine (500 UI); lincomicine (150 μ g/mL); espectinomicine (300 μ g/mL); C1- amicacine sulphate (500 μ g/mL); C2- amicacine sulphate (1500 μ g/mL) and C3- amicacine sulphate (2500 μ g/mL) on microbiota presents in the semen samples; the effect of the antibiotic protocols (A, B, C1, C2, C3) on spermatozoa by the test of membrane integrity; the bactericidal effect of the antibiotic protocols A, B and C2 added to the extensor, on the semen experimentally contaminated with *Leptospira* spp. serovars Hardjo (strains

Hardjoprajitno and Hardjobovis) and Wolffi (strain 3705), for the bacteriological culture and polimerase chain reaction (PCR), comparing themselves. Of the samples of preputial mucus and semen samples of eight bulls of an AIC it was observed correlation among bacterial Genera detected by the bacteriological culture of preputial mucus and semen in the same collection; but it was not observed difference relative to animal age groups and seasons of the year. The antibiotic protocols (A, B, C1, C2, C3) had no effect on the integrity of cytoplasmic membrane of the spermatozoa. C3 showed greater reduction on semen microbiota, but no statistically significant. PCR was more sensible than the bacteriological culture in the detection of *Leptospira* spp. from semen samples experimentally contaminated, however the reduction on the frequency of positive results by PCR was not related to bactericidal effect of the antibiotic protocols, maybe it was due to intrinsic factors of this method. The bacteriological culture showed very low sensitivity to isolate *Leptospira* spp. from experimental contaminated semen with 10^6 bacteria/mL. The transmission of leptospires by industrialized semen from donor bulls of AIC depend mainly on the concentration of leptospires excreted at the moment of the semen collection. The PCR confirms to be a fundamental tool for the detection of leptospires in the semen of donor bulls in AIC, and must be used at least twice during the quarantine, and for the animal monitoring during service time.

Word-key: Leptospirosis. Bovine semen. Antibiotic protocols. Microbiota autoctone.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L	microlitro
DNA	ácido desorribonucleíco
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
et al.	e colaboradores
IA	inseminação artificial
IC	intervalo de confiança
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
°C	graus Celsius
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
SAM	soroaglutinação microscópica
UI	unidades internacionais
A	gentamicina, tilosina, lincomicina, espectinomicina
B	penicilina, estreptomicina, lincomicina, espectinomicina
C1	amicacina 500 μ g/mL
C2	amicacina 1500 μ g/mL
C3	amicacina 2500 μ g/mL
C	controle
mL	mililitro
mg	miligrama
MN	monta natural

CIA	Centrais de inseminação artificial
MAPA	Secretaria de defesa agropecuária do ministério da agricultura, pecuária e abastecimento
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
CCPS	Centro de colheita e processamento de sêmen
2-ME	dois mercaptoetanol
Kg	quilograma
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
BVD	Diarréia viral bovina
CF	carboxifluoresceína
ID	Iodeto de propídio
X ²	qui-quadrado
TTR	teste de termo resistência
TPC	teste pós-congelamento
Mot.	Motilidade
V.	Vigor
Conc.	Concentração
OMS	Organização mundial da Saúde
CDC	Center for Disease Contro-USA

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Resultado da PCR para amostras de sêmen dos touros de uma CIA, com os respectivos protocolos A, B, C2 e Controle, contaminados experimentalmente com *Leptospira* spp. sorovares hardjo (estirpes hardjoprajitno e hardjobovis) e wolffi (estirpe 3705)----- 64

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Relação dos touros doadores de sêmen selecionados de uma Central de Inseminação Artificial, segundo a idade e raça. São Paulo, 2006----- 54
- Tabela 2 - Exames sorológicos de touros doadores de sêmen em uma Central de Inseminação Artificial segundo as enfermidades reprodutivas. São Paulo, 2006----- 54
- Tabela 3 - Soroaglutinação Microscópica realizada em duas amostras sorológicas pareadas de touros doadores de sêmen de uma Central de Inseminação Artificial. São Paulo, 2006----- 55
- Tabela 4 - Exame andrológico dos touros segundo raça, análise física (turbilhão, motilidade, volume e concentração) do sêmen *in natura*, teste de termo resistência (TTR) e teste pós congelamento (TPC) com diluidor gema citrato acrescido do protocolo de antibiótico utilizado pela Central de Inseminação Artificial (penicilina 250 µg/ml, tilosina 50 µg/ml, lincomicina 150 µg/ml, espectinomicina 300 µg/ml). São Paulo, 2006----- 56
- Tabela 5 - Exame andrológico dos touros relativos à análise morfológica do espermatozóide segundo a presença de defeitos maiores, defeitos menores e patologias totais. São Paulo, 2006----- 56
- Tabela 6 - Frequência de amostras de muco prepucial e sêmen *in natura* de touros com culturas bacteriológicas positivas para microbiota autóctone, antes da aplicação dos protocolos de associação antibiótica considerando-se quatro colheitas distintas. São Paulo, 2006----- 57
- Tabela 7 - Gêneros bacterianos da microbiota autóctone presente nas amostras de muco prepucial e sêmen *in natura* de touros, antes da aplicação dos protocolos de associação antibiótica considerando-se quatro colheitas distintas. São Paulo, 2006----- 58
- Tabela 8 - Frequência de gêneros bacterianos por amostra de muco prepucial e sêmen relativo a cada touro. São Paulo, 2006----- 58

Tabela 9 -	Freqüência de gêneros bacterianos por amostra de muco prepucial e sêmen relativo a cada touro em relação a sazonalidade (período de seca e chuva). São Paulo, 2006-----	59
Tabela 10 -	Efeito no teste de integridade da membrana medido pela média de espermatozóide lesados/integros por 100 cel/mL dos ejaculados dos touros dos grupos 1 e 2, por protocolo de associação antibiótica A, B, C1,C2 e C3 . São Paulo, 2006-----	59
Tabela 11 -	Freqüência de cultivos bacteriológicos positivos para microbiota autóctone em amostras de sêmen após aplicação dos protocolos de tratamento com associação antibiótica (A,B,C1,C2 e C3).São Paulo, 2006-----	60
Tabela 12 -	Comparação entre sensibilidade e especificidade diagnostica das técnicas de cultivo bacteriológico e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de <i>Leptospira</i> spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estipe 3705) em amostras de sêmen experimentalmente contaminado, sem tratamento antibiótico (controle). São Paulo, 2006-----	61
Tabela 13 -	Comparação entre as técnicas de cultivo bacteriológico e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de <i>Leptospira</i> spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estipe 3705) frente ao tratamento com protocolos A, B e C2 no total de amostras de sêmen experimentalmente contaminado. São Paulo, 2006-----	61
Tabela 14 -	Efeito dos tratamentos com os protocolos A, B e C2 sobre amostras de sêmen experimentalmente contaminadas com <i>Leptospira</i> spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705) pela PCR . São Paulo, 2006-----	62
Tabela 15 -	Efeito dos tratamentos com os protocolos A, B e C2 sobre amostras de sêmen experimentalmente contaminadas com de <i>Leptospira</i> spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705) pelo cultivo bacteriológico. São Paulo, 2006-----	63

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Padrões médios das características seminais bovinas segundo CBRA, 1998-----	85
ANEXO B	Padrões de julgamento de sêmen congelado de doadores. Portaria SDR – 26; 5/09/96 (CBRA, 1998)-----	86
ANEXO C	Padrão dos valores do Kappa e sua classificação (THURSFIELD, 1995)---	87
ANEXO D	ANEXO D – Protocolo de extração proteinase K (adaptado por LEAL et al, 1995)-----	88

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO -----	22
2	OBJETIVOS -----	35
3	MATERIAL E MÉTODOS -----	37
3.1	Breve resumo da rotina estabelecida na Central de inseminação parceira -----	37
3.2	Controle sanitário dos touros doadores -----	39
3.2.1	Animais Selecionados-----	39
3.2.1.1	Exames Sorológicos-----	39
3.2.1.2	Exames Bacteriológicos-----	40
3.2.1.3	Exame Direto para Tricomoníase-----	41
3.2.1.4	Exame Andrológico-----	41
3.2.2	Amostras clínicas-----	42
3.2.2.1	Soro-----	42
3.2.2.2	Muco Prepucial-----	42
3.2.2.3	Sêmen-----	43

3.3	Efeito dos protocolos de antibióticos sobre a microbiota do sêmen-----	43
3.3.1	Análise da Microbiota Prepucial-----	43
3.3.2	Análise da Microbiota do Sêmen-----	43
3.3.2.1	Colheitas-----	44
3.3.2.2	Pré-tratamento-----	44
3.3.2.3	Pós-tratamento-----	44
3.3.3	Teste de integridade de membrana-----	46
3.4	Efeito dos protocolos de antibióticos sobre o sêmen contaminado com	47
	<i>Leptospira spp</i>-----	
3.4.1	Cultura de Leptospiras-----	47
3.4.2	Inóculo-----	48
3.4.3	Cultivo Bacteriológico-----	48
3.4.4	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de <i>Leptospira spp</i> -----	49
3.4.4.1	Limiar de detecção -----	49
3.4.4.2	Extração de DNA-----	50
3.4.4.3	Amplificação do DNA Bacteriano e Análise do Produto Amplificado-----	51

3.5	Tratamento Estatístico-----	52
4	RESULTADOS-----	53
4.1	Etapa 1 – Seleção dos animais-----	53
4.2	Etapa 2 -Efeito dos protocolos de antibióticos sobre a microbiota autóctone do sêmen e sobre o sêmen contaminado por <i>Leptospira</i> spp-----	57
5	DISCUSSÃO-----	65
6	CONCLUSÃO-----	76
	REFERÊNCIAS-----	79

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença de curso agudo a crônico, causado por espiroquetas pertencentes à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae, gênero *Leptospira*, apresenta caráter zoonótico acometendo diversas espécies animais domésticas e silvestres.

Destaca-se por afetar aspectos ligados à produção, envolvendo principalmente a diminuição leiteira e a redução da fertilidade (LANGONI, 1999). Sua distribuição é amplamente difundida em vários países do mundo incluindo o Brasil, acarretando elevados prejuízos econômicos para a pecuária nacional e mundial (VASCONCELLOS, 1997; PINTO, 1997).

Até 1989 sua classificação era baseada em características antigênicas, dividindo o gênero em duas espécies: *Leptospira interrogans*, compreendendo as estirpes patogênicas e *L. biflexa*, que engloba as cepas saprófitas do meio ambiente (LEVETT, 2001). Esta divisão, com base em critérios relacionados às reações sorológicas específicas, resulta em 23 sorogrupos constituídos por cerca de 250 sorovares de leptospiros patogênicos e saprófitas (FAINE, 1999). Esta classificação é à base do sorodiagnóstico. Em 1987, o pesquisador brasileiro Yasuda propôs nova classificação baseada na hibridização por homologia do DNA e recentemente, então, o gênero *Leptospira* foi reclassificado, segundo características genotípicas, em oito genomoespécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. faine*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. santarosai* e *L. weilii*. As leptospiros saprófitas ou de vida livre estão englobadas em três genomoespécies: *L. biflexa*, *L. meyeri* e *L. wolbachii*, com raros casos de infecção (KMETY; DIKKEN, 1993).

As leptospiros são pouco resistentes à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos anti-sépticos. As leptospiros patogênicas sobrevivem na água variando seu período conforme

a temperatura, o pH, a salinidade e ao grau de poluição (BRASIL, 1995). Todas as leptospiras são sensíveis em pH ácido abaixo de 6,8, porém sobrevivem em condições alcalinas em pH entre 7,8 – 7,9. O armazenamento em nitrogênio líquido preserva a virulência e a antigenicidade deste agente (FAINE et al., 1999). Teoricamente, qualquer sorovar de *Leptospira* spp. pode infectar qualquer espécie animal, mas na prática existem sorovares endêmicos em uma determinada região ou país e adaptados aos hospedeiros naturais, favorecendo assim, sua preservação no meio ambiente.

Os sorovares Wolffii e Grippotyphosa podem estar presentes em alguns roedores silvestres e espécies marsupiais. Roedores sinantrópicos, suínos e cães são, respectivamente, considerados hospedeiros de manutenção dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Pomona e Canicola (ELLIS, 1984; FAINE et al., 1999 RADOSTITS et al., 2000;). Os roedores da espécie *Mus musculus*, *Rattus rattus* e principalmente o *Rattus norvegicus*, estão envolvidos na epidemiologia da leptospirose por eliminarem a leptospira pela urina por períodos prolongados (LANGONI, 1999). A persistência e a intensidade da leptospirúria variam com o hospedeiro e o sorovar infectante (GONÇALVES, 1995).

A porta de entrada mais comum é através de abrasões na pele e mucosas, principalmente as conjuntivas; a infecção também pode ocorrer na pele íntegra depois de prolongada imersão em água. (LEVETT, 2001). Após a entrada no hospedeiro ocorre a multiplicação da bactéria no sangue e praticamente em todos os órgãos e tecidos, o que caracteriza a fase de leptospiremia, na qual há comprometimento do fígado, rins, pulmões, adrenais, cérebro, útero, ovário, trompas e glândula mamária.

Nas fêmeas em gestação, o abortamento e suas complicações fazem da leptospirose uma importante doença da esfera reprodutiva (FAINE, 1982, 1994).

A habilidade em sobreviver e multiplicar é o maior componente de virulência deste grupo de bactéria, entretanto, a partir do surgimento de imunoglobulinas específicas e outros

mecanismos imunes, a multiplicação torna-se comprometida, o que não ocorre na primo infecção (FAINE, 1982, 1999). O período de incubação é de 7 a 14 dias, onde ocorre a septicemia com o aparecimento de imunoglobulinas da classe IgM, que têm atividade de poucos dias, surgindo tardiamente anticorpos da classe IgG. Apesar dos anticorpos ajudarem a combater a bacteremia, não eliminam por si só a infecção renal (REBHUN, 1995).

Nos animais que sobreviventes à infecção aguda, as leptospiros persistem em sítios imunologicamente protegidos, como os túbulos proximais, a câmara anterior do olho e trato genital. Nos rins multiplicam-se ativamente, atingindo o pico máximo em 3 a 4 semanas, sendo excretadas pela urina. Contudo, há animais portadores que podem manter-se negativos sorologicamente, mas eliminando leptospira para o meio ambiente constituindo-se, portanto, em fonte de infecção importante. Fetos parecem agir da mesma maneira que os adultos, nascendo portadores renais e excretadores de leptospiros (FAINE, 1982, 1994; FAINE et al., 1999).

Seu diagnóstico clínico é difícil exigindo usualmente a confirmação laboratorial (STOENNER, 1972) uma vez que não apresenta sinais patognomônicos.

Dentre as formas diagnósticas, a detecção de anticorpos séricos através da Reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM) ainda se constitui em prova de referência, conforme preconiza a Organização Mundial da Saúde. Embora a SAM consiga estabelecer com certo grau de especificidade sorogrupo/sorovar envolvido, apresenta como desvantagem ser pouco sensível quando considerado o tempo e a elevada concentração de anticorpos necessários para a emissão do sinal. Além disto, em alguns casos não é discriminatória de infecção pregressa, ativa ou reação vacinal (FAINE, 1999; KEE et al., 1994). Portanto, a sorologia não reflete necessariamente o estado de portador ou eliminador de leptospiros em bovino (VAN EYS et al., 1989).

O isolamento bacteriano é o diagnóstico definitivo da doença, porém este apresenta baixa sensibilidade, necessitando de amostras recém colhidas que devem ser observadas por um período mínimo de 30 dias (GENOVE et al., 1993; SCARCELLI et al., 2004). Em vista da necessidade do desenvolvimento de métodos que ofereçam maior sensibilidade, especificidade e rapidez, técnicas de Biologia Molecular têm sido aplicadas para a detecção de leptospiras (MAGAJEVSKI, 2002).

A leptospirose bovina ocorre mais frequentemente pelo resultado de infecção pela *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo (genótipo Hardjobovis ou Hardjoprajitno). Os sintomas nos bovinos não são específicos, podendo variar de assintomático até agudo, febril e severo. A leptospirose bovina aguda apresenta severidade dos sintomas de acordo com o sorovar infectante, sendo particularmente grave quando devida aos sorovares Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa e Pomona, principalmente em bezerros (FAINE et al., 1999). Os sintomas clínicos incluem febre alta, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, congestão pulmonar e ocasionalmente, meningite e morte. Animais que sobrevivem apresentam retardo ao crescimento e no ganho de peso, com significativa lesão renal, as quais condenam a carcaça no abate.

A síndrome mais comum associada à leptospirose aguda em gado leiteiro, é a síndrome da queda do leite ocorrendo diminuição na produção de leite que dura de 2 a 10 dias, caracterizando-se pelo aparecimento de mastite flácida com agalaxia, com pequena quantidade de sangue no leite, o qual adquire aspecto de colostro, amarelado, com grumos grosseiros e elevada contagem de células somáticas (FAINE et al., 1999).

A forma crônica geralmente associada aos sorovares Wolffi e Hardjo apresenta aborto, nascimento de animais fracos, natimortos, nascimento de prematuro e bezerros fracos ou aparentemente normais, mas portadores. Retenção de placenta pode ocorrer na infecção por Hardjo (FAINE et al., 1999).

Nos bovinos os principais sinais da leptospirose são agalaxia e os problemas ligados à reprodução, como infertilidade, abortos, natimortos, morte e reabsorção fetal e nascimento de animais debilitados (THIERMANN, 1984; ELLIS, 1986).

A transmissão do agente na espécie bovina pode ocorrer de forma indireta, através do contato com água e solos contaminados, e pelo modo direto, especialmente a forma venérea (AMATREDJO et al., 1975).

A transmissão venérea foi confirmada por Roberts (1958) e Jones (1958) que verificaram que a leptospirose poderia ser disseminada nos rebanhos por meio do sêmen contaminado, durante a monta natural (MN) e a Inseminação Artificial (IA).

A presença de *Leptospira* spp. em sêmen de touros naturais e experimentalmente infectados, já foi demonstrada (SLEIGHT; WILLIANS, 1961; SLEIGHT et al., 1964).

Sleighe e Willians (1961) verificaram que em touros portadores renais, a leptospirose assume grande importância tendo em vista que a uretra é comum à passagem da urina e do sêmen. Os bovinos infectados eliminam o agente pela urina por um período de tempo variável que pode chegar a mais de um ano (HANSON, 1982; THIERMANN, 1984), porém segundo Rebhun (1995), alguns bovinos eliminam o agente em caráter intermitente, persistindo entre 10 dias e quatro meses.

Sleighe et al. (1964) analisaram seis touros experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, quatro apresentavam lesões nos testículos e epidídimos semelhantes àquelas encontradas nos rins; em dois, as amostras de sêmen estavam contaminadas por leptospirosas, porém consideraram mais provável a contaminação pela urina, afirmando que a extensão do envolvimento dos órgãos genitais era insuficiente. Relataram também, que devido à variabilidade individual dos animais à infecção pelo sorovar Pomona seria possível a ocorrência de orquite nos touros infectados, capaz de afetar a fertilidade.

Kiktenko et al. (1976) comprovaram a importância do sêmen como meio de transmissão da leptospirose, isolando leptospiros de quatro amostras de sêmen de um total de 56 touros, os quais à necropsia revelaram inflamação dos testículos e das glândulas anexas. Alguns animais infectados apresentaram diminuição da libido e perdas da qualidade do sêmen, pela diminuição do volume do ejaculado, queda da concentração e da motilidade dos espermatozoides e necrospermia.

Ellis et al. (1986) isolaram o sorovar Hardjo no trato genital de touros naturalmente infectados, sendo microrganismo encontrado nos rins, vesículas seminais, epidídimo e testículos e confirmaram que a transmissão venérea a partir do sêmen de machos infectados, é tão ou mais importante que a transmissão urinária.

Vaz e Oliveira (1978) detectaram anticorpos anti-leptospira no sêmen de 54% de 71 touros examinados em uma Central de Inseminação no Rio Grande do Sul.

Guimarães et al. (1987), analisaram amostras de soro sanguíneo e de esperma de reprodutores bovinos em regime de quarentena em centrais de inseminação artificial do Estado de São Paulo, observaram que 11/41 (26,8%) eram reagentes na SAM para *Leptospira interrogans*, sendo 9/11 (81,8%) foram para o sorovar Wolffii e dois 2/11(18,2%) para o sorovar Shermani; porém as amostras de sêmen resultaram negativas frente à técnica de isolamento adotada. A falha no isolamento poderia ser explicada pela possível competição exercida por microrganismos inibidores e /ou pela presença de contaminantes (SCHÖNBERG, 1981).

Com o incremento do uso da Inseminação artificial (IA) nos últimos anos, tornando-se uma das técnicas de reprodução mais difundida no meio agropecuário, onde se estima que milhões de doses de sêmen congelado são comercializadas entre os diferentes países, a garantia sanitária de doadores deve ser motivo de grande preocupação. Uma vez que na IA, o sêmen é colocado diretamente no útero, evitando desta forma o efeito bactericida da secreção

cervico-vaginal produzida no estro, reconheceu-se que muitos patógenos ou mesmo agentes da microbiota na cavidade prepucial poderiam sobreviver aos processos laboratoriais, desde a diluição até o congelamento trazendo sérios riscos aos animais (EAGLEWSOME; GARCIA, 1992; GENOVEZ et al., 1999; PALIT et al., 1986).

Para prevenir o risco de transmissão de agentes infecciosos por meio da inseminação artificial, faz-se necessário um rígido controle da condição sanitária dos touros e da qualidade do sêmen, desde a colheita até a conservação. O método subjetivo de exame visual, para análise da motilidade dos espermatozóides, utilizando microscópio ótico com contraste de fase e platina aquecida, é aceitável quando realizado por pessoa experiente (VARNER et al., 1991).

O espermatozóide é dividido em cabeça, colo, peça intermediária e cauda, a qual subdividida em peça principal e peça terminal (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). Do ponto de vista do armazenamento do sêmen a baixas temperaturas (+5 e -196°C) considera-se o espermatozóide como um elemento dotado de um núcleo altamente condensado e de estruturas microtubulares, fibrosas e membranosas que tem diferentes respostas ao choque térmico e as baixas temperaturas. Dentre os fatores que afetam a preservação do sêmen, choque térmico é um dos mais importantes. Choque térmico é a denominação genérica dada às alterações morfológicas e bioquímicas irreversíveis das membranas celulares, induzidas pelo resfriamento rápido dos espermatozóides de +20 a +5°C. Estas alterações são acompanhadas por um padrão anormal de motilidade, perda rápida da motilidade e viabilidade, danos nas membranas plasmáticas e acrossomal, metabolismo reduzido e perda de componentes intracelulares (WATSON, 1981). O dano celular pode ser causado diretamente, como pela ruptura de membranas, ou indiretamente pela alteração de funções celulares, como a redução da velocidade dos processos metabólicos (WATSON, 1990).

Dentre as formas de preservação do sêmen, é importante destacar a utilização de diluentes com a finalidade de proteger os espermatozóides de condições ambientais desfavoráveis e a prolongar a sua sobrevivência (PICKETT; AMANN, 1987; BRINSKO; VARNER, 1992). Os diluentes também são utilizados para aumentar a viabilidade do sêmen, para aumentar o volume da dose também para auxiliar na avaliação do sêmen (MATOS, 1995). Um diluente deve possuir as seguintes características: pressão osmótica compatível com o espermatozóide; equilíbrio de elementos minerais; uma combinação de nutrientes; substâncias capazes de neutralizar produtos tóxicos produzidos pelos espermatozóides.

Muitos estudos comparam diluentes e métodos de resfriamento e de diluição tendo a motilidade espermática como principal variável de avaliação da preservação dos espermatozóides. A estimativa da motilidade espermática continua sendo um elemento importante na avaliação da função espermática (KENNEY et al., 1993; PICKETT et al., 1993; VARNER et al., 1988). Considerando que a motilidade é um componente indispensável do mecanismo de fertilização, a perda irreversível de motilidade pode ser considerada uma perda de função celular. Por outro lado, a manutenção da motilidade não implica na integridade celular completa (VARNER et al., 1988) e não tem correlação absoluta com a fertilidade (PACE; SULLIVAN, 1975).

A adição de antibióticos aos diluentes permite a redução da contaminação do sêmen, diminuindo a transmissão de doenças venéreas bacterianas (HUGHES; LLOYD, 1970) e o risco do desenvolvimento de endometrites decorrentes da inseminação. Há relatos na literatura comprovando que as leptospiros podem suportar as concentrações de antibióticos empregadas no processo de congelamento do sêmen, com ou sem redução em sua virulência (BLENDEN, 1976; BRYAN; BOLEY, 1975; HOAG; BELL, 1955).

Porém, alguns antibióticos reduzem a motilidade e a sobrevivência dos espermatozóides (JASKO et al., 1993). Os antibióticos comumente utilizados são

pertencentes aos grupos dos β -lactâmicos, como penicilina (KENNEY et al., 1975); amoxicilina (CLEMENTE et al., 1995), dos aminoglicosídeos como gentamicina, estreptomicina (KENNEY et al., 1983) e amicacina (VARNER et al., 1992).

Miraglia (2001) comparou a capacidade de quatro antibióticos, acrescidos ao diluidor de sêmen gema-citrato, concluindo que a associação penicilina-estreptomicina apresentou os melhores resultados na capacidade de destruir leptospiras, embora houvesse 2,0% (7/348) de cultivos positivos. Amoxicilina, ceftiofur sódico e a combinação de ambos, nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$, não foram efetivas para inativar as leptospiras.

Nos EUA, o "Certified Sêmen Services (CSS) Minimum Requirements for Disease Control of Semen Produced for Artificial Insemination", determina um protocolo com os padrões mínimos para o monitoramento de saúde e doenças dos touros, anteriormente à sua entrada, bem como durante o isolamento (quarentena) e a residência dos mesmos nas centrais de inseminação artificial (CIA). Em relação à leptospirose, os touros doadores de sêmen nas CIA são submetidos aos testes sorológicos semestrais para os cinco sorovares mais importantes naquele país: Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona e Grippotyphosa. Além disso, o CSS determinou quais os antibióticos e diluidores mais efetivos no controle microbiológico do sêmen. Um protocolo aceitável é aquele em que o sêmen e o diluidor são tratados com os antibióticos gentamicina, tilosina, lincomicina e estreptomicina (NAAB, 2001).

No Brasil, até recentemente, a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA determinava que o controle da transmissão de leptospirose pelo sêmen de touros doadores em centrais de inseminação artificial (CIA) deveria ser realizado através de duas provas sorológicas pela SAM com intervalo de 30 dias, iniciadas 15 dias após a medicação antibiótica, com título inferior a 1:100 para todos os sorovares usualmente constantes da bateria de antígenos conforme recomendado pela

Organização Mundial de Saúde, com especial atenção para os sorovares Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Grippytyphosa e Hardjo. Os bovinos reagentes somente poderiam ser utilizados em regime de coleta após tratamento com dihidroestreptomicina na dose de 25mg/kg, três dias consecutivos, e cujos títulos mantivessem inalterados ou em declínio, e ainda cujo resultado laboratorial em duas amostras de urina, colhidas duas semanas após tratamento fossem negativas. Atualmente, a Portaria 46 de julho de 2003 que versa sobre requisitos zoossanitários para importação de sêmen bovino e bubalino de países extra-mercosul e a Instrução Normativa 48 de junho de 2003, que determina os requisitos mínimos para a produção e comercialização de sêmen dessas espécies no Brasil, não preconizam qualquer medida de seleção do touro ingressante quanto à leptospirose, baseando-se apenas na utilização de dois protocolos de adição de antibióticos ao extensor, sejam eles: A) gentamicina (250 µg), tilosina (50 µg), lincomicina (150 µg) e espectinomicina (300 µg)- GTLS; ou B) penicilina (500 IU), estreptomicina (500 IU), lincomicina (150 µg) e espectinomicina (300 µg) (BRASIL, 2003).

Embora o procedimento anteriormente preconizado pelo MAPA impusesse restrições severas à entrada de touros em CIA baseado em critério falho, ou seja, na avaliação sorológica em curto prazo; na Instrução Normativa vigente nenhum controle sobre o status sanitário do animal ingressante tem sido considerado além da simples adição do diluente com um ou outro protocolo antibiótico.

A adição de antibióticos de amplo espectro nos extensores de sêmen, em concentrações que não sejam deletérias aos espermatozoides, mas que garantam a destruição de leptospiras, necessita de estudo (MIRAGLIA, 2001; MITCHELL, 1983; PAREZ, 1998; SLEIGHT, 1965). O sulfato de amicacina, que tem sido empregado na prevenção de contaminantes nas várias etapas da fertilização *in vitro* (FIV) deveria ser testado, avaliando seu nível de toxicidade para o espermatozóide (MIRAGLIA, 2001; MITCHELL, 1983;

PAREZ, 1984; SLEIGHT, 1965). Essa biotécnica visa multiplicar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas, portadoras ou não de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural, entretanto, a qualidade do sêmen rotineiramente utilizado para IA tem se mostrado insuficiente para o sucesso da FIV, particularmente no momento do co-cultivo. Pequenas quantidades de agentes ubiqüitários, de microbiota autóctone ou mesmo patógenos são francamente multiplicados nas condições de cultivo empregadas (GONÇALVES et al., 2002).

Estudos mostraram que o epitélio estratificado que recobre a cavidade prepucial e o pênis dos bovinos apresenta invaginações que podem atingir a lamina própria. A profundidade destas dobras é menor no prepúcio, sobre tudo na parte dorsal, aumentado em número e em profundidade com o avanço da idade do animal, estando relacionada principalmente a animais com idade superior a quatro anos (STOESSEL, 1982). Os reprodutores jovens apresentam certa resistência às infecções, principalmente por agentes microaerófilos, que não encontrariam quantidade e profundidade suficientes de criptas para sua manutenção e multiplicação (GENOVEZ et al., 1999). A microbiota por sua vez, também pode sofrer alterações sazonais que se reflete nas condições ambientais e de infraestrutura dos locais de coleta das centrais.

O efeito de diferentes tipos e de variáveis concentrações de antibióticos sobre a viabilidade do espermatozóide necessita ser ainda investigado com profundidade, e o emprego do teste de integridade de membrana seria uma boa opção. A integridade estrutural e funcional de membrana é importante para o sucesso da fertilização.

Para que se possa certificar da validade do processo de criopreservação, o espermatozóide deve estar com sua função e morfologia intactas de forma que possa ser considerado viável ao processo de fertilização (DELL'AQUA JÚNIOR, 2000). A integridade

da membrana plasmática é importante para o metabolismo espermático, assim como para os processos como capacitação espermática, reação acrossomal e a ligação do espermatozóide a superfície do óvulo (HARRISON; VICKERS, 1990).

Atualmente, o teste com sondas fluorescentes tem mostrado resultados satisfatórios seguindo a técnica descrita por Harrison e Vickers (1990) e modificada por Zúccari (1998) por ser de fácil preparo e interpretação. Segundo Zúccari (1998), a utilização de fluorocromos está se tornando cada vez mais rotineira, por serem corantes de fácil difusão em células integras ou lesadas, mesma na presença de um crioprotetor. Os corantes fluorescentes dividem-se em dois grupos, os que não são capazes de penetrar através da membrana íntegra (brometo de etídeo, iodeto de propídio, etc.), portanto só ingressando e corando células com a membrana lesada, ligando-se ao DNA celular e produzindo coloração vermelha. O segundo grupo, onde se encontra os compostos não polares, entre eles os ésteres de fluoresceína, que possuem a característica de se difundirem através da membrana intacta e ao ingressarem na célula espermática sofrem hidrólise por esterases, resultando na formação de carboxifluoresceína livre, permanecendo nas células intactas, corando-as de fluorescência verde (HARRISON; VICKERS, 1990; ROTMAN; PAPERMASTER, 1966).

Considerando-se que a leptospirose pode ser transmitida pela IA e a existência de possíveis falhas no controle do sêmen bovino com relação ao protocolo atual preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA, o qual não contempla qualquer seleção prévia dos animais com relação a esta enfermidade, e ainda em virtude das dificuldades de obtenção de melhores taxas na FIV empregando-se sêmen comercial, o presente trabalho propôs a análise de três protocolos de antibióticos no controle da leptospirose, como também seu efeito sobre a microbiota do sêmen de touros < 4 anos e ≥ 4 anos, doadores em Central de Inseminação Artificial - CIA assim como sua variação com o

período de chuva e seca, através do exame bacteriológico com isolamento e identificação do agente e da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivos:

- avaliar a microbiota autóctone presente nas amostras de muco prepucial e sêmen colhidas em duas épocas distintas do ano, na chuva e na seca, e entre touros com <4 e ≥ 4 anos.
- avaliar o efeito do tratamento com os protocolos antibióticos adicionados ao extensor : A): gentamicina (250 μg), tilosina (50 μg), lincomicina (150 μg), espectinomicina (300 μg) e B): penicilina (500 UI), estreptomicina (500UI), lincomicina (150 μg), espectinomicina (300 μg), ambas determinadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA nº46/2003 e 48/2003 em vigência no Brasil, e C): Sulfato de amicacina: C1) 500 $\mu\text{g/mL}$, C2) 1500 $\mu\text{g/mL}$ e C3) 2500 $\mu\text{g/mL}$ de uso corrente na FIV, sobre a microbiota presente na amostra de sêmen de touros provenientes de um Centro de Colheita e Processamento de Sêmen – CCPS, São Paulo-SP.
- avaliar o efeito dos protocolos de antibióticos (A, B, C1, C2, C3 e Controle) sobre o espermatozóide através do teste de integridade de membrana.
- avaliar o efeito bactericida do emprego dos três protocolos antibióticos (A, B e C2), adicionados ao extensor de sêmen experimentalmente contaminado com *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705),

provenientes desses touros, através das técnicas de cultivo microbiológico e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), comparando-as entre si.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A conduta laboratorial foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa foram selecionados os animais mediante exames sanitários e andrológico. Na segunda etapa foram realizados os exames propriamente ditos referentes à avaliação do efeito das associações antibióticas sobre a qualidade do sêmen.

3.1 Breve Resumo da Rotina Estabelecida na Central de Inseminação Artificial

Os animais são colhidos em dois locais distintos, um contendo grama e/ ou areia, a qual é umedecida previamente para diminuir a poeira. Os touros são trazidos para o local de colheita aproximadamente 6:30h onde são examinados clinicamente, lavados e escovados para retirada de todas as sujidades aderidas ao corpo. Após o banho, é lavada a região do óstio prepucial primeiramente com água e sabão e depois realizada a lavagem da região prepucial com água deionizada e posteriormente com solução salina 0,9%.

A estimulação para coleta de sêmen é realizada através da utilização de manequins que passam pelo mesmo processo de higienização.

A coleta de sêmen é realizada pelo método de vagina artificial individualizada, as quais são lavadas e desinfetadas após as colheitas. O sêmen individualizado é colhido em um frasco de vidro graduado, levado imediatamente ao laboratório e mantido em banho termostático a 37°C durante o tempo de realização do exame físico.

No laboratório são realizados dois exames: espermograma e avaliação de patologias do espermatozóide. No primeiro, leva-se em consideração as características físicas do ejaculado: volume e aspecto, seguido do exame em microscopia ótica (100 x) para análise do turbilhão, motilidade, vigor e concentração. No segundo, uma alíquota da amostra de sêmen é acrescida de formol 10% na diluição de 1:10 para análise morfológica, patologias como anormalidades da cabeça e da cauda.

Uma vez considerado apto para a reprodução, ou seja, apresenta o padrão mínimo exigido para a comercialização no Brasil, que segue os critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), passa a ser diluído adicionando-se o diluente ou extensor contendo a mistura antibiótica, previamente preparada. Esta suspensão é mantida a 4° C por no mínimo 4 horas até ser distribuído e congelado a -196° C. Dentro de 24-48 horas o sêmen congelado é submetido a dois exames complementares: teste de termo resistência, onde o sêmen é colocado a 45°C por 30 minutos para a observação da motilidade e do vigor, e o teste pós-congelamento em duas etapas, a primeira imediatamente após o descongelamento e a segunda após o sêmen ter sido mantido a 37°C por 30 minutos, onde são também observadas motilidade e vigor.

3.2 Controle Sanitário dos Touros Doadores

Nesta fase foi realizado o controle sanitário dos animais doadores.

3.2.1 Animais Selecionados

Os animais foram submetidos a exames laboratoriais para que fossem selecionados, devendo apresentar-se livres de enfermidades reprodutivas:

3.2.1.1 Exames Sorológicos

- a- Brucelose -Antígeno Acidificado Tamponado segundo ALTON et al.,1988, confirmação pelo 2-ME em soroaglutinação lenta.
- b- Leptospirose - Soroaglutinação Microscópica (SAM) segundo FAINE et al.,1999) frente a 26 sorovares de *Leptospira* spp. Quando na triagem apresentavam título ≥ 50 com 100% de aglutinação, foram tituladas em diluições seriadas de razão 2, sendo o título final, a maior diluição capaz de revelar 50% das leptospiras livres por campo microscópico. Na eventual positividade sorológica para leptospirose, os animais foram tratados com três doses consecutivas de diidroestreptomicina 25mg/kg e as amostras de sêmen foram colhidas 10 dias após o término do tratamento.

- c- IBR e BVD-Virusneutralização em microplacas para IBR e BVD segundo PITUCO, 1988 e PITUCO, 1995.
- d- Neosporose – kit comercial Neospora caninum "Antibody test kit Idexx - Herd check (IDEXX do Brasil 11-63457007 - São Paulo).
- e- Clamidiofilose- Reação de Fixação do complemento segundo Igayara et al. (2002).

3.2.1.2 Exames Bacteriológicos

- a- Campilobacteriose genital bovina e exame bacteriológico de muco prepucial conforme GENOVEZ et al., 1989.
- b- Espermocultura para agentes oportunistas da microbiota prepucial, segundo Genovez et al. (1999) e para patógenos como *Leptospira* spp. segundo Faine, (1999); *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e subsp. *venerealis* segundo Genovez et al., (1986); GENOVEZ et al., (1989); Genovez (1997); *Histophilus somni* segundo Scarcelli et al. (2004) e *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* segundo Cardoso et al. (2001).

3.2.1.3 Exame Direto para Tricomoníase

Foi realizado através da visualização a fresco do lavado prepucial, segundo Amaral e Santos, (1974).

3.2.1.4 Exame Andrológico

Este exame foi realizado no sêmen in natura segundo Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

1) Identificação do Animal

2) Exame Clínico: anamnese ou história clínica, exame clínico geral, comportamento sexual e índole, exame do sistema genital: bolsa escrotal e testículos: forma, simetria, consistência, mobilidade, sensibilidade, temperatura, posição, tamanho e biometria testicular; epidídimos; cordões espermáticos; prepúcio; pênis; genitália interna.

3) Espermograma: colheita de sêmen, características físicas do ejaculado: volume, aspecto, turbilhão, motilidade, vigor, concentração; características morfológicas dos espermatozoides: anormalidades de cabeça e cauda.

4) Exames Complementares: teste de termo-resistência; exames microbiológicos (para controle de patógenos) e exames sorológicos (para controle de patógenos).

5) Diagnóstico e Conclusão: quando um reprodutor é submetido a uma avaliação andrológica é necessário que se chegue a um diagnóstico/ conclusão com vistas ao seu aproveitamento. Os reprodutores são classificados em aptos, questionáveis ou inaptos para a reprodução.

Os Anexos A e B representam os valores seminais padronizados para bovinos segundo CBRA.

3.2.2 Amostras Clínicas

Foram coletados amostras de soro, muco prepucial e sêmen para realização dos exames.

3.2.2.1 Soro

Cerca de 10 mL de sangue de cada touro foram colhidos de forma asséptica, antes do fornecimento de ração, separado o soro sanguíneo, transferido para frasco estéril e mantido a -20° C até o momento da utilização .

3.2.2.2 Muco prepucial

Os animais selecionados foram submetidos à colheita de muco prepucial realizada como preconizado por Genovez et al. (1999).

3.2.2.3 Sêmen

Os animais selecionados foram submetidos à colheita de sêmen através da vagina artificial como preconizado pela Central de Inseminação Artificial-CIA.

As amostras de muco prepucial e sêmen foram colhidos sempre nas mesmas datas.

3.3 Efeito dos Protocolos de Antibióticos sobre a Microbiota do Sêmen

3.3.1 Análise da Microbiota Prepucial

Foram realizados exames bacteriológicos do muco prepucial segundo GENOVEZ, et al., 1999, para identificação da microbiota que pudesse interferir por contigüidade com o sêmen. Os resultados dos testes propostos foram avaliados em função das idades dos touros (<4 anos e \geq 4 anos) e em relação à sazonalidade, período de chuva e seca.

3.3.2 Análise da Microbiota do Sêmen

A seguir, será mencionado a análise das amostras de sêmen no pré e pós tratamento.

3.3.2.1 Colheitas

Para este exame foram realizadas colheitas nas mesmas condições acima.

3.3.2.2 Pré-tratamento

Foi realizado exame bacteriológico com isolamento e identificação de agentes para identificação da microbiota do sêmen *in natura* antes da aplicação dos protocolos de antibióticos. 10 uL de cada amostra de sêmen *in natura* foram submetidos ao exame bacteriológico pelo método UFC –unidades formadoras de colônia segundo Genovez et al. (1999).

3.3.2.3 Pós-tratamento

A cada amostra de sêmen foi adicionado o extensor acrescido de cada um dos três protocolos de antibióticos A, B, C1, C2 e C3, e um controle sem antibiótico (apenas extensor), os quais foram submetidos ao cultivo bacteriológico para isolamento e identificação de agentes de microbiota.

- Protocolos de antibióticos

Protocolo A: gentamicina (250 µg/mL), tilosina (50 µg/mL); lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL).

Protocolo B: penicilina (500 UI); estreptomicina (500 UI); lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL).

Protocolo C1: sulfato de amicacina (500 µg/mL)

Protocolo C2: sulfato de amicacina (1500 µg/mL)

Protocolo C3: sulfato de amicacina (2500 µg/mL)

Controle (C): extensor sem antibiótico

- Preparo do extensor

O extensor foi preparado com 26,21g de meio Tris, 14,51g. de ácido cítrico, 220 mL de gema de ovo e dissolvidos em água destilada.

- Diluição do Sêmen

Imediatamente após a colheita, cada amostra de sêmen foi colocada em banho termostático a 37° C, e analisadas quanto ao volume (mL), motilidade (%) e vigor (0-5) (MAARA, 1996).

A diluição do sêmen foi realizada de acordo com a concentração espermática obtida através da leitura em espectrofotômetro calibrado frente a uma amostra de sêmen diluído, de concentração conhecida através de prévia determinação por contagem direta (CBRA, 1998).

Para cada protocolo (A, B, C1, C2, C3 e Controle) a diluição do sêmen foi 30×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente o sêmen diluído foi resfriado a 4°C por 4 horas e logo após, envasado e congelado em nitrogênio líquido (-196°C).

3.3.3 Teste de integridade de membrana

O teste de integridade de membrana foi realizado para avaliação da possível toxicidade ou efeito deletério dos protocolos de antibióticos sobre o espermatozoide. Os parâmetros espermáticos foram avaliados através da análise computadorizada da motilidade (CASA – Hamilton Thorn – HTM-IVOS 10) e para a avaliação da integridade da membrana espermática, adotou-se o protocolo descrito por Harrison e Vickers (1990) e modificado por Zúccari (1998), pelo uso de sondas fluorescentes. Utilizou-se a seguinte solução: - 01 mL de citrato de sódio - 10 μL de solução formol - salina - 20 μL de carboxifluoresceína (C.F.) - 10 μL de iodeto de propídio (I.D.) Adicionou-se 10 μL de sêmen a 40 μL da solução acima e então examinou-se em microscopia de epifluorescência com a qual foram contadas 100 células.

- A interpretação da leitura obedeceu ao seguinte critério:

Íntegros: espermatozoides com a membrana plasmática íntegra, células coradas pela carboxifluoresceína (CF), apresentando-se verde em toda a sua extensão.

Lesados: e espermatozoides com a membrana plasmática e a acrossomal lesada, células coradas pelo iodeto de propídio (ID), apresentando-se vermelha.

3.4. Efeito dos Protocolos Antibióticos sobre Sêmen Contaminado com *Leptospira* spp.

Foi analisado o efeito de todos os protocolos de antibióticos através do cultivo microbiológico e da PCR.

3.4.1 Cultura de *Leptospira* spp.

As culturas de *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpe Hardjoprajtno) e Wolffi (estirpe 3705) foram obtidos do Center for Disease Control-Atlanta-USA e Hardjobovis da OMS—Organização Mundial da Saúde.

As culturas de leptospiros foram mantidas em 10 mL de meio líquido de EMJH (DIFCO-USA) modificado (ALVES, 1996) suplementado com 15% de soro estéril de coelho e inativado a 56°C por 30 minutos, enriquecido com 1% de piruvato de sódio, 1% de cloreto de cálcio, 1% de cloreto de magnésio e 3% de L-asparagina e incubadas durante sete dias em estufa bacteriológica a 30°C. Cada cultura foi examinada quanto à pureza e ausência de autoaglutinação em microscopia de campo escuro em aumento 100X, e submetido à contagem em Câmara Petroff-Housser, (Thomas Scientific - catalogo numero 3900) de células bacterianas de pelo menos 5 tubos, com concentração média final de 10^8 microrganismos /mL.

3.4.2 Inóculo

300 μL de sêmen acrescidos do extensor contendo os respectivos protocolos de antibióticos (A, B, C1, C2, C3) e controle (C) sem antibióticos, na diluição 30×10^6 espermatozóide/mL foram experimentalmente contaminados com 3,0 μL dos cultivos de *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705) na concentração de 10^6 leptospiras /mL .

Após contaminação, as amostras de sêmen foram armazenadas em tubos criogênicos e a mistura foi mantida à temperatura de 28-30° C por 30 minutos, para a obtenção de um melhor contato entre inóculo e sêmen diluído. Logo após este período foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) por 48 horas, simulando as condições de produção na Central de Inseminação, sendo descongeladas no momento do uso.

3.4.3 Cultivo Bacteriológico

Ainda, simulando o momento da inseminação artificial nas condições de campo, as amostras de sêmen armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em temperatura ambiente e deixadas em temperatura de 30°C por 30 minutos, para em seguida proceder-se a detecção das leptospiras pelo isolamento bacteriológico e PCR.

Foi utilizado o meio EMJH (DIFCO-USA) conforme descrito e acrescido de mistura antibiótica 5-fluoruracil 1% e ácido nalidixico 4%, em condições aeróbicas a 30°C por 24 horas. Uma alíquota de 100 μL de cada tubo foi semeado em 3 mL de EMJH procedendo-se a

leitura em microscópio Jena Zeiss com condensador de campo escuro seco, com lente objetiva Epiplan 10x/0,20 e de ocular 10 (100X), observado sob as mesmas condições semanalmente por 30 dias (FAINE et al., 1999).

3.4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a Detecção de *Leptospira* spp.

Foi realizada análise do limiar de detecção da técnica de PCR para amostras de sêmen experimentalmente contaminadas.

3.4.4.1 Limiar de detecção

A fim de determinar a menor concentração de DNA bacteriano que a técnica de PCR pode detectar em sêmen bovino, duas amostras de sêmen bovino, na diluição de 30×10^6 espermatozoides/mL somente com diluente sem antibiótico, foi experimentalmente contaminado com diferentes concentrações de *Leptospira interrogans* sorovar Wolffi, de modo a se obter 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 bactérias por mL de sêmen. Para a obtenção dessas concentrações de leptospira no material foi utilizada uma cultura pura diluída a 10^{-2} , pois nessa diluição foi observada a melhor distribuição das leptospiras para sua contagem na câmara de Petroff-Hausser. Foram colocados 10 μ L da cultura diluída a 10^{-2} , preenchendo a câmara, esperou-se pela sedimentação do material, e a contagem foi realizada em microscopia de campo escuro no aumento de 400x. Foram contados, ao acaso, cinco quadrados de linhas

triplas, e então foi calculado o número aproximado de leptospiras naquele meio, seguindo-se a fórmula usual:

$$\frac{\text{Número de leptospiras contadas} \times \text{fator de diluição} \times 20.000}{80} \times 1.000$$

80

Foram contadas 35 leptospiras nos cinco quadrados de linha tripla, aplicando-se a fórmula obtiveram-se $8,75 \times 10^8$, leptospiras por mL de sêmen, foi adicionado 11,4 μL da cultura diluída a 10^{-2} , em 988,6 μL de sêmen (com diluente sem antibiótico), e a partir daí obtiveram-se as demais diluições.

3.4.4.2 Extração de DNA

A técnica com proteinase K (LEAL et al., 1995), foi aplicada para extração de DNA a partir da diluição de 200 μl de cada amostra de sêmen com 400 μl de TE (Tris EDTA ph 7,0). O volume foi centrifugado a 13000 x g por 30 minutos, e o sedimento foi ressuspendido em 300 μL de tampão Tris-EDTA anteriormente ao protocolo de extração (Anexo D).

3.4.4.3 Amplificação do DNA Bacteriano e Análise do Produto Amplificado

Foram realizadas reações de PCR com os primers Lig1 e Lig2 desenhados a partir do gene que codifica proteínas semelhantes a imunoglobulinas de leptospiros (*lig*), descritos por Palaniappan et al. (2005), sendo que a expressão dos genes *lig* é um fator de virulência único de leptospiros patogênicos. Os primers amplificam fragmentos de 468 pares de base (pb). Para a amplificação do DNA foi utilizado volume total de 50 µL, com 200 µM de cada dNTP, 5 µL de tampão 1X, 3 mM de MgCl₂, 30 pmol de cada primer (Lig1 e Lig2), 1,5 U Taq polymerase e 10 µL de DNA. Antes do ciclo de temperaturas, a desnaturação inicial foi realizada a 95°C por 5 minutos e, ao final, extensão a 72°C por 10 minutos. Foram realizados trinta e cinco ciclos divididos em três fases: desnaturação a 95°C por 60 segundos, hibridização a 58°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Uma alíquota da cultura de *Leptospira interrogans sorovar Pomona* (ATCC) foi utilizada como controle positivo da PCR, e uma alíquota do meio sem DNA bacteriano foi utilizada como controle negativo. As amplificações foram realizadas em máquina termocicladora Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research) e a análise dos produtos amplificados foram realizadas por eletroforese em gel de agarose a 1.3% corado com brometo de etídeo.

Lig 1 – 5' TCAATCAAAACAAGGGGCT 3'

Lig 2 – 5' ACTTGCATTGGAAATTGAGAG 3'

3.5 Tratamento Estatístico

A análise estatística dos resultados foi realizada com os programas MedCalc ® versão 8.2.02, SPSS version 14.0 for Windows e EpiInfo 6.04 através dos testes não paramétricos. Para comparação de proporções foi utilizado o teste de qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher (ZAR, 1999). Para comparação de médias foi utilizado o teste de Friedman. A concordância entre as técnicas de cultivo microbiológico e PCR para a detecção de *Leptospira* spp foi estimada através do indicador *Kappa* (THRUSFIELD, 1995).

O teste de McNemar (ZAR, 1999), foi utilizado para comparações entre amostras dependentes.

4 RESULTADOS

Estão sendo apresentados seguindo-se as duas etapas laboratoriais descritas no item 3.

4.1 Etapa 1 – Seleção dos animais

Foram selecionados 8 touros constantes na tabela 1, divididos em dois grupos, segundo a idade.

As tabelas 1 a 6 apresentam os resultados dos exames que permitiram a seleção desses animais segundo as condições sanitárias relativas as seguintes enfermidades reprodutivas: Brucelose, Leptospirose, Clamidofilose, IBR, BVD, Neosporose, Campilobacteriose Genital Bovina, Histofilose e Tricomoniase e exame andrológico das amostras de sêmen. Nos exames bacteriológicos do muco prepucial e sêmen, os animais não apresentaram culturas positivas para *Campylobacter fetus* subsp *fetus*, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma* spp..

Com base nos exames bacteriológicos, sorológico e andrológico os animais foram considerados livres de doenças e aptos para a reprodução.

Tabela 1 - Relação dos touros doadores de sêmen selecionados de uma Central de Inseminação Artificial, segundo a idade e raça - São Paulo - 2006

Identificação dos touros		Data de Nascimento/idade	Raça/Código
Grupo 1	1	06/08/97 -7 anos	Nelore Mocho – NO
	2	20/08/97 –7 anos	Nelore – NE
	3	20/05/01 – 4 anos	Jersey – JE
	4	06/11/01 – 4 anos	Aberdeen Angus – NA
Grupo 2	5	14/03/02 –3 1/2 anos	Gir Leiteiro – GL
	6	19/04/02 – 3 anos	Gir Leiteiro – GL
	7	29/04/03 – 3 anos	Gir Leiteiro – GL
	8	10/08/02 – 3 anos	Nelore – NE

Tabela 2 - Exames sorológicos de touros doadores de sêmen em uma Central de Inseminação Artificial segundo as enfermidades reprodutivas - São Paulo - 2006

Identificação dos touros	IBR	BVD	Neosporose	Brucelose	Clamidofilose
Grupo 1	1	Reagente	Reagente	Não reagente	Não reagente
	2	Reagente	Reagente	Não reagente	Não reagente
	3	Reagente	Reagente	Não reagente	Não reagente
	4	Reagente	Reagente	Não reagente	Não reagente
Grupo 2	5	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Não reagente
	6	Reagente	Reagente	Não reagente	Não reagente
	7	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Não reagente
	8	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Não reagente

Os animais reagentes para leptospirose pela SAM na primeira colheita sorológica foram tratados com três doses consecutivas de dihidroestreptomicina 25mg/Kg e acompanhados com nova sorologia como mostra a tabela 3. Após tratamento da urina e sêmen os animais não mostraram excreção de leptospiros pela PCR.

Tabela 3 - Soroaglutinação Microscópica realizada em duas amostras sorológicas pareadas de touros doadores de sêmen de uma Central de Inseminação Artificial - São Paulo - 2006

Identificação dos touros	Sorovares Reagentes		
	1ª colheita	2ª colheita	
Grupo 1	1	Hardjo (100) + Autumnalis (200) + Bratislava (200) + Shermani (1600)	Wolffi (50) + Hardjo (100)
	2	Wolffi (50) + Hardjo (200)	Não reagente
	3	Não reagente	Não reagente
	4	Wolffi (50) + Hardjo (400) + Hebdomadis (100) + Guaricura (400)	Wolffi (50) + Hardjo (200)
Grupo 2	5	Shermani (400)	Shermani (200)
	6	Wolffi (50) + Hardjo (50)	Wolffi (50) + Hardjo (50)
	7	Shermani (400)	Shermani (200)
	8	Wolffi (100) + Hardjo (400) + Bratislava (100) + Hebdomadis (100) + Shermani (100)	Hardjo (200) + Shermani(100)

* Intervalo entre a primeira e segunda colheitas 60 dias

Tabela 4 - Exame andrológico dos touros segundo raça, análise física (turbilhão, motilidade, volume e concentração) do sêmen *in natura*, teste de termo resistência (TTR) e teste pós-congelamento (TPC) com diluidor gema citrato acrescido do protocolo de antibiótico utilizado pela Central de Inseminação Artificial (penicilina 250 µg/ml, tilosina 50 µg/ml, lincomicina 150 µg/ml, espectinomicina 300 µg/ml) - São Paulo - 2006

Identificação dos touros ¹	Raça	Hora da Colheita	Volume	Turbilhonamento	Motilidade/ Vigor	Concentração*	Fator de Diluição**	Extensor/ ML***	TPC		TTC	
									Mot./Vigor	Mot./Vigor	Mot./Vigor	Mot./Vigor
Grupo 1	1	NO	8:55	8	4	80/4	1,834	30	114	50/3-4	50/3-4	
	2	NE	10:15	6	3-4	75/3-4	1,226	30	55	40/3-4	30/3-4	
	3	JE	9:20	4,5	3-4	75/3-4	1,692	30	100	60/3-4	50/3-4	
	4	NA	9:00	2,5	4	80/3-4	2,035	30	40	50/3-4	50/3	
Grupo 2	5	GL	9:40	4,5	3-4	80/3-4	1,771	30	413	60/3-4	50/3-4	
	6	GL	10:00	10	4	80/3-4	1,339	30	79	60/3-4	50/3-4	
	7	GL	8:45	6	4	80/4	1,424	25	90	50/3-4	50/3-4	
	8	NE	11:10	4,5	4	80/3-4	1.690	25	90	50/3-4	50/3-4	

Concentração por mL de sêmen

Fator de diluição: Fator milhões de espermatozoides/ mL

Extensor/mL: quantidade do extensor

TCP-Mot./Vigor= Teste pós congelamento – Motilidade / Vigor

TTC-Mot./Vigor=Teste de termo resistência – Motilidade / Vigor

Tabela 5 - Exame andrológico dos touros relativo à análise morfológica do espermatozóide segundo a presença de defeitos maiores, defeitos menores e patologias totais - São Paulo - 2006

Patologias	Touros							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Defeitos maiores	5	4	10	4	2	4	7	2
Defeitos Menores	1	0	0	2	3	3	1	1
Patologias Totais	6	4	10	6	5	7	8	3

4.2 Etapa 2 - Efeito dos protocolos de antibióticos sobre a microbiota autóctone do sêmen e sobre o sêmen contaminado por *Leptospira* spp.

A análise dos efeitos dos protocolos de antibióticos foi realizada tanto para microbiota do muco prepucial quanto para do sêmen. Estes resultados estão representados nas tabelas 6 a 11.

Tabela 6 - Frequência de amostras de muco prepucial e sêmen *in natura* de touros com culturas bacteriológicas positivas para microbiota autóctone, antes da aplicação dos protocolos de associação antibiótica considerando-se quatro colheitas distintas - São Paulo - 2006

	Muco Prepucial		Sêmen	
	< 4 anos	≥4 anos	< 4 anos	≥ 4 anos
Positivo	16	15	13	14
Negativo	0	1	3	2

Pelo Teste exato de Fisher ($p= 0,196$) não houve diferença estatística entre a frequência de culturas bacteriológicas positivas para microbiota autóctone em amostras de muco e sêmen.

Tabela 7 - Gêneros bacterianos da microbiota autóctone presentes nas amostras de muco prepucial e sêmen *in natura* de touros, antes da aplicação dos protocolos de associação antibiótica considerando-se quatro colheitas distintas - São Paulo - 2006

Gêneros Bacterianos	
Muco Prepucial	Sêmen
<i>Proteus</i> spp	<i>Proteus</i> spp
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus</i> spp	<i>Streptococcus</i> spp
<i>Acinetobacter</i> spp	<i>Acinetobacter</i> spp
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i>	Levedura
<i>Bacillus</i> spp	<i>Corynebacterium</i> spp
<i>Enterobacter</i> spp	
<i>Corynebacterium</i> spp	

Tabela 8 - Frequência de gêneros bacterianos por amostra de muco prepucial e sêmen relativo a cada touro - São Paulo - 2006

Identificação dos touros	Muco Prepucial	Sêmen	
Grupo 1	1	4	3
	2	3	2
	3	5	4
	4	5	2
Grupo 2	5	4	2
	6	3	1
	7	4	3
	8	5	2

Não houve diferença estatística entre frequência de gêneros bacterianos encontrados no muco prepucial e no sêmen e entre os grupos 1 e 2 (Teste de χ^2 : $p=0,992$).

Tabela 9 - Frequência de gêneros bacterianos por amostra de muco prepucial e sêmen relativo a cada touro em relação à sazonalidade (período de seca e chuva) - São Paulo - 2006

Identificação dos touros		SECA		CHUVA	
		Muco prepucial	Semen	Muco prepucial	Semen
Grupo 1	1	2	3	4	3
	2	3	2	2	2
	3	5	3	3	4
	4	2	2	4	1
Grupo 2	5	4	2	2	1
	6	3	0	2	1
	7	3	1	2	3
	8	3	1	4	2

Não houve diferença estatística entre a frequência de gêneros bacterianos nas amostras de muco prepucial e sêmen, tanto no período da seca (Teste de χ^2 : $p= 0,806$) quanto no período da chuva (Teste de χ^2 , $p= 0,904$).

Não houve diferença estatística entre a frequência de gêneros bacterianos nas amostras de muco prepucial durante os períodos de seca e chuva (Teste de χ^2 , $p= 0,869$).

Não houve diferença estatística entre a frequência de gêneros bacterianos nas amostras de sêmen durante os períodos de seca e chuva (Teste de χ^2 , $p= 0,895$).

Tabela 10 - Efeito no teste de integridade da membrana medido pela média de espermatozoide lesados/integros por 100 cel/mL dos ejaculados dos touros dos grupos 1 e 2, por protocolo de associação antibiótica A, B, C1,C2 e C3 - São Paulo - 2006

Reação	A	B	C1	C2	C3	C
Verde	62,12	63,75	63	60	64,25	64,75
Vermelho	37,87	36,25	37	40	35,75	35,25

Protocolos: A = gentamicina (250 $\mu\text{g/mL}$), tilosina (50 $\mu\text{g/mL}$); lincomicina (150 $\mu\text{g/mL}$); espectinomicina (300 $\mu\text{g/mL}$); B= penicilina (500 UI); estreptomina (500 UI); lincomicina (150 $\mu\text{g/mL}$); espectinomicina (300 $\mu\text{g/mL}$); C1= sulfato de amicacina (500 $\mu\text{g/mL}$); C2 = sulfato de amicacina (1500 $\mu\text{g/mL}$); C3= sulfato de amicacina (2500 $\mu\text{g/mL}$) e C=controle (sêmen com extensor sem antibiótico)

Verde= espermatozóide íntegro

Vermelha= espermatozóide lesado

Com relação à integridade de membrana dos espermatozoides não foi observada diferença estatística entre os cinco tratamentos antibióticos.

Pelo Teste de Friedman ($p=0,892$) não houve diferença estatística quanto à integridade de membrana dos espermatozoides entre os cinco protocolos.

Tabela 11 – Frequência de cultivos bacteriológicos positivos para microbiota autóctone em amostras de sêmen após aplicação dos protocolos de tratamento com associação antibiótica (A, B,C1,C2 e C3) - São Paulo - 2006

Cultivos	A	B	C1	C2	C3	C									
Positivo	1	3	3	4	1	6									
Negativo	5	3	3	2	5	0									
	A x B	A x C1	A x C2	A x C3	A x C	B x C1	B x C2	B x C3	B x C	C1 x C2	C1 x C3	C1 x C	C2 x C3	C2 x C	C3 x C
P	0,726	0,726	1	0,219	1	1	1	0,625	0,507	1	0,625	0,507	1	0,289	1

Protocolos: A = gentamicina (250 µg/mL), tilosina (50 µg/mL); lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL); B= penicilina (500 UI); estreptomina (500 UI); lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL); C1= sulfato de amicacina (500 µg/mL); C2 = sulfato de amicacina (1500 µg/mL); C3= sulfato de amicacina (2500 µg/mL) e C=controle (sêmen com extensor sem antibiótico)

OBS: Durante a avaliação, duas amostras do grupo controle mostraram-se estéreis, tendo sido retiradas da análise estatística.

Pelo Teste de McNemar evidenciou-se ausência de significância estatística entre as frequências de cultivos bacteriológicos positivos para microbiota autóctone em amostras de sêmen após aplicação de tratamentos.

Tendo em vista os resultados das tabelas 10 e 11, aplicou-se o protocolo C2 para o estudo sobre a detecção de *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estipe 3705) de amostras de sêmen experimentalmente contaminadas pelos exames bacteriológicos e PCR.

O limiar de detecção da técnica de PCR em amostras de sêmen bovino experimentalmente contaminadas com *Leptospira interrogans* sorovar Wolffii com os primers Lig 1 e Lig 2 foi de 10^4 bactérias /mL de sêmen.

Estão representados nas tabelas de 12 a 15 os resultados estatísticos encontrados entre os exames de cultivo microbiológico e PCR nas amostras contaminadas experimentalmente pela *Leptospira* spp.

Tabela 12 - Comparação entre sensibilidade e especificidade diagnóstica das técnicas de cultivo bacteriológico e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estipe 3705) em amostras de sêmen experimentalmente contaminado, sem tratamento antibiótico (controle) - São Paulo - 2006

	Cultivo X PCR	PCR X Cultivo
Sensibilidade	28,33%	100%
Especificidade	100%	45,57%

Tabela 13 - Comparação entre as técnicas de cultivo bacteriológico e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estipe 3705) frente ao tratamento com protocolos A, B e C2 no total de amostras de sêmen experimentalmente contaminado - São Paulo - 2006

CULTIVO \ PCR	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
	POSITIVO	17	0
NEGATIVO	43	36	79
TOTAL	60 (62,5%)	36	96

Observou-se fraca concordância entre as técnicas de PCR e cultivo bacteriológico (Anexo C) (Kappa = 0,229). Pelo Teste de McNemar, $p < 0,0001$ e, portanto a concordância fraca obtida pelo cálculo do índice Kappa apresentou significância estatística.

Tabela 14 – Efeito dos tratamentos com os protocolos A, B e C2 sobre amostras de sêmen experimentalmente contaminadas com *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705) pela PCR - São Paulo - 2006

Hardjoprajitno	A	B	C2	C		
positivo	1	4	2	8		
negativo	7	4	6	0		
	AXC	BXC	C2XC	AXB	AXC2	BXC2
P	0,016	0,012	0,031	0,025	1	0,500
Hardjobovis	A	B	C2	C		
positivo	5	5	7	8		
negativo	3	3	1	0		
	AXC	BXC	C2XC	AXB	AXC2	BXC2
P	0,250	0,250	1	1	0,500	0,500
Wolffi	A	B	C2	C		
positivo	5	5	4	8		
negativo	3	3	4	0		
	AXC	BXC	C2XC	AXB	AXC2	BXC2
P	0,250	0,250	0,125	1	1	1

Protocolos: A = gentamicina (250 µg/mL), tilosina (50 µg/mL); lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL); B= penicilina (500 UI); estreptomina (500 UI); lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL); C2 = sulfato de amicacina (1500 µg/mL) e C=controle (sêmen com extensor sem antibiótico)

Pelo teste McNemar, houve diferença estatística entre os protocolos A ($p=0,016$), B ($p=0,012$) e C2 ($p=0,031$) com os controles e entre A e B ($p=0,025$) apenas para a estirpe Hardjoprajitno.

Pelo teste exato de Fisher, houve diferença estatística apenas no protocolo C2, entre as estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis

Tabela 15 – Efeito dos tratamentos com os protocolos A, B e C2 sobre amostras de sêmen experimentalmente contaminadas com de *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705) pelo cultivo bacteriológico - São Paulo - 2006

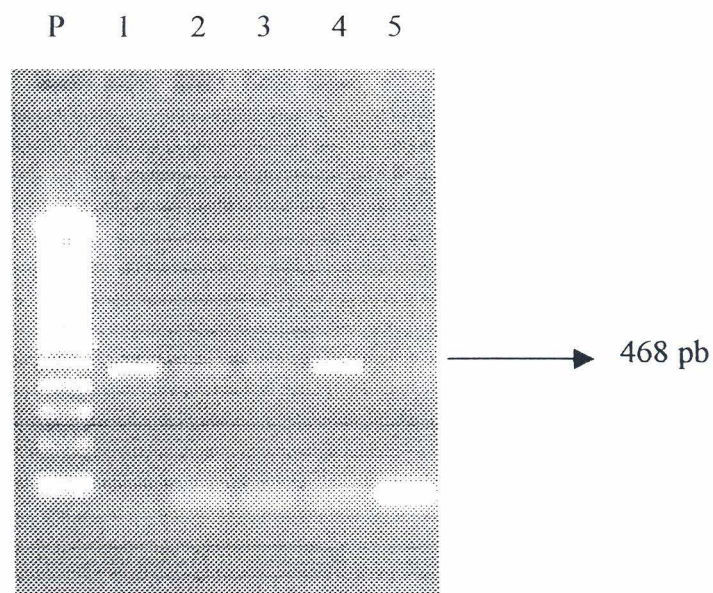
Hardjoprajitno	A	B	C2	C		
positivo	0	0	1	2		
negativo	8	8	7	6		
	AXC	BXC	C2XC	AXB	AXC2	BXC2
P	0,500	0,500	1	1	1	1
Hardjobovis	A	B	C2	C		
positivo	1	2	4	5		
negativo	7	6	4	3		
	AXC	BXC	C2XC	AXB	AXC2	BXC2
P	0,125	0,250	1	1	0,250	0,500
Wolffi	A	B	C2	C		
positivo	1	0	2	2		
negativo	7	8	6	6		
	AXC	BXC	C2XC	AXB	AXC2	BXC2
P	1	0,500	1	1	1	0,500

Protocolos: A = gentamicina (250 µg/mL), tilosina (50 µg/mL); lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL); B= penicilina (500 UI); estreptomina (500 UI); lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL); C2 = sulfato de amicacina (1500 µg/mL) e C=controle (sêmen com extensor sem antibiótico)

Pelo teste de Mcnemar não houve diferença estatística entre os protocolos para a mesma estirpe de *Leptospira* spp.

Pelo Teste exato de Fisher, não houve diferença estatística por protocolo entre as estirpes.

A figura 1 representa o resultado da PCR, mostrando amostras positivas e negativas.



1 Figura Resultado da PCR para amostras de sêmen dos touros de uma CIA, com os respectivos protocolos A, B, C2 e Controle, contaminados experimentalmente com *Leptospira* spp. sorovares hardjo (estirpes hardjoprajitno e hardjobovis) e wolffi (estirpe 3705).
P) Padrão de peso molecular; 1) sêmen, colheita com protocolo A; 2) sêmen, colheita com protocolo B, 3) sêmen, colheita protocolo C2, 4) controle positivo; 5) controle negativo.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, procurou-se seguir os procedimentos realizados pela CIA sem qualquer alteração na rotina estabelecida.

Como se observa nas tabelas 1-5, o touro se encontravam em condições adequadas para a realização deste trabalho, apesar da verificação de alguns defeitos maiores e menores no exame andrológico, forma compatíveis com os parâmetros preconizados pelo CBRA. Observa-se também nessas tabelas que os touros selecionados apresentavam-se reagentes para *Leptospira* spp. e que quando submetidos ao tratamento com dihidroestreptomicina os títulos de aglutininas na SAM se mantiveram ou declinaram fracamente, entretanto não se verificando excreção de leptospiros pela urina e sêmen na PCR.

As contaminações experimentais das amostras de sêmen com os soravares de *Leptospira* spp. foram realizadas com a dose média de 10^6 leptospiros, considerando-se a concentração excretada por mL de urina de bovinos (FAINE,1999), e seguiram as condutas realizadas na CIA simulando o procedimento de industrialização do sêmen, com a única diferença de terem sido empregados tubos criogênicos para armazenamento em nitrogênio líquido no lugar das palhetas.

Geralmente acima de quatro anos, o epitélio estratificado que recobre a cavidade prepucial e o pênis dos bovinos apresenta aumento na profundidade e no número de criptas (STOESSEL, 1982), propiciando a instalação da diversidade de microbiota que se relaciona com as condições ambientais e de infraestrutura dos locais de colheitas das CIA, assim como de patógenos como *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* que se aproveitam da baixa tensão de oxigênio local (GENOVEZ et al., 1999). Pela Tabela 6, não foram observadas diferenças nas frequências de cultivos com presença de microbiota em muco prepucial e sêmen *in natura*

relativos à idade dos animais. Genovez et al. (1999) também não observaram variação entre o número de amostras contaminadas nas diferentes faixas etárias de touros de CIA. Entretanto, pode se verificar nesta tabela que alguns animais independentemente da idade não apresentavam qualquer tipo de contaminação, no muco ou sêmen considerando-se quatro colheitas distintas e intervaladas, o que mostra boa condição de higienização da região prepucial adotada pela CIA.

À parte dos patógenos naturais, é difícil estabelecer a importância dos oportunistas como potenciais patógenos. Segundo Genovez et al. (1999) a desinfecção prévia do prepúcio influi na qualidade do sêmen, reduzindo-se com este procedimento cerca de 50% dos microrganismos. A colheita através de vagina artificial propicia menor contaminação do que a massagem das vesículas seminais. Mesmo sob adequadas e melhores condições de colheita, observa-se contaminação microbiana. Pode-se estabelecer que o número de bactérias presentes no sêmen é inversamente proporcional à frequência de lavados da cavidade prepucial e regiões adjacentes. Por outro lado, lavagens muito frequentes podem tornar a cavidade prepucial vulnerável à predominância de uma única população de microrganismos e assim interferir na sobrevivência do espermatozóide, competindo na utilização dos nutrientes e do oxigênio. Existem controvérsias quanto ao papel de bactérias da microbiota autóctone e ubiçitárias sobre sua capacidade fecundante e ainda sobre a possibilidade de infectar fêmeas interferindo nas taxas de concepção, de mortalidade embrionária ou causando o abortamento. Agentes bacterianos de origem ambiental podem atingir o feto em condições especiais de debilidade imunológica, e por serem geralmente ocorrências pontuais, denotam problemas com o sistema de manejo do rebanho (SCARCELLI et al., 2004). Alguns países importadores exigem exames de sêmen visando à detecção de microrganismos ubiçitários e oportunistas, destacando-se os gêneros *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, além de alguns fungos e leveduras.

Touros de CIA normalmente instalados em baias individualizadas apresentam o hábito de exporem com frequência o pênis, favorecendo a penetração de agentes ambientais na cavidade prepucial e conseqüentemente por contigüidade contaminarem o ejaculado no momento da colheita. Pelos resultados obtidos, observou-se diversidade de gêneros bacterianos contaminantes da cavidade prepucial e sêmen (tabela 7), havendo correlação entre eles, sendo praticamente os mesmos observados por Genovez et al. (1999) que também mostraram estreita relação entre os agentes. Quando foram computados as frequências de gêneros bacterianos por amostra de muco prepucial e sêmen de cada animal, não se observou diferença entre as amostras e os grupos 1 e 2, relativos a idade dos animais (tabela 8). Ao exame das tabelas 7 e 8 denota-se diminuição de contaminantes no sêmen em relação ao muco prepucial confirmando as boas práticas de colheita desta CIA.

A colheita de sêmen nesta CIA era realizada em dois ambientes, um em grama e outro em areia. A princípio supôs-se que a época da seca, favoreceria o aumento dos aerossóis o que provavelmente permitiria maior contaminação da cavidade prepucial e por conseqüência o sêmen no momento da colheita. Entretanto, as análises não mostraram diferenças significantes entre a frequência de gêneros bacterianos nas amostras de muco prepucial e sêmen, tanto no período da seca quanto no período da chuva (tabela 9).

O controle sanitário oficial da produção de sêmen visa a manutenção da saúde dos animais de um centro de inseminação artificial garantindo o mínimo risco para a distribuição internacional tanto para os animais quanto ao seres humanos. Além disto, deve assegurar que o sêmen seja colhido, tratado e armazenado dentro das normas de higiene (OIE, 2006) incorporação do extensor contendo antibióticos é uma prática internacional para minimizar ou assegurar a destruição e, portanto impedir a transmissão de patógenos eliminados pela urina e sêmen. Atualmente dois protocolos são recomendados pela OIE; com livre escolha das CIAs, sendo os mesmos empregados no Brasil : A) gentamicina (250 µg/mL), tilosina (50 µg/mL);

lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL) e B) penicilina (500 UI); estreptomicina (500 UI); lincomicina (150 µg/mL); espectinomicina (300 µg/mL). Estudos sobre a eficácia de outros protocolos foram realizados.

Burns et al. (1975), verificaram redução de 99% na concentração bacteriana em relação ao sêmen não diluído (controle) após 2 horas de incubação a temperatura ambiente. Amostras de sêmen onde foi empregado leite desnatado/ glicose como extensor e acrescido de gentamicina (1mg/mL) ou uma combinação de penicilina (1500UI/mL) e estreptomicina (1500UI/mL) foram submetidas a repetidas culturas bacteriológicas e comparadas com o controle, mostraram não haver crescimento bacteriano na presença da associação antibiótica, independentemente da temperatura de incubação (KENNEY et al., 1975).

O uso de sulfato de polimixina B para o controle de possíveis patógenos no sêmen foi recomendado por Squires et al. (1981). Este antibiótico controlou o crescimento bacteriano em baixas concentrações e não teve efeitos aparentes sobre a motilidade espermática após 1 h de Incubação A 38° C.

CLEMENT (1995), compararam o grau de contaminação bacteriana de amostras de sêmen puro e em diluente contendo penicilina (50UI/mL) e sulfato de gentamicina (50µg/mL) logo após a colheita e de amostras mantidas a 4°C durante 6 e 24 horas. Na medição feita logo após a colheita, o sêmen sem diluente apresentou grau de contaminação significativamente maior que o sêmen diluído ($p < 0,001$). Uma nova redução significativa na contaminação foi observada nas 6 horas de preservação, baixando gradativamente até a temperatura atingir níveis inferiores a 15°C, quando os antibióticos utilizados passam a ter sua eficácia reduzida. Neste mesmo trabalho, os autores testaram a eficácia de diferentes antibióticos β -lactâmicos e a gentamicina com base na contaminação bacteriana medida nas amostras mantidas por 6 horas a 4°C. Foram usados 11 diluentes: leite desnatado sem antibiótico, com penicilina (40 ou 400UI/mL), ticarcilina (20 ou 200 µg/mL), amoxicilina (20 ou 200 µg/mL), penicilina

ticarcilina (40UI + 20 µg/mL), gentamicina (40 µg/mL), e gentamicina com penicilina (50 µg/mL + 50 ou 400UI/mL). As amostras contendo gentamicina apresentaram contaminação significativamente menor ($p < 0,001$) que as amostras contendo antibióticos β-lactâmicos. Os autores também consideram que baixas concentrações de antibióticos (50 µg/mL gentamicina e 50UI/mL de penicilina), são tão eficazes quanto as outras doses maiores como gentamicina de 1000 µg/mL (KENNEY et al., 1975) e 2500 µg/mL (BACK et al., 1975) e no caso da penicilina, de 1000UI/mL (VARNER et al., 1998) e 1500UI/mL (KENNEY et al., 1975).

A motilidade espermática avaliada por microscopia óptica tem sido considerada como um dos critérios mais importantes na avaliação da fertilidade do sêmen.

Kjaestad et al., (1993) relacionaram características seminais pós-congelação como motilidade, vigor integridade de acrossomo com taxas de retorno ao cio, comprovando que a motilidade e o vigor proporcionam um dado confiável de predição da fertilidade dos touros. As técnicas que utilizam sondas fluorescentes têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies. As células espermáticas coradas por esta técnica, podem ser avaliadas tanto quanto aos aspectos morfológicos como quanto aos funcionais (ERICSSON et al., 1989). Segundo Parks e Graham (1992), a integridade de membrana espermática exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fertilizante. Ao se utilizar concentrações diferentes de antibióticos, estes podem ser deletérios aos espermatozóides, comprometendo assim sua capacidade de fertilização. Porém, os resultados obtidos com os protocolos testados (A, B, C1, C2 e C3) não apresentaram diferença estatística com relação à integridade de membrana, mostrando assim, que não houve alteração morfológica e nem funcional dos espermatozóides mesmo quando submetidos ao tratamento com sulfato de amicacina nas três concentrações empregadas (500µg/ mL, 1500µg/ mL ou 2500µg/ mL); o que sugere a possibilidade de uso deste antibiótico na preservação do sêmen ou no controle

de patógenos sensíveis a este antimicrobiano, assim como sua aplicação no processo de manipulação de gametas na FIV .

Na tabela 11 pode se verificar que os protocolos A e C3 apresentaram redução na frequência de cultivos bacteriológicos positivos para a microbiota autóctone em amostras de sêmen quando comparados ao controle representado pela mesma amostra sem tratamento antibiótico, entretanto sem significância estatística. Talvez este resultado tenha sido prejudicado pelo baixo número de amostras trabalhadas.

Uma vez que as concentrações não interferiram na viabilidade do espermatozóide a concentração intermediária (C2) foi selecionada para o estudo sobre a detecção de leptospiras no sêmen.

As estirpes de *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705) foram escolhidas para este estudo pela ampla distribuição mundial, pela elevada soroprevalência no Brasil e sobretudo pela implicação reprodutiva nos rebanhos bovinos, especificamente pela capacidade de estabelecerem portadores genitais.

A dose infectante de 10^6 leptospiras/mL (FAINE et al.,1999) empregada na contaminação das amostras de sêmen foi utilizada tomando-se por base a concentração usualmente excretada pela urina pelo bovino, simulando as condições naturais, para que o efeito da mistura antibiótica seja efetivamente avaliado e possa servir de respaldo para as instruções normativas do MAPA quanto a ausência de seleção prévia dos animais com relação a leptospirose.

Frente aos resultados da tabela 12 a PCR apresentou 100% de sensibilidade e especificidade nas amostras de sêmen contaminadas com leptospiras contra 28,33 e 45,57% respectivamente do cultivo. Era esperado que a PCR detectasse todas as amostras contaminadas, pois independentemente da viabilidade das leptospiras, o DNA bacteriano

estaria presente. Quando foram comparadas as técnicas de cultivo bacteriológico e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estipe 3705) no sêmen experimentalmente contaminado e não submetido a qualquer tratamento antibiótico (controle) observou-se fraca concordância entre as técnicas (Kappa = 0,229, com significado estatístico).

O cultivo com isolamento e identificação de leptospiras se constitui no teste definitivo para a identificação de doentes e portadores renais ou genitais. Entretanto, a baixa sensibilidade devido a necessária viabilidade da bactéria em amostras clínicas e portanto recém colhidas e adequadamente armazenadas, e ainda a interferência do pH e da umidade, fazem desta metodologia um grande desafio. Somado a isto, as culturas devem ser examinadas sob microscopia por pelo menos trinta dias para resultados conclusivos (BOLIN et al., 1989; GENOVEZ et al., 1993; GENOVEZ, 2006; SCARCELLI et al., 2004).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e suas variações vem sendo empregadas com sucesso a partir de qualquer material clínico permitindo minimizar tais impedimentos, identificando o DNA de agentes microbianos de forma específica, com elevada sensibilidade e em curto período de tempo. Regiões específicas de DNA são amplificadas exponencialmente através de ciclos programados de temperaturas com o uso de um aparelho termociclador utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (primers) na presença da enzima *Taq DNA* polimerase, e o produto amplificado revelado por eletroforese. A etapa de extração do DNA é o ponto crítico da técnica, devendo ser ajustados aos tecidos e fluidos, prevenindo a presença de substâncias inibidoras que poderão afetar o rendimento da PCR e alterar seu resultado (GENOVEZ, 2006).

Na leptospirose, essa técnica se constitui em ferramenta fundamental quando o isolamento está comprometido pela não viabilidade do agente, baixa intensidade de excreção, material clínico muito contaminado ou submetido à conservação inadequada e

particularmente no sêmen onde há competição por nutrientes da microbiota autóctone. A PCR é uma ótima opção de diagnóstico, por ser rápida e extremamente sensível (BELÁK; BALLAGI-PORDÁNY, 1993).

Com o incremento das biotécnicas na reprodução animal, produção de embriões *in vitro*-PIV e transferência de embriões-TE, a qualidade sanitária de embriões ganhou destaque e a PCR tem sido a técnica de escolha nestes testes (GENOVEZ, 2006).

Na tabela 13 que compara o cultivo bacteriológico e a PCR para detecção de *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffii (estirpe 3705) frente aos protocolos A, B e C2 no total de amostras de sêmen experimentalmente contaminado, depara-se com a fraca concordância entre cultivo e PCR, estatisticamente significativamente, onde a PCR foi capaz de identificar 62,5% contra 17,7% do cultivo. Se de fato o DNA bacteriano deveria ser detectado em todas as amostras de sêmen contaminadas, em algum pós-tratamento com antibióticos, isto não ocorreu.

Denota-se pela análise da tabela 14, pelos resultados da PCR houve redução na frequência de exames positivos frente aos três protocolos comparados ao controle somente para estirpe Hardjoprajitno. Entre os protocolos A e B, a redução foi maior com A, não havendo diferença com C2. O protocolo C2 foi capaz de reduzir mais frequentemente os resultados positivos de Hardjoprajitno quando comparada a Hardjobovis, mas sem diferença com Wolffii. Uma vez que a PCR nas condições realizadas foi capaz de detectar quantidades da ordem de 10^4 leptospiras/ml de sêmen (limiar de detecção), esta redução pode ser discutida. Diferentemente das quinolonas, que teriam ação na replicação do DNA bacteriano e portanto poderiam interferir na detecção do DNA pela PCR; os antibióticos contidos nos protocolos A, B e C2 atuam na síntese protéica das bactérias interferindo com o RNA ribossômico e portanto, esses resultados provavelmente não se relacionam com o efeito bactericida desses antibióticos. A menor detecção de leptospiras no sêmen após a adição do

extensor contendo os protocolos A, B ou C2 pela PCR deve estar relacionada a fatores intrínsecos desta técnica.

Magajevski (2002) não obteve sucesso na detecção de leptospiros pela PCR em amostras de sêmen de touros sorologicamente reagentes para o sorovar Hardjo.

Em contrapartida, a tabela 15, que apresenta o efeito dos tratamentos com os protocolos A, B e C2 sobre amostras de sêmen experimentalmente contaminadas com as estirpes de leptospiros pelo cultivo bacteriológico, confirma a deficiência deste método; pois mesmo no controle as leptospiros foram pouco recuperadas (2/8; 5/8 e 2/8 respectivamente para Hardjoprajtino, Hardjobovis e Wolffi). Em função deste resultado, não foi observada diferença estatística entre os protocolos para a mesma estirpe de *Leptospira* spp. e também entre os protocolos ensaiados.

Segundo, Schönberg (1981), a ausência de isolamento de leptospira das amostras de sêmen poderia ser explicada pela possível competição exercida por microrganismos inibidores e contaminantes presentes nesse material.

Outros fatores devem ser ainda mencionados. Primeiramente, a dose contaminante de leptospiros empregada no sêmen foi menor do que aquelas empregadas em trabalhos semelhantes. Segundo Miraglia, (2001) o diluidor contendo penicilina – estreptomicina (1000 UI-1000 µg/mL) foi superior a amoxicilina (1000 µg/mL) e ceftiofur sódico (1000µg/mL) na inativação de *Leptospira santarosai* sorovar Guaicurus. Observa-se nesse trabalho, que o inoculo empregado foi de dois mL de uma suspensão de 10⁶ leptospiros/mL para um mL de sêmen, e portanto muito maior que aquele empregado no presente trabalho.

Outro ponto discutível é a recuperação de leptospiros mantidas em nitrogênio líquido. Cultivos desta bactéria quando armazenados em nitrogênio líquido necessitam de elevada concentração bacteriana para serem prontamente recuperados. O efeito tóxico do glicerol como criopreservante na concentração acima de 5% é fator limitante na recuperação de

culturas mantidas nesta condição (PALLIT et al., 1986; REED et al., 2000). No sêmen comercial a concentração final de glicerol é de 6,4%, o que certamente interfere na recuperação de baixas concentrações de leptospiras.

Brod et al. (1995), avaliaram amostras de sêmen de vários reprodutores e verificaram ser possível observar leptospiras durante o exame direto após 24 horas de cultivo em meio semi-sólido. No presente estudo, embora as amostras de sêmen contaminadas com leptospiras fossem semeadas inicialmente em meio seletivo, o que diminuiu o crescimento de contaminantes; após 24 horas de incubação essas culturas foram repicadas em meio sem antibióticos, o que favoreceria o crescimento das leptospiras.

De qualquer forma, há discrepância entre os resultados bacteriológicos pós-tratamento com antibiótico entre os autores, os quais são dependentes das condições experimentais. Balashov (1971); Balashov et al. (1967); Jones (1958); Kikitenko et al. (1976) e Rodina (1971), constataram para o sorovar Pomona e Warren et al. (1955) para o sorovar Sejroe maior sensibilidade “in vitro” da estreptomicina. Ao contrário de Hoad E Bell (1955), os quais verificaram o crescimento dos sorovares Sejroe, Pomona, Grippothyphosa e Icterohaemorrhagiae, na presença do mesmo aminoglicosídeo. Este estudo também diferiu dos achados por Bryan e Boley (1955), os quais observaram a sobrevivência das leptospiras em sêmen bovino diluído com penicilina, estreptomicina sulfanilamida.

Conclui-se que a transmissão de leptospiras pelo sêmen industrializado de touros doadores em CIA é principalmente dependente da concentração de leptospiras excretadas no momento da colheita.

O emprego das duas técnicas, PCR e cultivo, seriam importantes para a confirmação diagnóstica de excreção de leptospiras pelo sêmen; entretanto, a baixa sensibilidade do cultivo e o fato da detecção do DNA bacteriano pela PCR não depender de sua viabilidade, podem conduzir à interpretação equivocada da capacidade infectante do patógeno (GENOVEZ,

2006). Uma forma de minimizar o risco de entrada da leptospirose numa CIA é o emprego da PCR em pelo menos duas amostras de sêmen colhidas na quarentena e posteriormente no monitoramento da infecção, garantindo a biosseguridade pelas elevada sensibilidade, especificidade diagnóstica com rapidez.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e analisados, segundo a metodologia empregada, possibilitaram as seguintes conclusões:

- 1 - houve correlação entre os gêneros bacterianos detectados no cultivo bacteriológico das amostras de muco prepucial e sêmen na mesma colheita.
- 2 - a frequência de gêneros bacterianos detectados no cultivo bacteriológico por amostra de muco prepucial e sêmen de cada touro não mostrou diferença quanto à idade (<4 e ≥ 4 anos).
- 3 - as colheitas de muco prepucial e sêmen nesta CIA, realizadas em dois ambientes, grama ou areia, não mostraram diferenças sazonais (época de chuva e de seca) quanto a frequência de cultivos bacteriológicos positivos para microbiota autóctone e a diversidade de gêneros bacterianos isolados.
- 4 - pelo teste de integridade de membrana, os protocolos A = gentamicina (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tilosina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); lincomicina (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$); espectinomicina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e B= penicilina (500 UI); estreptomina (500 UI); lincomicina (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$); espectinomicina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não propiciaram alteração morfológica ou funcional dos espermatozoides.
- 5 - pelo teste de integridade de membrana, o sulfato de amicacina não apresentou diferença nas três concentrações (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) quanto a alteração

morfológica ou funcional dos espermatozoides, podendo ser empregado na preservação do sêmen.

- 6 - os protocolos A e C3 apresentaram redução na frequência de cultivos bacteriológicos positivos para a microbiota autóctone em amostras de sêmen quando comparados ao controle representado pela mesma amostra sem tratamento antibiótico, entretanto sem significância estatística.
- 7 - a PCR apresentou 100% de sensibilidade e especificidade nas amostras de sêmen contaminadas com leptospiros contra 28,33 e 45,57% respectivamente do cultivo, com fraca concordância (Kappa = 0,229, com significado estatístico) entre elas .
- 8 - a diminuição na frequência de resultados positivos na PCR, em amostras de sêmen contaminadas com três estirpes de *Leptospira* spp e tratadas com os protocolos A, B ou C, está relacionada a fatores intrínsecos da técnica e não ao efeito bactericida dos antibióticos empregados.
- 9 - houve baixa sensibilidade do cultivo bacteriológico no isolamento de estirpes de *Leptospira* spp em sêmen experimentalmente contaminado com 10^6 bactérias/mL.
- 10 - a transmissão de leptospiros pelo sêmen industrializado de touros doadores em CIA é principalmente dependente da concentração de leptospiros excretadas no momento da colheita.

11 - a PCR confirma ser uma ferramenta fundamental na detecção da presença de leptospiras no sêmen de touros doadores em Centrais de Inseminação Artificial, devendo ser empregada em pelo menos duas colheitas na quarentena, e posteriormente no monitoramento do animal.

REFERÊNCIAS

AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R. S. F.; PATH, M. R. C. Bovine leptospirosis. **Veterinary Bulletin**, v. 45, n. 12, p. 875-891, 1975.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* tipo *hardjo-bovis* in bovine urine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 7, p. 1001-1003, 1989.

BACK, D. G.; PICKETT, B. W.; VOSS, J. L.; SEIDSL, G. E. Effect of antibacterial agents on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. **Journal of Animal Science**, v. 41, n. 1, p. 137-143, 1975.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Manual de Leptospirose**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 98.p. 1995.

BURNS, S. J.; SIMPSON, R. B.; SNELL, J. R. Control of microflora in stallion semen with a semen extender. **J. Repr. Fert.** Cambridge, v. 23, p. 139-142, 1975.

CACCHIONE, R. A.; DURLACH, R.; LARGHI, O. S. P.; MARTINO, P. Temas de Zoonosis III. In: GENOVEZ, M.E. **Diagnóstico Laboratorial de La Leptospirose Animal**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis, p.177-181, 2006.

CHAPPEL, R. J.; PRIME, R. W.; MILLAR, B. D.; JONES, R. T.; CUTLER, R. S.; ADLER, B. Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* slaughtered in abattoir in Victoria, Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 235-242, 1998.

CLEMENT, F.; VINDAMENT, M.; GUERIN, B. Microbial contamination of stallion semen. **Biology of reproduction: monograph series: equine reproduction VI**, Madison, Wisconsin, 1995.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Trichomonas foetus* **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 743-750, 1992.

ELLIS, W. A. Leptospirosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 27, p. 683-92, 1986.

- ERICSSON, S. A.; GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; DOWING T. W.; MARSHALL, C. E. Interrelationship among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 39, p. 1009-1024, 1993
- FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneve: WHO, 1982, 171 p. (Publication offset, 67)
- FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. USA: CRC Press, 1994, 353p.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PERULAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: MediSci, 1999, 272 p.
- GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E. P.; FACIOLLI, M. R.; CARDOSO, M. V.; TEIXEIRA, S. R. Avaliação bacteriológica de sêmen "in natura" industrializado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, 403-405, 1999.
- GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E. P.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.
- GILLESPIE, D. The magic and challenge of DNA probes as diagnostic reagents. **Veterinary Microbiology**, v. 24, n. 3-4, p. 217-233, 1990.
- GINGERAS, T. R.; RICHMAN, D. D.; KWOH, D. Y.; GUATELLI, J. C. Methodologies for in vitro nucleic acid amplification and their applications. **Veterinary Microbiology**, v. 24, n. 3-4, p. 235-251, 1990.
- GONÇALVES, C. A. **Zoonoses**. São Paulo: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI, 1995, 121 p.
- HANSON, L. E. Leptospirosis in domestic animals: the public health perspective. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 12, p. 1505-1509, 1982.
- HUGHES, J. P.; LOY R. G. Artificial insemination in the equine. A comparison of natural breeding and artificial insemination of mares using semen from six stallions. **Cornell Vet.**, v. 60, p. 463-475, 1970.
- JASKO, D. J.; BEDFORD, S. J.; COOK, N. L.; MUMFORD, E. L.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Effects of antibiotics motion characteristics of cooked stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, p. 885-893, 1993.

JONES, R. K. Study of the viability of *Leptospira pomona* in frozen extended bovine semen. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 133, n. 4, p. 216-218, 1958.

KJAESTAD, H. E.; ROPSTAD, E.; ANDERSEN BERG, K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 299-303, 1993.

KEE, S.; KIM, I.; CHOI, M.; CAANG, W. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.

KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V., COOPER, W. L., MORSE, G. W. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 21., 1975, Boston. **Proceedings...** Boston: 1975, p. 327.

KIKTENKO, V. S.; BALASHOV, N. G.; RODINA, V. N. Leptospirosis infection through insemination of animals. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 2, p. 207-213, 1976.

LANGONI, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 52-58, 1999.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

MAGAJEVSKI, F. Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de *Leptospira interrogans* sorovar *hardjo* em sêmen e urina de touros (*Bos taurus*) sorologicamente reagentes. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2002.

MIRAGLIA, F. Emprego da penicilina- Estreptomicina, amoxicilina, ou ceftiofur sódico no diluidor gema-citrato, para destruir leptospiras em sêmen bovino experimentalmente contaminado por *Leptospira santarosai* sorovar *guaicurus*. 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal – Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Reprodução Animal, São Paulo, 2001

OIE. Office International Epizooties. Disponível em: <
http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es_chapitre_3.2.1.htm > Acesso em 14/12/2006.

OLIVEIRA, S. J. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? **Hora Veterinária**, v. 19, p. 87-90, 1999.

PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG Y.; CHANG, C.; PAN, M. J.; YANG, C. W.; HARPENDING P.; MCDONOUGH, S. P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; Q.U. J.; ROE B.

Evaluation of *lig*-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 111-117, 2005.

PALIT, A.; HAYLOCK, L. M.; COX, S. C. Storage of pathogenic leptospires in liquid nitrogen. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, n. 5, p. 407-411, 1986.

PAUL, P. S. Applications of nucleic acid probes in veterinary infections diseases. **Veterinary Microbiology**, v. 24, n. 3-4, p. 409-417, 1990.

PARKS, E. J., GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-22, 1992.

PINTO, C. M. Utilização do papel de filtro para o transporte de amostras destinadas à reação de soroprecipitação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. 1997. 39 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary microbiology**. Spain: Grafos, 1994. p. 292-303.

REBHUN, W. C. **Disease of dairy cattle**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p. 472-474.

ROBERTS, S. J. A. A study of leptospirosis in a large artificial insemination stud. **Cornell Veterinarian**, v. 48, p. 536, 1971.

RODINA, V. N. Transmission of leptospirosis by artificial insemination **Veterinary Bulletin**, v. 41, p. 536, 1971.

RODINA, V. N.; BALASHOV, N. G. Leptospirosis infection of animals transmitted through insemination. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 1971. Mexico. **Proceedings...** v. 2, p. 707-708.

ROTHMAN, B.; PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. **Proceedings of the national academy of sciences of USA**, v. 55, p. 134-141, 1966.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CARDOSO, M. V.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; TEIXEIRA, S.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Detecção de agentes bacterianos pelas técnicas de isolamento e identificação e PCR – Multiplex em fetos bovinos abortados. **Vet. bras. reprod. animal**, v. 28, n. 1, p.23-27, jan /mar. 2004.

SCHÖNBERG, A. Studies on the effect of antibiotic substances on leptospire and their cultivation from material with a high bacterial count. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 249, p. 400-406, 1981.

SLEIGHT, S. D.; ATALLAH, O. A.; STEINBAUER, D. J.; Experimental *Leptospira pomona* infection in bulls. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 1663-1668, 1964.

SLEIGHT, S. D. The role of penicillin and streptomycin in the prevention of transmission of bovine leptospirosis by artificial insemination. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 365-368, 1965.

SLEIGHT, S. D.; WILLIAMS, J. A. Transmission of bovine leptospirosis by coition and artificial insemination **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 138, p. 151-152, 1961.

STOENER, H. G. Application of serologic findings to the diagnosis of leptospirosis. In: ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, USA, 1972. **Proceeding...**v. 76, p. 622-634.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v 184, n. 6, p.722-725, 1984.

VANEYS, G. J. J. M.; GRAVEKAMP, C.; GERRITSEN, M. J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M. T. E.; TER SCHEGGET, J.; TERPSTRA, W. G. Detection of leptospirosis in urine by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 10, p. 2258-2262, 1989.

VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M.; THOMPSON, J. A.; BRUMBAUG, G. W.; BLANCHARD, T. L.; CARLTON, C. M.; JONHSON, L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**, v. 50, p. 559-573, 1998.

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINI JUNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A. C. M.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirese bovina. Níveis de ocorrência e sorovares predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 7-15, jul /dez. 1997.

VAZ, A. K.; OLIVEIRA, S. J. Títulos aglutinantes para *Leptospira* de touros usados em inseminação artificial no Rio Grande do SUL. **Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor**, v. 5, p. 23-6, 1978.

YAGAYARA, C. A. **Ocorrência de anticorpos anti-*Chlamydophila* em bovinos e sua relação com distúrbios reprodutivos**. São Paulo. 2002. p. 63 Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2002.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, K. R.; SULZER A. F.; KAUFMANN, F. R.; BRENNER D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 407-415, 1987.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. Ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, p. 663, 1999.

ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu, 1998. 121p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 1998.

ANEXO A - Padrões médios das características seminais de bovinos, segundo CBRA, 1998.

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS	
VARIÁVEL	VALORES MÉDIOS
Volume	5
Movimento de massa	presente
Vigor (V)	3
Nº total de espermatozóides	7×10^9
Motilidade espermática (Mot)	70%
Espermatozóides normais	80%

ANEXO B - Padrões de julgamento de sêmen congelado de doadores – portaria SDR- 26;
5/09/96 (CBRA, 1998).

SÊMEN CONGELADO	
Será considerado <u>fora dos padrões</u> quando apresentar as seguintes características após descongelação:	
VARIÁVEL	VALORES
Volume da dose	< 0,25 mL
Motilidade Progressiva (Mot)	<30%
Vigor (V)	< 3
Doses= 10×10^6	
defeitos totais	>30%
defeitos maiores	>20%
Doses 6×10 a $< 10 \times 10$	
defeitos totais	>20%
defeitos maiores	>10%

ANEXO C - Padrão dos valores do Kappa e sua classificação (THURSFIELD, 1995).

VALORES DO KAPPA	CLASSIFICAÇÃO
$K \leq 0,2$	Ruim
$0,21 \leq K \leq 0,41$	Fraca
$0,41 \leq K \leq 0,6$	Moderada
$0,61 \leq K \leq 0,8$	Substancial
$0,81 \leq K \leq 1,0$	Ótima

ANEXO D - Extração de DNA por lise enzimática com Proteinase K (adaptado de LEAL et al., 1995)

- Adicionar 200 μL da amostra previamente homogeneizada
- Adicionar 400 μL de TE
- Agitar os tubos e centrifugar a 13000 g / 10 min.
- Desprezar o sobrenadante dos tubos
- Ressuspender o sedimento em 300 μL de tampão de lise (195 μL água mQ, 60 μL TNE, 30 μL SDS e 15 μL pK a 20 mg/mL)
- Incubar em banho-maria a 56°C / 1 hora / mix 350 rpm
- Adicionar 150 μL de fenol tamponado
- Agitar bem e centrifugar a 13000 g / 5 min.
- Transferir 300 μL da fase aquosa para novo eppendorf
- Adicionar 100 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)
- Agitar bem e centrifugar a 13000 g / 5 min.
- Transferir 200 μL da fase aquosa para novo eppendorf
- Adicionar 40 μL de acetato de sódio 2 M (1/5 do volume)
- Adicionar 480 μL de etanol puro (2 x volume total)
- Homogeneizar por inversão
- Manter a -20°C por pelo menos 2 horas
- Centrifugar a 13000 g / 10 min.
- Descartar o sobrenadante por inversão
- Adicionar 500 μL de etanol 70%
- Homogeneizar por inversão e centrifugar a 13000 g / 10 min.
- Descartar o sobrenadante por inversão
- Secar na “estufa” a 45°C / 15 min.
- Adicionar 30 μL de TE
- Incubar em banho-maria a 56°C / 15 min. / mix 350 rpm
- Estocar a -20°C