

Avaliação microbiológica do sêmen de pequenos ruminantes criados em Pernambuco, Brasil

Microbiological evaluation of semen from small ruminants raised in Pernambuco, Brazil

Felipe Gabriel Carneiro Pessoa

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rebeca Feitosa Botelho de Andrade

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Márcio Douglas Leal da Silveira

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Emmylly Victória Gomes de Lima

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Lucilene Martins Trindade Gonçalves

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Erika Fernanda Torres Samico-Fernandes

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Huber Rizzo

Universidade Federal Rural de Pernambuco

huber.rizzo@ufrpe.br

Resumo. Diversas bactérias podem estar presentes no ejaculado de pequenos ruminantes, podendo algumas ter efeito negativo sobre a sua qualidade, sendo assim este trabalho teve como objetivo, realizar a pesquisa da presença de microrganismos no sêmen fresco de reprodutores de pequenos ruminantes, criados Pernambuco, Brasil. Foram utilizado vinte pequenos ruminantes (três caprinos e dezessete ovinos), aparentemente saudáveis, criados na Região Metropolitana do Recife (Paulista e Recife) e participantes da Feira Agropecuária de Carpina, Zona da Mata de Pernambuco, submetidos a exame clínico e andrológico com colheita de sêmen por eletroejaculação, e pesquisa microbiológica de agentes bacterianos e fúngicos por isolamento. As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Bacteriose do Departamento de Medicina Veterinária de UFRPE para semeio, cultura e identificação do agente. Todos os machos apresentavam-se saudáveis e aprovados quanto aos parâmetros avaliados no exame andrológico. Das vinte amostras analisadas, ocorreu o crescimento de ao menos um agente bacteriano e/ou fúngico em 80% (16) delas (um caprino e quinze ovinos), sendo os microrganismos isolados: *Candida* sp (n=5), *Bacillus* spp. (n=4), *Cocobacilo* gram negativo, *Escherichia coli* (20%), *Klebisiella* spp. (n=3), *Pseudomonas* sp. e *Citrobacter* sp. (n=1). Em treze amostras ocorreu o isolamento de apenas um microrganismo, em duas houve associação entre *Cocobacilo* gram negativo e *Candida* sp e *Bacillus* e *Candida* sp e uma isolamento com esses três agentes. Os agentes isolados aparentemente fazem parte da flora do trato reprodutivos dos machos, no entanto é preciso mais pesquisas para determinar os reais efeitos no trato reprodutor dos machos ovinos e caprinos, a depender da espécie, cepa bacteriana, indivíduo e da carga microbiana presente no organismo.

Palavras-chave: bactéria, *Candida* sp., *Escherichia coli*, exame andrológico, fungo.

Abstract. Various bacteria can be present in the ejaculate of small ruminants, some of which can have a negative effect on its quality. The aim of this study was therefore to investigate the presence of microorganisms in the fresh semen of small ruminant breeding animals reared in Pernambuco, Brazil. Twenty small ruminants (three goats and seventeen sheep), apparently healthy, raised in the Metropolitan Region of Recife (Paulista and Recife) and participating in the Carpina Agricultural Fair, Zona da Mata de Pernambuco, were used. They underwent a clinical and andrological examination with semen collection by electroejaculation, and microbiological research into bacterial and fungal agents by isolation. The samples were sent to the Bacteriosis laboratory of the Department of Veterinary Medicine at UFRPE for sowing, culture and identification of the agent. All the males were healthy and approved of the parameters assessed in the andrological examination. Of the twenty samples analyzed, at least one bacterial and/or fungal agent grew in 80% (16) of them (one goat and fifteen sheep), and the microorganisms isolated were: *Candida* sp (n=5), *Bacillus* spp. (n=4), gram negative cocobacillus, *Escherichia coli* (20%), *Klebisiella* spp. (n=3), *Pseudomonas* sp. and *Citrobacter* sp. (n=1). In thirteen samples only one microorganism was isolated, in two there was an association between gram negative cocobacillus and *Candida* sp and *Bacillus* and *Candida* sp and one isolation with these three agents. The agents isolated appear to be part of the flora of the male reproductive tract, but more research is needed to determine the real effects on the reproductive tract of male sheep and goats, depending on the species, bacterial strain, individual and the microbial load present in the organism.

Keywords: bacteria, *Candida* sp., *Escherichia coli*, andrological examination, fungus.

Introduction

A utilização de biotecnologias da reprodução contribui para alavancar o melhoramento genético através do incremento das taxas de fertilidade, que está intimamente relacionada com a produção de espermatozoides viáveis, em concentração satisfatória (Consentino et al., 2022).

O exame clínico e andrológico é a forma mais segura de atestar a aptidão dos machos para a reprodução, isto é, se os reprodutores estão em perfeito estado reprodutivo para participar da estação de acasalamento, com o objetivo de aumentar os índices de fertilidade do rebanho. O andrológico também deve estar ligado ao plano sanitário, visto que doenças relacionadas ao sistema reprodutor são investigadas durante a avaliação clínica do animal (Bernardy et al., 2022).

Além dos exames clínicos, os machos aptos à reprodução devem submeter-se a análises microbiológicas do sêmen para a identificação de possíveis agentes que possam comprometer os índices de fertilidade do rebanho, uma vez que existe uma diversidade de microrganismos já isolados no sêmen de carneiros e bodes (Souza et al., 2006; Rizzo, 2011, Fernandes et al., 2013). As bactérias presentes podem ser transmitidas tanto pela monta natural quanto pela inseminação artificial e, além disso, prejudicar a função reprodutiva da fêmea (Andrabi et al., 2001). Em geral, a contaminação ocorre principalmente pelo sistema urinário, sendo as infecções geniturinárias responsáveis por 15% dos casos de infertilidade em machos (Pellati et al., 2008).

Os agentes isolados em sêmen de pequenos ruminantes no Brasil relatados na literatura foram; *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria* spp., *Klebsiella* spp., *Micoplasmas* spp., *Micrococcus* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Shigella* spp., *Streptococcus* spp. e *Rodococcus* spp (Alves et al., 2004; Souza et al., 2006; Madeira, 2011; Rizzo, 2011, Bezerra et al., 2012; Gregory et al., 2012; Celeghini et al., 2013; Fernandes et al., 2013), enquanto as *Brucellas ovis* e *abortus* possuem estudos com diagnóstico sorológico e o *Histophilus somni* nunca foi isolado em aparelho reprodutor de machos pequenos ruminantes (Carvalho Júnior et al. 2010; Rizzo et al., 2019; Freitas, 2023). O principal efeito negativo desses microrganismos na qualidade do sêmen é a redução na motilidade dos espermatozoides, afetando a função acrossomal e causando danos ultra estruturais (Diemer et al., 2000), além de quadros de orquite, epididimite e vesiculites (Gregory et al., 2012; Celeghini et al., 2013; Rizzo et al., 2023).

Devido à escassez de dados sobre a microbiota presente no sêmen dos reprodutores caprinos e ovinos, objetivou-se identificar as bactérias presentes em amostras seminais de pequenos ruminantes saudáveis.

Material and Methods

Seleção dos animais

Foram selecionados de forma aleatória e por conveniência, vinte pequenos ruminantes, sendo três bodes e dezessete carneiros, em bom estado nutricional, aparentemente saudáveis e sexualmente maduros, com idade entre dois e cinco anos. Os animais eram criados em uma propriedade em Recife (n=3) e outra em Paulista (n=6), Zona Metropolitana de Pernambuco e os demais (n=11) eram participantes da Feira Agropecuária de Carpina, Zona da Mata de Pernambuco, sendo criados em diversos municípios do estado (Tabela 1). As raças dos ovinos eram Santa Inês (n=7), mestiços (n=5), Somalis (n=3) e White Dorper (n=2) e dos caprinos a Saanen (n=3).

Tabela1. Procedência dos pequenos ruminantes utilizados no estudo

Procedência	Espécie		Total
	Caprino	Ovino	
Feira Agropecuária, Carpina	1	10	11
Paulista	-	6	6
Recife	2	1	3
Total	3	17	20

Exame clínico

Para identificar possíveis alterações clínicas os animais foram submetidos a exame clínico onde foram avaliados os parâmetros: escore de condição corporal, aprumos, pelame, temperatura, frequência cardíaca, respiratória e ruminal, turgor cutâneo, tempo de perfusão capilar, exame das mucosas e palpação dos linfonodos. Para determinar possíveis alterações no aparelho genital, os animais foram submetidos ao exame clínico do aparelho reprodutivo, onde foram realizadas a inspeção e palpação dos cordões espermáticos, testículos, epidídimos, escroto, pênis, mensuração do perímetro escrotal (Stockler et al., 2020; Bernardy et al., 2022; Consentino et al., 2022)

Colheita de amostras

Para minimizar a contaminação do sêmen no momento da colheita, os materiais (funil e tubos) passaram por limpeza com gliconato de clorexidina 2% degermante e desinfetante a base de amônia quaternária e esterilização prévia, para certificação da esterilização foi utilizado o indicador químico de esterilização Classe 5 da 2Ibiological® (Figura 1A). Os animais utilizados foram submetidos a uma lavagem primária do prepúcio e toda região circunvizinha com sabão e água, após isso foi realizada a tricotomia e limpeza secundária do prepúcio com gliconato de clorexidina 2%, iodo polvidine degermante e soro fisiológico, após isso a área foi seca utilizando gaze estéril.

As amostras de sêmen foram colhidas através de eletroejaculador com probe adequada para pequenos ruminantes (Figura 1B), onde do ejaculado foi separada uma alíquota com cerca de

100µL, colocadas em tubos Falcon estéreis e, em seguida, transportadas em caixa térmica contendo baterias resfriadas ao laboratório de Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, para análise microbiológica.



Figura 1. Colheita de sêmen. (A) Material (funil e tubos) pós esterilização e (B) colheita seminal por eletroejaculação em carneiro da raça White Dorper.

Cultura Bacteriana

As amostras de sêmen foram semeadas com auxílio de alça de platina em ágar base acrescido de 5% de sangue ovino desfibrinado ou em ágar BHI (Gram positivas) e em ágar MacConkey (Gram negativas), e incubadas em aerobiose a 37°C de 24 a 48 horas, sendo analisadas a cada 24 horas.

Nas amostras que apresentaram crescimento foram observadas características de crescimento das colônias em placa, como produção de hemólise, pigmento e características morfotintoriais, classificando-as em gram-positivas ou negativas, cocos ou bastonetes, utilizando-se o método de coloração pela técnica de GRAM (Quinn et al., 1994), as observações foram realizadas utilizando microscópio de campo claro na objetiva de 1000x. Para identificação das enterobactérias foram utilizadas as seguintes provas bioquímicas: produção de urease, reação em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), teste de VM/VP (VM: reação de Vermelho de Metila; VP: reação de Voges-Proskauer), teste em Ágar SIM (S: produção de H₂S; I: produção de Indol;

M: motilidade) e teste em Ágar Citrato (utilização do carbono do citrato), sendo identificadas de acordo com Carter (1988).

Para leitura dos testes bioquímicos e identificação das enterobactérias foi usado o software: Enterobacterales 3.15.12-032023 (ABIS online). Os resultados obtidos foram analisados de forma descritiva para cálculo de frequências absoluta e relativa (Sampaio, 1998).

Princípios Éticos

Essa pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob protocolo de submissão nº 7673130622 e foi aprovada dentro dos princípios éticos e da legislação vigente.

Resultado e discussão

Os animais avaliados não apresentaram alterações no exame clínico e da morfologia do sistema reprodutor, onde é possível destacar a circunferência escrotal como um importante componente da avaliação da capacidade reprodutiva, principalmente por ser de fácil realização, além de estar associada com boa qualidade seminal e alta produção espermática, em reprodutores clinicamente saudáveis. Os vinte machos apresentaram os valores dos parâmetros do exame andrológico de um animal apto a reprodução quanto a coloração, pH, motilidade, vigor, turbilhonamento, concentração e patologias (Bernardy et al, 2022; Consentino et al., 2022).

Em 80% (16/20) das amostras de sêmen colhidas observou-se crescimento bacteriano e/ou fúngico dos seguintes agentes: *Escherichia coli*, *Cocobacilo* gram-negativo, *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., *Candida* sp., *Citrobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. e em três amostras associação entre bactérias e *Candida* sp. (Tabela e Figuras 2).

Tabela 2. Frequência absoluta e relativa de microrganismos isolados no sêmen fresco de reprodutores ovinos e caprinos, Pernambuco, 2022.

Microrganismos isolados	Ocorrência % (n)	Um isolado	Espécie	
			Caprino	Ovino
<i>Candida</i> sp.	31,25% (5)	12,5% (2)	-	2
<i>Bacillus</i> spp.	25% (4)	12,5% (2)	-	2
<i>Cocobacilo</i> gram negativo	18,75% (3)	6,25% (1)	-	1
<i>E. coli</i>	18,75% (3)	18,75% (3)	-	3
<i>Klebsiella</i> spp.	18,75% (3)	18,75% (3)	1	2
<i>Pseudomonas</i> sp.	6,25% (1)	6,25% (1)	-	1
<i>Citrobacter</i> sp.	6,25% (1)	6,25% (1)	-	1
Total isolamento único		81,25% (13)	1	12
Associação de microrganismos				
<i>Candida</i> sp. + <i>Cocobacilos</i> gram negativo		6,25% (1)	-	1
<i>Candida</i> sp. + <i>Bacillus</i> spp		6,25% (1)	-	1
Total dois organismos		12,5% (2)	0	2
<i>Candida</i> sp. + <i>Bacillus</i> spp + <i>Cocobacilos</i> gram negativo		6,25% (1)	-	1
Total três organismos		6,25% (1)	0	1
Total amostras com isolamento		80% (16/20)	33,33% (1/3)	94,11% (16/17)

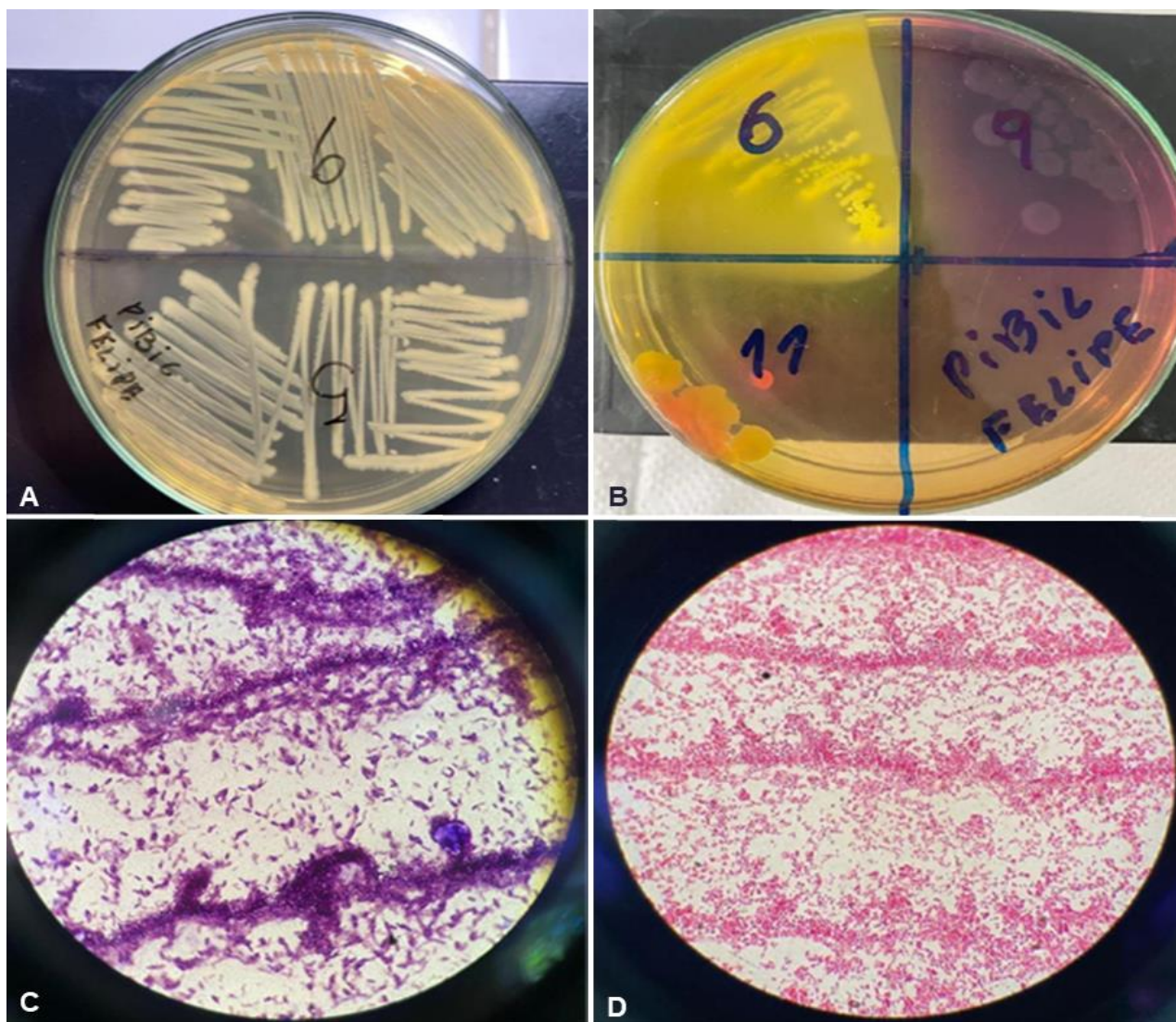


Figura 2. Agentes isolados em amostras seminais de carneiros e bodes. (A) Crescimento bacteriano em meio Ágar BHI e (B) meio Ágar MacConkey, (C). Teste de coloração de Gram, positivo para bactéria Gram + e (D) Gram -.

Os microrganismos identificados mostraram semelhanças com os relatados por Souza et al. (2006), que, ao investigar a microbiota presente no sêmen fresco de caprinos, observaram a presença de *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp., com frequências de 72% e 64%, respectivamente. Fernandes et al. (2013), identificaram diferentes bactérias de acordo com o sistema de criação de ovinos Santa Inês, onde os animais submetidos a confinamento apresentaram a presença principalmente de *Bacillus* spp., enquanto nos animais a pasto foi o *Staphylococcus* spp., com diferença significativa ($p < 0,05$) no isolamento de *E. coli*, *Bacillus* spp. e *Listeria* spp. no grupo confinado quando comparado com o grupo à pasto. Em estudo com sêmen de reprodutores da raça Crioula Lanada, os gêneros *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Corynebacterium* spp. e *Bacillus* spp., foram os mais isolados (Madeira, 2011), assim como observado nesse estudo.

Otter (2008), ao investigar a presença de bactérias em sêmen de carneiros com suspeita de infertilidade, identificou com maior frequência *E. coli*, *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, *Bacillus*

spp. e *Proteus* spp., sugerindo que essas bactérias podem ser comensais do trato reprodutor ou contaminantes, capazes de colonizar a mucosa peniana, prepucial e possivelmente a uretra distal, já que foram detectadas em proporções similares em amostras de sêmen com qualidade normal e reduzida.

E. coli, quando presente nos ejaculados, normalmente, apresenta efeito inibitório na motilidade das células espermáticas, bem como provoca aglutinação e danos ultra estruturais na membrana dos espermatozoides, com uma redução significativa na motilidade, velocidade e viabilidade das células espermáticas (Yániz et al., 2010; Tvrdá et al., 2022). Neste estudo, as bactérias *E. coli* isoladas não promoveram alterações significativas nos parâmetros avaliados do sêmen, sendo que há indícios que o efeito deletério dessa bactéria no sêmen é concentração-dependente (Althouse et al., 2000). Yániz et al. (2010) identificaram as bactérias entéricas *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter cloacae*, e as não entéricas *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* como as mais frequentes em amostras de sêmen de carneiros, associando a *E.*

coli e a *E. cloacae* com redução da qualidade espermática. No Brasil a *E. coli* já foi descrita causando, juntamente com o *Corynebacterium spp.*, quadro de orquite, epididimite e vesiculites em ovino (Rizzo et al., 2023).

Quanto a *Candida sp.*, o agente presente em mais amostras de sêmen do estudo, ainda não se sabe seu real potencial em causar infertilidade em ruminantes, no entanto avaliações *in vitro* com sêmen humano demonstrou o potencial do fungo causar redução da motilidade espermática e do potencial de membrana mitocondrial, acelerando mecanismos de apoptose molecular (Burrello et al., 2009)

Assim, torna-se notoriamente desafiador determinar a significância da presença de microrganismos e suas reais consequências, uma vez que esses resultados podem variar dependendo da espécie, indivíduo e concentração do microrganismo em questão. A contaminação do ejaculado pode ter diversas origens, incluindo o sistema urinário, com infecções genitourinárias que causam infertilidade em machos (Pellati et al., 2008), microrganismos presentes no próprio sêmen, bactérias encontradas na mucosa peniana e prepucial, bem como durante os processos de colheita, processamento e armazenamento do sêmen. Estas situações podem ser atribuídas a práticas deficientes de higiene por parte dos manipuladores ou ao uso inadequado dos equipamentos (Amiridis; Cseh, 2012; Fernandes, 2013). Nesse estudo tentou-se minimizar os riscos de contaminação externa, com esterilização dos materiais e limpeza da região prepucial, no entanto o processo de coleta por eletroejaculador possibilita que bactérias presentes na região prepucial e abdominal possam contaminar a amostra, principalmente no momento da contração causada pelo estímulo elétrico.

Apesar de nesse estudo não ter sido isolada nenhum agente bacteriano já relatado no Brasil causando problemas reprodutivos como; *A. seminis* (Gregory et al., 2009; Santos et al., 2014), já isolado em Pernambuco (Bezerra et al., 2012), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Alves et al., 2004) e *Salmonella enterica sub-diarizonae* (Celeghini et al., 2013) a presença das bactérias isoladas nos dezesseis machos, a depender da carga e diversidade bacteriana, podem afetar a qualidade seminal, uma vez que bactérias nos ejaculados podem desencadear processos inflamatórios, superprodução de espécies reativas de oxigênio e, assim, contribuir para alterações na estrutura dos espermatozoides, comprometendo a capacidade de fertilização dos gametas masculinos (Tvrdá et al., 2022). Em estudo realizado com carneiros e bodes no Iran, bactérias encontradas neste estudo foram isoladas em diferentes estações do ano no sêmen, sendo indicativos de comporem a flora bacteriana dos animais (Khalid, 2024).

Nesse estudo não ocorreu o isolamento de micoplasmas, uma vez que para a pesquisa desse agente é necessário alíquotar a amostra de sêmen

em meio de manutenção e cultura específico, sendo um processo de isolamento laborioso, no entanto é um agente a ser considerada nas pesquisas de casos de infertilidade em pequenos ruminantes, podendo causar redução da motilidade e balanite (Gregory et al., 2012; Kalshingi et al., 2015), sendo já isolado em reprodutores ovinos de Pernambuco (Oliveira et al., 2013).

Conclusão

Conclui-se que é notoriamente difícil determinar a origem dos microrganismos presentes no sêmen e seus reais efeitos no trato reprodutor dos machos ovinos e caprinos, uma vez que pode haver variações dependendo da espécie, da cepa bacteriana, do indivíduo e da carga microbiana presente no organismo.

Dada a escassez de informações sobre a avaliação microbiológica e os efeitos dos microrganismos no sêmen dos pequenos ruminantes, é fundamental conduzir mais pesquisas com a avaliação de um número maior de reprodutores para que os resultados sejam mais fidedignos com a realidade dos machos da região. Estas investigações são necessárias para preencher a lacuna atual na literatura e para ajudar a identificar a microbiota seminal. Além disso, elas podem contribuir para a elaboração de medidas de controle visando a redução da contaminação, com o intuito de garantir rebanhos saudáveis, férteis e livres de afecções.

Referencias

- ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; COX, M.; ANDRIOLI, A.; AQUINO NETO, H.M.; SILVA, A.M.C. Epididimite-orquite causado por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v.26, n.1, p.11-16, 2004.
- ANDRABI, S.M.H.; AHMAD, N.; ABBAS, A.; ANZAR, M. Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal Bull semen. Pakistan Veterinary Journal. v.21, n.4, p.166-169, 2001.
- ALTHOUSE, G.C.; KUSTER, C.E.; CLARK, S.G.; WEISIGER, R.M. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. Theriogenology, v.53, n.5, p.1167-1176, 2000.
- BERNARDY, M.; MIGUEL, A.K.A.; OLIVEIRA, J.P.A.; SENEDA, M.M.; MORO, F. Exame andrológico em touros: aplicações práticas. Revista Brasileira de Buíatria, v.1, n.3, p.60-81, 2022.
- BEZERRA, M.J.G.; SANTOS, A.S.; CRUZ, J.A.L.O.; KUNG, E.S.; SÁ, S.G.; JABOUR, F.F.A. BRITO, M.F.; MOTA, R.A. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no Estado de Pernambuco. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.32, n.5, p. 369-373, 2012.

- BURRELLO, N.; SALMERI, M.; PERDICHIZZI, A.; BELLANCA, S.; PETTINATO, G.; D'AGATA, R.; VICARI, E.; CALOGERO, A.E. *Candida albicans* experimental infection: effects on human sperm motility, mitochondrial membrane potential and apoptosis. *Reproductive BioMedicine Online*, v.18, n.4, p.496-501, 2009.
- CARTER, G.R. Fundamentos de bacteriología e micología veterinária. São Paulo: Roca, 1988. 249p.
- CARVALHO JÚNIOR, C.A.; XAVIER, M.N.; COSTA, L.F.; SILVEIRA, S.S.; SANT'ANNA, F.M.; BORGES, A.M.; GOUVEIA, A.M.G.; SANTOS, R.L. Agentes infecciosos que podem promover infertilidade em machos da espécie ovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, n.3, p.160-167, 2010.
- CELEGHINI, E.C.C.; GREGORY, L.; PINHEIRO, E.S.; PIVA, F.M.; CARNEIRO, P.A.B.; PARAPINSKI-SANTOS, B.; BIANCHI, M.; BENESI, F.J. Orquiepididimite em carneiro por *Salmonella enterica sub-diarizonae*: primeiro caso na América do Sul. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65, n.1, p.139-144, 2013.
- AMIRIDIS, G.S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants, *Animal Reproduction Science*, v.130, n.3-4, p.152-161, 2012.
- DIEMER, T.; HUWE, P.; MICHELMANN, H.W. et al. *Escherichia coli*-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *International Journal of Andrology*. v.23, n.3, p.176-186, 2000.
- FERNANDES, G.O.; LEAL, D.R.; MOREIRA, N.H.; SILVA, T.A.S.N.; RAMOS, A.F.; NEVES, J.P. Identificação de bactérias no sêmen de ovinos em diferentes sistemas de criação e o efeito do uso de Kilol-I®. *Ciência Animal Brasileira*, v.14, n.3, p.332-337, 2013.
- FREITAS, M.A.B. Epididimite em ovinos por *Brucella ovis*. *Revista VIDA: Exatas e Ciências da Terra*, v.1, n.2, p.78-92, 2023.
- GREGORY, L.; RIZZO, H.; MEIRA JUNIOR, E.B.S.; LINS, G.J.V.; LINS, G.P.V.; PINHEIRO, E.S. Relato do primeiro caso de orquite e epididimite unilateral ovina causada por *Actinobacillus seminis* no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.2, p.105-107, 2009.
- GREGORY, L.; RIZZO, H.; GAETA, N.C.; TORTORELLI, G.; CARDOSO, M.V.; METTIFOGO, E.; BUZINHANI M.; TIMENETSKY J.I Interference of *Mycoplasma* spp. or *Ureaplasma* spp. in ovine semen quality. *Journal of Microbiology Research*, v.2, n.5, p.118-122, 2012.
- KALSHINGI, H.A.; BOSMAN, A.M.; GOUWS, J.; VAN VUUREN, M. Molecular characterisation of *Mycoplasma* species isolated from the genital tract of Dorper sheep in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, v.8, n.86, e1-e11, 2015.
- KHALID, M.A. Comparative study of bacterial contamination in local Iraqi sheep and goats sêmen. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, v.18, n.1, p.71-78, 2024.
- MADEIRA, E. M. Eficácia da inclusão de antibióticos em diluente para criopreservação de sêmen ovino e sua influência na viabilidade espermática. 2011, 35p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- OLIVEIRA, P.R.F.; SOUZA, F.D.N.; MELO, R.P.B.; MOTA, A.R.; Mota, R.A.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; MORAES, E.P.B.X. Pesquisa de *Mycoplasma* spp. no sêmen de reprodutores ovinos comercializados no Estado de Pernambuco. In: *Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 13, 2013, Recife. *Anais... Recife, JEPEX*, 2013.
- OTTER, A. Bacterial isolates from the semen of rams with suspected infertility. *Veterinary Record*, v.162, n.19, p.623-624, 2008.
- PELLATI, D.; MYLONAKIS, I.; BERTOLONI, G.; FIORE, C.; ANDRISANI, A.; AMBROSINI, G.; ARMANINI D. Genital tract infections and fertility and infertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.140, n.1, p.3-11, 2008.
- QUINN, P.J.; CARTER, M. E.; BACT, D.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. 1ed. London: Wolfe, 1994. 648p.
- RIZZO, H. Estudo da ocorrência e avaliação clínica de enfermidades do trato genital de ovinos (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758) criados no estado de São Paulo. 2011. 218p. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- RIZZO, H.; ANDRADE, R.L.F.S.; MENEZES, H.C.O.; NASCIMENTO, U.F.S.; SILVA, I.W.S.; JESUS, T.K.S.; CARVALHO, J.S.; SILVA, L.M.P. Occurrence of anti-*Brucella abortus* agglutinins in small ruminants in Sergipe. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.86, n.1-5, e0212019, 2019.
- RIZZO, H.; CRUZ, J.A.L.O.; ROCHA, L.L.L.; ONO, M.S.B.; COUTINHO, L.C.A.; MOTA, R.A.; SILVA JÚNIOR, V.A. Urethral obstruction due to seminal vesiculitis in a sheep - case report. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.75, n.2, p.247-253, 2023

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 185p.

SANTOS, F.A.; AZEVEDO, E.O.; AZEVEDO, S.S.; GARINO JÚNIOR, F.; MOTA, R.A.; KIM, P.C.P.; GOMES, A.L.V.; ALVES, C.J. Isolation of *Actinobacillus seminis* from a goat with clinical epididymo-orchitis in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v.45, n.1, p.205-209, 2014.

SOUZA, A.F.; GUERRA, M.M.P.; COLETO, Z.F.; MOTA, R.A.; SILVA, L.B.G.; LEÃO, A.E.D.S.; SOBRINHO, E.S.N. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.13, n.3, p.329-336, 2006.

STOCKLER, R.M.; STOCKLER, J.W.; SHIPLEY, C.F.; PUGH, D.G. Physical examination, handling, and restraint of sheep, goats, and cervids. In: PUGH, D.G.; BAIRD, A.N.; EDMONDSON, M.A.; PASSLER, T. Sheep, Goat, and Cervid Medicine. 3ed. Elsevier: Amsterdam, 2020. p.1-14.

TVRDÁ, E.; KACÁNIOVÁ, M.; BALÁŽI, A.; VAŠÍCEK, J.; VOZAF, J.; JURČÍK, R.; DURACKA, M.; ŽIAROVSKÁ, J.; KOVÁČ, J.; CHRENEK, P. The impact of bacteriocenoses on sperm vitality, immunological and oxidative characteristics of ram ejaculates: does the breed play a role? Animals, v.12, n.54, p.1-22, 2022.

YÁNIZ, J.L.; MARCO-AGUADO, M.A.; MATEOS, J.A.; SANTOLARIA, P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. Animal Reproduction Science, v.122, n.1-2, p.142-149, 2010.