

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INCIDÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA SOLUÇÃO
OBTIDA DA PERFUSÃO INTRA-UTERINA PARA COLHEITA DE
EMBRIÕES EM BÚFALAS (*Bubalus bubalis*).

Gisele Andrea Satrapa

Uberlândia-MG.
Dezembro/1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INCIDÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA SOLUÇÃO
OBTIDA DA PERFUSÃO INTRA-UTERINA PARA COLHEITA DE
EMBRIÕES EM BÚFALAS (*Bubalus bubalis*)

Gisele Andrea Satrapa

Pr^ª MS. Sueli C. Almeida Ribeiro

Monografia apresentada à
coordenação do curso de Ciências
Biológicas, da UFU, para
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG.
Dezembro/1997

Todas as descobertas, que
dilataram a alegria e a cultura no planeta, nasceram
na aflição de Homens desajustados que souberam
criar a renovação à custa do próprio sacrifício.

DEDICATÓRIA.

Aos meus pais que sempre estiveram comigo, seguindo a jornada, retirando pedras do caminho, ajudando em cada “tombo” na estrada e, principalmente, me amando muito, assim como, eu os amo. Aos meus irmãos, que mesmo sem saberem, me ajudaram com carinho e incentivo.

Ao Marcos, meu namorado, por me auxiliar, confiar, participar e por ter tido sempre muita paciência nas horas de ausência.

Aos meus amigos, Gabriela, Ana Paula Belele, Leandro, Fernanda, que me deram ânimo nas horas difíceis, aos mestres que despertaram em mim a curiosidade científica.

AGRADECIMENTOS.

Agradeço a Deus por estar presente em todos os dias de minha vida.

Em especial à minha orientadora, Prof^a Sueli, que acreditou na minha capacidade, confiou nas minhas afirmativas e principalmente por tornar-se uma grande amiga.

Aos técnicos Marília, Manoel e Altair, do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas do Curso de Medicina Veterinária da UFU, pela paciência e dedicação.

RESUMO

Com a expansão da bubalinocultura no Brasil, assumem importância o uso de técnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões (TE) com o objetivo de promover o melhoramento genético.

Embora sejam tomadas severas medidas de antissepsia durante todo o processo de colheita de embriões, essa é uma técnica invasiva com a qual corre-se, eventualmente, o risco de se provocar uma infecção uterina.

O estudo teve como objetivo verificar a contaminação da solução obtida da perfusão intra-uterina para colheita de embriões, avaliar quantitativamente o índice de contaminação bacteriana, observar a susceptibilidade aos antimicrobianos e propor medidas profiláticas mais adequadas.

Foram realizados testes com 29 amostras da solução de perfusão intra-uterina de búfalas, obtendo-se 26 culturas positivas (91%) e 3 culturas negativas (9%).

Nas amostras cresceram um ou dois tipos de bactérias. Foram feitos 33 isolamentos bacterianos:, prevaleceu *Enterobacter* spp (69,70%) seguido pelo *Staphylococcus epidermidis* (27,27%) e *Bacillus* spp (3,03%).

A incidência de contaminação bacteriana teve um valor expressivo; em média, foram encontradas para *Enterobacter* spp, $3,64 \times 10^4$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e para *Staphylococcus epidermidis*, a média foi de $2,90 \times 10^4$ UFC/mL.

O *Enterobacter* spp mostrou-se susceptível à Amicacina (91,30%), Cefotaxima (61,90%) e Gentamicina (56,52%), não foi susceptível à Tetraciclina (0%).

O *Staphylococcus epidermidis* mostrou-se susceptível à Amicacina (100%), Gentamicina (100%) e Norfloxacin (85,71%) e não susceptível (0%) à Ampicilina, Cloranfenicol, Sulfazotrim, Tetraciclina, Eritromicina, Oxacilina e Penicilina.

Em função dos resultados obtidos, sugerem-se medidas profiláticas mais apropriadas, utilizando-se, por exemplo, alguns dos derivados da Acridina¹ por apresentarem ação efetiva contra bactérias gram positivas e negativas e serem livres da ação tóxica ou irritante para o animal ().

Pode-se ainda, utilizar uma associação de antibióticos na solução de DPBS, com Amicacina e Gentamicina, não antes de um estudo sobre a possível toxicidade dessas drogas para o embrião.

¹ Rivanol.

ÍNDICE.

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	04
3.1. Coleta das amostras.....	04
3.2. Técnica de transferência de embriões.....	04
3.3. Técnica de análise quantitativa.....	05
3.4. Técnica de análise qualitativa.....	05
3.5. Técnica de difusão em gel.....	06
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	07
5. CONCLUSÕES.....	14
6. ANEXO.....	15
7. BIBLIOGRAFIA.....	16

1.INTRODUÇÃO.

Nas duas últimas décadas, a metodologia da Transferência de Embriões (TE) vem sendo largamente empregada em muitos países, não só objetivando o melhoramento genético de rebanhos bovinos, bubalinos, caprinos e ovinos mas, ainda, para pesquisas em embriologia (WHITTINGHAM et al.,1972; DROST et al.,1983; TERVIT, GOOLD, 1984; BAKER et al., 1989; MISRA et al., 1990; ANDERSON et al., 1991; CURTIS et al., 1991; HAFEZ et al., 1993).

Paralelamente, desenvolveram-se também, técnicas de criopreservação as quais permitiram a estocagem de embriões por longo tempo, condição decisiva para sua exploração comercial bem como, para a preservação de reservas genéticas raras e superiores (COCERO et al., 1982; LEIBO, 1983; SCHNEIDER, MAZAR, 1984; ZICARELLI, 1994; DOCHI et al., 1995).

Com o rebanho de aproximadamente 2,5 milhões de animais, o maior do mundo ocidental e uma taxa de crescimento anual de 12%, a bubalinocultura surge no cenário da pecuária brasileira como uma real possibilidade de produção de alimentos (NASCIMENTO, CARVALHO, 1993).

Face ao envolvimento de matrizes bubalinas de alto valor genético no processo da TE, é condição fundamental a observação de rigorosa assepsia na realização da técnica, para evitar infecções uterinas ou a contaminação das estruturas coletadas, mesmo que existam procedimentos visando minimizar a possibilidade de transmissão da maioria das moléstias bacterianas pela TE, como por exemplo, pelo emprego de antibióticos nos meios de cultivo de embriões.

Infecções inespecíficas são responsáveis por sérios problemas na reprodução, podendo levar a infertilidade nos rebanhos, causando perdas econômicas significantes na pecuária de corte e mais na pecuária de leite, como no caso a bubalina. (AWAD, HARIRI, 1980; DERASHI et al., 1983).

Ainda que sejam praticados certos princípios preliminares de antissepsia, o processo de colheita representa uma ameaça em potencial para a integridade do endométrio, predispondo o útero aos processos infecciosos, particularmente nessa fase do ciclo estral, na qual a colheita é realizada no 6^o dia após a inseminação artificial.

Trata-se da fase progesterônica, que favorece a proliferação e o crescimento bacteriano no útero, além de apresentar uma depressão da atividade imunológica (NUNN et al., 1970; MILLER et al., 1980; FRANK et al., 1983; VALDEPLASSCHE et al., 1984; ROBERTS et al., 1986).

As infecções uterinas inespecíficas, em sua maioria, são causadas por agentes como, *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, entre outros (SAGARTZ, HARDENBROOK, 1971; SHAH, DHOLAKIA, 1983; OLSON et al., 1986; FERREIRA, SÁ, 1987; RIBEIRO et al., 1990; OBA et al., 1994). Portanto, reveste-se de importância clínica e econômica, avaliar em que extensão o processo de colheita de embriões pode comprometer a condição asséptica do útero.

2.OBJETIVOS.

Identificar possíveis bactérias aeróbias contaminantes em amostras do lavado intra-uterino, obtido do processo de colheita de embriões, em matrizes bubalinas.

Determinar a susceptibilidade dessas bactérias aos antimicrobianos.

Determinar, quantitativamente, a contaminação bacteriana.

Propor medidas profiláticas mais adequadas e econômicas, capazes de minimizar a possibilidade de instalação de processos infecciosos do endométrio, em função da introdução de um catéter intra-uterino para a colheita de embriões.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Coleta das amostras.

Foram coletadas em tubos de ensaio estéreis, amostras da solução DPBS (solução salina fosfatada tamponada segundo Dulbecco's, pH 7 e 300 mOs, com 10.000 UI de penicilina G potássica por litro e 10 mg/L de sulfato de estreptomicina), proveniente da perfusão intra-uterina de cada uma das 29 búfalas submetidas a um programa de TE, durante o primeiro semestre de 1997, na Fazenda Capim Branco, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). As amostras foram acondicionadas em gelo e encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas do Curso de Medicina Veterinária da UFU, para serem analisadas.

3.2. Técnica de Transferência de Embriões.

Para todas as búfalas, o processo de colheita de embriões foi efetuado no sexto dia do ciclo estral (D₆) após a inseminação, pelo método não cirúrgico. Os procedimentos adotados para a realização das colheitas e de avaliação morfológica dos embriões foram baseados na publicação de DROST (1991) e serão descritos em seus pontos principais. A seguir, com a búfala presa em tronco de contenção, procedeu-se o esvaziamento do conteúdo fecal, seguida de uma rigorosa higienização das regiões perineal e vulvar após o que, foi feita uma anestesia epidural com 3 a 5 ml de Xilocaina a 2%. Um catéter tipo Foley de duas vias, número 18, montado com um mandril metálico, revestido com uma camisa sanitária de plástico, que foi removida antes de sua penetração na cérvix, foi

introduzido em um dos cornos uterinos e fixado pelo balão inflável, próximo à região da bifurcação uterina. Após a retirada do mandril, acoplou-se ao catéter um sistema de mangueiras através das quais se introduzia a solução DPBS adicionada de 2% de soro fetal bovino e aquecida a 37°C. O efluente foi drenado para filtros específicos (poros de 75µm). Para a lavagem do outro corno uterino repetiu-se a manobra descrita, com um novo catéter. O volume total da solução de DPBS empregado por colheita foi de 1.000 ml.

3.3. Técnica para análise quantitativa.

Para a contagem de colônias, foi observado o desenvolvimento das mesmas a partir do material semeado em ágar Sangue, Simples e MacConkey usando-se solução de perfusão intra-uterina não diluída e das diluições, em salina, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} ml. Em cada meio de cultura, foi semeado 0,1 ml de cada uma das diluições e da amostra não diluída.

Usando “swab” seguindo-se a semeadura em véu (KONEMAN et al., 1989).

O volume da solução de DPBS foi medido no laboratório, utilizando-se proveta na realização dos Cálculos Quantitativos para se chegar a uma determinada unidade formadora de colônias/ml (UFC/ml).

Na avaliação do número de colônias, utilizou-se a média aritmética calculada a partir do número de colônias presentes em cada um dos três meios de cultura; e esse valor foi multiplicado pela diluição praticada (1:10.000) e o resultado, dividido pelo volume inicial das amostras; obtendo-se, assim, o número de UFC/ml.

Após 24 horas, em estufa à temperatura de 37°C, fez-se a contagem das colônias, em cada placa, com o auxílio do contador de colônias.

3.4. Técnica para análise qualitativa.

Para cultura, foi colocado 3 ml de cada amostra em tubo de ensaio contendo 5 ml de caldo Mueller Hinton e deixado 12 horas, em estufa à 37°C, para enriquecimento do material. As amostras foram semeadas em ágar Sangue, Simples e MacConkey com alça de platina utilizando-se o estriamento por

esgotamento, para obtenção de colônias isoladas. Esta operação foi realizada em cada meio de cultura, e depois levados para a estufa à 37°C, por 24 horas.

Depois de 24 horas, foi observado o crescimento nos meios, feito o esfregaço das colônias que foram coradas pela coloração de Gram. (OSBALDISTON, 1975).

Após a observação do microrganismo quanto a coloração e morfologia, foram feitos os testes bioquímicos convencionais para a identificação do gênero/espécie dos mesmos.

Para a realização das provas bioquímicas, foram utilizados os seguintes substratos: citrato, tríplice-açúcar ferro ("TSI"), SIM, urease e lisina descarboxilase (LDC) para os microrganismos Gram negativos e para os Gram positivos, testes de coagulase e catalase.

3.5. Técnica de difusão em gel.

O teste de difusão em gel foi preparado utilizando-se a técnica do NCCLS (1993). Os microrganismos foram cultivados em 5mL de TSB por 3 a 4 horas, e as suspensões resultantes foram diluídas em salina a 0,85%, estéril, até atingir a turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a uma concentração de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml). Seguiu-se realizando a semeadura em ágar Mueller-Hinton em véu com "swab". Os antimicrobianos utilizados foram os seguintes: amicacina, ampicilina, gentamicina, carbenicilina, cefalotina, cloranfenicol, kanamicina, sulfazotrim, cefotaxima, tetraciclina, cefazolina, cefoxitina, eritromicina, oxacilina, norfloxacin e penicilina

A leitura do teste foi realizada fazendo-se a medida do halo de inibição para cada antimicrobiano e posteriormente foram feitas as interpretações quanto a susceptibilidade ou resistência.

O estudo bacteriológico citado, foi efetuado seguindo-se as técnicas de OSBALDISTON (1975), LENETTE (1980) e MACFADDIN (1984).

Todos os dados do estudo bacteriológico foram anotados em fichas (Anexo).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Observou-se uma contaminação bacteriana na solução obtida da perfusão intra-uterina para colheita de embriões. Das 29 amostras colhidas, 26 (91%) apresentaram crescimento e 3 (9%) amostras não. (Tabela 1 e Figura 1)

Para explicar o fato de algumas amostras não terem apresentado crescimento, pode-se chamar a atenção para as seguintes hipóteses: ou a manobra para a introdução do catéter no útero, foi feita, possivelmente com menor dificuldade e o risco de contaminação ficou diminuído, ou algumas dessas cepas foram susceptíveis aos antimicrobianos presentes na solução de DPBS.

Vários autores citam a presença de patógenos no útero de bovinos e bubalinos, relacionados com infecções por partos distócicos, por puerpério alterado com ou sem retenção de envoltórios fetais, por permanência em águas paradas contaminadas (hábito característico da espécie) ou por condições insuficientes de higiene. (DESSOURY, JUNA, 1973; NARASHINA, MANNARAYANA, 1982; OHASHI et al., 1984).

Entretanto trabalhos específicos sobre a contaminação pela TE, não foram encontrados na literatura consultada.

SHAH e DHOLAKIA (1983), em estudos feitos da microflora do muco cervical e vaginal de búfalas, isolaram os seguintes germes: *Corynebacterium pyogenes*, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium ovis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus*

spp, *Enterobacter* spp e *Bacillus* spp. Nestes experimentos participaram búfalas normais, com endometrites e em anestro.

Os testes realizados neste trabalho, levaram à identificação de três gêneros/espécies de microrganismo: *Enterobacter* spp, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus* spp (Tabela 2; Figura 2). Portanto, os germes isolados condizem com os resultados encontrados em estudos anteriores.

Infecções podem ser causadas por germes banais ou germes patogênicos anaeróbios, aeróbios, esporos ou fungos que, uma vez atingindo a cavidade uterina, ocasionam inflamações da mucosa. (PAISLEY et al., 1983).

Enterobacter spp e *Staphylococcus epidermidis* fazem parte da flora bacteriana saprófita normal do trato intestinal e genital de fêmeas das espécies bubalina e bovina, e a maioria dos *Bacillus* spp são microrganismos saprófitas prevalentes no solo, na água, no ar e na vegetação. Todos estes saprófitas, sob determinadas condições, podem causar infecções.(EL-NAGGAR et al.,1983; SHAH, DHOLAKIA, 1983; RIBEIRO et al.,1987; OBA et al., 1994)

Nas amostras examinadas cresceram um ou dois tipos de bactérias. Foram feitos 33 isolamentos bacterianos, *Enterobacter* spp prevaleceu (69,70%) seguido pelo *Staphylococcus epidermidis* (27,27%) e *Bacillus* spp (3,03%). (Tabela 2; Figura 2).

Trabalhos realizados com o objetivo de determinar as bactérias presentes na secreção uterina, feitos por um grupo de pesquisadores em Belém (Pará), encontraram uma alta porcentagem de espécies da família Enterobacteriaceae, seguidas por *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus* spp (RIBEIRO et al., 1986).

O presente trabalho foi realizado presumindo-se que a cavidade uterina estivesse estéril, e as amostras coletadas foram provenientes da perfusão intra-uterina, o que dificulta a correlação com trabalhos anteriores realizados por outros autores, por tratarem-se de metodologias diferentes.

A avaliação quantitativa das amostras foi feita através de contagem de colônias, originadas a partir do crescimento de microrganismos da diluição de 1:1000 (10^{-3}). Para cada microrganismo foi observado o crescimento nos respectivos meios de cultura seletivo.

A semeadura a partir da diluição 10^{-3} mostrou-se mais adequada para proceder a contagem das colônias isto porque, para esta diluição, o número de colônias não ultrapassou 100 unidades e a leitura foi mais precisa.

O estudo quantitativo das amostras foi feito para medir a incidência de contaminação bacteriana na solução obtida da perfusão intra-uterina e, isso possibilitou estabelecer uma avaliação do grau de contaminação (Tabela 3).

Enterobacter spp teve uma variação do índice de contaminação de $0,37 \times 10^4$ UFC/ml a $8,33 \times 10^4$ UFC/ml, obtendo-se uma média ($\pm dp$) de $3,64 \pm 2,14 \times 10^4$ UFC/ml. Portanto, nos 23 isolamentos de *Enterobacter* spp a contaminação foi de um valor expressivo.

Staphylococcus epidermidis teve uma variação do índice de contaminação de $0,71 \times 10^4$ UFC/ml a $6,25 \times 10^4$ UFC/ml, obtendo-se uma média ($\pm dp$) de $2,90 \pm 1,63 \times 10^4$ UFC/ml. Observou-se que nos 9 isolamentos de *Staphylococcus epidermidis* a contaminação, também foi efetiva.

Tanto na análise qualitativa (Identificação do gênero/espécie) quanto na análise quantitativa, a frequência de *Bacillus* spp não foi expressiva.

A contaminação por *Enterobacter* spp mostrou-se mais elevada do que por *Staphylococcus epidermidis*, mas ambos os índices de UFC/ml foram relevantes.

Alguns microrganismos mostraram-se susceptíveis a certos antimicrobianos, os quais podem ser propostos como medidas terapêuticas em casos de infecções uterinas.(THORNSBERRY, HAWKINS, 1977).(Tabela 4; Figura 4 e 5).

O *Enterobacter* spp foi susceptível aos antimicrobianos, Amicacina (91,30%); Cefotaxima (61,90%), Gentamicina (56,52), teve uma susceptibilidade de moderada à baixa à sulfazotrim (36,36%), Kanamicina (35,00%), Cefoxitina (28,57%), Ampicilina (26,07%), Carbenicilina (21,74%), Cloranfenicol (21,74%), Cefazolina (16,66%), Cefalotina (13,04%); não foi susceptível à Tetraciclina (0%).

O *Staphylococcus epidermidis* foi significativamente susceptível à Amicacina (100%), Gentamicina (90%) e Norfloxacin (85,71%) e teve uma susceptibilidade baixa à Cefalotina (11,11%) e não foi susceptível (0%) à

Ampicilina, Cloranfenicol, Sulfazotrim, Tetraciclina, Eritromicina, Oxacilina, e Penicilina.

Em função da susceptibilidade aos antimicrobianos, pode-se observar que os microrganismos isolados foram extremamente resistentes, dado que por si só, leva à expectativa de possível patogenicidade e, graças a isso, desenvolver uma infecção permanente.

Tabela 1 Culturas positivas e negativas da solução obtida da perfusão intra uterina de búfalas, Fazenda Capim Branco/UFU, Uberlândia, MG, 1997.

CULTURAS	NEGATIVAS	POSITIVAS
Nº	Nº (%)	Nº (%)
29	3 (9)	26 (91)

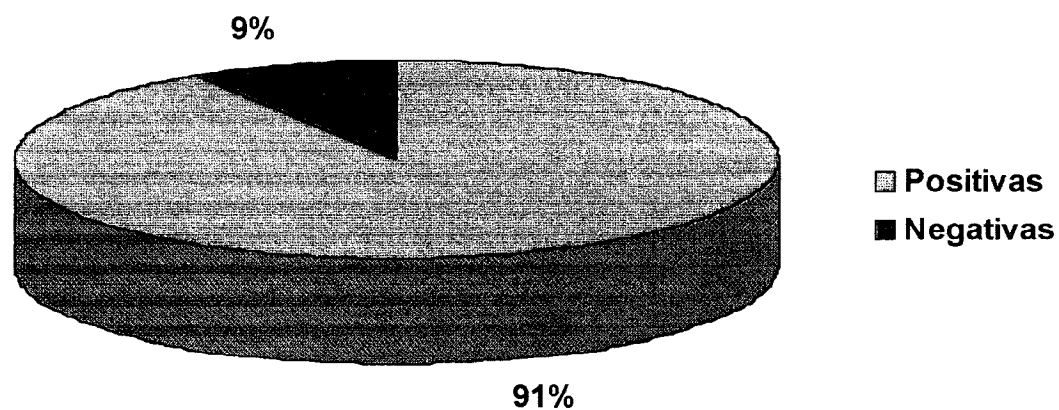


Figura 1. Culturas positivas e negativas (%) da solução de perfusão intra-uterina de búfalas.

Tabela 2 Frequência de microorganismos isolados na solução de perfusão intra uterina de búfalas, Fazenda Capim Branco/UFU, Uberlândia, MG, 1997.

MICROORGANISMO	Nº DE ISOLAMENTO	%
<i>Enterobacter</i> spp	23/33	69,70
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9/33	27,27
<i>Bacillus</i> spp	1/33	3,03

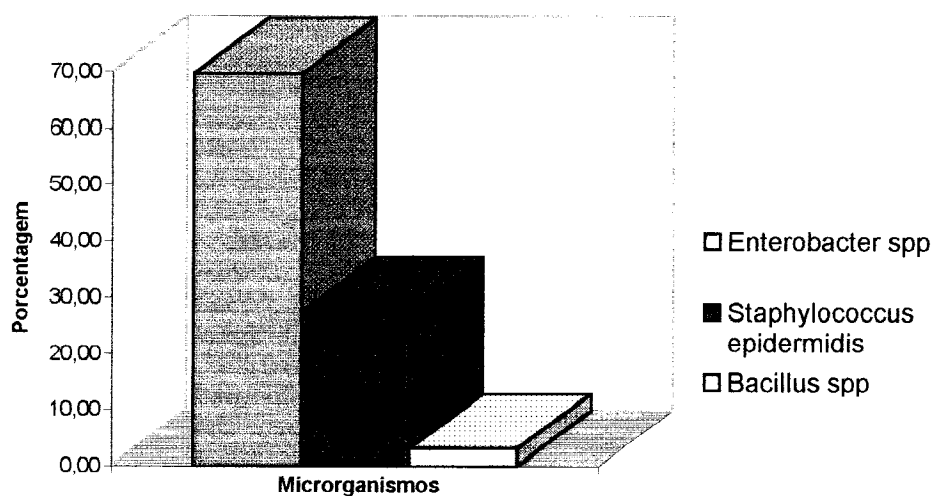


Figura 2. Frequência dos microrganismos isolados.

Tabela 3 Índices das unidades formadoras de colônias (média $\pm$ dp), através do crescimento de microrganismos obtidos da perfusão intra-uterina para colheita de embriões em búfalas, Fazenda Capim Branco/UFU, Uberlândia, MG, 1997.

Nº DE ISOLOMENTOS	GÊNERO/ESPÉCIE	MEIOS DE CULTURA	MÉDIA($\pm$ dp) DAS UFC/ml
23	<i>Enterobacter</i> spp	MACCONKEY	$3,64 \pm 2,14 \times 10^4$
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SANGUE	$2,90 \pm 1,63 \times 10^4$
1	<i>Bacillus</i> spp	SANGUE	$2,85 \pm 0 \times 10^4$

Tabela 4 Susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias prevalentes obtidas de perfusão intra-uterina de búfalas, Fazenda Capim Branco/ UFU, Uberlândia, MG, 1997.

Microrganismos Antimicrobianos	<i>Enterobacter spp</i>			<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
	Amostras testadas	Amostras sensíveis	Eficiência (%)	Amostras testadas	Amostras sensíveis	Eficiência (%)
Amicacina	23	21	91,30	9	9	100,00
Ampicilina	23	6	26,07	8	0	0
Gentamicina	23	13	56,52	9	9	100,00
Carbenicilina	23	5	21,74	—	—	—
Cefalotina	23	3	13,04	9	1	11,11
Cloranfenicol	23	5	21,74	9	0	0
Kanamicina	20	7	35,00	—	—	—
Sulfazotrim	22	8	36,36	9	0	0
Cefotaxima	21	13	61,90	—	—	—
Tetraciclina	18	0	0	9	0	0
Cefazolina	12	2	16,66	—	—	—
Cefoxitina	14	4	28,57	—	—	—
Eritromicina	—	—	—	9	0	0
Oxacilina	—	—	—	9	0	0
Norfloxacina	—	—	—	7	6	85,71
Penicilina	—	—	—	9	0	0

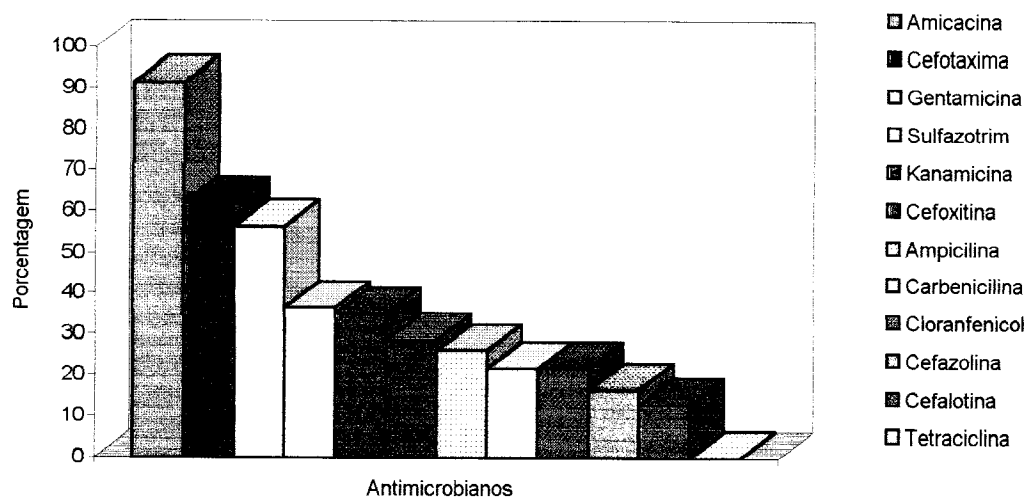


Figura 4. Susceptibilidade do *Enterobacter* spp aos antimicrobianos.

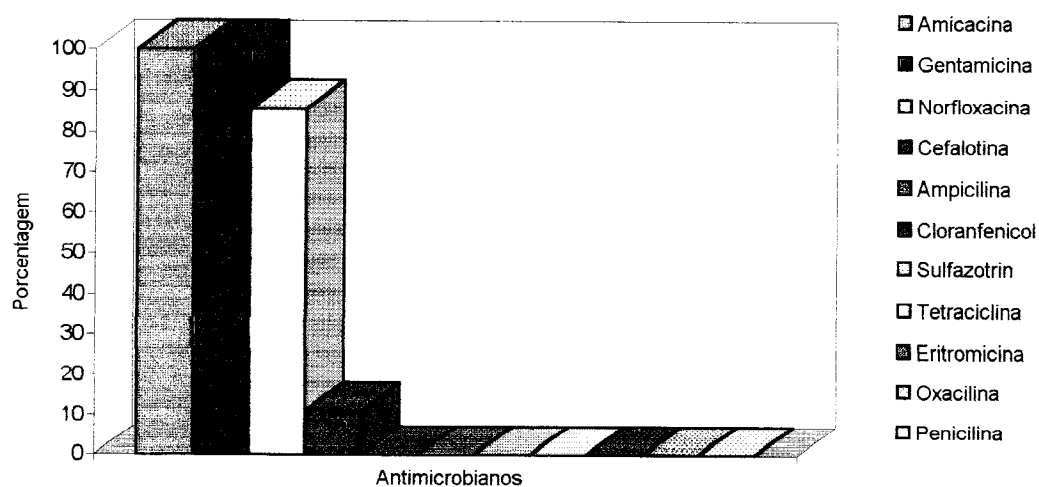


Figura 5. Susceptibilidade do *S. epidermidis* aos antimicrobianos

5. CONCLUSÕES.

Foram identificados os seguintes microrganismos: *Enterobacter* spp, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus* spp.

No estudo de susceptibilidade aos antimicrobianos, as drogas que tiveram uma eficiência significativa foram: Amicacina, Cefotaxima e Gentamicina para *Enterobacter* spp e Amicacina, Gentamicina e Norfloxacin para *Staphylococcus epidermidis*.

Quantitativamente, a contaminação teve um índice elevado, tanto para amostras contaminadas por *Enterobacter* spp, como para as contaminadas por *Staphylococcus epidermidis*.

Deve-se realizar uma anti-sepsia mais adequada utilizando-se, por exemplo, alguns dos derivados da Acridina¹, por apresentarem ação efetiva contra bactérias Gram positivas e negativas e serem livres da ação tóxica ou irritante para o animal.

Pode-se ainda, utilizar uma associação de antibióticos na solução de DPBS, como Amicacina e Gentamicina, não antes de um estudo sobre possíveis efeitos deletérios dessas drogas para o embrião.

¹ Rivanol

6. ANEXO.

CONTROLE INDIVIDUAL

Número do Animal:		crescimento	Data da colheita: —/—/—		
Número da amostra:		da amostra	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Número de Colônias	Ágar MacConkey				
	Ágar sangue				
	Ágar Simples				

ANÁLISE BACTERIANA:

CRESCIMENTO APÓS 24h: (anotar em qual ágar houve ou não crescimento)

Cresceu:

Não cresceu:

MORFOLOGIA:

Cocos:

Bastonetes:

COLORAÇÃO DE GRAM:

Gram positivo:

Gram negativo:

IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO: (anotar todos os testes)

ANÁLISE DO ANTIBIOGRAMA:

7. BIBLIOGRAFIA.

- ANDERSON, G. B. Fertilization, Early Development and Embryo Transfer. In: CUPS, P. T. (ed.). **Reproduction in Domestic Animals**. 4^a. ed. San Diego: Academic Press, 1991. 670 p. p.279-313.
- AWAD, H. H. E HARIRI, M. N. F. The bacteriology of the cervical mucus during oestrus in repeat breeder cows and buffaloes and sensitivity to different antibiotic in vitro. **Egypt Vet. Med. Assoc.** v. 41, p 103-111, 1980.
- BAKER, R. D. Embryo transfer calves produced in the United States from 1973 to1988. In: PROCEEDINGS OF THE 8th ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN EMBRIO TRANSFERS ASSOCIATION. 1989, Nashville, Tx, U.S.A.. **Anais**. v.1, p.108-115.
- COCERO, M. J., PROCUREUR, R., de la FUENTE, J., CHUPIN. D. Glycol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. **Theriogenology**, v.29, p.238, 1982 (Abstr.).
- CURTIS, J. L. Cattle embryo transfer procedure. San Diego: Academic Press, 1991.131p. p. 13-19.
- DERASHRI, H. J., DHOLAKIA, P. M., KODAGALI, S. B. Genital infections and treatment in Surti buffaloes. **Indian J. Anim. Reprod.** v. 4, p.63-65, 1983. apud Vet Bull, v.53, p. 283, 1984.
- DESSOUKY, F. E JUNA, K. H. Infertility problems among cows and buffaloes in Iraq. **Indian J. Anim. Sci.** v. 43, p. 187-192, 1973.

- DOCHI, O., IMAI, K., TAKAKURA, H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. **Anim. Reprod. Sci.**, v.38, p.179-185, 1995.
- DROST, M, WRIGHT, J. M., CRIPE, W. S., RICHER, A. R. Embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.20, p.579-584, 1983.
- DROST, M. Non-surgical embryo recovery In: **Training manual for embryo transfer in water-buffaloes**. FAO Animal Production and Health. Paper 84. Rome, 1991. 58p.+iii" p.13-16.
- EL-NAGAAR, M. A., EL-TIMANU, A. A. H., OSMAN, A. M., SERUR, B. H. Treatment of repeat breeder buffalo-cows. **Asiut Vet. Med. J.** v. 11, p.207-210, 1983 apud RIBEIRO, H. F. L., VALE, W. G., SOUZA, J. S., OHASHI, O. M., SILVA, N. Q., VIEIRA, J. M. S. Aspectos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos das endometrites em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.14, n. 1, p.31-44,1990.
- FERREIRA, A. M., E SÁ, W. F. Estudo das infecções uterinas em vacas leiteiras. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.22, n. 3 Março p.339-44, 1987.
- HAFEZ, E. S. E. Embryo transfer, IVF and Genetic engineering. In: (ed.). **Reproduction in Farm Animals**. 5ª. Ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1987. 670p. p.279-313.
- KASIRAJ, MISRA, A. K., MUTHA RAO, M. JAISWAL, R. S., RAGAREDDI, N. S. Successful culmination of pregnancy and live birth following the transfer of frozen-thawed buffalo embryos. **Theriogenology**, v.39, p.118-192, 1993.
- KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., DOWELL, JR. V. R., SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico** Texto e atlas colorido. São Paulo, SP. Ed. Panamericana. 730p., 1989.
- LENETTE, E. H.(ed.). **Manual of clinic microbiology**. 4ª de. Washington: American Society for Microbiology, 1980. 1149p.
- McFADDIN, J. F. **Biochemical test for indication of medical bacteria**. 2ª ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1984. 301p.
- McINTOSH, A. K., JOSHI, B.V., AGRAWALA, P. L., KASIRAJ, R., SIVAIAH, S., RANGAREDDI, N. S., SIDDIQUI, M. U. Multiple ovulation and embryo

- transfer in indian buffaloes. (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.33, n.1, p.289, 1990.
- NARASHINA, R. A. V. E MANNRAYANA, S. O. Clinical analysis of reproductive failure among female buffalo (*Bubalus bubalis*) under village management in Andhara Pradesh. **Theriogenology**, v.18, p. 403-411.1982.
- NASCIMENTO, C, MOURA CARVALHO, L. O. **Criação de Búfalos: Alimentação, Manejo, Melhoramento e Instalações**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1993. 403 p. p.1-9.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved Standart, M7A3 Villanova, Pa: **NCCLS**. 1993.
- OBA, E., LAGONI, H., PAULA SANTOS, M. A. F., LISTONI, F., EMÍLIO, J., PIMENTEL, M. A. Estudo bacteriológico e sensibilidade dos microorganismos isolados da vagina de búfalas face a diferentes drogas antimicrobianas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 18, n. 1-2, p.47-54, 1994.
- OHASHI, O. M., VALE, V. R., VALE, W. G., SOUSA, J. S. Ocorrência de alterações do sistema genital de búfalos (*Bubalus bubalis*), abatidos em matadouros. I. Anomalias de ovários e tuba uterina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 36, p. 29-39, 1984.
- OLSON, J. D., BRETZLAFF, K. N., MORTIMER, R. G., BALL, L. The metritis-pyometra complex. In: MORROW, D. A. (ed.). Current Therapy in **Theriogenology**. 2^a. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. 1.143p. p.227-236.
- ORGANIZATION MUNDIAL DE LA SALUD. Standartization of methods for conducting microbic sesitivity tests. Second report of the Expert Commitee on Antibiotics. (Who Technical Report Series 210), Geneve, 1961. 79p.
- OSBALDISTON, G. W. **Técnicas de laboratório em bacteriologia clínica veterinária**. Zaragaza, Acribia, 1975. 128p.
- PAISLEY, L. G.; MICKELSEN, W. D. ANDERSON, P. B. Mchanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections in the cow: a review. **Theriogenology**, v. 25, p. 353-381, 1976.

- RIBEIRO, H. F. L. **Prevalência das alterações clínicas e patológicas do sistema genital de búfalas** (*Bubalus bubalis* Lin.), na região do Baixo Amazonas, Estado do Pará. Itaguaí, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, 1986, 90p (Dissertação, Mestrado).
- RIBEIRO, H. F. L., VALE, W. G., SOUZA, J. S., OHASHI, O. M., SILVA, N. Q., VIEIRA, J. M. S. Aspectos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos das endometrites em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.14, n. 1, p.31-44,1990.
- RIBEIRO, H. F. L.; SILVA, N. Q.; VALE, W. G.. Distúrbios reprodutivos em búfalas na região do Baixo Amazonas. **Pesq. Vet. Bras.** v. 7(4), p.113-115, 1987.
- ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 3^a.ed. Ann Arbor: Edwardas Brothers,1986. p. 434-575.
- SAGARTZ, J. W. E HARDENBROOK, H. F. A clinical, bacteriological and histologic survey of infertile cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 158, p.619-622, 1971.
- SHAH, N. M. E DHOLAKIA, P. M. Microflora of the cervico-vaginal mucus of surti buffaloes and their drug-resistence pattern. **Ind. J. Anim. Sci.**, v.53, n. 2, p.147-150, 1983.
- TERVIT, H. R., GOOLD, P. G. Deep freezing sheep embryos. **Theriogenology**, v.21, p.268, 1984 (Abstr.).
- THORNSBERRY, C. E HAWKING, T. M. **Agar disc diffusion susceptibility testing procedures**. U.S. Dept. Health. Public Health Service, Centre for Disease Control, 1977. P.820.
- VANDEPLASSCHE, M. **Stimulation and inhibition of phagocytosis in domestic animals**. In: 10TH INT. CONG. ANIM. REP. AND A.I., v. 3, p. 475, Champaing, Illinois, 1984.
- WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P., MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to-196 and- 269° C. **Science**, v. 178, p.411-414, 1972.
- ZICARELLI, L. Embryo transfer in Mediterranean buffaloes. **Buffaloes J.**, Suppl.2, p.87-101. 1994.

