

UDK: 636.2+636.02+614.9
Originalni naučni rad

IZOLACIJA *CANDIDE ALBICANS* I *CITROBACTER FREUNDII* IZ DUBOKO ZAMRZNUTOG SEMENA BIKA

M. Maletić, S. Vakanjac, S. Nedić, V. Magaš, M. Đurić*

Izvod: Mikrobiološki pregled semena kao deo zdravstvene kontrole bikova od velikog je značaja za uspeh reprodukcije goveda. Duboko zamrznuto seme bikova treba da bude slobodno od patogenih, kao i od uslovno patogenih mikroorganizama, što kontrolisana proizvodnja semena treba da omogući. Prema OIE preporukama otopljenom doza semena ne treba da sadrži više od 5000 cfu/ml saprofitskih mikroorganizama. Prema Zakonu o veterinarstvu Republike Srbije, članu 115 (Promet reproduktivnog materijala) "Zabranjen je promet, uvoz ili izvoz semena za veštačko osemenjavanje, jajnih ćelija i oplodjenih jajnih ćelija koji sadrži uzročnike bolesti životinja ili veći broj bakterija od dozvoljenog ili koji svojim biohemijskim, biofizičkim i morfološkim svojstvima ne ispunjavaju uslove za reprodukciju".

Jasna granica broja i vrste dozvoljenih saprofitskih mikroorganizama u duboko zamrznutom semenu nije navedena. Mikrobiološkom analizom obuhvaćen je 351 uzorak duboko zamrznutog semena bikova, u čistoj kulturi je izolovana *Candida albicans* u 9 uzorka, *Citrobacter freundii* u 5 uzoraka, dok su ostali uzorci bili slobodni od mikroorganizama.

Infekcije krava sa *Candida albicans* su dosta opisane u literaturi, i poznato je da može da izazove mastitise, endometritise i pobačaje kod krava.

Citrobacter freundii je poznat kao uzročnik nozokomijalnih infekcija respiratornog, urinarnog trakta i krvi ljudi. Navedeno je da je 29% oportunističkih infekcija kod ljudi izazvano ovim mikroorganizmom. U veterinarskoj medicini infekcije sa *Citrobacter freundii* su opisane kod pasa, laboratorijskih životinja, riba i kornjača. Poznato je da *Citrobacter* vrste mogu izazvati mastitise i pobačaje krava, ali literaturni podaci o patogenom delovanju *Citrobacter freundii* na reproduktivno zdravlje krava su oskudni. Izolacija ovog mikroorganizma iz duboko zamrznutog semena bikova nije opisana u nama dostupnoj literaturi.

Na osnovu preporuke OIE i našeg Zakona o veterinarstvu, a zbog malo dostupne literature o infekcijama (posebno *C. freundii*) data je preporuka, da je duboko zamrznuto seme bika neupotrebljivo za veštačko osemenjavanje.

Ključne reči: zamrznuto seme bika, *C. freundii*, *C. Albicans*.

Uvod

Za proizvodnju i distribuciju kvalitetnog semena u programu za veštačko osemenjavanje koriste se samo bikovi koji su prošli odgovarajuće testiranje, slobodni od bolesti, i njihovo seme se prikuplja i obrađuje u skladu sa standardnim protokolima. Ipak, mikroorganizmi su u manjem ili većem procentu prisutni u svakom ejakulatu. Sveži ejakulati uzeti od zdravih bikova ne sadrže patogene mikroorganizme. Međutim, nalaz patogenih mikroorganizama ukazuje na prisustvo sistemskih infekcija, ili lokalne infekcije genitalnog trakta bika. Kontaminacija semena mikroorganizmima spoljašnje sredine može nastati u toku prikupljanja ejakulata, obrade i skladištenja semena i predstavljaju oportunističke patogene niskog značaja za izazivanje bolesti ljudi i životinja. Međutim, čak i ta mikroflora može dovesti do infekcije, prema OIE (Appendix 3.2.1.) koji definiše da „unošenje većeg broja

* Milan Maletić, dr. vet., asistent; Dr sci. vet. med. Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor; Svetlana Nedić, dr. vet.; Dr sci. vet. med. Vladimir Magaš, docent; Miloje Đurić, dr. vet., asistent; Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Republika Srbija.

E-mail prvog autora: maletic@vet.bg.ac.rs. Ovaj rad je podržan sredstvima projekta III 46002 koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

ili određene kombinacije egzogene mikroflora, može da oslabi imunološki odbrambeni sistem, što može dovesti do infektivnih procesa“.

Mikrobiološki pregled semena je neophodan, kako bi na vreme prevenirali razna patološka stanja: rana embrionalna uginuća, abortusi, endometritisi, zaostala posteljica i produžen međutelidbeni period, a koja mogu nastati kao posledica unosa mikrobiološki neispravnog semena u genitalni trakt ženke prilikom osemenjavanja. Prisustvo patogenih mikroorganizama u semenu može dovesti do smanjenja broja i pokretljivosti spermatozoida, dok je procenat patološki promenjenih spermatozoida uglavnom povećan (Khalili i sar., 2000).

Poznato je da makrofagi i polimorfonuklearni granulociti koji čine prvu liniju odbrane organizma protiv mikroorganizama, stvaraju slobodne kiseonikove radikale (ROS) čija je funkcija baktericidna. ROS, međutim, mogu da reaguju i sa spermatozoidima, štetno delujući na ćelijsku membranu pri čemu dolazi do smanjenja motiliteta i vitalnosti. Ćelijski antioksidansi, prisutni uglavnom u citoplazmi spermatozoida su oskudni i neadekvatni, jer je citoplazma spermatozoida mala, i uglavnom raspoređena na midpiece (Drevious, 1970).

Efikasna veterinarsko-sanitarna kontrola ima za cilj da spreči unos infektivnih agenasa u semenu koji se putem veštačkog osemenjavanja mogu raširiti u populaciji. Prema Zakonu o veterinarstvu Republike Srbije, članu 115 (Promet reproduktivnog materijala) "zabranjen je promet, uvoz ili izvoz semena za veštačko osemenjavanje, jajnih ćelija i oplođenih jajnih ćelija koji sadrži uzročnike bolesti životinja ili veći broj bakterija od dozvoljenog ili koji svojim biohemijskim, biofizičkim i morfološkim svojstvima ne ispunjavaju uslove za reprodukciju". Prema preporukama OIE ukupan broj saprofitičkih mikroorganizama u semenu ne treba da prelazi 5000 cfu/ml (Appendix 3.2.1., Article 3.2.1.6)

Cilj mikrobioloških analiza je identifikacija patogenih, kao i određivanje broja saprofitičkih mikroorganizama koji mogu, kada je njihov broj veći od dozvoljenog da kontaminiraju seme i učine ga neupotrebljivim.

Materijal i metode rada

Ispitivanjem je obuhvaćen 351 uzorak duboko zamrznutog semena bikova koji su dostavljeni u Laboratoriju za mikrobiologiju i citologiju Katedre za porodiljstvo sterilitet i V.O., Fakulteta veterinarske medicine. Obrada uzoraka je obuhvatala otapanje pajeta u vodenom kupatilu na 37, zatim su obrisane papirnom vatom i dezinfikovane 70% alkoholom. Vrh pajete je pažljivo isečen, a njihov sadržaj je zasejavan na podloge (krvni agar sa dodatkom 5% ovčije krvi, MacConkey agar i Sabouraud dekstrozni agar). Ploče su inkubisane u aerobnim uslovima na 37 24-48h, nakon čega su mikroorganizmi identifikovani na osnovu morfoloških, kulturnih osobina i biohemijske aktivnosti.

Precizna identifikacija *Candida albicans* izvršena je subkultivisanjem na CHROMagar Candida podlozi ispitivanjem sposobnosti asimilacije i fermentacije određenih ugljenih hidrata.

Kolonije izrasle na krvnom i MacConkey agaru su pojedinačno umnožene na hranljivom agaru i ispitivane testovima katalaze, oksidaze, i biohemijskim nizom (Kliglerov šećer, saharoza, laktoza, glukoza, metil-crveno, citrat, inozitol, urea, dekarboksilacija lizina, želatin, arabinoza, ONPG i SIM). Mikroorganizam je identifikovan kao *Citrobacter freundii*, a identitet izolata je potvrđen upotrebom BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ® ID System (Becton Dickinson, Detroit, MI, USA).

Rezultati i diskusija

Rezultati ispitivanja 351 uzorka duboko zamrznutog semena bikova, pokazuju da je u 9 uzorka izolovana *Candida albicans* u čistoj kulturi i *Citrobacter freundii* u 5 uzoraka. Interesantno je da su ostali uzorci bili u potpunosti slobodni od mikroorganizama.

Candida albicans - Iako u rodu *Candida* postoji preko 200 vrsta, *Candida albicans* je najčešći prouzročivač infekcija kod domaćih životinja. *C. albicans* je normalan stanovnik nazofaringealne regije, gastro-intestinalnog trakta i spoljašnjih delova genitalnog trakta mnogih životinjskih vrsta. Infekcije izazvane *C. albicans* su oportunističke koje nastaju sporadično, obično kao posledica imunosupresivnih stanja ili duge upotrebe antimikrobnih sredstava i glukokortikoida. Infekcije krava sa *Candida albicans* su opisane u literaturi, i poznato je da mogu da dovedu do smanjena fertlnosti, abortusa (Quinn i sar., 2002), endometritisa (Wang i sar., 2011), i mastitisa (Hanna i Cruz, 2011).

Studija koju su sproveli Burello i sar. (2009) je pokazala da infekcije muškaraca sa *C. albicans* mogu da smanje funkcionalnu sposobnost spermatozoida tako što dovode do smanjenja motiliteta i membranskog potencijala mitohondrija (MMP) i ubrzavaju molekularne mehanizme apoptoze.

Citrobacter freundii je poznat kao oportunistički patogen ljudi i životinja, koji se često nalazi u vodi, zemljištu i otpacima. Kao deo fiziološke mikroflore digestivnog trakta ljudi, često se dovodi u vezu sa slučajevima nastanka diareja, jer ima sposobnost da proizvede enterotoksine, koji mogu biti termostabilni i termolabilni a koji su homologni toksinima izolovanim kod *E. coli* (Schmidt i sar., 1993). Infekcije zdravih ljudi su retke, ali kod pacijenata sa slabim imunim sistemom opisane su nozokomijalne infekcije respiratornog trakta, infekcije mokraćnih puteva i krvi (Whalen i sar., 2009). *Citrobacter freundii* može da izazove neonatalni meningitis, penetrirajući krvno-moždanu barijeru, pri čemu je stopa smrtnosti od 25 do 50% veoma zabrinjavajuća, a ozbiljni neurološki problemi ostaju kod 75% preživelih.

U veterinarskoj medicini ima malo podataka o patogenom delovanju *Citrobacter freundii*, i infekcije su uglavnom opisane kod laboratorijskih životinja, riba i kornjača. Galarneau i sar. (2003) su opisali septikemiju dva psa izazvanu sa *Ctr. freundii*. U literaturi su ranijih godina opisani mastitisi (McDonald i sar., 1970), abortusi (Renken-Zurne, 1985) i dijareje goveda (Kabankov i Kvasnikova, 1980) izazvane sa *Citrobacter spp.*, dok su podaci o patogenom delovanju vrste *Ctr. freundii* na reproduktivno zdravlje krava oskudni.

Kontrolisana proizvodnja semena treba da omogući da duboko zamrznuto seme bude slobodno od patogenih, kao i od uslovno patogenih mikroorganizama. U tehnološkom procesu obrade semena dodaju se kombinacije antibiotika širokog spektra delovanja, a antimikrobni efekat dodatih antibiotika putem razređivača, zavisi prevashodno od prisutnih mikroorganizama. Ipak, pojedini mikroorganizmi preživljavaju proces obrade, i niske temperature skladištenja semena.

Nedavno, Abro i sar. (2009) su ispitali 100 uzoraka duboko zamrznutog semena bikova, i izolovali i identifikovali 7 različitih bakterijskih vrsta (*Acinetobacter*, *Actinobacillus lignieris*, *Citrobacter*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus intermedius*). Bielanski i sar. (2003) naveli su izolaciju *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus sciuri*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Morganella morgani*, *Gemella morbillorum*, *Citrobacter koseri*, *Corynebacterium xerosis*, *Photobacterium damsela*, *Bacillus sphaericus*, *Corynebacterium spp.*, *Ralstonia pickettii* i *Aspergillus spp.* iz uzoraka duboko zamrznutog semena bikova uskladištenih 6-35 godina u tečnom azotu. Izolacija *Ctr. freundii* i *C. albicans* iz duboko zamrznutog semena bikova, nije opisana u nama dostupnoj literaturi.

Pojedini mikroorganizmi koji se izoluju iz duboko zamrznutog semena, preživljavaju na -196°C u tečnom azotu, i stiču određeni stepen rezistencije na antibiotike (Ronald i Probhakar, 2001). Od ranije je poznato da krioprezervacija može smanjiti koncentraciju bakterijskih kontaminanata u spermi bika (Mazurova i sar., 1975). Ipak, mnogi sastojci razređivača semena mogu delovati kao stabilizatori za m.o. na niskim temperaturama (npr. mleko, glicerol, serum ili serumski albumin, saharoza, sorbitol i drugi šećeri) (Bielanski i Vajta, 2009).

Zaključak

Literaturni podaci o patogenom delovanju *C. freundii* na reproduktivni trakt krava su oskudni, dok pojedini autori potvrđuju da se ova bakterija kao deo "normalne mikroflore", može izolovati iz uzoraka nativnog semena. Mikrobiološki nadzor nad kvalitetom semena treba da spreči širenje potencijalno patogenih mikroorganizama, čime se i opravdava njegova svrha. Imajući u vidu potencijalni patogeni efekat izolovanih mikroorganizama iz duboko zamrznutog semena, mišljenja smo da je seme bikova iz koga su izolovani *C. albicans* i *Ctr. freundii* neupotrebljivo za veštačko osemenjavanje krava.

Literatura

1. Abro, S. H., Wagan, R., Tunio, M. T., Kamboh, A. A., Munir, M. (2009): Biochemical activities of bacterial species isolated from the frozen semen of cattle, J Agric Soc Sci, 109-113.
2. Bielanski, A., Bergeron, H., Lau P. C., Devenish, J. (2003): Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen, Cryobiol, 46, 146-152.
3. Bielanski, A., Vajta, G. (2009): Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units, Human Reprod, 24, 2457-2467.
4. Burrello, N., Salmeri, M., Perdichizzi, A., Bellanca, S., Pettinato, G., D'Agata, R., Vicari, E., Calogero, A. E. (2009): *Candida albicans* experimental infection: effects on human sperm motility, mitochondrial membrane potential and apoptosis. Reproductive BioMedicine, Vol. 18 Issue 4, p496.
5. De Casia Dos Santos, R., Marin, J. M. (2005): Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil, Mycopathologia, 159(2), 251-253.
6. Drevious, L. O. (1970): Bull spermatozoa as osmometers, J Reprod Fertil, 28, 29-39.
7. Galarneau, J. R., Fortin, M., Lapointe, J. M., Girard, C. (2003): *Citrobacter freundii* septicemia in two dogs, J Vet Diagn Invest. 15(3), 297-9.
8. Kabankov, J. S., Kvasnikova, E. D. (1980): Bakteriologische Untersuchungen beim Ferkeldurchfall, Veterinarija Moskva 7, 32-34.
9. Khalili, M. A., Pourshafie, M. R., Saifi, M., Khalili, M. B. (2000): Bacterial infection of the reproductive tract of infertile men in Iran, MEFSJ, 5, 126-131.
10. Mazurowa, J., Rysanek, M., Forejtek, M., (1975): Effect of long-term freezing preservation on the level of bacterial contamination of the sperm, Vet Med (Praha), 20, 147-152.
11. McDonald, T. J., McDonald, J. S., Rose, D. L. (1970): Aerobe gram-negative rods isolated from bovine udder infections, Am J Vet Res, 31, 1937-1941.
12. Office International Des Epiyooties, (2003): Appendix 3.2.1., Bovine semen. Article 3.2.1.6. General considerations for hygienic collection and handling of semen, Terrestrial Animal Health Code, Twelfth Edition, 335-6.
13. Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C., Leonard, F. C. (2002): Veterinary Microbiology and Microbial Disease.
14. Renken-Zurne, A. (1985): Vorkommen und veterinarmedizinische Bedeutung von Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae mit Ausnahme der Gattungen *Escherichia* und *Salmonella* sowie der Spezies *Yersinia pestis*, Vet. Med, Diss Hannover.

15. Ronald, B. S. M., Prabhakar, T. G. (2001): Bacterial analysis of semen and their antibiogram, Ind J Anim Sciences, 71(9), 829-831.
16. Schmidt, H., Montag, M., Bockemühl, J., Heesemann, J., Karch, H. (1993): Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples, Infect Immun, 61(2), 534-543.
17. Seker, E. (2010): Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in western Turkey, Mycopathologia, 169(4), 303-308.
18. Wang, J. T., Chang, S. C., Chen, Y. C., Luh, K. T. (2000): Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods, The Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 33(4), 258-62.
19. Whalen, J. G., Mully, T. W., English, J. C. (2007): Spontaneous *Citrobacter freundii* infection in an immunocompetent patient, Archives of dermatology, 143(1), 124-5.

UDC: 636.2+636.02+614.9
Original scientific paper

ISOLATION OF *CANDIDA ALBICANS* AND *CITROBACTER FREUNDII* FROM DEEP FROZEN SEMEN OF BULLS

M. Maletić, S. Vakanjac, S. Nedić, V. Magaš, M. Đurić*

Summary

Microbiological examination of semen as part of health control of bulls is of great importance for the success cattle reproduction. Deep-frozen semen of bulls should be free of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms and controlled production of seed should allow out. According to the OIE recommendations unfrozen dose of semen should not contain more than 5000 cfu / ml of saprophytic microorganisms. According to the Law of Veterinary Medicine of Serbia, Article 115 (Traffic reproductive material) it is prohibited to trade, import and export of seeds for artificial insemination, ova and fertilized eggs containing pathogens of animals or more bacteria than allowed, or that their biochemical, biophysical and morphological properties are not eligible for reproduction.

Clear limits of number and types of allowed saprophytic microorganisms in deep-frozen semen is not listed. Microbiological analysis included a sample of 351 semen of bulls in pure culture was isolated *Candida albicans* in 9 samples, *Citrobacter freundii* in 5 samples, while other samples were free of microorganisms.

Infection with *Candida albicans* are well described in the literature, and it is known that can cause mastitis, endometritis and abortion in cows.

Citrobacter freundii is known as a cause of nosocomial infection of respiratory, urinary tract and blood in humans. It was stated that 29% of opportunistic infections in humans are caused by these microorganisms. In veterinary medicine, infection with *Citrobacter freundii* have been described in dogs, laboratory animals, fish and turtles. It is known that *Citrobacter* species can cause abortions and mastitis in cows, but literature data on the effect of pathogen *Citrobacter freundii* on cows reproductive health are low. Isolation of this organism from the semen of bulls has not been described in the available literature.

On the basis of our recommendations and OIE Veterinary Act, and the little available literature on infections (especially *C. freundii*) it is recommended that the deep-frozen bull semen is unusable for arteficial insemination.

Keywords: frozen bull semen, *C. freundii*, *C. albicans*.

* M.Sc. Milan Maletić, teaching fellow; Ph.D. Slobodanka Vakanjac, associate professor; Svetlana Nedić, BVM; Ph.D. Vladimir Magaš, assistant professor; Miloje Đurić, BVM, teaching fellow; University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Republic of Serbia.

E-mail of the first author: maletic@vet.bg.ac.rs. This paper was supported by funds of Project III 46002, financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.