

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Avaliação da microbiota bacteriana vaginal e uterina e sua relação com o ciclo estral em
fêmeas equinas**

Ruhan Henrique Lima de Araújo

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Avaliação da microbiota bacteriana vaginal e uterina e sua relação com o ciclo estral em
fêmeas equinas**

Ruhan Henrique Lima de Araújo

Graduando

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

Orientador

Prof^ª Dr^ª Norma Lúcia de Souza Araújo

Co orientadora

Patos

Junho de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

A663a Araújo, Ruhan Henrique Lima de

Avaliação da microbiota bacteriana vaginal e uterina e sua relação com o ciclo estral em fêmeas equinas / Ruhan Henrique Lima de Araújo. – Patos, 2017.

28f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2017.

“Orientador: Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro.”

“Co-Orientação: Profa. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo.”

Referências.

1. Microrganismos. 2. Útero. 3. Vagina. 4. Ciclo estral. 5. Égua. I. Título.

CDU 636.082

RUHAN HENRIQUE LIMA DE ARAÚJO

Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADA EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro
Orientador

Nota: _____

Prof^a Dr^a Norma Lúcia de Souza Araújo
Co orientador e Examinador I

Nota: _____

Prof. Dr^a Felício Garino Jr
Examinador II

Nota: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, minha família e aos meus amigos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, que sempre iluminou o meu caminho e me ajudou a seguir em frente em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, que sempre me deram a oportunidade do estudo para que eu pudesse me tornar um bom profissional.

Aos meus avós, que são inspiração para minha vida, onde tenho todo o amor e respeito do mundo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro e minha co orientadora Prof^a. Dr^a Norma Lúcia de Souza Araújo que foram fundamentais para despertar meu interesse e dedicação pela área da Reprodução Animal. Obrigado por todo apoio.

Ao professor Prof. Felício Garino Jr que realizou a análise microbiológicas do meu experimento no laboratório de Microbiologia Veterinária.

Aos amigos Pedro, André, João Paulo, Heitor e Raphael que, junto comigo, habitava o “cabaré da veterinária”. Amizade que pretendo levar para o resto da minha vida.

Ao grupo de estudo Bico do Urubu (GEBU), composto por André, Pedro Jorge, Chiarelli, Raimundo, João Paulo, João Augusto e Artur. Amigos que fiz durante o curso e levarei sempre comigo. Obrigado pelo companheirismo.

Ao meu amigo e companheiro de profissão Dr. Everton Marques, o qual acompanhei em vários estágios, sempre me passando todo seu conhecimentos, além de me ajudar a desenvolver todas as coletas do meu experimento. Obrigado meu amigo.

À minha turma, na qual convivi durante todo o curso e que, apesar de todas as diferenças, é uma turma nota 10.

A todos os professores que contribuíram de alguma maneira para minha formação como Médico Veterinário. Um sonho que está sendo realizado.

Obrigado a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Aspectos da fisiologia reprodutiva dos equídeos	13
2.2 Microrganismos colonizadores do trato reprodutivo.....	14
2.3 Mecanismos de defesa uterina.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Local do experimento e animais utilizados	17
3.2 Metodologia.....	17
3.2.1 Exame ultrassonográfico	17
3.2.2 pH Vaginal.....	17
3.2.3 Coleta de amostras.....	18
3.2.4 Cultura microbiológica: vaginal e uterina	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Bactérias presentes no útero e vagina de éguas em diferentes fases do ciclo estral.....	19
Tabela 2-	Bactérias presentes no útero de éguas em diferentes fases do ciclo estral.....	20
Tabela 3-	Bactérias presentes na vagina de éguas em diferentes fases do ciclo estral.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Swab acoplado a pipeta de inseminação artificial para coleta de amostra de conteúdo vaginal e uterino em éguas.....	17
Figura 2- Prevalência de bactérias isoladas no útero de éguas nas diferentes fases do ciclo estral.....	22
Figura 3- Prevalência de bactérias isoladas na vagina de éguas nas diferentes fases do ciclo estral.....	23

RESUMO

ARAÚJO, RUHAN HENRIQUE LIMA DE. **Avaliação da microbiota bacteriana vaginal e uterina e sua relação com o ciclo estral em fêmeas equinas.** Patos, Universidade Federal de Campina Grande. 2017. p. (Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária).

Durante a monta natural ou Inseminação Artificial (IA), algumas bactérias da microbiota vaginal normal podem ser transferidas para o interior do útero, podendo ser esta a causa principal de infecções uterinas que têm sido reconhecidas como a principal causa de baixa fertilidade em éguas. Com o presente trabalho objetivou-se avaliar a microbiota colonizadora do trato reprodutivo de éguas nas diferentes fases do ciclo estral, determinando as bactérias presentes na vagina e útero. Foram utilizadas 20 éguas e foram realizadas duas coletas de amostra de conteúdo vaginal e uterino por meio da utilização de swab. Posteriormente, foi realizada uma cultura microbiológica para identificação do tipo de bactéria presente. Os resultados obtidos indicaram que em 43% dos animais que estavam em estro, houve a presença de *Escherichia coli* no útero. Houve também a predominância de *Escherichia coli* em 60% fêmeas que estavam em diestro. Já em 40% fêmeas que estavam em proestro, constatou-se a presença de *Aeromonas hydrophyla*. Por sua vez, das fêmeas que estavam em anestro, o *Staphylococcus sp*, ocorreu em 40% dos casos. Nas amostras de conteúdo vaginal, em 43% das fêmeas que estavam em estro houve a presença de *Escherichia coli* na vagina. O mesmo microrganismo também predominou em 50% fêmeas que estavam em diestro. Já das cinco fêmeas que estavam em proestro, constatou-se a presença de *Klebsiella pneumoniae* em 33% destas, enquanto que a *Klebsiella pneumoniae* foi isolada em 40% das amostras das fêmeas em anestro. Foram encontradas bactérias patogênicas no útero e vagina de fêmeas em atividade reprodutiva. Pode-se concluir que, em alguns casos, microrganismos presentes no útero não foram isolados na vagina da mesma fêmea, indicando que a contaminação nem sempre ocorre de forma ascendente. Mais estudos com um número maior de fêmeas submetidas a diferentes tipos de manejo devem ser desenvolvidos a fim de aprofundar os conhecimentos acerca de como essa contaminação ocorre.

Palavras chave: Microrganismos, útero, vagina, ciclo estral, éguas.

ABSTRACT

ARAÚJO, RUHAN HENRIQUE LIMA DE. **Evaluation of uterine and vaginal bacterial microbiota and its relationship with the estrous cycle in mares.** Patos, Universidade Federal de Campina Grande. 2017. p. (Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária).

During the natural mount or Artificial Insemination (AI), some vaginal microbiota bacteria can be transferred into the uterus. This may be the main reason of uterine infections that has been recognized as the main cause of low fertility in mares. The present work is aimed to evaluate the reproductive microbiota tract of mares in the different phases of estrous cycle, determining the microorganisms present in the vagina and uterus. During the study, 20 mares were used in which vaginal and uterine content samples were collected in duplicate with swabs. Microbiological culture assays were performed to identify the microorganism present. The results obtained indicated that 43% of the animals in estrus had *Escherichia coli* in the womb. There was also a prevalence of *Escherichia coli* in 60% of the mares in diestrus. The mares that were in proestrus, 40% had the presence of *Aeromonas hydrophyla*. In other hand for the animals that were in anestrus, *Staphylococcus sp* occurred in 40% of cases. In the vaginal contents samples of the mares in estrus, 43% had the presence of *Escherichia coli*. The same microorganism also prevailed in 50% of females in diestro. However, the five mares that were in proestrus, there was a presence of *Klebsiella pneumoniae* in 33% of them, whereas *Klebsiella pneumoniae* was isolated in 40% of the samples in anestrus mares. Pathogenic bacteria were found in the womb and in the vagina of mares that were in reproductive activity. It can be concluded that, in some cases, microorganisms present in the uterus were not isolated in the same mare vagina, indicating that the contamination does not occurs always ascendant. Further studies with a larger number of mares subjected to different types of management must be developed in order to deepen the knowledge of how this contamination occurs.

Keywords: Microorganisms, uterus, vagina, estrous cycle, mares.

1 INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva da fêmea está diretamente relacionada com a eficácia uterina de manter um ambiente propício para o desenvolvimento embrionário e crescimento fetal, assim os mecanismos de defesa naturais são cruciais e eficientes na neutralização e remoção dos agentes contaminantes, contanto que as barreiras anatômicas estejam intactas. Nas éguas o ambiente uterino saudável não apresenta microflora, diferente da vagina onde sabe-se que existe uma flora vaginal rica em microrganismos não patogênicos e que constituem parte desse mecanismo de defesa.

Durante a monta natural ou Inseminação Artificial (IA), algumas bactérias da flora vaginal normal podem ser transferidas para o interior do útero, podendo ser esta a causa principal de infecções uterinas que têm sido reconhecidas como a principal causa de baixa fertilidade em éguas, sendo a incidência dos problemas uterinos maior em doadoras de embrião, provavelmente por serem estas submetidas a uma manipulação intensa do trato genital. Por sua vez, bactérias patogênicas que causam aborto ou morte fetal podem ser isoladas da fossa clitoriana e vestibulo vaginal de éguas, indicando um fator de risco de infecção bacteriana ascendente, devido o manuseio do trato reprodutivo durante procedimentos de inseminação, infusões, coleta de material uterino e transferência de embriões.

Na literatura existem poucos trabalhos relacionados à microbiologia do trato genital de éguas correlacionando com as fases do ciclo estral. Diante destes aspectos, o objetivo do presente estudo é avaliar a flora vaginal e uterina em éguas, em diferentes fases reprodutivas para melhor entendimento da colonização de bactérias presentes no ambiente uterino e vaginal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos da fisiologia reprodutiva dos equídeos

As éguas tem a capacidade de ficar prenhes em qualquer época do ano, portanto são consideradas poliéstricas. No entanto, a maior parte é definida como poliéstrica sazonal, em virtude dos picos de cio ocorrerem em épocas onde a quantidade de horas luz diárias é maior, fazendo com que a estação reprodutiva nessa espécie concentre-se na primavera e no verão. No entanto, por mais que as éguas mostrem cio durante todo o ano, em certas latitudes, elas não concebem obrigatoriamente ao longo de todos os períodos estrais (HAFEZ, 2004).

Além da influência da duração do período de luz/dia, alguns outros fatores como temperatura, nutrição e condições de sanidade alteram os padrões de ciclo estral nessa espécie (ROMANO et al., 1998).

O estro caracteriza-se pelo predomínio do estrógeno, aceitação do garanhão, a vulva aumenta seu volume e fica edemaciada, úmida e hiperêmica. Ocorre a presença de um ou mais folículos dominantes, edema endometrial e essa fase possui duração de sete a nove dias. A ovulação se dá em um período de 24 a 48 horas antes do término dos sinais indicativos de cio (LEY, 2006). Durante o período do estro a égua apresenta sinais característicos de cio, levanta a cauda, urina e realiza contrações rítmicas expondo o clitóris, seu trato genital está preparado para receber e transportar os espermatozoides (HAFEZ, 2004).

As variações histológicas da genitália da égua, durante o ciclo estral, se aproximam aos padrões gerais encontrados em todos os mamíferos. No entanto, essas variações não são suficientemente nítidas, ao ponto de um esfregaço vaginal ser útil na determinação do estágio do ciclo estral (FRANDSON, 1979).

De acordo com Meira (2007), nos casos em que a égua não aceita, não foi coberta ou exposta a um garanhão ou demonstrou perda embrionária precoce (antes de 12 a 14 dias), o endométrio secreta prostaglandina, que através da circulação sistêmica, atinge o corpo lúteo e leva o seu regresso (luteólise). A produção de progesterona decai em 4 a 40 horas seguintes e a égua começa a apresentar sinais de aceitação ao passo que entre em seu ciclo estral.

O metaestro é a fase pós-ovulatória, em que o corpo lúteo funciona, e por sua vez há uma diminuição do estrógeno e uma elevação nos teores de progesterona gerada pelo corpo lúteo (FRANDSON, 1979).

Por sua vez, o diestro caracteriza-se pelo predomínio da progesterona, ausência de aceitação ao macho, presença de pelo menos um corpo lúteo funcional e sua duração é de aproximadamente 15 dias (GINTHER, 1995).

2.2 Microrganismos colonizadores do trato reprodutivo

O trato genital feminino possui uma microbiota residente desde suas regiões externas ao óstio cervical. Normalmente, o útero é desprovido de microrganismos ou transitoriamente contaminado com pequeno número deles. A vagina contém espécies de bactérias anaeróbias obrigatórias, incluindo as Gram-negativas e Gram-positivas. A função desempenhada pela microbiota normal da vagina é incerta. Entretanto, assim como em outras superfícies mucosas, deve ser considerada protetora, possivelmente com a exclusão de cepas mais patogênicas. De forma mais prática, a microbiota normal contém espécies que irão contaminar o útero, podendo torná-lo comprometido (HIRSH, 2003).

Os microrganismos que compõe a microbiota endógena, geralmente considerados de pouca malignidade, alerta para o motivo de que estes não podem ser desprezados automaticamente como contaminantes. Ao contrário, é possível que tenham grande importância clínica, devido a fatores (administração de drogas imunossupressoras) que podem ocasionar na modificação da microbiota endógena, provocando a infecção (SOUZA; SCARCELLI, 2000).

2.3 Mecanismos de defesa uterina

O útero dos equídeos é mantido isento de contaminantes através de mecanismos imunológicos, físicos e de um sistema linfático funcional. As barreiras físicas que impedem o acesso de microrganismos ao útero são: a vulva, a prega vestíbulo-vaginal (HINRICHS et al., 1988) e a cérvix (LEBLANC, 2003). Na espécie dos equídeos, independentemente do método de cobertura, o sêmen é depositado na luz uterina, sendo, assim, as barreiras físicas ultrapassadas, onde todo o material aí depositado induzirá uma resposta inflamatória aguda (TROEDSSON, 1997).

A flora bacteriana vaginal, associada à presença de vários componentes da imunidade inata e adquirida, constitui um significativo mecanismo de defesa para evitar a invasão/proliferação de patógenos microbianos (LINHARES et al., 2010). A imunidade inata na superfície das mucosas representa a primeira linha de defesa contra os microrganismos patogênicos aos qual o hospedeiro é normalmente exposto (KATILA, 1995).

As células epiteliais exercem um papel importante na indução da resposta imune inata no trato genital feminino (WITKIN et al., 2007). Essas células que revestem as superfícies mucosas não agem apenas como barreira física, mas também atuam ativamente da secreção de substâncias antimicrobianas e fatores imunes (MAX, et al., 2008).

A flora vaginal, por não apresentar sua composição constante, acaba sofrendo variações em resposta a fatores exógenos e endógenos (PRIESTLLEY et al., 1997; ESCHENBACH et al., 2000). As alterações ocorridas no meio vaginal podem aumentar ou diminuir as vantagens seletivas para microrganismos específicos (LINHARES et al., 2010).

O transporte dos espermatozóides do útero para o oviduto se completa em quatro horas após cobertura ou IA, e apenas uma pequena porção do sêmen depositado no útero atinge o oviduto (BRINSKO et al., 2003). O aumento da contração do miométrio uterino é também responsável pela rápida eliminação dos espermatozóides do útero pela cérvix em razão da cobertura ou IA (KATILA et al., 2000 apud CHAVES, 2011), porém nem todos os espermatozóides são removidos do útero por este mecanismo (TROEDSSON et al., 2008).

O neutrófilo é a célula de defesa mais importante do útero e 30 minutos após a cobertura está presente na luz uterina alcançando o pico inflamatório em 12 horas (KATILA, 1995; TROEDSSON, 1997) e são atraídos pelos mediadores inflamatórios, responsáveis pela fagocitose dos antígenos (GALINDO et al., 2003). Os macrófagos, por sua vez, são capazes de realizar atividade fagocítica prolongada além de secretarem citocinas que amplificam a resposta imune, controlam a inflamação e contribuem para o reparo tecidual através da remoção do tecido danificado ativando as elastases, gelatinases e colagenases possibilitando o aporte de células para o processo de reparação (TIZARD et al., 1998).

Após a ovulação e o fechamento da cérvix, o sistema linfático torna-se responsável pela drenagem de subprodutos do processo inflamatório. No entanto, é essencial possuir uma boa contratilidade miometrial para que a drenagem linfática exerça sua função (LEBLANC et al., 1995).

Após iniciado o processo inflamatório, uma série de mediadores pró-inflamatórios são liberados pelos neutrófilos realizando fagocitose, por células endometriais lesadas, pelas células do endotélio vascular, e pelos macrófagos ativados pela inflamação (GALINDO et al., 2003). Estes mediadores tem como principais funções atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficácia da eliminação do agente agressor (MACKAY, 2000).

A resposta uterina rápida contra um antígeno é realizada por mediadores quimiotáticos resultando em influxo de células polimorfonucleares (neutrófilos) para o lúmen uterino. Os

neutrófilos são atraídos por produtos inflamatórios complementares como Leucotrieno B4 (LTB4), Prostaglandina E, Prostaglandina F2 alfa e Interleucina 8 (TROEDSSON et al., 2008).

Os hormônios esteróides influenciam os mecanismos de defesa uterina. Assim, sob o domínio estrogênico característico do estro, o útero apresenta-se edemaciado, com aumento da produção de muco. Acontece uma hiperemia que favorece o aporte de neutrófilos e ocorrem contrações miométriais de forma rítmica, favorecendo a evacuação do conteúdo uterino através da cérvix, que nesta fase encontra-se aberta. Já no caso de altas concentrações progesterônicas a cérvix se encontrará fechada e as contrações miométriais passam a ser longas, com baixa amplitude, o que caracteriza o tônus uterino típico da égua nesta fase. Portanto, todos esses fatores fazem com que a égua em diestro apresente uma menor capacidade de eliminação de uma possível contaminação e inflamação uterina (JONES et al., 1991).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento e animais utilizados

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia Veterinária do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos-PB.

Foram utilizadas 20 fêmeas da espécie equina da raça Quarto de Milha, oriundas de criadores de dois haras localizados em municípios da microrregião do Seridó do estado do Rio Grande do Norte. Os animais foram escolhidos de forma aleatória, com idades que variaram entre 3 e 24 anos, independente da fase do ciclo estral, do histórico reprodutivo e da conformação perineal.

3.2 Metodologia

Foi realizada, uma avaliação do escore corporal e uma anamnese abordando aspectos relacionados à vida reprodutiva do animal como, histórico de abortos, anestro e repetição de cio.

3.2.1 Exame ultrassonográfico

Foi realizado exame ultrassonográfico do útero e ovários antes da colheita do material de cada animal. Foi utilizando o aparelho Mindray DP 2200 equipado com transdutor linear de cinco mega-hertz (MHz). Foi identificada a fase do ciclo estral por meio da detecção da presença de corpo lúteo, além da contagem e mensuração dos folículos ovarianos presentes no momento da avaliação.

3.2.2 pH Vaginal

O pH vaginal das éguas foi determinado através de fita de pH colocada no fundo da vagina, onde permaneceu por dois minutos. A leitura da fita foi feita logo após e o resultado foi determinado mediante a tabela do fabricante.

3.2.3 Coleta de amostras

Foram realizadas duas coletas de cada um dos 20 animais, a primeira no dia 18 de março, e a segunda no dia 6 de abril. Os animais foram colocados em um tronco de contenção, onde inicialmente foi realizada uma lavagem externa da vagina com água corrente. A amostra vaginal foi coletada utilizando um swab estéril acoplado a uma pipeta de inseminação artificial (Provar), revestida por uma camisinha de inseminação para evitar a contaminação do swab através da parede da vagina quando a amostra foi coletada do útero (Figura 1). Em seguida, a mesma foi acondicionada em meio de transporte Stuart e encaminhada para o Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande para ser analisada.

Figura 1 – Swab acoplado a pipeta de inseminação artificial para coleta de amostra de conteúdo vaginal e uterino em éguas.



Fonte: Arquivo pessoal (2017).

3.2.4 Cultura microbiológica: vaginal e uterina

Cada amostra de material coletado foi cultivado em Ágar sangue de ovino desfibrinado a 5%, Ágar MacConkey e BHI (Brain Infusion Heart), incubado em estufa a 37°C e em seguida, foi observada a presença de crescimento bacteriano. Para a identificação das bactérias nas amostras foram realizadas observações microscópicas, bioquímicas e morfotintoriais (método de Gram) para a classificação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 40 swabs do útero e vagina de 20 éguas. Do total das amostras de secreção vaginal e uterina de éguas coletadas para análise microbiológica, todas apresentaram crescimento bacteriano.

Os resultados referentes às bactérias presentes no útero e vagina de éguas em diferentes fases do ciclo estral, obtidos no presente estudo, estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Bactérias presentes no útero e na vagina de éguas nas diferentes fases do ciclo estral. Patos, 2017.

Microbiota bacteriana	Frequência	
	N	%
<i>Escherichia coli</i>	15	33
<i>Staphylococcus sp</i>	7	15
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	7	15
<i>Pseudomonas auriginosa</i>	6	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	13
<i>Proteus sp</i>	3	7
<i>Streptococcus sp</i>	1	2
<i>Enterobacter sp</i>	1	2
Total	46	100

As bactérias predominantes foram: *Escherichia coli* 33%, seguido por *Staphylococcus sp* e *Aeromonas hydrophyla*, ambos com uma frequência de 15%. *Pseudomonas auriginosa* e *Klebsiella pneumoniae* ocorreram igualmente em 13 % das fêmeas, neste estudo, enquanto *Proteus sp*, *Streptococcus sp* e *Enterobacter sp* ocorreram em 7%, 2% e 2%, dos animais, respectivamente.

Com base nesses resultados, pode-se constatar que houve um crescimento de oito espécies de microrganismos, onde a maioria foi de bactérias Gram-negativas correspondendo a 83% e Gram-positivas 17%, discordando do resultado descrito por Araújo e colaboradores, (2014) que relatam que a microbiota da vulva e vagina de éguas criadas em haras é constituída principalmente por bactérias Gram-positivas seguida por *Enterobacteriaceae* e fungos, que apresentam grande capacidade de causar distúrbios ao sistema reprodutivo, na dependência de fatores condicionantes.

As bactérias presentes no útero de éguas nas diferentes fases do ciclo estral estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Bactérias presentes no útero de éguas em diferentes fases do ciclo estral. Patos, 2017.

Microbiota bacteriana	Frequência	
	N	%
<i>Escherichia coli</i>	8	37
<i>Staphylococcus sp</i>	4	18
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	4	18
<i>Proteus sp</i>	2	9
<i>Pseudomonas auriginosa</i>	2	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	9
Total	22	100

Das amostras de útero coletadas nas 20 éguas, as bactérias predominantes foram: *Escherichia coli* (37%), *Staphylococcus sp* (18%), *Aeromonas hydrophyla* (18%), *Proteus sp* (9%), *Pseudomonas auriginosa* (9%), *Klebsiella pneumoniae* (9%).

Observa-se que, apesar dos animais deste estudo apresentarem-se com boa saúde geral, um escore corporal variando de regular a bom e bom histórico reprodutivo, todos apresentaram isolamento de algum microrganismo intra-uterino. Das fêmeas avaliadas, apenas três apresentaram histórico de aborto, sete foram identificadas com repetição cio e três possuíam conteúdo uterino.

Os achados microbiológicos do conteúdo uterino obtidos neste estudo diferem daqueles descritos por Hinrichs et al., (1988), que observaram que na maioria das amostras coletadas do útero não houve crescimento bacteriano.

Os tipos de bactérias presentes na vagina em diferentes fases do ciclo estral nas fêmeas utilizadas neste estudo estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3 - Bactérias presentes na vagina de éguas em diferentes fases do ciclo estral. Patos, 2017.

Microbiota bacteriana	Frequência	
	N	%
<i>Escherichia coli</i>	7	29
<i>Pseudomonas auriginosa</i>	4	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	17
<i>Staphylococcus sp</i>	3	12,5
<i>Aeromonas hidrophyla</i>	3	12,5
<i>Proteus sp</i>	1	4
<i>Streptococcus sp</i>	1	4
<i>Enterobacter sp</i>	1	4
Total	24	100

Das 20 amostras de secreção vaginal de éguas coletadas para análise microbiológica, foram encontrados os seguintes agentes: *Escherichia coli* (29%), *Pseudomonas auriginosa* (17%), *Klebsiella pneumoniae* (17%), *Staphylococcus sp* (12,5%), *Aeromonas hidrophyla* (12,5%), *Proteus sp* (4%), *Streptococcus sp* (4%), *Enterobacter sp* (4%).

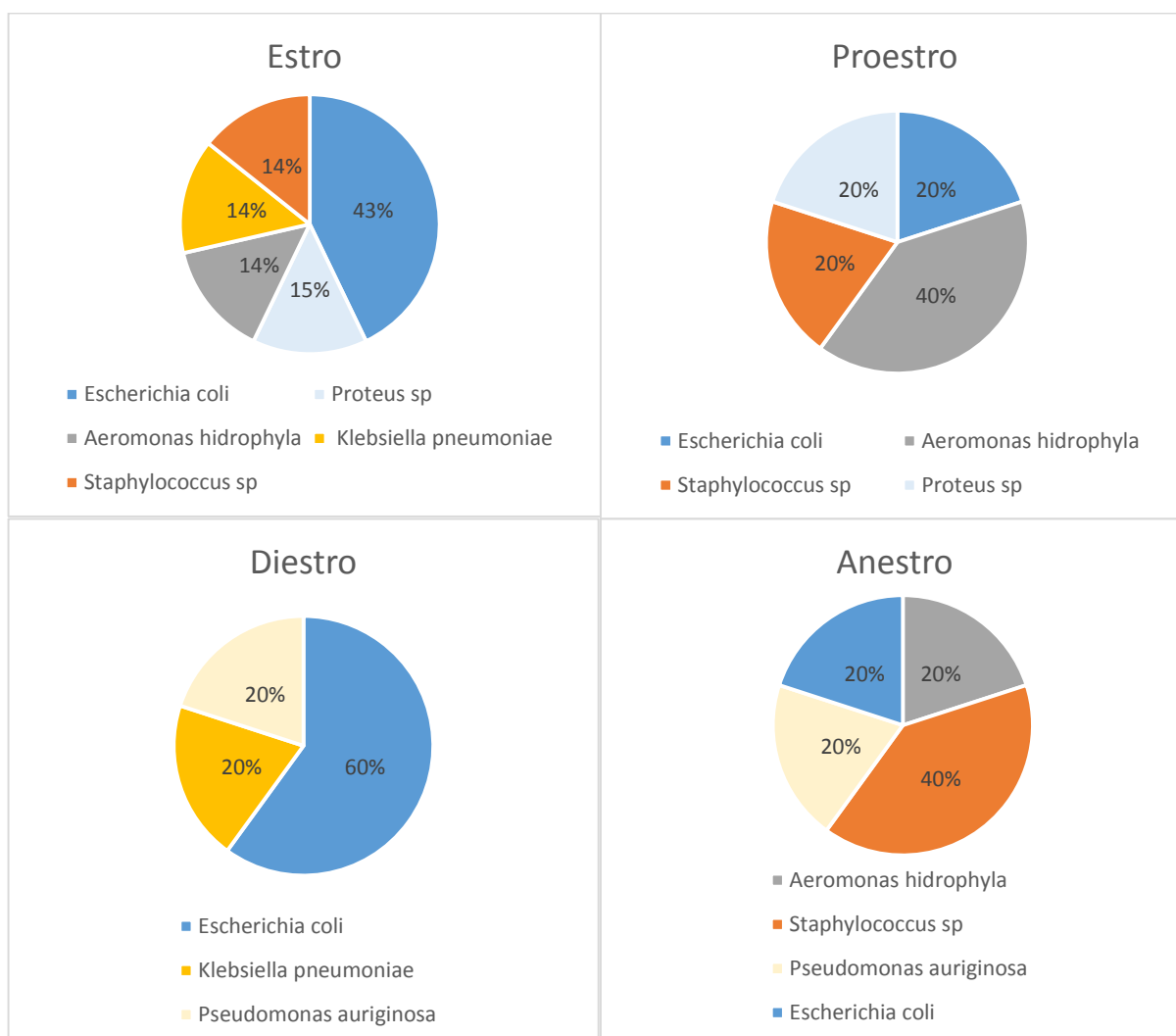
Constata-se, portanto, uma maior variedade de tipos de microrganismos presentes no ambiente vaginal das fêmeas neste estudo. Entretanto há uma semelhança no tipo de agente predominante no útero e na vagina, como é o caso da *Escherichia coli*, presente em 37% das amostras de conteúdo uterino e em 29% das amostras de conteúdo vaginal obtidas dos animais deste estudo.

Das 20 fêmeas avaliadas neste estudo, sete, encontravam-se em estro, cinco em diestro, cinco em proestro e apenas três em anestro. De acordo com os dados registrados durante a avaliação ultrassonográfica, as éguas na fase de estro apresentaram folículos que variaram de 35 a 46 mm, aproximando-se dos resultados descritos por Ginther e colaboradores, (2008), que afirmaram que o folículo atinge seu estágio pré-ovulatório com aproximadamente 40 mm, e com isso, há aumento de LH levando à ovulação.

O pH dos animais variou de 7 a 9, sendo considerado um pH alcalino, onde segundo Fraga et al., 2008, o pH vaginal de éguas em condições normais é 7.0.

Com base na identificação das diferentes fases do ciclo estral, os resultados relativos aos tipos de microrganismos isolados em amostras de conteúdo uterino dos animais utilizados neste estudo estão demonstrados na figura 2.

Figura 2 – Prevalência das bactérias isoladas no útero de éguas nas diferentes fases do ciclo estral. Patos, 2017.



Pode-se observar que, das fêmeas avaliadas neste estudo, sete das quais estavam em estro, sendo que, em 43% destes animais houve a presença de *Escherichia coli* no útero. Houve também a predominância de *Escherichia coli* em 60% fêmeas que estavam em diestro. Já em 40% fêmeas que estavam em proestro, constatou-se a presença de *Aeromonas hydrophyla*. Por sua vez, das fêmeas que estavam em anestro, o *Staphylococcus sp*, ocorreu em 40% dos casos.

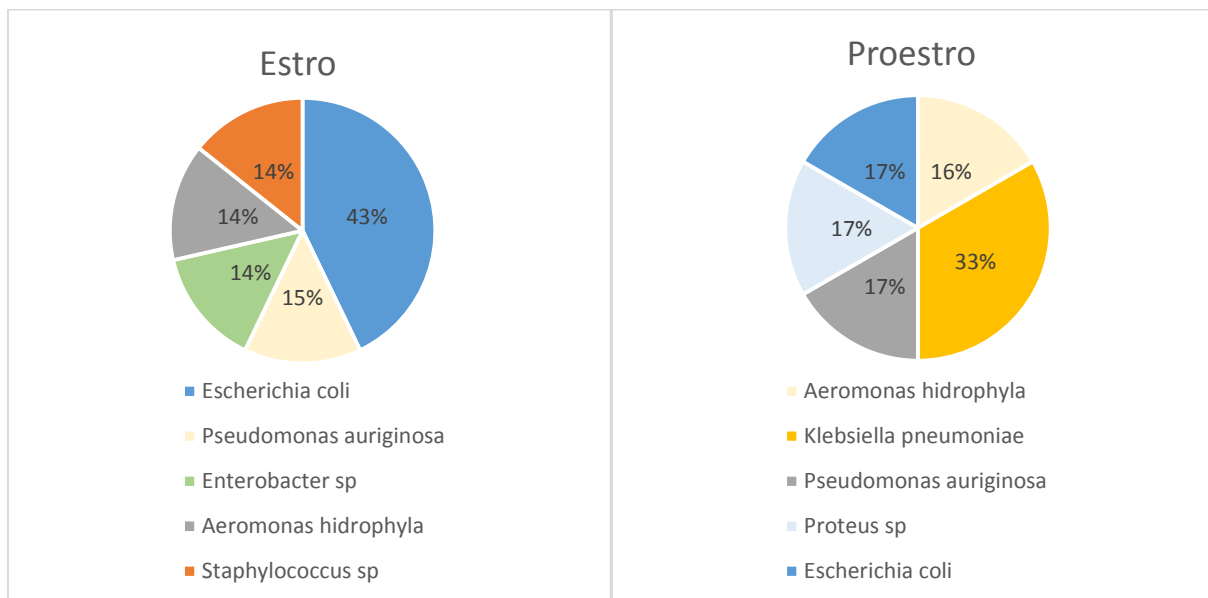
Em éguas sadias, o útero é protegido da contaminação externa por barreiras físicas que consistem na vulva, vestíbulo, vagina e cérvix, onde qualquer falha nessas barreiras pode predispor a égua à infecção uterina. O útero é um órgão bastante eficiente ao combate de microrganismos na tentativa de garantir um ambiente estéril, mas com o avanço da idade, essa eficiência vai diminuindo (ARAÚJO et al. 2014).

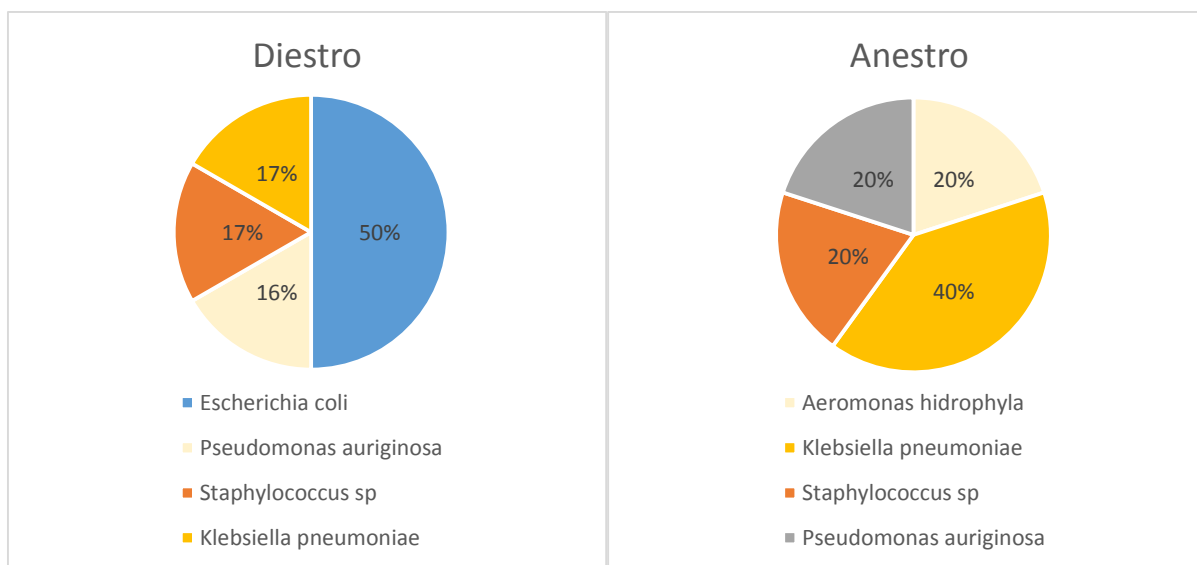
A alta ocorrência de agentes da família Enterobacteriaceae, com destaque para *Escherichia coli*, coincide com outros estudos conduzidos na investigação da etiologia das

endometrites em éguas. O registro destes agentes tem sido atribuído a diversos fatores predisponentes, dentre eles: manobras ginecológicas inadequadas, uso de instrumental contaminado em exames ginecológicos ou defeitos anatômicos (urovagina, pneumovagina), que facilitem a veiculação de material fecal para o trato genital das éguas (MORENO et al., 1972; THRELFALL e IMMEGART, 2000). Esse grupo de éguas apresentavam idade mais avançada que as demais, justificando a queda na eficiência uterina.

Neste estudo, pode-se observar que a presença dos agentes tanto no ambiente vaginal quanto no útero, ocorreu de modo semelhante, independentemente da idade das fêmeas em questão. A presença desses microrganismos no útero e vagina, nas diferentes fases do ciclo estral, pode ser explicada, em três éguas, por apresentarem diarreia por ocasião da avaliação. Em outros casos, as condições inadequadas de manejo, como as péssimas condições de sanidade, limpeza da vulva dos animais no momento da coleta com água não estéril. Esse grupo de éguas também apresentava idade mais avançada que as demais, justificando a queda na eficiência uterina.

Figura 3 – Prevalência das bactérias isoladas na vagina de éguas nas diferentes fases do ciclo estral. Patos, 2017.





Nas sete fêmeas que estavam em estro neste estudo, em 43% destas houve a presença de *Escherichia coli* na vagina. O mesmo microrganismo também predominou em 50% fêmeas que estavam em diestro. Já das cinco fêmeas que estavam em proestro, constatou-se a presença de *Klebsiella pneumoniae* em 33% destas, enquanto que a *Klebsiella pneumoniae* foi isolada em 40% das amostras das fêmeas em anestro.

Observa-se, portanto, uma grande variedade de bactérias na flora vaginal das 20 éguas avaliadas neste estudo. Foram encontrados *E. coli*, *Pseudomonas auriginosa*, *Enterobacter sp*, *Aeromonas hydrophyla*, *Staphylococcus sp*, *Proteus* e *Klebsiella pneumoniae*, discordando de Hinrichs (1988) que relatou que esses microrganismos não são comuns da flora vaginal clinicamente normal.

Ainda, em três éguas avaliadas neste estudo, observou-se a presença de conteúdo uterino. Essas, fêmeas tinham idades de 24, 17 e 9 anos, estando as duas primeiras na fase de proestro e a última em estro. Clinicamente o acúmulo de líquido uterino antes da cobertura, especialmente quando ultrapassa dois centímetros, é o melhor indicativo de susceptibilidade a endometrite, embora não seja de natureza inflamatória, ele indica que a égua apresenta alguma deficiência em sua capacidade de limpeza física (BRINSKO et al., 2003).

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e de acordo com as condições deste estudo pode-se concluir que:

Foram encontradas bactérias patogênicas no útero e vagina de fêmeas em atividade reprodutiva em todas as fases do ciclo estral.

Em alguns casos, microrganismos presentes no útero não foram isolados na vagina da mesma fêmea.

Mais estudos com um número maior de fêmeas submetidas a diferentes tipos de manejo devem ser desenvolvidos a fim de aprofundar os conhecimentos acerca de como essa contaminação ocorre.

O conhecimento sobre a natureza da contaminação uterina é de grande importância como auxílio no estabelecimento de estratégias de controle e tratamento de possíveis problemas reprodutivos em éguas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D. K. G. O.; SANTOS, E. M. C.; SILVA, K. P. C.; SILVA, SÁTIRO, S. R. M. C. **Estudo da microbiota de vulva e vagina de éguas**. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, Recife-PE, v. 17, n. 3, p. 62 - setembro/dezembro, 2014.
- BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; VARNER D. D.; BLANCHARD, T. L. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *In: Annual convention of the AAEP*. 49, 2003, New York. New York: IVIS, 2003.
- CHAVES, M. M. B. C. **Estudo da microbiota vaginal de éguas com ênfase na pesquisa de lactobacilos**. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98256/chaves_mmbc_me_botfmvz.pdf?sequence=1>. Acesso em: 31 mar. 2016.
- ESCHENBACH, D.A; THWINN, S.S; PATTON, D.L; HOOTON, T.M; STAPLETON, A.E; AGNEW, K. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge and microflora. *Clinics Infectious Diseases*. v.30, p.901-907, 2000.
- FRANDSON, R. D. **Anatomia e fisiologia dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, p. 301-304, 1979.
- GALINDO, A.S.D.; KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA, B.D. Mecanismos de defesa uterinos na fêmea bovina. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*. v.9, n.30, p.49-58, 2003.
- GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals, Book 2**. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 1995.
- GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; RODRIGUES, B.L. et al. Follicle diameters and hormone concentrations in the development of single versus double ovulations in mares. *Theriogenology*, Amsterdam, v. 69, n. 5, p. 583-590, 2008.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7 ed. Barueri-SP: Manole, p.21-24, 59, 193-210, 2004.
- HINRICHS, K.; CUMMINGS, M. R.; SERTICH, P. L.; KENNEY, R. M. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule and clitoral fossa of clinically normal mares. *Journal of American of Veterinary Medicin Association*. v.193, p.72-75, 1988.
- HIRSH, D. C. O. Trato Genital Como um Hábitat Microbiano. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap.35, p.179.
- JONES, D. M.; FIELDEN, E. E.; CARR, D. H. **Some physiological and pharmacological factors affecting uterine e motility as measured by electromyography in the mare**. *J reprod fertile suppl*. v. 44, p. 357-358, 1991.
- KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology of Reproduction*. v.1, p.515-517, 1995.
- LEBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis. In: ROBINSON, N.E. (Ed.). **Current Therapy in Equine Medicine**. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003. p. 234-237.

LeBLANC, M. M. et al. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**. v. 68. p. 403-412, 2007.

LEBLANC, M. M.; JOHNSON, R. D.; CALDERWOOD, M. B.; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Biology of Reproduction**. v.1, p.501-506, 1995.

LEY, M.B.; **Reprodução em Éguas para veterinários de equinos**. 1ª Ed. Roca, São Paulo, 2006, p.184-191.

LINHARES, I. M; GIRALDO, P.C; BARACAT, E.C. **Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal**. **Associação de Médicos Brasileiros**. 56(3): 370-374, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302010000300026>. Acesso em: 31 mar. 2016.

MACKAY, R. J. Inflammation in horses. **Vet clin north am equine pract**. v.16, p.15-27, 2000.

MAX, M.; HOELZLE, K.; HOELZLE, L.E. What's new in bacteriology of the mare's genital tract. **Pferdeheilkunde**. v.24, p.53-55, 2008.

MEIRA, C. **Endocrinologia da Reprodução, Dinâmica Folicular, Superovulação e Transferência de Embriões na Espécie Equina** 2007. (Área da Reprodução) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/j1OsKEw0s5EtDHD_2013-8-13-18-21-19.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2016.

MORENO, G.; BOTTINO, J.A.; MÓS, E.N.; MIGUEL, O. Infecções genitais de éguas puro sangue inglês. **Inquérito bacteriológico**. *Biológico*, São Paulo v.37, n.1, p.8-12, 1972.

PIMENTEL, C. A. In: RIET-CORREA, F. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, v. 2, p. 467-476, 2007.

PRIESTLLEY, C.F.J; JONES, B.M; DHAR, J; GOODWIN, L. What is normal vaginal flora? **Genitourinary Medicin**. v.73, p.23-28, 1997.

ROMANO, M.A.; MUCCIOLO, R.G.; SILVA, A.E.D.F. Biologia reprodutiva de éguas: estudo do ciclo estral e momento de ovulação. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.35, n. 1, p.25-28, 1998. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v35n1/35n1a04.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2016.

SOUZA, F. A.; CANISSO, I. F.; D'OLIVEIRA-SOUSA, A.; PATRICIO, F. A. C.; GOMES, M. G. T.; PINTO, P. F. B. **Dinâmica folicular ovariana na égua**. *Ciênc. vet. tróp.*, Recife-PE, v. 13, no 1/2/3, p. 17 - 23 - janeiro/dezembro, 2010.

SOUZA, C. A. I.; SCARCELLI, E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. **Arquivos Instituto Biológico**. v.67, n.2, p.275-281, jul./dez, 2000. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/V67_2/26.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2016.

TIZARDI, I.R. Resistência às bactérias. **Imunologia veterinária**. 5 ed. São Paulo: Editora Roca, 1998. p.294-309.

THRELFALL, W.R. & IMMEGART, H.M. Doença uterina e tratamento. In: REED, S.M. & BAYLY, W.M. (Eds.). **Medicina interna eqüina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.666-671.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.P. Persistent breeding-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**. v.24, p.56-60, 2008.

WITKIN, S.S.; LINHARES, I.M.; GIRALDO, P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. **Best Practices in Research Clinic Obstetric Gynecology**. v.21, p.347-354, 2007.