



Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias aeróbias isoladas de éguas suspeitas de endometrite procedentes do Estado de Pernambuco⁽¹⁾

(Etiology and sensitivity profile of aerobic bacteria isolated from mares suspected of endometritis originated from state of Pernambuco)

"Artigo Científico/Scientific Article"

IB Oliveira^A, RM Peixoto^B, DR Silva^A, JW Pinheiro Junior^A,
AAF Oliveira^C, RA Mota^{C(*)}

^APrograma de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

^BMédico Veterinário, Recife-PE, Brasil

^CProfessor (a) Adjunto, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Rua Dom Manuel, s/n, Dois Irmãos, CEP.: 52171-900, Recife-PE, Brasil

^(*)Autor para correspondência/Corresponding author (canjani_ch@hotmail.com)

Resumo

Objetivou-se com este trabalho determinar a frequência e o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos microrganismos isolados do útero de éguas durante o estro. Foram selecionadas 64 éguas de várias raças, sendo 39 sem suspeita de endometrite e 25 suspeitas, procedentes do Estado de Pernambuco. O material obtido foi semeado em ágar base acrescido de 8% (v/v) de sangue ovino desfibrinado e ágar levine. Os testes de sensibilidade antimicrobiana in vitro dos isolados foram realizados utilizando-se a técnica de difusão em ágar Müeller Hinton. Observou-se que das 64 éguas analisadas, 41 (64,4%) foram positivas ao exame microbiológico e o microrganismo mais frequente foi a *Escherichia coli* (20,4%) seguido de *Klebsiella sp* (10,9%) e *Shigella sp* (10,9%). O perfil de sensibilidade dos microrganismos isolados demonstrou que a maioria destes foi sensível a gentamicina (70,0%). Constatou-se ainda que a eritromicina (88,5%), ampicilina (86,5%) e penicilina (83,0%) apresentaram um elevado índice de resistência. Os resultados obtidos indicam a necessidade de se realizar manobras ginecológicas adequadas com vistas a evitar a contaminação uterina por agentes ambientais. Além disso, os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos ressaltam a importância de se realizar ensaios in vitro para a condução de uma terapêutica mais eficiente.

Palavras-chave: microrganismos, útero, antibióticos, resistência

Abstract

The aim of the present study was to determine the frequency and the antimicrobial sensitivity profile of microorganisms isolated from the uterus of mares during estrous cycle. Sixty-four mares from different breeds were selected, being 25 under suspicion of endometritis and 39 not. The samples collected were seeded onto agar 8% (v/v) defibrinated sheep blood, Levine agar. The in vitro antimicrobial sensitivity tests from isolates was observed that among 64 mares studied, 41 (64.4%) were positive for microbiological examination and the most prevalent microorganism was *Escherichia coli* (20.4%) followed by *Klebsiella sp* (10.9%) and *Shigella sp* (10.9%). The sensitivity profile of isolated microorganisms to the nine different antibiotics tested showed that majority was sensitive to gentamicin (70.0%). It was also noticed that erythromycin (88.5%), ampicillin (86.5%) and penicillin (83.0%) showed elevated levels of resistance. The results obtained demonstrate it is necessary to adequate gynecological strategies in order to avoid uterine contamination by

⁽¹⁾Trabalho extraído da Dissertação de Mestrado da primeira autora apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

^(*)Autor para correspondência/Corresponding author (canjani_ch@hotmail.com)

environmental agents. Moreover, the antimicrobial susceptibility tests results reassure the importance to perform in vitro assays in order to establish a more efficient therapeutic.

Key-words: *microorganisms, uterus, antibiotics, resistance*

Introdução

De acordo com Amaral et al. (1999) é notável o impacto econômico determinado pela subfertilidade e infertilidade da égua na indústria do cavalo. Ao contrário de outras espécies de animais domésticos de grande porte, a cérvix relaxa completamente durante o estro, de forma que o garanhão ejacula diretamente dentro do útero na monta natural (DAY e MILLER, 1940).

O útero da égua é protegido da contaminação através de mecanismos físicos e imunológicos. Os mecanismos físicos são constituídos por barreiras, como a vulva, a prega vestibulo-vaginal, a cérvix e a contratilidade miometrial. Os mecanismos imunológicos são compostos pelo sistema imune humoral, por algumas classes de imunoglobulinas e pela fagocitose realizada por neutrófilos (MATTOS et al., 2003).

Durante a cobertura, o útero é contaminado por bactérias, partículas sólidas e debris celulares que são carregados pelo pênis do garanhão e introduzidos através da cérvix aberta (AMARAL et al., 1999). De acordo com Silva et al. (1999), as infecções bacterianas do útero determinam importantes complicações à reprodução equina, resultando, principalmente, em falhas na concepção.

As endometrites são alterações inflamatórias agudas, crônicas ou degenerativas do endométrio que podem ou não estar associadas à presença de agentes infecciosos e são divididas quanto a sua etiopatogenia em: endometrite causada por doenças sexualmente transmissíveis, endometrite persistente induzida pela cobertura, infecção uterina crônica e endometrite crônica degenerativa (MATTOS et al., 2003). Frequentemente ocorrem devido à alterações nos mecanismos de defesa responsáveis pela eliminação de microrganismos existentes no útero. Nestas condições, as bactérias contaminantes

procedentes do coito e do parto se instalam e desenvolvem processos infecciosos que determinam infertilidade por ocasionarem, na maioria das vezes, morte embrionária precoce (ASBURY et al., 1982).

De acordo com revisão realizada por Langoni et al. (1999), a etiologia das endometrites na espécie equina é bastante variável, podendo ser causada por *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

A porta de entrada para os agentes infecciosos que colonizam o útero é o trato reprodutivo caudal, incluindo vagina e genitália externa, entretanto, a contaminação por matéria fecal devido a fatores predisponentes, como pneumovagina e fraca conformação perineal ou iatrogênica decorrente de cultura uterina, citologia, biopsia ou inseminação artificial, também é possível. O uso de antibiótico também é comumente descrito como predisponente à infecção fúngica (ZAFRACAS, 1975).

De acordo com Jacob et al. (2003), o diagnóstico de endometrite é importante em éguas vazias durante a estação de monta e nas que apresentam dificuldades de concepção. Exames como a palpação retal, a técnica de ultra-sonografia e utilização de métodos complementares de diagnóstico, como o da citologia esfoliativa e do cultivo bacteriológico devem ser realizados, sendo o início do estro, o período mais indicado para proceder à colheita do material.

O tratamento da endometrite é baseado inicialmente na minimização dos fatores predisponentes associados com as éguas em risco e compreender os mecanismos inatos da resistência em éguas. A endometrite é de difícil tratamento pelo fato da existência de inúmeras variáveis associadas com cada égua afetada, não sendo prudente tratar os casos de endometrite com protocolos

padronizados (HURTGEN, 2006). A seleção dos antimicrobianos a serem utilizados para o tratamento baseia-se tanto na determinação da prevalência dos microrganismos causadores, quanto no conhecimento da susceptibilidade desses frente aos antimicrobianos (McCUE et al., 1991).

Diante do exposto objetivou-se com este trabalho determinar a frequência e o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos microrganismos isolados em éguas suspeitas ou não de endometrite na região do Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco.

Material e Métodos

Foram selecionadas 64 éguas de várias raças, sendo 39 clinicamente sadias e 25 suspeitas de endometrite devido à presença de líquido intra-uterino e ponto ecogênico ao exame ultra-sonográfico ou com problemas de repetição de cio. As éguas, procedentes de seis haras localizados no Agreste e Zona da Mata do estado de Pernambuco, eram utilizadas como matrizes, doadoras e receptoras de embrião e compreendiam uma faixa etária entre 2,5 a 18 anos. Os sistemas de criação das propriedades eram extensivo e semi-intensivo, onde fornecia-se volumoso, ração concentrada e sal mineral, além de água *ad libitum*.

O material foi obtido após lavagem e secagem da região vulvar e perivulvar, anteriormente a inseminação artificial ou monta natural. Os *swabs* esterilizados eram protegidos na palma da mão e introduzidos na vagina. Com o dedo indicador na cérvix, os *swabs* eram introduzidos, via cervical, até o interior do útero, onde era colhida a amostra. Após a colheita, os *swabs* eram colocados em tubos contendo meio de transporte, imediatamente fechados e identificados com o nome ou número da égua e. A seguir eram acondicionados em caixas isotérmicas e encaminhados ao Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco para o devido processamento.

A cultura do material foi realizada em placas contendo ágar base acrescido de 8%

(v/v) de sangue ovino desfibrinado e ágar levine. As placas foram incubadas em aerobiose a 37° C por 72h, sendo analisadas a cada 24h. Observaram-se as características de crescimento das colônias em placa, como produção de hemólise, pigmento e características morfotintórias, utilizando-se o método de coloração pela técnica de Gram (Quinn et al., 1994). Para identificação das enterobactérias foram utilizadas as provas bioquímicas relativas à 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).

Os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados foram realizados utilizando-se a técnica de difusão em ágar Müller Hinton, segundo Bauer et al. (1966). Utilizou-se os discos impregnados com: ampicilina (10mcg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (5 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30mcg), penicilina (10U.I.), sulfa (25 µg) + trimetoprim (5 µg) e tetraciclina (30µg).

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se análise descritiva para cálculo das frequências absoluta e relativa (SAMPAIO, 1998).

Resultados e Discussão

Os resultados dos exames microbiológicos encontram-se na Tabela 1. Observou-se que das 64 éguas analisadas, 41 (64,4%) foram positivas ao exame microbiológico, resultado inferior ao obtido por Langoni et al. (1999) que verificaram o isolamento bacteriano em 80,7% das éguas com endometrite clinicamente confirmada. Esse achado pode ser justificado pelo fato de que 39 (60,9%) éguas não apresentavam histórico de endometrite. Das 25 éguas suspeitas de endometrite isolou-se o agente em 17 (68,0%). Jacob et al. (2002) discutiram que o isolamento de determinado

microrganismo no útero não representa necessariamente, a presença de endometrite porque ocorrem resultados falsos positivos devido à possibilidade de contaminação ambiental quando da colheita do material.

Tabela 1 - Frequência absoluta (F.A) e relativa (F.R) dos exames microbiológicos realizados em éguas no estro na Zona da Mata e Agreste do Estado de Pernambuco, 2006

Microorganismos Isolados	F.A.	F.R. (%)
Negativo	23	35,6
<i>Escherichia coli</i>	13	20,4
<i>Klebsiella</i> sp	07	10,9
<i>Shigella</i> sp	07	10,9
<i>Staphylococcus</i> sp	02	3,1
<i>Escherichia coli</i> + <i>Shigella</i> sp	02	3,1
<i>Corynebacterium</i> sp	01	1,6
<i>Citrobacter</i> sp	01	1,6
<i>Bacillus</i> sp	01	1,6
<i>Enterobacter</i> sp	01	1,6
<i>Edwardsiella</i> sp	01	1,6
<i>Escherichia coli</i> + <i>Klebsiella</i> sp	01	1,6
<i>Escherichia coli</i> + <i>Staphylococcus</i> sp	01	1,6
<i>Staphylococcus</i> sp + <i>Shigella</i> sp	01	1,6
<i>Streptococcus</i> sp + <i>Citrobacter</i> sp	01	1,6
<i>Corynebacterium</i> sp + <i>Klebsiella</i> sp	01	1,6
TOTAL	64	100,0

O percentual de amostras negativas 23 (35,6%) também foi inferior ao encontrado por Langoni et al. (1999) que relataram 45,1% de amostras negativas quando as culturas eram incubadas em condições aeróbicas. Contudo, estes autores obtiveram melhores resultados quando as amostras foram cultivadas em condições anaeróbicas concomitantes.

O microrganismo que apresentou maior frequência no isolamento foi

Escherichia coli (20,4%) seguido de *Klebsiella* sp (10,9%) e *Shigella* sp (10,9%). A alta ocorrência de agentes da família *Enterobacteriaceae*, com destaque para o isolamento de *Escherichia coli*, coincide com outros estudos nacionais e internacionais conduzidos na investigação da etiologia das endometrites eqüinas (MORENO et al., 1995; SILVA et al., 1999; ALBIHN et al., 2003).

A ocorrência desses agentes pode ser atribuída a fatores predisponentes, incluindo manobras ginecológicas inadequadas, utilização de instrumental contaminado em exames ginecológicos ou defeitos anatômicos (urovagina e pneumovagina) que favoreceram a veiculação de material fecal para o trato genital das éguas, como ressaltado por Threlfall e Immeegart (2000). Observou-se nesse estudo que 2,9% das éguas apresentavam defeitos anatômicos, como inclinação da vulva que, reconhecidamente, facilita a entrada desses microrganismos.

Streptococcus sp foi isolado em 1,6% das amostras e de acordo com McCue et al. (1991), Wittenbrink et al. (1997) e Langoni et al. (1999), esse é o microrganismo mais frequentemente isolado em casos de endometrite eqüina.

Apesar da baixa frequência de isolamento de *Staphylococcus* sp e *Bacillus* sp, estes podem, de acordo com Langoni et al. (1999) e Silva et al. (1999), estar envolvidos em casos de endometrite eqüina, contrariando as informações de McCue et al. (1991) que atribuem a presença desses microrganismos como contaminantes.

Outro achado importante neste estudo foi a constatação da associação de microrganismos em sete casos (10,9%). As infecções mistas podem agravar as lesões no endométrio, além dificultar o tratamento devido à variação de sensibilidade ao antimicrobiano utilizado que pode ocorrer.

O perfil de sensibilidade dos microrganismos isolados frente aos oito antibióticos utilizados encontra-se na Figura 1. Observou-se que a maioria dos microrganismos foi sensível a gentamicina

(70%), corroborando com os resultados obtidos por Silva et al. (1999) e Langoni et al. (1999).

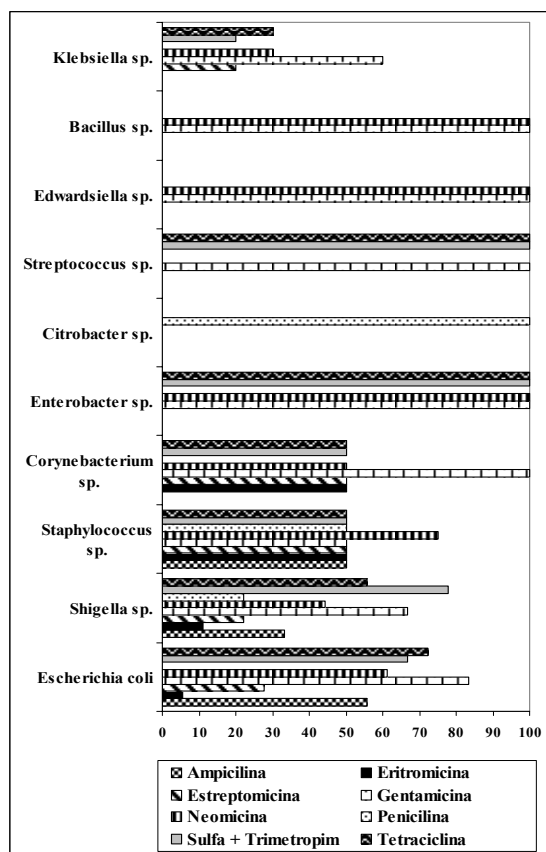


Figura 1 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos microrganismos isolados de éguas no estro na Zona da Mata do Estado de Pernambuco, 2006

O perfil de resistência dos microrganismos isolados dos casos de endometrite, frente aos oito antibióticos utilizados, encontra-se na Figura 2. Os isolados apresentaram, em média, 73,83% de resistência aos antimicrobianos testados. Aguiar et al. (2005) relataram 20% ou mais de resistência, confirmando a resistência múltipla na endometrite equina e indicando a necessidade de se conduzir uma terapia adequada, de acordo com os antibióticos que apresentarem um melhor resultado *in vitro*.

Observou-se ainda que a penicilina (100%), eritromicina (94,4%) e

estreptomicina (66,7%) apresentaram um elevado índice de resistência frente à *Escherichia coli*. Seis antibióticos (ampicilina, eritromicina, estreptomicina, neomicina, penicilina e tetraciclina) apresentaram um índice de resistência superior a 50% frente à *Shigella* sp. A média de resistência para todos os microrganismos isolados frente à penicilina, tetraciclina e sulfa + trimetoprim foi de 68,48%, com destaque para a penicilina, para a qual 93,0% dos antibióticos, como a ampicilina apresentou média de 100% de resistência frente a sete microrganismos diferentes. Esse resultado foi elevado quando comparado aos achados obtidos por Aguiar et al. (2005). Esses autores verificaram que, aproximadamente, 20% das bactérias eram resistentes para esses antimicrobianos. Ainda ressaltaram que essas drogas são de indicação clássica para a terapia de afecções uterinas, podendo, desta forma, comprometer o resultado do tratamento dessas éguas na região estudada.

Segundo Mota et al. (2005), a utilização indiscriminada de antibióticos no tratamento e prevenção de doenças é um problema de saúde animal e pública, uma vez que elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos são registrados em estudos realizados nas diferentes espécies animais e no homem.

Outro achado que merece destaque é a múltipla resistência (100%) observada para as bactérias *Citrobacter* sp, *Streptococcus* sp, *Edwardsiella* sp e *Bacillus* sp para cinco antibióticos testados. Segundo Claude et al. (1983) o uso freqüente de antibióticos, utilizados de forma empírica, pode resultar no desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos.

Gutierrez et al. (1990) destacam que é de extrema importância realizar o isolamento e a identificação dos agentes em laboratório como prova definitiva no diagnóstico das enfermidades além da realização dos testes de sensibilidade antimicrobiana. A adoção dessas medidas é fundamental para controlar a utilização de terapêutica adequada e promover

um decréscimo na resistência bacteriana frente aos antibióticos utilizados na terapêutica da endometrite.

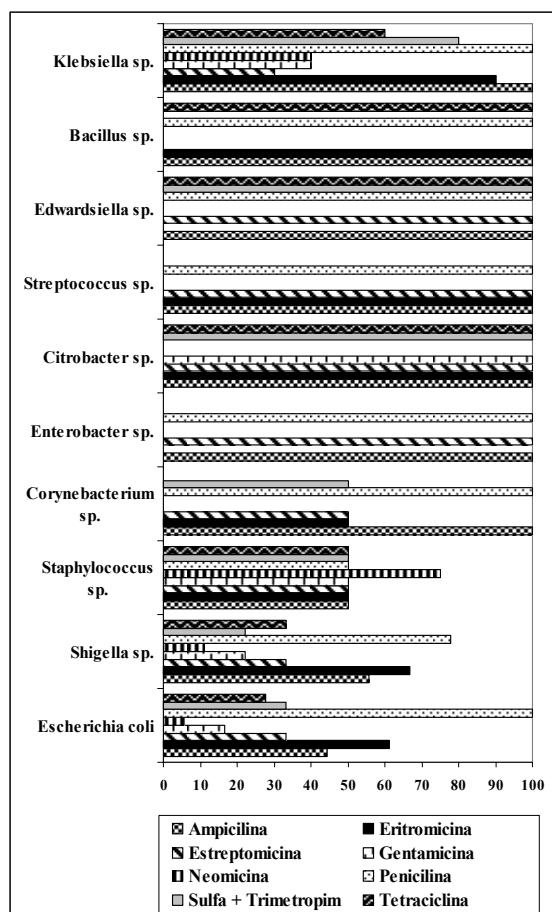


Figura 2 - Perfil de resistência antimicrobiana *in vitro* dos microrganismos isolados de éguas no estro na Zona da Mata do Estado de Pernambuco, 2006

Conclusão

Os resultados obtidos, quanto aos microrganismos isolados, indicam a necessidade da realização de manobras ginecológicas adequadas para evitar a contaminação uterina por agentes ambientais. Além disso, os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos ressaltam a importância de se realizar ensaios *in vitro* para a condução de uma terapêutica mais eficiente.

Referências

AGUIAR, D.N. et al. Etiologia e sensibilidade *in vitro* de microrganismos aeróbicos isolados de endometrite eqüina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.1, p. 107-109, 2005.

ALBIHN et al. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.44, p.121-129, 2003.

AMARAL, D. et al. Alterações no endométrio detectadas através de técnicas morfométricas e histoquímicas em relação à idade e ao ciclo estral em éguas PSI. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.3, p.197-199, 1999.

ASBURY, A.C. Failure of uterine defense mechanisms. In: ROBINSON, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine 2**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1987. 840p.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

CARTER, G. R. **Fundamentos da Bacteriologia e Micologia Veterinária**. São Paulo: Roca. 1988. 249p.

CLAUDE, A.B. et al. Endometrial levels of amikacin in the mare after intrauterine infusion of amikacin sulfate. **Theriogenology**, v.19, p.433-439, 1983.

DAY, F.T.; MILLER, W.C. A comparison of the efficiency of methods of diagnostic equine pregnancy, with special reference to the mucin test. **Veterinary Recorder**, v.52, p.711-716, 1940.

GUTIERREZ, L.M. et al. Incidence staphylococci in ovine mastitic milk and antibiotic susceptibility of the strains. **Milchwissenschaft**, v.45, p.778-781, 1990.

HURTGEN, J.P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. **Theriogenology**, v.66, p.560-566, 2006.

JACOB, J.C.F. et al. Susceptibilidade antimicrobiana de swab uterino e da fossa clitoriana de éguas com subfertilidade. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XII. 2002, Seropédica. **Anais...** XII Jornada de Iniciação Científica, 2002. p.12.

- JACOB, J.C.F. et al. Citologia x bacteriologia uterina: métodos complementares para diagnóstico da endometrite eqüina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.572-574, 2003.
- LANGONI, H. et al. Participação de bactérias aeróbicas, microaerófilas e anaeróbicas na endometrite eqüina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.1, p.44-51, 1999.
- MATTOS, R. C. et al. Endometritis in the mares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p. 15-19, 2003.
- McCUE, P.M. et al. Antimicrobial susceptibility patterns for equine endometrial isolates. **California Veterinarian**, v.1-2, p.23-26, 1991.
- MORENO, G. et al. Characterization of aerobic bacteria in the uterus and cervix of mares with suspected or clinical metritis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.5, p.633-639, 1995.
- MOTA et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição e multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.6, p.465-470, 2005.
- QUINN, P. J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**, London: Wolfe, 1994. 648p.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 185p.
- SILVA, N. et al. Isolamento e teste de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias em infecções uterinas de éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, p.213-216, 1999.
- SILVA, A.E. et al. **Criação de eqüinos: Manejo reprodutivo e da alimentação**. Brasília: Embrapa – SPI, 1998. 99p.
- THRELFALL, W.R.; IMMEGART, H.M. Doença uterina e tratamento. In: REEDM S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna eqüina**. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2000. p.666-671.
- ZAFRACAS, A.M. Candida infection of the genital tract in Thoroughbred mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.349-351, 1975.
- WHITTENBRINK, M.M. et al. Mechanisms of bacterial pathogenesis in equine endometritis. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.450-452, 1997.