

MICROBIOTA CÉRVICO-VAGINAL DURANTE O FINAL DE GESTAÇÃO E PUERPÉRIO EM VACAS GIROLANDO

ALEXANDRO ALUÍSIO ROCHA¹, MARIA LÚCIA GAMBARINI², MARIA AUXILIADORA ANDRADE³,
BENEDITO DIAS DE OLIVEIRA FILHO² E FREDERICO ARAÚJO GOMES⁴

1. Doutorando do programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto
2. Departamento de Produção Animal, Setor de Reprodução Animal, Escola de Veterinária/UFG, Campus II, CP 131, Goiânia, Goiás, CEP 74001-970, mlgambarini@hotmail.com
3. Departamento de Medicina Veterinária, EV/UFG
4. Graduando em Medicina Veterinária, EV/UFG

RESUMO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de verificar as alterações presentes na microbiota cérvico-vaginal durante o final da gestação e o puerpério em vacas da raça Girolando. Para isso, no período compreendido entre 27 dias antes do parto e 58 dias após, foram realizados 117 cultivos bacteriológicos, oriundos de material colhido da região cérvico-vaginal a intervalos de 14 dias, com exceção do período compreendido entre o dia zero (parto) e o dia 2. Foram obtidos 101 isolamentos, constatando-se que as amostras negativas predominaram durante o período pré-parto (58,8%) e no final do puerpério (44%), mas que durante o período entre o parto e o 16º dia todas as amostras colhidas foram positivas ao cultivo e isolamento microbiano.

PALAVRAS-CHAVE: Bovinos, microbiota cérvico-vaginal, parto, puerpério.

Os agentes isolados foram: *Escherichia coli* (27,72%), *Staphylococcus coagulase negativa* (21,78%), *Staphylococcus coagulase positiva* (1,98%), *Streptococcus spp.* (19,80%), *Corynebacterium spp.* (7,92%), *Corynebacterium bovis* (3,98%), *Bacillus spp.* (6,98%), *Pseudomonas spp.* (3,96%), *Enterobacter aerogenes* (1,98%), *Actinomyces pyogenes* (1,98%), *Citrobacter freundii* (0,99%) e *Citrobacter amalonaticus* (0,99%). Amostras obtidas de fêmeas primíparas mostraram maior positividade, sugerindo sensibilidade alterada dessa categoria à contaminação do trato reprodutor por microrganismos no período subsequente ao parto.

SUMMARY

CERVICO-VAGINAL MICROBIOTA AROUND THE PARTURITION TIME

The present study was designed to evaluate the changes in the cervico-vaginal microbiota during the period between 27 days before until 58 days after parturition in 23 Girolando cows. The cervico-vaginal mucus was collected with 14 days intervals, except the period between the day of parturition and two days after. Bacteriological culture was performed for 117 samples and 101 isolations were achieved. Negative cultures were concentrated mainly during the period before parturition (58,8%) and the final of puerperium (44,4%), but from the day of parturition until the 16th day after all of the samples were positive for bacterial culture and isolation. The agents isolated were: *Escherichia*

coli (27,72%), *Staphylococcus coagulase negative* (21,78%), *Staphylococcus coagulase positive* (1,98%), *Streptococcus spp.* (19,80%), *Corynebacterium spp.* (7,92%), *Corynebacterium bovis* (3,98%), *Bacillus spp.* (6,98%), *Pseudomonas spp.* (3,96%), *Enterobacter aerogenes* (1,98%), *Actinomyces pyogenes* (1,98%), *Citrobacter freundii* (0,99%) and *Citrobacter amalonaticus* (0,99%). Primiparous females showed more positive samples during the time of puerperium, suggesting an association between the age of the animal and the sensitivity to bacterial colonization of the reproductive tract.

KEY WORDS: Bovine, cérvico-vaginal, microbiota, parturition, puerperium.

INTRODUÇÃO

As principais causas da baixa eficiência reprodutiva em fêmeas bovinas de aptidão leiteira são as infecções uterinas provocadas por agentes bacterianos durante o período pós-parto. Embora muitas fêmeas possuam defesa contra tais agentes, a contaminação do trato genital nesse período pode ser considerada normal. Alguns animais, no entanto, apresentam os mecanismos de defesa alterados, e pode ocorrer a multiplicação desses agentes no trato genital e, em decorrência disso, instalarem as infecções clínicas e subclínicas (BOUTERS & VANDESPLASSCHE, 1977).

As estimativas da incidência de problemas puerperais variam entre 3% e 30%, segundo a raça e manejo (FERREIRA, 1985). Uma consequência desse tipo de alteração e que muitas vezes passa despercebida é a infecção vaginal inespecífica, principalmente após o parto, levando à infertilidade. Para TORRES et al. (1994), a localização vulvar em ambiente externo pode favorecer a chegada de microrganismos à vagina e o estabelecimento de microbiota residente normal, originada da adaptação de agentes do trato gastrointestinal ao sistema genital feminino.

Embora algumas barreiras físicas impeçam que patógenos oportunistas colonizem o trato genital, as fêmeas podem se tornar susceptíveis aos microrganismos que passam pela cérvix e alcançam o útero. ELLIOT et al. (1968) afirmam que durante o período pós-parto ocorre a migração dos microrganismos presentes na vulva e vagina para a cérvix e útero. Os microrganismos habituais da vagina tornam-se patogênicos quando os animais apresentam o sistema imunológico comprometido, em decorrência do estresse causado por fatores variados tais como súbitas mudanças de temperatura, nutrição deficiente, final de gestação e parto (VERMA et al., 1994; LIANJUAN et al., 1995; KUNTZE & AURICH, 1995).

PAISLEY et al. (1986) afirmam que os microrganismos comumente isolados de amostras obtidas do trato reprodutor feminino são patógenos facultativos, tais como *Streptococcus* hemolíticos, corinebactérias, *Staphylococcus*, coliformes e Gram-negativos anaeróbios. Para KREPLIN (1990),

as bactérias anaeróbias facultativas e obrigatórias podem atuar sinergicamente, permitindo o crescimento e aumentando a patogenicidade.

A tendência de queda no número de isolamentos positivos no decorrer do puerpério ocorre pela eliminação espontânea dos microrganismos pelas contrações uterinas e secreções glandulares, atividade fagocitária, aumento nos níveis de enzimas lisossomais com efeito bactericida no fluido uterino, contínua involução uterina e fechamento da cérvix (HUSSAIN et al., 1990; KUNZ et al., 2002).

Sob condições normais, a microbiota vaginal apresenta composição e número variável, e os microrganismos encontrados estão presentes também na pele e fezes, com propriedades invasivas, podendo estar em pequeno número no útero de vacas sadias. As vacas não sofrem contaminações contínuas com tais agentes, porém estes colonizam o trato genital se houver oportunidade. Após o parto, a microbiota vaginal pode invadir o útero, através da cérvix, que está parcialmente aberta em decorrência da ação dos estrógenos liberados durante o parto. Grande parte das bactérias isoladas de conteúdo vaginal constitui-se de bastonetes Gram-negativos provenientes do trato gastrointestinal (TGI), especialmente *Escherichia coli* e Gram-positivos como *Streptococcus spp.* (RAMASWAMY et al., 1991; SHARDA et al., 1991; BALASSU et al., 1992; CAMPERO et al., 1992; ARTHUR et al., 1996; KUNZ et al., 2002).

Com base nessas informações, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a evolução da microbiota presente no conteúdo cérvico-vaginal de vacas durante o período final de gestação e após o parto, para subsidiar pesquisas das alterações na saúde genital durante o puerpério de vacas Girolando.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas propriedades rurais localizadas no município de Goiânia, estado de Goiás, Região Centro-Oeste, clima tropical de savana, megaarmético segundo a classificação de Kröppen. As propriedades A e B selecionadas produziam em média 150 litros de leite/dia, com características similares em relação ao manejo

reprodutivo, manejo nutricional, número de fêmeas em produção e controle sanitário, e foram incluídas no estudo em virtude do número de vacas gestantes.

Vinte e três vacas (treze múltíparas e dez primíparas) foram acompanhadas durante 85 dias, sendo catorze animais na propriedade A e nove na propriedade B, escolhidas do total de fêmeas gestantes por apresentarem idade gestacional similar (230-240 dias). As amostras de conteúdo cervico-vaginal foram colhidas em intervalos de catorze dias, com exceção do período compreendido entre o dia zero e dois dias pós-parto. Foram utilizadas zaragatoas confeccionadas com algodão hidrófilo esterilizado e umedecidas em solução fisiológica. Para a realização das colheitas procedia-se à higienização seca da região perineal com papel-toalha, efetuava-se a abertura dos lábios vulvares e introduzia-se o espéculo tubular através da vagina, sendo a zaragatoa conduzida até o fundo de saco vaginal, realizando-se então movimentos de rotação visando obter maior quantidade possível de material. Para cada dia de colheita dez espéculos tubulares eram disponibilizados, todos devidamente autoclavados e mantidos no invólucro de papel até o momento de sua utilização.

Imediatamente após a colheita o material era acondicionado em tubo de vidro esterilizado e levado ao Laboratório de Microbiologia da Escola de Veterinária/UFG para realização de cultivos bacteriológicos. Para o isolamento e a identificação das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas seguiu-se a metodologia descrita por BARON et al. (1994).

O período experimental para todas as fêmeas estudadas foi iniciado no 27º dia da fase pré-parto, finalizando no 58º dia do puerpério. Para melhor ilustração, a fase pré-parto foi representada por Algarismos negativos (-27, -13), o dia do parto por "0" (zero) e a fase pós-parto por Algarismos positivos (+2, +16, +30, +44, +58).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 117 culturas bacteriológicas foram obtidos 101 isolados; os microrganismos mais frequentes foram os mesmos encontrados em vacas portadoras de cervicite e vaginite (RAMASWANY et al. 1991;

SHARDA, 1991; CAMPERO et al. 1992), o que pode ser sugestivo de que para o estabelecimento de processos infecciosos nesta região a alteração do ambiente vaginal é mais importante que o tipo de microrganismo.

Os agentes encontrados foram *Escherichia coli* (27,72%), *Staphylococcus coagulase negativa* (21,78%), *Streptococcus spp.* (19,80%), *Corynebacterium spp* (7,92%), *Bacillus spp.* (6,98%), *Pseudomonas spp.* (3,96%), *Corynebacterium bovis* (3,98%), *Staphylococcus coagulase positiva* (1,98%), *Enterobacter aerogenes* (1,98%), *Actinomyces pyogenes* (1,98%), *Citrobacter freundii* (0,99%) e *Citrobacter amalonaticus* (0,99%). Entre os dias -27 e -13 foi possível identificar seis agentes, na seguinte frequência: (2) *Streptococcus spp*; (1) *Escherichia coli*; (1) *Corynebacterium bovis*; (1) *Corynebacterium spp*; (1) *Staphylococcus coagulase negativa*; (1) *Citrobacter freundii*. No intervalo seguinte (-13 a 0) houve aumento da frequência de isolamentos: (4) *Escherichia coli*; (1) *Streptococcus spp*; (2) *Staphylococcus coagulase negativa*; (1) *Corynebacterium spp* (1) *Bacillus spp*. A presença desses agentes foi relatada também por DELDAR et al. (1984) e BALASSU et al. (1992), para o mesmo período estudado.

A fase compreendida entre o dia do parto (0) e o dia +2 foi caracterizada pela obtenção dos seguintes microrganismos: (8) *Escherichia coli*; (6) *Staphylococcus coagulase negativa*; (2) *Staphylococcus coagulase positiva*; (1) *Streptococcus spp*; (1) *Bacillus spp*; (1) *Pseudomonas spp* e (1) *Actinomyces pyogens*, confirmando as afirmações de ELLIOT et al. (1968), ZEMJANIS (1986), PAISLEY et al. (1986) e KUNZ et al. (2002), de que o sistema genital feminino durante o puerpério oferece condições adequadas à chegada e instalação de inúmeros agentes bacterianos. Cofirmam também os achados de TORRES et al. (1994), VERMA et al. (1994) e LIANJUAN et al. (1995), com exceção de *Pseudomonas spp* e *Actinomyces pyogenes*, que não foram encontrados pelos autores citados.

A microbiota presente na vagina, em especial na porção cervico-vaginal, durante o período imediatamente posterior ao parto, pode refletir o grau

de contaminação uterino, pois com a abertura cervical a constituição do conteúdo torna-se muito semelhante para útero, cérvix e vagina. *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Actynomices pyogenes* são considerados habitantes da vulva, vagina, pele e trato gastrointestinal, mas possuem propriedades invasivas, segundo OLIVEIRA (1995). A presença de *Streptococcus spp*, principalmente associado a outros microrganismos, pode favorecer a proliferação de bactérias de maior patogenicidade, pois estes produzem penicilinase e protegem outros agentes (PANANGALA et al., 1978; KREPLIN, 1990). Deve-se ressaltar que a *Pseudomonas spp*, quando instalada no útero, conduz à ocorrência de metrite severa (GUERREIRO, 1984; CARTER, 1988).

O período entre +3 a +16 dias foi caracterizado por maior percentual de isolamentos positivos durante todo o experimento, confirmando os dados relatados por HUSSAIN et al. (1990), que citam maior frequência de isolamentos positivos durante a segunda semana do puerpério. Nas amostras positivas foram identificados os seguintes agentes bacterianos: (8) *Streptococcus spp*; (3) *Staphylococcus coagulase negativa*; (3) *Escherichia coli*; (2) *Pseudomonas spp*; (1) *Corynebacterium spp*; (1) *Citrobacter amalonaticus*; (1) *Bacillus spp*.

Em comparação ao período entre os dias 0 e +2, a frequência de isolamentos foi modificada, pois neste houve predominância de *Escherichia coli*, e no intervalo de +3 a +16 a frequência foi maior para *Streptococcus spp*. Observações semelhantes foram feitas para conteúdo uterino na mesma fase, com maior frequência de Gram - imediatamente após o parto e posterior predominância de agentes Gram + (HUSSAIN & DANIEL, 1992). Tais resultados discordam, no entanto, dos obtidos por TORRES et al. (1994), que não observaram esse padrão tanto para os isolamentos de conteúdo vaginal quanto uterino.

Para KUNTZE & AURICH (1995), as enterobactérias predominam na vagina e vulva pela contaminação originada do TGI, causando processos infecciosos e deslocamento de leucócitos granulócitos

para os tecidos. Posteriormente predominam as bactérias Gram-positivas, principalmente *Streptococcus spp* e *Staphylococcus coagulase negativa*, que são agentes originários da pele e mucosas. Para CARTER (1988), o *Streptococcus spp*. pode causar infecções locais inaparentes e destruir os leucócitos locais, impedindo a primeira linha de defesa celular local.

Em duas fêmeas múltiplas foi possível isolar *Pseudomonas spp*. em cultura pura, o que pode sinalizar maior patogenicidade (CARTER, 1988), mas a avaliação clínica não evidenciou a presença de infecção severa.

No intervalo de +16 a +30 dias verificou-se maior percentagem de amostras negativas (21,4%), e aquelas positivas para bacteriologia mostraram os seguintes agentes: (5) *Staphylococcus coagulase negativa*; (2) *Streptococcus spp*; (2) *Corynebacterium spp*; (3) *Escherichia coli*; (1) *Pseudomonas spp*; (1) *Enterobacter aerogenes*. HUSSAIN et al. (1990) também relatam maior frequência de isolamentos bacterianos entre a primeira e a segunda semana após o parto. Isso pode evidenciar que os agentes bacterianos presentes no sistema genital feminino atingiram sua maior taxa de crescimento entre seis e quatorze dias após o parto, sugerindo que a progressão da involução uterina favorece a eliminação de bactérias como coliformes e aquelas que colonizam acidentalmente o útero, não impedindo, porém, que permaneçam na mucosa vaginal.

Nos dois períodos seguintes (+30 a +44 e +44 até +58 dias), as culturas de conteúdo cérvico-vaginal apresentaram, nas amostras positivas, os seguintes agentes: (6) *Escherichia coli*; (3) *Corynebacterium spp*; (1) *Corynebacterium bovis*; (3) *Streptococcus spp*; (1) *Staphylococcus coagulase negativa*; (1) *Bacillus spp*; (1) *Enterobacter aerogenes*, com aumento do número de amostras negativas (29,4%) em relação ao período anterior, e predominância de *Escherichia coli* e das corinebactérias. TORRES et al. (1994) verificaram que a *Escherichia coli* foi o agente mais frequente nesse período, tanto para as amostras vaginais quanto uterinas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a evolução da microbiota cérvico-vaginal pode ser caracterizada por queda no número de isolamentos bacterianos com o avançar do puerpério, evidenciando que as características microbiológicas temporais do fundo de saco vaginal podem refletir a saúde genital de fêmeas bovinas, e constituem um importante parâmetro para estudar a microbiota uterina.

REFERÊNCIAS

- ARTHUR, G. H.; NOAKES, D. E.; PEARSON, H.; PARKINSON, T. J. **Veterinary reproduction & obstetrics**. 17.ed. London: W. B. Saunders Company, 1996.
- BALASSU, M. T.; TORRES, E. B.; VIZMANOS, M. F.C. Bacteriologic profile of the uterus and vagina of non-pregnant buffalo-cows. **Philadelphia Journal of Medicine**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 35-41, 1992.
- BARON, E. J.; PETERSON, L.R.; FINEGOLD, S.M. **Diagnostic microbiology**. 9.ed. St. Louis. Mosby, 1994.
- BOUTERS, R.; VANDEPLASSCHE, M. Post partum infection in cattle: diagnosis, preventive and curative treatment. **Journal of South Africa Veterinary Association**, v. 48, n. 4, p. 237-239, 1977.
- CAMPERO, C.M.; CONOSCIUTO, G.; ODRIOZOLA, E. Hallazgos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos en vaca lecheras, asociados con problemas reproductivos. **Revista Medicina Veterinaria Buenos Aires**, Buenos Aires, v. 72, n. 6, p. 264-272, 1992.
- CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.
- DELDAR, A.; NAYLOR, J. M.; BLOOM, J.C. Effects of *Escherichia coli* endotoxin on leukocyte and platelet counts, fibrinogen concentrations, and blood clotting in colostrums-fed and colostrums-deficient neonatal calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 4, 1984.
- ELLIOT, L.; McMAHON, K.J.; GIER, H.T.; MARION, G.B. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. **American Journal of Veterinary Research**, v. 29, n. 1, p. 77-81, 1968.
- FERREIRA, A.M. **Guia-diagnóstico de problemas reprodutivos em fêmeas bovinas**. Coronel Pacheco, MG: EMBRAPA- CNPGL, 1985. 49p. (EMBRAPA – CNPGL, Documento n. 20).
- GUERREIRO, M.G.; OLIVEIRA, S.J.;SARAIVA, D. **Bacteriologia especial com interesse em saúde animal e saúde pública**. Porto Alegre: Sulina, 1984.
- HUSSAIN, A.M.; DANIEL, R.C.W. Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows following normal and abnormal parturition. **Theriogenology**, v. 37, p. 1253-1267, 1992.
- HUSSAIN, A.M.; DANIEL, R.C.W.; O'BOYIE, D. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerparium in cows. **Theriogenology**, v. 34, n. 2, p. 291-302, 1990.
- KREPLIN, C.M. Infectious causes of reduced fertility in cattle. **Alberta Agriculture, Food and Rural Development**, v. 1, p. 31, 1990.
- KUNTZE, A.; AURICH, J. **Der Endometritis-Pyometra-Complex bei tieren**. Berlin: Gustav Fischer, 1995.
- KUNZ, T. L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; GALINDO, A .D.S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 8, p. 28-36, 2002.

LIANJUAN, M.; YUEMIN, L.; XUN-M. Microbial flora of the vagina of cows after parturition. **Chinese Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 25, n. 5, p. 26-7, 1995.[Abstract].

OLIVEIRA, S.J. **Guia bacteriológico prático**. Canoas: Ulbra, 1995.

PAISLEY, L. G.; MICKELSEN, W. D.; ANDERSON, P. B. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. **Theriogenology**, v. 25, n. 3, p. 353-81, mar. 1986.

PANANGALA, V.S.; FISH, N.A.; BARNUM, D.A. Microflora of the cervico-vaginal mucus of repeat breeder cows. **Canadian Veterinary Journal**, v. 19, p. 83-89, apr. 1978.

RAMASWAMY, V.; ANDREW, M.; ROY, P. Aerobic microbes of cervico-vaginal mucus from repeat breeders bovines and their antibiogram.

Singapore Veterinary Journal, v. 14-15, p. 60-65, 1991.

SHARDA, R.; MOGHE, M.N.; TANWANI, S.K. Antibiotic sensitivity pattern of bacteria isolated from repeat breeding animals. **Indian Veterinary Journal**, v. 68, p. 197-200, mar. 1991.

TORRES, E.B.; ENRIQUEZ, J.B.; VIZMANOS, M.F.C. Bacteriologic profile of the vagina and uterus of postpartum dairy cows. **Philadelfia Journal of Veterinary Medicine**, v. 31, n. 1, p. 1-4, 1994.

VERMA, H.K.; SHARMA, D.K.; KAUR, H.; DHABLAMA, D.C. A bacteriological study of repeat breeders cows and their treatment. **Indian Veterinary Journal**, v. 47, n. 6, p. 467-70, 1994.

ZEMJANIS, R. Repeat breeding on Conception failure Cattle. In: MORROW, D. (Ed.). **Current therapy in theriogenology**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986.