

DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITE EM VACAS REPETIDORAS DE ESTRO PROVENIENTES DE PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

ENDOMETRITIS DIAGNOSIS IN REPEAT BREEDER COWS FROM EMBRYO TRANSFER PROGRAMS

C. S. OLIVEIRA¹, L. Z. OLIVEIRA^{1*}, W. M. GONÇALVES², H. MAGALHÃES²,
F. Z. BRANDÃO³, L. A. G. NOGUEIRA³

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a técnica de lavagem uterina como método para colheita de material biológico destinado a pesquisa bacteriológica, para o diagnóstico de endometrite bacteriana; e estimar se a mesma representa uma causa significativa de falha reprodutiva em animais submetidos à colheita de embriões. Para tanto, foram selecionadas 20 fêmeas repetidoras de estro oriundas de programas de transferência de embriões, na ausência de sintomatologia clínica de afecções reprodutivas. As amostras dos lavados uterinos foram semeadas em sistemas de cultivo aeróbio e anaeróbio, e o sistema API Index® de classificação bioquímica foi utilizado para a identificação das bactérias. A técnica apresentou-se satisfatória, permitindo a recuperação de bactérias da flora uterina em 80% dos animais. Apesar de a prevalência de gêneros bacterianos grau III não relacionados à endometrites (55%) ter sido superior ($p<0.05$) à presença de bactérias patogênicas grau I (20%), o isolamento de bactérias descritas como causadoras de endometrite (grau I e II) foi possível em 50% dos animais avaliados, o que pode representar um importante fator para o declínio de fertilidade nestes indivíduos.

PALAVRAS-CHAVE: Vacas repetidoras de estro. Flora uterina. Cultivo bacteriológico. Endometrite.

SUMMARY

The aim of this work was evaluate the uterine flush as a method for biological material harvest and bacteriological isolation for endometritis diagnosis; and evaluate if subclinical endometritis represents a cause of reproductive failure in animals submitted to embryo transfer. For that, 20 repeat breeder females from embryo transfer programs, without reproductive pathologies symptoms, were selected for the experiment. The samples were sown in aerobic and anaerobic culture systems. Identification of isolated microorganisms was performed with API Index® classification system. The technique presented satisfactory results, allowing recovery of aerobic and anaerobic bacteria recognized as being part of uterine flora in 80% of the animals. Even if the presence of bacteria level III that are not normally associated with endometritis (55%) was superior ($p<0.05$) to pathogenic bacteria level I (20%), the isolation of bacteria that causes endometritis (level I and II) was carried out in 50% of the animals, and that might represent an important fertility decline factor.

KEY WORDS: Repeat breeders. Cow. Uterine flora. Bacteriological culture. Endometritis.

¹Depto. Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, UNESP. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n. CEP: 14884-900, Jaboticabal/SP.

* Autor para correspondência: leticiazoccolaro@yahoo.com.br.

²PESAGRO RIO – Niterói/RJ.

³UFF – Niterói/RJ.

INTRODUÇÃO

A fêmea repetidora de estro é definida por não se tornar gestante após três ou mais serviços associados a estro verdadeiro, na ausência de anormalidades detectáveis (ZEMJANIS, 1980). Em grandes rebanhos, fatores intrínsecos do animal como metrites, endometrites, cervicites e vaginites contribuem para 30% das causas de repetição de estro. Em sistemas intensivos de produção, entretanto, o monitoramento da detecção do estro, a qualidade do sêmen e a técnica de inseminação artificial são bem conduzidos, e a falha na concepção se deve principalmente aos fatores intrínsecos dos animais, incluindo infecções uterinas (KUNZ et al., 2002).

A endometrite subclínica caracteriza-se pela ausência de descarga vaginal e alterações vaginais ao exame clínico, tratando-se, portanto, de uma afecção de difícil diagnóstico pela ausência de achados clínicos e laboratoriais específicos (ECKERT et al., 2004). A inflamação do endométrio reduz o desempenho reprodutivo do animal, e traz como consequência o aumento do número de serviços por concepção e o decréscimo das taxas de prenhez, submissão e concepção (KASIMANICKAM et al., 2004).

Em programas de transferência de embriões, algumas doadoras apresentam declínio em sua fertilidade, deixando de apresentarem resultados satisfatórios na produção de embriões e prenhezes mesmo na ausência de sintomatologia clínica aparente de qualquer afecção. Acreditamos que uma das hipóteses para estas ocorrências seria a instalação de um quadro de endometrite bacteriana subclínica, facilitada pela manipulação excessiva do trato genital destes animais e administração exógena de hormônios.

O lavado uterino é uma ferramenta para colheita de amostra para bacteriologia, e foi descrito para este fim primeiramente por Ball et al. (1988). Segundo os autores, a técnica permite maior recuperação de bactérias patogênicas do que o suabe uterino por aumentar a abrangência em área da amostra endometrial e a concentração das bactérias durante a centrifugação.

Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a flora microbiana de vacas repetidoras de estro provenientes de programas de TE e fora do período pós-parto, utilizando-se o lavado uterino e cultivo bacteriológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte fêmeas bovinas (dez da raça Pardo Suíço e dez Girolando) que apresentavam elevado índice de retorno ao estro foram selecionadas para o experimento. Os animais apresentavam escore de condição corporal entre três e quatro considerando-se escala de um a cinco (EDMONSON et al., 1989), e não estavam no período pós-parto por pelo menos 180 dias. As fêmeas foram submetidas ao manejo de inseminação artificial por técnico habilitado por ao menos três vezes no período de 150 dias, quando manifestavam estro. Após, os animais vazios foram

selecionados e submetidos ao exame clínico geral e exame específico do aparelho genital feminino, composto por vaginoscopia e palpação transretal.

Os animais que não apresentaram nenhuma enfermidade aparente foram submetidos à lavagem uterina descrita por Ball et al. (1988) para obtenção de material biológico. No entanto, precauções foram tomadas para minimizar contaminações vaginais, que configuram uma limitação da técnica. O uso de camisa sanitária foi uma solução proposta para este fim.

Após anestesia epidural baixa com 2 a 4 mL de cloridrato de lidocaína 2% (Person, Eurofarma, Itapevi, Brasil), uma sonda de *Foley* (Solidor, São Paulo, Brasil), protegida por camisa sanitária (IMV Technologies, L'Aigle, França), foi inserida com auxílio de mandril universal estéril através da vulva. Após transposição do primeiro anel cervical, a camisa sanitária foi rompida, e a sonda de *Foley* introduzida através da cérvix e fixada na entrada do corpo uterino. Utilizando um equipo de três vias (Nutricell, Campinas, Brasil) em sistema fechado, foi infundido um volume de 100 a 300 mL de solução salina tamponada no lúmen uterino. Os cornos uterinos foram massageados, e a solução foi recuperada (mínimo de 30 mL) para cultivo bacteriológico. O material refrigerado (4-7° C) foi remetido ao laboratório de bacteriologia no tempo máximo de oito horas, para que fosse realizada a semeadura das amostras em sistemas de cultivo aeróbio e anaeróbio.

O processamento das amostras incluiu centrifugação a 1400 x g por 10 minutos. A recuperação do precipitado foi obtida com auxílio de uma pipeta *Pasteur*. A semeadura anaeróbica foi realizada primeiramente nos meios de cultura Tarozzi e Tioglicolato, após fervura por 15 minutos e resfriamento brusco com banho de gelo para retirada de ar. Os frascos foram lacrados com parafina e incubados em estufa a 37° C por 48 a 96 horas. A partir do crescimento bacteriano nos tubos, a amostra foi repicada para placas de Agar Tyga® (Agar Extrato de Levedura e Glicose), e acondicionadas em jarra de anaerobiose utilizando o sistema Aerogen® (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), por 48 a 96 horas a 37° C. A semeadura em aerobiose foi realizada utilizando primeiramente os meios Caldo Glicosado e Agar Simples, que foram incubados em estufa por 24 a 48 horas a 37° C. A partir do crescimento bacteriano nestes meios, as colônias foram repicadas para Agar Teague® e Agar Sangue. Os gêneros bacterianos isolados foram submetidos às provas bioquímicas do sistema de classificação API Index® (bioMérieux, Paris, França). As bactérias isoladas da flora uterina foram classificadas de acordo com o potencial de patogenicidade, segundo a classificação estabelecida por Sheldon et al. (2002): gêneros bacterianos do grupo 1, que compreende bactérias freqüentemente causadoras de endometrite (*Arcanobacterium pyogenes*, *Bacteroides asaccharolytica* e *Bacteroides capillosus*), do grupo 2, correspondente às bactérias que são causas infreqüentes de endometrite (*Bacillus* spp, *Peptostreptococcus assaccharolyticus*, *Peptostreptococcus* spp e *Staphylococcus* spp

coagulase-positivo) e do grupo 3 (*Clostridium* spp, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp e *Staphylococcus* spp coagulase-negativo), não reconhecidas como patógenos uterinos.

Para análise estatística da frequência dos três grupos bacterianos realizou-se o teste exato de Fisher, utilizando-se o programa INSTAT (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se a técnica de lavagem uterina para a colheita de material destinado a cultivo bacteriológico e pesquisou-se a presença de bactérias no útero de vacas repetidoras de estro provenientes de programas de transferência de embriões.

Os resultados obtidos demonstraram que a coleta de material biológico por lavado uterino prestou-se para a pesquisa de flora bacteriana uterina, uma vez que propiciou o isolamento e a sobrevivência de bactérias aeróbias e/ou anaeróbias, pois 80% das vacas (16/20) repetidoras de estro apresentaram isolamento de bactérias. As bactérias encontradas e sua prevalência nos 20 animais estudados foram: *Arcanobacterium pyogenes* (10%), *Bacillus* spp (30%), *Bacteroides asaccharolytica* (5%), *Bacteroides capillosus* (5%), *Clostridium* spp (5%), *Enterobacter* spp (5%), *Klebsiella* spp (5%), *Peptostreptococcus assaccharolyticus* (5%), *Peptostreptococcus* spp (5%), *Pseudomonas* spp (5%), *Staphylococcus* spp coagulase-negativo (45%), e *Staphylococcus* spp coagulase-positivo (5%).

A síndrome de repetição de estro ocasiona prejuízos à eficiência reprodutiva da propriedade, e pode ser desencadeada por diversos fatores (ECKERT et al., 2004). Uma das hipóteses proposta para a instalação desta síndrome é a colonização do ambiente uterino por bactérias patogênicas, que causam inflamação do endométrio na ausência de sintomatologia, caracterizando-se assim a endometrite subclínica (KASIMANICKAM et al., 2004).

Conforme classificação proposta por Sheldon et al. (2002), gêneros bacterianos do grupo 1 foram encontrados em 20% (4/20) dos animais, associados ou não a outras bactérias; os do grupo 2 em 40% (8/20) dos animais pesquisados e os do grupo 3 em 55% (11/20) dos animais, estando presentes em 68,75% (11/16) dos animais positivos. O lume uterino consiste em um ambiente estéril, podendo ser colonizado por bactérias patogênicas provenientes da flora vaginal ou por patógenos ambientais. Porém, o útero saudável é capaz de controlar tais infecções transitórias com bastante eficácia, principalmente pela ação fagocítica dos leucócitos uterinos sobre as bactérias (GILBERT et al., 2004). A falha dos mecanismos de defesa uterinos e a presença de bactérias altamente patogênicas podem determinar a persistência da infecção e o estabelecimento de um quadro de endometrite (DHALIWAL et al., 2001). No presente trabalho, 50% (10/20) dos animais estudados apresentaram bactérias dos grupos 1 e 2 relacionados a afecções uterinas, o que pode sugerir a instalação de endometrite na ausência de sintomatologia aparente (endometrite

subclínica). Em contrapartida, tipos bacterianos do grupo 3 não associados às afecções uterinas foram observados concomitantemente ou não aos tipos bacterianos dos grupos 1 e 2. De acordo com a análise estatística, observou-se diferença ($P < 0,05$) entre a prevalência de bactérias do grupo 1 e a prevalência de bactérias do grupo 3. Na Figura 1 observa-se a frequência dos três grupos bacterianos (SHELDON et al., 2002) nos animais analisados.

Este achado sugere que colonização bacteriana do ambiente uterino das vacas repetidoras de estro avaliadas, está principalmente relacionada à presença de bactérias não conhecidas como patógenos uterinos. Apesar da presença de bactérias do grupo 3 não ser considerada como um indicio de endometrite, estas podem também exercer influência negativa na concepção dos animais por alterarem o microambiente (GILBERT et al., 2004). Assim, a presença de bactérias patogênicas, associada à falha dos mecanismos de defesa, poderia estar estabelecendo um quadro de endometrite, exercendo assim efeito negativo na fertilidade da fêmea por alterações do microambiente uterino e/ou infecção embrionária (DHALIWAL et al., 2001).

Diante do exposto concluiu-se que nas vacas repetidoras de estro a colonização do lume uterino por bactérias patogênicas ocorre com frequência de 20%, podendo provocar alterações no ambiente uterino, favorecendo a instalação de outros patógenos e/ou ocasionando prejuízos à sobrevivência dos gametas, à fecundação, e à sobrevivência do embrião.

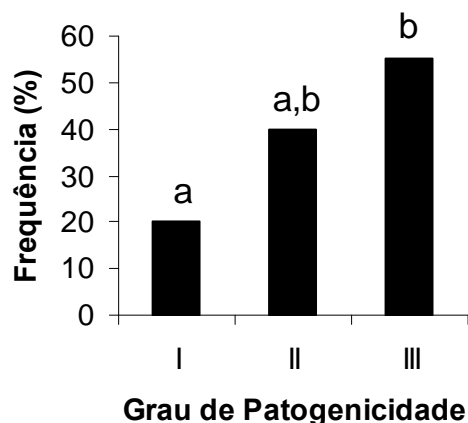


Figura 1 – Frequência dos três grupos bacterianos (classificados de acordo com grau de patogenicidade) observada após lavado uterino em 20 vacas repetidoras de estro. (Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística pelo teste de Fisher a 5%)

REFERÊNCIAS

BALL, B. A., SHIN, S. J., PATTERN, V. H., LEIN, D. H., WOODS, G. L. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology*, v.29, n.6, p.1269-1283, 1988.

DHALIWAL, G. S., MURRAY, R. D., WOLDEHIWET, Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. **Animal Reproduction Science**, v.67, n.3-4, p.135-152, 2001.

ECKERT, L. O., THWIN, S. S., HILLIER, S. L., KIVIAT, N. B., ESCHENBACH, D. A. The antimicrobial treatment of subacute endometritis: A proof of concept study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.190, n.2, p.305-313, 2004.

EDMONSON, A. J., LEAN, I. J., WEAVER, L. D., FARVER, T., WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.1, p.68-78, 1989.

GILBERT, R. O. Uterine disease in the postpartum period. In. 15TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2004, Porto Seguro. **Workshop Communications**, Porto Seguro, 2004. p.66-73.

KASIMANICKAM, R., DUFFIELD, T. F., FOSTER, R. A., GARTLEY, C. J., LESLIE, K. E., WALTON, J. S., JOHNSON, W. H. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v.62, n.1, p.9-23, 2004.

KUNZ, T. L., GAMBARINI, M. L., OLIVEIRA FILHO, B. D., GALINDO, A. D. S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. **Revista CFMV**, v.8, n.26, p.28-36, 2002.

SHELDON, I. M., NOAKES, D. E., RYCROFT, A. N., PFEIFFER, D. U., DOBSON, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, v.123, p.837-845, 2002.

ZEMJANIS, R. Repeat-breeding or conception failure in cattle. In:___ MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders. 1980, p.205-213.