

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

GABRIELLE MARCONDES

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CANAL VAGINAL E DE DISPOSITIVOS  
INTRAVAGINAIS DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA EMPREGADOS  
EM FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A UM PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

PONTA GROSSA  
2019

GABRIELLE MARCONDES

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CANAL VAGINAL E DE DISPOSITIVOS  
INTRAVAGINAIS DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA EMPREGADOS  
EM FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A UM PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do título  
de graduação de Bacharel em Zootecnia, na  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana da Silva Leal  
Karolewski

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ester Moura Rios

PONTA GROSSA

2019

GABRIELLE MARCONDES

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CANAL VAGINAL E DE DISPOSITIVOS  
INTRAVAGINAIS DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA EMPREGADOS EM  
FÊMEAS BOVINAS SUBMETIDAS A UM PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de graduação de Bacharel em Zootecnia, na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ponta Grossa, 26 de junho de 2019.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana da Silva Leal Karolewski  
Doutora em Medicina Veterinária  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ester Moura Rios  
Doutora em Agronomia  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Juliano Issakowicz  
Doutor em Ciência Animal  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

**AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ser meu porto seguro, meu abrigo, meu tudo! Sem Ele eu não seria quem sou, e jamais teria chegado até aqui;

Aos meus pais e amores Luís e Silvana Marcondes, por não medirem esforços para que eu concluísse todas as importantes etapas da minha vida, por todo suporte, carinho e palavras que me impulsionaram e me encorajaram a atingir meus objetivos;

A minha Orientadora Luciana da Silva Leal Karolewski, por toda a ajuda, paciência e tempo dedicado a esse trabalho. Sem sua orientação nada disso seria possível; também a minha Coorientadora Ester Moura Rios por todo o conhecimento compartilhado e suporte durante este trabalho;

Ao grupo de Microbiologia, em especial a Fernanda Antunes Martins e a Valquíria Nanuncio Chochel por toda a ajuda nas atividades em laboratório;

A Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Instituto Agronômico do Paraná sem os quais este experimento não teria sido executado;

Por fim, a minha família e amigos, que me ajudaram a enfrentar esse período de graduação e TCC.

Minha conquista é de vocês!

**RESUMO**

Objetivou-se determinar se os dispositivos intravaginais consistem em um meio potencial para a contaminação e a proliferação de bactérias, em fêmeas bovinas. O experimento foi realizado na Fazenda Modelo – IAPAR, utilizando-se 29 fêmeas, divididas em: nulíparas (n=10), primíparas (n=9) e pluríparas (n=10) submetidas a um programa de IATF. Usando *swabs* estéreis, foram colhidas amostras da parede vaginal (antes da inserção do dispositivo) e do dispositivo (antes do uso); oito dias depois (no momento da remoção dos dispositivos) foi realizada novamente a colheita de amostras nas mesmas regiões. As amostras foram distribuídas em meios de cultura; após o crescimento, as colônias foram caracterizadas e a coloração de Gram foi feita nas principais colônias isoladas. Os dados foram submetidos à estatística descritiva, com o cálculo dos percentuais considerando o isolamento em cada meio de cultura e os resultados no método de Gram. Para comparar o número de colônias contadas segundo o grupo de animais, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Observou-se uma alteração qualitativa e quantitativa na microbiota nativas das fêmeas, além disso, foi observado também um aumento de enterobactérias isoladas da vagina, após a retirada do dispositivo, nas três categorias analisadas. As nulíparas apresentaram esse aumento significativo, demonstrando que essas fêmeas ficaram mais susceptíveis à contaminação por enterobactérias. Os microrganismos mais isolados nas três categorias foram *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*. Não houve isolamento microbiano nos dispositivos antes do uso. Conclui-se que o uso dos dispositivos intravaginais consistem em um meio potencial para proliferação de bactérias com potencial patogênico (enterobactérias) no canal vaginal dos animais.

**Palavras-chave:** Antibiograma. Enterobactérias. Reprodução animal. Vaginite.

## ABSTRACT

The objective of this study was to determine if the intravaginal devices consisted in a potential medium for the contamination and proliferation of bacteria, in bovine females. The experiment was carried out at the Model Farm - IAPAR, using 29 females, divided into: nulliparous (n=10), primiparous (n=9) and pluriparous (n=10) submitted to a FTAI program. Using swabs, samples were collected from the vaginal wall (before insertion of the device) and from the intravaginal device (before use); eight days later (at the moment of removal of the devices) the samples were collected again from the same regions. The samples were distributed in culture mediums; after growth, the colonies were characterized and Gram staining was done in the main isolated colonies. The data were submitted to descriptive statistics, with the percentage considering the growth in each culture medium and the results in the Gram method. To compare the number of colonies counted according to the group of animals, the averages were compared by the Tukey's test, at 5% of significance. A qualitative and quantitative change was observed in the native microbiota of the females, in addition, it was also observed an increase of enterobacteria from the vagina, after withdrawal of the devices, was observed in the three categories analyzed. The nulliparous presented the significant increase, demonstrating that these females were more susceptible to enterobacterial contamination. The most isolated microorganisms in the three categories were *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli*. There was no microbial isolation in the devices before use them. It is concluded that the use of intravaginal devices consist of a potential medium for bacterial proliferation with pathogenic potential (enterobacteria) in the vaginal canal of the animals.

**Keywords:** Antibiogram. Enterobacteria. Animal reproduction. Vaginitis.

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** – Médias de log UFC mL<sup>-1</sup> isoladas do canal vaginal de fêmeas bovinas de corte, antes da inserção dos dispositivos, nos diferentes meios de cultura. Estação Experimental Fazenda Modelo, Ponta Grossa/PR, 2019.....14

**TABELA 2** – Médias de log UFC mL<sup>-1</sup> isoladas do canal vaginal de fêmeas bovinas de corte, depois da inserção dos dispositivos, nos diferentes meios de cultura. Estação Experimental Fazenda Modelo, Ponta Grossa/PR, 2019.....15

**TABELA 3** – Frequências de microrganismos Gram positivos, Gram negativos e fungos presentes no canal vaginal de fêmeas bovinas de corte, antes e após a aplicação dos dispositivos intravaginais. Estação Experimental Fazenda Modelo, Ponta Grossa/PR, 2019.....16

**TABELA 4** – Frequências de microrganismos, segundo a família, que predominaram no canal vaginal de fêmeas bovinas de corte, antes e após aplicação dos dispositivos intravaginais. Estação Experimental Fazenda Modelo, Ponta Grossa/PR, 2019.....18

**TABELA 5** – Percentual de sensibilidade das principais bactérias Gram+ e Gram- aos antimicrobianos testados, Ponta Grossa/PR, 2019.....24

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
2.1 Local do experimento.....	11
2.2 Animais e coleta das amostras.....	11
2.3 Processamento das amostras.....	12
2.4 Testes bioquímicos.....	12
2.5 Análise estatística.....	13
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>14</b>
3.1 Contagem bacteriana nas categorias de fêmeas bovinas segundo os meios de cultura, antes e após o uso dos dispositivos intravaginais.....	14
3.2 Frequência de microrganismos Gram positivos e negativos e fungos no canal vaginal de fêmeas bovinas antes e após o uso dos dispositivos.....	15
3.3 Famílias bacterianas predominantes.....	18
3.3.1 Staphylococcaceae.....	18
3.3.2 Enterobacteriaceae.....	20
3.4 Contagem bacteriana dos dispositivos intravaginais.....	23
3.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	24
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio no Brasil é de suma importância para a economia do país, representando cerca de 21,58% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. Dentro desse setor, a pecuária vem crescendo cada vez mais, e grande parte desse avanço é devido ao desenvolvimento em técnicas de criação do gado de corte que evoluíram tanto na produtividade quanto na qualidade do produto. Essas técnicas consistem em um aperfeiçoamento, principalmente dos manejos reprodutivo, nutricional e sanitário, além do avanço no melhoramento genético (CEPEA, 2017). No mercado da carne bovina atual, o Brasil se destaca como o maior exportador mundial e o segundo maior produtor (CARVALHO; ZEN, 2017). As exportações de carne bovina, em 2018, fecharam com 1,64 milhão de toneladas, 11% acima do volume exportado em 2017. Neste mesmo ano de 2018, foram 9,9 milhões de toneladas de carne produzidas (ABIEC, 2018). O rebanho total de cabeças de gado de corte ultrapassa a marca de 218 milhões (IBGE, 2017). Devido a esses índices crescentes, à grande demanda mundial por quantidade de carne e a alta exigência do mercado externo e interno pela qualidade do produto, é que se pode perceber a importância em se investir ainda mais em pesquisas e em novas tecnologias que melhorem o desempenho reprodutivo dos animais.

Uma das práticas de reprodução empregada nas criações de bovinos de corte e de leite é o programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), que dentre os objetivos principais está o fato de diminuir o intervalo entre partos das vacas e evitar erros cometidos na inseminação artificial comum, como as falhas na detecção do cio, podendo inseminar muitos animais em um mesmo período (PATTERSON, 2006). Dentro desse programa, utilizam-se hormônios (progesterona, estrógeno, prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$ , gonadotrofina coriônica equina), que induzem o ciclo estral das vacas (SÁ FILHO et al., 2010), melhorando assim os resultados reprodutivos.

O fornecimento da progesterona (P<sub>4</sub>) pode ser feito através de dispositivos intravaginais que apresentam como principal vantagem o fato de poderem ser reutilizados sem perdas na taxa de fertilidade das fêmeas, o que diminui os custos com o produto, além do aumento considerável nas taxas de prenhez (MOTLOMELO et al., 2002). Porém são necessários certos cuidados com o manejo dos dispositivos para poder reutilizá-los sem perdas na eficiência dos mesmos e também para evitar que sejam meios de contaminação microbiana e transmissão de possíveis doenças para as vacas (RAMOS, 2016).

Dentre os cuidados que devem ser tomados no manejo dos dispositivos está a necessidade de se realizar a correta desinfecção ou esterilização dos mesmos, pois de acordo com estudos realizados por Bazzan et al. (2013) podem ser reutilizados até três vezes, desde que estejam nas mesmas condições de higiene e limpeza de antes do primeiro uso, quando eram estéreis. Dentre os meios existentes de esterilização o calor é o mais eficiente. Estudo feito por Souza (2010) demonstrou que a esterilização por meio da autoclave não interfere na eficiência da reutilização do dispositivo; porém a aquisição de uma autoclave poderia não ser viável na maioria das propriedades, devido ao tempo longo de esterilização necessário e ao treinamento que deveria ser realizado antes do manuseio da autoclave. Para a desinfecção dos dispositivos deve-se lavá-los em água corrente, e colocá-los em um recipiente contendo dióxido de cloro ou iodopovidona a 10%, durante 15 minutos. Posteriormente seca-los e armazena-los na embalagem de origem deixando-os em local limpo e fresco até a reutilização (BRAGA, 2008).

No caso dos cuidados necessários com as fêmeas que receberão o implante, deve-se fazer a correta limpeza da vulva, a fim de se obter um ambiente higiênico o que diminui as chances de contaminação durante o processo, evitando, por exemplo, que restos fecais contaminem o local. Além disso, existem microrganismos que naturalmente habitam a vagina, e que não são classificados como patogênicos, mas em algumas situações específicas, podem causar alguma doença (MEDALHA et al. 2015; NASCIMENTO, 2015).

São várias as causas do aparecimento de doenças relacionadas à reprodução, provocadas pela redução da imunidade das fêmeas bovinas, tais como: deficiência nutricional, parto ou final da gestação, alterações muito grandes de temperatura ambiental e demais situações de estresse em que esses animais são submetidos (SILVA et al., 2011). Devido a essa queda na imunidade, é que os microrganismos, normalmente presentes no trato genital, podem tornar-se patogênicos, desencadeando doenças no animal e diminuindo sua eficiência reprodutiva.

O trabalho de Ramos (2016) apontou como um dos principais isolados das amostras do fundo vaginal, *Escherichia coli*, tanto antes da inserção dos dispositivos intravaginais, como também depois da retirada dos mesmos, além deste, *Proteus* spp. também teve grande frequência após a retirada do dispositivo. No mesmo estudo, *Staphylococcus* spp. foi o segundo microrganismo mais isolado da microbiota vaginal. Estudos de Vasconcelos et al. (2016) demonstraram uma grande frequência de *Staphylococcus* spp. na microbiota vaginal de ovelhas, antes de inserir os dispositivos, assim como Cesca e Bragança (2015), que

encontraram esse mesmo gênero de microrganismo no fundo vaginal também de ovelhas. No trabalho realizado por Rodrigues et al. (2015) foi feita uma associação entre a frequência microbiana normalmente encontrada na região vaginal com a frequência isolada em animais que apresentaram problemas reprodutivos. Dentre as que tiveram resultado positivo para essa associação, os grupos das famílias Bacteroidaceae e Enterobacteriaceae foram os mais isolados.

Em novilhas que receberam os dispositivos de P<sub>4</sub> foi verificada a presença de coliformes e *Streptococcus* spp. em 64% das amostras analisadas (FISCHER-TENHAGEN; VON KRUEGER; HEUWIESER, 2012). Já Cesca e Bragança (2015) relataram que no momento da retirada dos dispositivos novos, foram verificados agentes Gram-negativos em 100% das amostras, sendo a maioria pertencente ao gênero das Enterobactérias, já nos dispositivos reutilizados foram encontrados tanto Gram-negativos quanto positivos. *E. coli* tem sido relatado como um dos principais agentes presentes na região vulvovaginal de novilhas após o uso dos dispositivos analisadas (FISCHER-TENHAGEN; VON KRUEGER; HEUWIESER, 2012) e um dos responsáveis pelo desenvolvimento de vaginite (SHELDON et al., 2008).

A vaginite pode estar associada a uma infecção mais extensa do trato genital causada por agentes patogênicos ou não, que podem já estar presentes nesse local ou também podem ser transmitidos durante os protocolos de IATF. Esta doença pode se tornar evidente no momento da retirada do dispositivo (PENNA et al., 2013) e até evoluir para infecções uterinas, diminuindo também as taxas de prenhez (VASCONCELOS et al., 2016). Dentre os agentes causadores de vaginite, Andrews; Blowey e Eddy (2008) citaram como os principais: *Mycoplasma bovigenitalium*, *Ureaplasma diversum*, *Haemophilus somnus* e BHV 1 e BHV 4 (herpesvirus bovino), além desses, identificaram-se a presença de patógenos uterinos como *E. coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenica*, *Arcanobacterium pyogenes*, e algumas espécies de *Proteus* (RAMOS, 2016).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi determinar se os dispositivos intravaginais de liberação lenta de P<sub>4</sub> consistem em um meio potencial para a contaminação e a proliferação de microrganismos vaginais, quando empregados em fêmeas bovinas submetidas a um programa de IATF. Buscou-se avaliar também se houve mudança na microbiota vaginal nativa, entre as diferentes categorias animais analisadas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local do experimento

O experimento foi executado na Estação Experimental Fazenda Modelo – Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), localizada em Uvaranas - Ponta Grossa/ PR. O processamento das amostras e análises laboratoriais foram realizados no laboratório de Anatomia e Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia, Bloco Z, UEPG.

### 2.2 Animais e coleta das amostras

As coletas foram realizadas no período de agosto a setembro de 2018, acompanhando a rotina do programa de IATF empregado no IAPAR. Foi feito um estudo do perfil microbiano do canal vaginal de fêmeas bovinas e dos dispositivos intravaginais de liberação lenta de P<sub>4</sub> antes e após a inserção dos mesmos. Utilizou-se 29 fêmeas bovinas da raça Purunã e puras e cruzadas de suas raças de origem (Charolês, Caracu, Canchim, Aberdeen Angus) que fazem parte do rebanho de corte do IAPAR, selecionadas aleatoriamente, sadias e aptas à reprodução. As fêmeas selecionadas foram subdivididas em três categorias: nulíparas (que nunca pariram), primíparas (que pariram uma vez) e pluríparas (que pariram mais de uma vez). Foram 10 animais das categorias nulíparas e pluríparas, e 9 para a categoria primíparas. Os dispositivos utilizados foram da marca Sincrogest<sup>®</sup> - Ouro Fino.

Com o auxílio de *swab* estéril, foram colhidas amostras da parede vaginal (antes da inserção do dispositivo) e do dispositivo (antes do uso); oito dias depois, foi realizada novamente a coleta da amostra da parede vaginal (após a remoção do dispositivo) e do dispositivo (após a remoção). Antes da realização das coletas dos materiais microbiológicos do canal vaginal das fêmeas (antes da inserção do dispositivo) foi higienizada a região vulvar das mesmas, utilizando-se papel toalha. Enquanto uma pessoa auxiliava mantendo os lábios vulvares das fêmeas abertos (para evitar o contato do *swab* com a região externa) outra pessoa fazia a coleta da região mais interna. Para a coleta da amostra microbiológica do dispositivo, o *swab* era inserido dentro do pacote com os dispositivos, e friccionado naquele que iria ser inserido na fêmea. O mesmo procedimento foi repetido após oito dias. Foi empregado um *swab* para cada local e em cada momento, cuja ponta foi mergulhada em pequenos tubos de vidro de 10 mL, contendo salina (0,85% NaCl para 100 mL de água destilada), conservando assim, os microrganismos durante o transporte até o

laboratório.

### 2.3 Processamento das amostras

No laboratório, as amostras foram distribuídas em placas de Petri, com os meios de cultura previamente preparados e já prontos para serem utilizados. Os meios utilizados foram: ágar sangue (para crescimento geral dos microrganismos); ágar MacConkey (para isolamento de microrganismos Gram negativos), ágar manitol (para isolamento de microrganismos Gram positivos) e ágar fungo (para isolamento de fungos). A preparação dos meios de cultura foi de acordo com a indicação dos fabricantes.

Para a inoculação das amostras microbiológicas, o tubo de salina com o *swab* foi homogeneizado. Após isso foram pipetados 100 µl do líquido do tubo, dentro das placas de cada meio, e o conteúdo espalhado com a ajuda da alça de Drigalski, flambada e esfriada. Depois de inoculadas as amostras, as placas com os meios ágar sangue, ágar manitol e ágar MacConkey foram incubadas em estufa BOD, a uma temperatura média de 35<sup>0</sup>C, durante 24 a 48 horas para o crescimento de microrganismos; já as placas com o meio ágar fungo foram incubadas em estufa BOD a uma temperatura ambiente (25°C), por aproximadamente cinco dias.

Após o período na estufa, as placas em que houve crescimento foram separadas para realização da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e também a caracterização das mesmas. Tal caracterização foi de acordo com o formato, tamanho e cor de cada uma. Após isso, foi procedida a coloração de Gram das principais colônias isoladas em cada meio de cultura. A coloração de Gram foi realizada segundo indicações do fabricante (conjunto para a coloração de Gram – Laborclin). Realizou-se a análise da morfologia, do arranjo das colônias e da coloração em microscópio óptico (objetiva 100 x).

### 2.4 Testes bioquímicos

Foram realizados testes bioquímicos (catalase e oxidase) para os microrganismos mais predominantes. Tais testes ajudam a identificar *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Para o teste catalase (Peróxido de Hidrogênio 10V – Laborclin) era necessário coletar a colônia com a alça de platina, e transferi-la para uma lâmina, logo após adicionava-se uma gota de água oxigenada. Caso houvesse a presença imediata de bolhas, o teste catalase para aquela colônia era positivo, pois indicava a conversão de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em

água e oxigênio gasoso, confirmando ser *Staphylococcus* spp. Este teste foi realizado para colônias que cresceram em meio manitol (Gram positivo). Já o teste de oxidase auxilia na identificação de bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose, e para realizar esse teste era necessário utilizar fitas de oxidase (Tiras de Oxidase – Laborclin). Coletava-se a colônia do ágar MacConkey com ponteiros de plástico, e depositava na fita. Caso a coloração sofresse alteração da colônia para a cor mais escura, o teste oxidase para a colônia testada era positivo, se permanecesse na mesma cor, o teste oxidase para a colônia testada era negativo.

Para a identificação bioquímica das enterobactérias foi empregado o kit para enterobactérias da Laborclin. Foi realizado o teste para sensibilidade a antimicrobianos, e para tal foi seguido o Manual para Antibiograma (Laborclin) com o método de difusão em disco Kirby-Bauer (BAUER et al.,1966). Foram 12 antibióticos testados, para 21 tipos de microrganismos, sendo 9 tipos de Gram positivos e 12 tipos de Gram negativos. Juntamente ao antibiograma, realizou-se o teste coagulase (COAGU-PLASMA – Laborclin), cujo objetivo foi identificar se o *Staphylococcus* isolado é o *S. aureus*. Para a execução deste teste foi adotada as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004).

## 2.5 Análise estatística

Para a análise dos dados foi empregado o programa estatístico Minitab 18<sup>®</sup>. Os dados foram submetidos à estatística descritiva, com o cálculo dos percentuais considerando o isolamento em cada meio de cultura e os resultados no método de GRAM. Os números de colônias contabilizadas foram convertidas para log UFC mL<sup>-1</sup>. Para comparar o número de colônias contadas segundo o grupo de animais, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Os resultados do antibiograma foram descritos segundo a frequência (%) de sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos testados, assim sendo, foi realizada a estatística descritiva destes.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Contagem bacteriana nas categorias de fêmeas bovinas segundo os meios de cultura, antes e após o uso dos dispositivos intravaginais

A tabela 1 demonstra a contagem bacteriana média (log UFC mL<sup>-1</sup>) considerando as três categorias de animais avaliadas, no período antes da inserção dos dispositivos intravaginais.

**Tabela 1** – Médias de log UFC mL<sup>-1</sup> isoladas do canal vaginal de fêmeas bovinas de corte, antes da inserção dos dispositivos, nos diferentes meios de cultura. Estação Experimental Fazenda Modelo, Ponta Grossa/PR, 2019

MEIOS DE CULTURA	NULÍPARAS	PRIMÍPARAS	PLURÍPARAS
MACCONKEY	0,35	0,88	0,45
MANITOL	4,51 <sup>a*</sup>	3,09 <sup>ab</sup>	2,77 <sup>b</sup>
ÁGAR FUNGO	0,00	0,29	0,00

\*Médias que não compartilham uma letra na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05)

Fonte: A autora

De acordo com a tabela 1, não houve diferença significativa (P<0,05) para os microrganismos isolados do fundo vaginal nos diferentes meios, com exceção do meio ágar manitol. A categoria nulíparas teve média maior que as pluríparas e similar às primíparas, indicando que estas fêmeas tiveram em sua microbiota vaginal nativa maior contagem de microrganismos que crescem em ágar manitol (Gram positivos).

Os achados encontrados com relação aos Gram positivos isolados foram semelhantes ao observado por Bragança et al. (2017), que encontraram predomínio de bactérias Gram positivas na microbiota nativa de todas as fêmeas ovinas analisadas, no entanto, os resultados encontrados por Nascimento (2015) sugeriram que novilhas apresentam, antes da utilização dos dispositivos, menor carga bacteriana, além de menor variedade de isolados da região vaginal, o que diferiu do presente estudo.

A tabela 2 mostra a contagem bacteriana média (log UFC mL<sup>-1</sup>) considerando as três categorias de animais avaliadas, porém no período após a remoção dos dispositivos intravaginais.

**Tabela 2** – Médias de log UFC mL<sup>-1</sup> isoladas do canal vaginal de fêmeas bovinas de corte, depois da inserção dos dispositivos, nos diferentes meios de cultura. Estação Experimental Fazenda Modelo, Ponta Grossa/PR, 2019

MEIOS DE CULTURA	NULÍPARAS	PRIMÍPARAS	PLURÍPARAS
MACCONKEY	3,17	2,83	1,56
MANITOL	2,68	1,82	2,62
ÁGAR FUNGO	1,08 <sup>a*</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,23 <sup>ab</sup>

\*Médias que não compartilham uma letra na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05)

Fonte: A autora

Houve uma diferença em relação ao crescimento de fungos, após a retirada dos dispositivos, sendo que as nulíparas também tiveram maior média (P<0,05) de crescimento microbiano isolado em relação às primíparas e assemelhando-se às pluríparas (tabela 2). Nascimento (2015) também isolou fungos da região vaginal das vacas, sendo o gênero *Mycosphaerella* um dos mais abundantes. O mesmo autor citou como possível motivo para o isolamento de fungos a presença destes no solo e nas plantas, que por meio da ingestão destes pelos animais, passam a colonizar a vagina através do trato gastrointestinal. Essa colonização pode ter ocorrido devido a uma possível contaminação do dispositivo que teve contato com as fezes, durante o período em que esteve implantado nas fêmeas.

### 3.2 Frequência de microrganismos Gram positivos e negativos e fungos no canal vaginal de fêmeas bovinas antes e após o uso dos dispositivos

A seguir encontra-se a tabela 3, em que estão demonstradas as frequências (%) de microrganismos (bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos) que foram isolados do canal vaginal das fêmeas bovinas das diferentes categorias estudadas, antes da inserção dos dispositivos, e após sua remoção.

**Tabela 3** – Frequências de microrganismos Gram positivos, Gram negativos e fungos presentes no canal vaginal de fêmeas bovinas de corte, antes e após a aplicação dos dispositivos intravaginais. Estação Experimental Fazenda Modelo, Ponta Grossa/PR, 2019

	NULÍPARAS		PRIMÍPARAS		PLURÍPARAS	
	%		%		%	
	A*	D**	A	D	A	D
<b>GRAM +</b>	99,5	35,2	90,2	11,7	93,1	56,8
<b>GRAM -</b>	0,5	64,1	9,5	88,3	6,9	43,1
<b>FUNGOS</b>	0	0,7	0,3	0	0	0,1
<b>TOTAL</b>	100	100	100	100	100	100

\*A: Antes da inserção dos dispositivos

\*\*D: Depois da retirada dos dispositivos

**Fonte:** A autora

As nulíparas apresentaram o maior número de colônias isoladas do fundo vaginal antes da inserção dos dispositivos. Ao total foram  $6,6 \times 10^5$  isolados, sendo a grande maioria destes, bactérias Gram positivas (99,5%). Após a retirada dos dispositivos, o número total caiu para  $5,7 \times 10^5$ , e o crescimento predominante passou a ser de bactérias Gram negativas (64,1%).

Para a categoria primíparas, a mesma situação ocorreu, como consta na tabela 3, em que bactérias Gram positivas apresentaram predominância antes da utilização dos dispositivos (90,2%), e após a retirada dos mesmos, esse número diminuiu (11,7%), sendo a única categoria de fêmeas em que o total isolado aumentou após a retirada dos dispositivos, de  $2,0 \times 10^5$  para  $4,4 \times 10^5$ . A frequência de bactérias Gram negativas, que antes era de 9,5%, após a retirada dos dispositivos aumentou para 88,3%.

Nas pluríparas foram  $4,6 \times 10^5$  isolados antes da inserção dos dispositivos, sendo a maioria destes bactérias Gram positivas (93,1%), assim como nas outras categorias. Após a retirada dos dispositivos o total isolado foi de  $2,7 \times 10^5$ , dos quais, bactérias Gram negativas apresentaram um percentual de 43,1%. Apenas esta categoria continuou a apresentar predominância de bactérias Gram positivas após a retirada dos dispositivos (56,8%).

Com relação aos fungos, não houve crescimento antes da utilização dos dispositivos nas categorias nulíparas e pluríparas, e após a retirada dos mesmos o crescimento foi de 0,7%

e 0,1%, respectivamente. Nas primíparas, o crescimento foi maior no período antes da inserção (0,3%), e não foi observado crescimento após a retirada do dispositivo.

São poucos estudos existentes sobre a frequência de microrganismos isolados, tanto do fundo vaginal quanto dos dispositivos, de fêmeas bovinas de diferentes números de partos. Devido a isso são escassas as informações encontradas na literatura.

Vasconcelos et al. (2016) mostraram que 68,2% das amostras coletadas antes da inserção dos dispositivos eram de bactérias Gram positivas, especificamente *Staphylococcus* spp. Após a remoção dos dispositivos, 100% das ovelhas apresentaram sinais clínicos de vaginite, e analisando as amostras coletadas, 72,7% dos microrganismos eram Gram negativos, especificamente da família das Enterobactérias. Swartz et al. (2014) relataram que a microbiota de ovelhas e vacas se difere muito pouco, sendo assim, pode-se comparar os resultados anteriormente citados, aos achados do presente estudo, confirmando o aumento de bactérias Gram negativas após a remoção dos dispositivos. Estes mesmos autores descreveram que além dos fatores hormonais interferirem na alteração da microbiota vaginal, os dispositivos podem facilitar a transmissão dos microrganismos de origem fecal para a região genital dos animais, além disso, a presença do dispositivo pode desencadear ações inflamatórias no local, por ser visto como um corpo estranho, podendo facilitar a proliferação microbiana (MANES et al., 2017; RODRIGUES et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2016). Essas afirmações explicam o fato de ter se aumentado a prevalência de bactérias Gram negativas no fundo vaginal, pois esse tipo de bactéria habita naturalmente o trato gastrintestinal, como será discutido posteriormente.

A redução do número total de microrganismos isolados nas categorias nulíparas e plúriparas foi uma surpresa, já que o esperado seria o aumento destes. Uma hipótese possível para esses resultados seria o fato de muitos tipos de microrganismos necessitarem de quantidade elevada de umidade para sua proliferação, e segundo Martinez-Ros et al. (2018) a presença de quantidades elevadas de P<sub>4</sub> durante o período de implante dos dispositivos pode diminuir o teor de água presente no muco vaginal em até 90%, isso dificultaria a proliferação de muitos tipos de microrganismos. Além disso estes autores também observaram mudanças no pH vaginal durante a implantação dos dispositivos, sendo o pH normal deste ambiente próximo da neutralidade, e após o uso dos dispositivos o pH se tornou altamente alcalino, tornando-se assim um ambiente favorável para a proliferação de bactérias patogênicas. Esta mesma mudança de pH pode ter ocorrido no presente estudo, elevando o pH e com isso,

diversos tipos de microrganismos que crescem com o pH próximo da neutralidade diminuiriam sua quantidade, confirmando o aumento do número de bactérias que crescem em ambientes alcalinos (enterobactérias), após o uso dos dispositivos.

### 3.3 Famílias bacterianas predominantes

A tabela 4 apresenta a frequência de isolados que predominaram de acordo com a família Staphylococcaceae e Enterobacteriaceae. Dentro do grupo Staphylococcaceae, os principais isolados foram *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus coagulase* negativos. No grupo Enterobacteriaceae, os principais isolados foram *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp. e *Enterobacter* spp. No grupo classificado como “Outros” na tabela foram isoladas várias espécies, porém em menor frequência, dentre elas, *Streptococcus* spp., *Actinomicetos*, Leveduras, *Streptobacilos* spp., etc.

**Tabela 4** – Frequências de isolados, segundo a família, que predominaram no canal vaginal de fêmeas bovinas de corte, antes e após aplicação dos dispositivos intravaginais. Estação Experimental Fazenda Modelo, Ponta Grossa/PR, 2019

Famílias	NULÍPARAS		PRIMÍPARAS		PLURÍPARAS	
	N* (%)		N (%)		N (%)	
	A**	D***	A	D	A	D
Staphylococcaceae	13 (59)	11 (42)	3 (38)	7 (58)	13 (65)	11 (81)
Enterobacteriaceae	3 (13)	7 (27)	5 (62)	5 (42)	3 (15)	5 (19)
Outros	6 (28)	8 (31)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (20)	0 (0,0)
<b>TOTAL</b>	22 (100)	26 (100)	8 (100)	12 (100)	20 (100)	16 (100)

\*N: Número de isolados

\*\*A: Antes da inserção dos dispositivos

\*\*\*D: Depois da retirada dos dispositivos

Fonte: A autora

#### 3.3.1 Staphylococcaceae

Com relação ao crescimento de bactérias Gram positivas, os isolados predominantes foram da família Staphylococcaceae, em que, somando todas as categorias, o percentual total antes da inserção dos dispositivos foi de 58%, diminuindo para 54% após a retirada dos mesmos. Essa diminuição ocorreu devido ao aumento do número de bactérias Gram negativas

após a retirada dos dispositivos. Para a categoria nulíparas, houve diminuição do número de *Staphylococcus* spp. após o período de uso dos dispositivos, ao contrário das primíparas, em que houve aumento mais evidente do que nas pluríparas. Outros microrganismos, tanto Gram positivos quanto Gram negativos, também foram encontrados nas três categorias analisadas e nos dois momentos, porém com menor frequência. De acordo com o teste de coagulase realizado, não foi identificada a presença de *Staphylococcus aureus*, porém, por meio do teste de fermentação do manitol, os resultados foram positivos para a presença desta espécie. Sendo assim, não foi possível afirmar com exatidão a ausência de *Staphylococcus aureus* de poderoso potencial patogênico. *Staphylococcus epidermidis* e demais espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa foram isolados com maior frequência.

Espécies da família Staphylococcaceae são relatadas como patógenos oportunistas, responsáveis por causar diversas doenças, não apenas no sistema reprodutivo dos animais, mas também em outros locais, como nas glândulas mamárias, causando mastite. Habitam normalmente a pele e mucosa de homens e animais (ANVISA, 2004). Dentro desse grupo estão os *Staphylococcus* coagulase negativos considerados também como patógenos emergentes de alta frequência (SILVA et al., 2016).

Os achados coincidem com o encontrado por Wang et al. (2015) que isolaram em nulíparas (sem utilização de dispositivos) predominantemente espécies do gênero *Staphylococcus* spp. enquanto que espécies da família Enterobacteriaceae foram isoladas em quantidades muito baixas. *Staphylococcus* spp. foi uma das principais espécies descritas como pertencentes à microbiota vaginal de vacas saudáveis (GALVÃO; SANTOS, 2014; SWARTZ et al. 2014; VASCONCELOS, 2016; WANG et al. 2013), confirmando os achados predominantes antes da inserção dos dispositivos. Porém esse gênero de microrganismo está bastante associado a problemas reprodutivos (MARTINEZ-ROS et al. 2018). Como citado anteriormente, Vasconcelos et al. (2016) isolaram mais de 68% de *Staphylococcus* spp. do fundo vaginal dos animais, antes da inserção dos dispositivos, sendo grande parte destes *Staphylococcus epidermidis*, assim como no presente estudo. Nascimento (2015) pontuou a importância das espécies de *Staphylococcus* e *E.coli* como, apesar de residentes da microbiota vaginal, causadores de problemas reprodutivos, como a vulvovaginite.

Após a retirada dos dispositivos, um corrimento vaginal turvo, com cor tendendo ao amarelo foi observado na maioria dos animais, das três categorias, o que coincidiu com o estudo de Fisher-Tenhagen; Von Krueger e Heuwieser (2012). De acordo com os

pesquisadores, isso é normal em vacas que recebem o implante de P<sub>4</sub>, podendo também ser detectada vaginite purulenta. No presente estudo foi detectada apenas uma novilha com sinais clínicos de vaginite (corrimento vaginal purulento, em alta quantidade e com cheiro fétido característico, além do dispositivo muito sujo no momento da remoção).

### 3.3.2 Enterobacteriaceae

Observou-se um aumento de microrganismos da família Enterobacteriaceae (bactérias Gram negativas) isoladas do fundo vaginal, após a retirada dos dispositivos liberadores de P<sub>4</sub>, nas categorias nulíparas e pluríparas. Nas primíparas, o total de enterobactérias isoladas permaneceu o mesmo mas, após a retirada dos dispositivos, a frequência (%) de enterobactérias sobre o total de isolados diminuiu (de 62% para 42%) devido ao aumento de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus* spp.), como demonstrado na tabela 4.

Do total isolado, foram contabilizados mais de 47 tipos diferentes de bactérias, sendo aproximadamente 26 tipos de Gram negativas e 21 tipos predominantes de Gram positivas. Dentro do grupo de bactérias Gram negativas 14 tipos foram isolados com maior frequência, dos quais, Enterobacteriaceae tiveram maior prevalência, tanto no fundo vaginal das fêmeas, quanto nos dispositivos, após o período de uso.

Na categoria nulíparas, antes da inserção dos dispositivos, isolou-se enterobactérias do fundo vaginal em apenas 10% dos animais. Após a retirada dos mesmos, esse percentual aumentou para 80% dos animais, e 60% dos dispositivos, antes sem nenhum crescimento bacteriano, sendo a categoria cuja contaminação por enterobactérias foi maior. Além disso, as nulíparas apresentaram o maior número de diferentes tipos de colônias isoladas. Nas primíparas, as enterobactérias isoladas do fundo vaginal, antes do uso do dispositivo, apareceram em 30% dos animais e, após o período de uso dos dispositivos, essa quantidade aumentou para 60% dos animais e 60% dos dispositivos, que antes do uso tiveram crescimento nulo de enterobactérias. Na categoria pluríparas, foram isoladas enterobactérias em 10% dos animais, antes do uso dos dispositivos, e após sua retirada esse percentual aumentou para 40% dos animais e 60% dos dispositivos.

Considerando todos os microrganismos isolados, antes da inserção dos dispositivos, o percentual total de enterobactérias nas três categorias foi de 22%, após a retirada dos dispositivos esse percentual aumentou para 28% do total isolado. Estes resultados confirmam

ter ocorrido contaminação fecal nas três categorias sendo esses microrganismos Gram negativos habitantes naturais do trato gastrointestinal.

Das espécies de enterobactérias que foram identificadas no presente estudo, *Enterobacter* spp. predominou nas nulíparas, antes da inserção dos dispositivos. Após a retirada dos mesmos, além desta mesma espécie, isolou-se também, porém em maior frequência, *Citrobacter* spp. Estas duas espécies são mencionadas como potenciais causadores de problemas reprodutivos (QUINN et al., 2005). Nas primíparas, isolou-se predominantemente *E.coli* tanto antes como depois do uso dos dispositivos. Nas pluríparas foi identificada a presença de *Citrobacter* spp., após o uso dos dispositivos. Isolaram-se também outras espécies, nas três categorias, porém não foram identificadas. Este aumento de enterobactérias após a utilização dos dispositivos coincide com o encontrado por Bragança et al. (2017), que isolaram Gram negativas em 100% das amostras, sendo predominantemente enterobactérias.

Bactérias da família Enterobacteriaceae são habitantes naturais do trato intestinal de humanos e animais, e são comumente isoladas também da mucosa vaginal de vacas saudáveis (MORENO et al., 2016; NASCIMENTO, 2015; WANG et al., 2013) independentemente do número de partos. Dentro desse grupo existem diversas espécies de importância veterinária, capazes de ocasionar, entre outras doenças, distúrbios reprodutivos, como é o caso das espécies *E.coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Proteus* (QUINN et al., 2005).

Moreno et al. (2016) relataram que a microbiota natural vaginal pode ser alterada por fatores intrínsecos (hormonal, fisiológica, imunológica) ou extrínsecos (tratamentos antimicrobianos e hormonais, manejo). Rodrigues et al. (2015) analisando a microbiota do canal vaginal de vacas saudáveis, isolaram mais de 50% de bactérias Gram negativas; desse total, foram 17,8% de enterobactérias. Ao analisarem a mesma região de vacas com distúrbios reprodutivos o percentual de enterobactérias foi maior, indicando uma possível proliferação dessas bactérias na região, e uma diminuição na imunidade das fêmeas, juntamente aos fatores anteriormente citados, acarretando conseqüentemente nos problemas reprodutivos encontrados. Confirmando isto, McClure (2018) afirmou que a principal causa de infecções no trato genital é devido à ascensão de microrganismos de potencial patogênico.

Além de várias outras espécies de enterobactérias, *Escherichia coli* tem sido frequentemente associada a problemas reprodutivos como metrite, endometrite, vaginite (LUQUE et al., 2017), devido a fatores como sua importante capacidade em permanecer por

longos períodos nas regiões contaminadas (MORENO et al., 2016), da rápida proliferação e por se tratar também de um agente oportunista em vários ruminantes (OLIVEIRA et al., 2013; VASCONCELOS, 2016). Ao contrário dos autores anteriormente referenciados, que relacionaram *E. coli* como agente normalmente encontrado na microbiota vaginal, Wang et al. (2015) detectaram esse mesmo agente apenas nos animais que estavam com metrite.

Os achados de Moreno et al. (2016) coincidem com os do presente estudo, cuja pesquisa mostrou, dentre outras espécies, *E. coli* especificamente em vacas com um ou mais partos. Os mesmos autores demonstraram perfis microbianos mais homogêneos nesses grupos citados, do que em nulíparas.

Uma possível justificativa para o maior isolamento de enterobactérias no presente estudo, após a remoção dos dispositivos, é uma contaminação oriunda do trato gastrintestinal (RAMOS, 2016), já que é normal a ocorrência destes no intestino dos animais. Agentes como coliformes podem ter se proliferado na vagina através de algum possível contato com fezes do próprio animal, pois a proximidade anatômica entre o trato digestivo e trato reprodutivo poderia facilitar essa colonização (NASCIMENTO, 2015). Além disso, Fisher-Tenhagen; Von Krueger e Heuwieser (2012) descreveram que as vacas, por serem curiosas, podem chegar a lamber ou tentar arrancar os dispositivos uma das outras, através da cauda azul que fica exposta. Isso poderia ser outro meio de transmissão dos microrganismos presentes na boca das vacas, para os dispositivos, conseqüentemente para a região vaginal das fêmeas com o implante. Os mesmos autores também sugeriram que os animais tratados com dispositivos que possuíam a cauda externa tiveram maior incidência de corrimentos purulentos após a retirada dos dispositivos, devido a irritação mecânica causada pelos mesmos, dentro da vagina.

Vasconcelos et al. (2016) relataram que esse aumento de enterobactérias é normal após a retirada dos dispositivos, mas a própria defesa do animal proveniente de células epiteliais da parede vaginal pode se encarregar de normalizar a microbiota original da vagina (SUÁREZ et al., 2006), presumivelmente em torno de 24 a 48 horas após a remoção dos dispositivos, fato observado pelos autores no mesmo estudo, já que após esse período de tempo, depois de se retirar os dispositivos, a predominância passou a ser novamente de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus* spp.). Isto demonstra que as células de defesa desta região reconhecem os patógenos presentes e ajudam a montar uma resposta imune (GALVÃO; SANTOS, 2014; MORENO, 2016; WANG et al., 2015). Um estudo mais

aprofundado sobre a capacidade autoimune da microbiota vaginal de bovinos poderia ser benéfico para a diminuição do uso indiscriminado frente a antimicrobianos.

#### 3.4 Contagem bacteriana dos dispositivos intravaginais

Não houve crescimento microbiano nos dispositivos antes do uso, como esperado. Porém, após a retirada dos mesmos, houve crescimento microbiano em todos os dispositivos utilizados nas três categorias, evidenciando que houve contaminação destes, que antes eram estéreis, após seu uso. Com relação ao momento de aplicação destes dispositivos, não houve contato destes com a vulva, sendo depositado através do equipamento específico diretamente no interior da vagina. Desta maneira diminui-se a possibilidade de contaminação dos dispositivos, no momento de sua aplicação. Porém, no momento da retirada, é normal que o contato destes ocorra com fezes, corrimentos vaginais, e o próprio ambiente externo.

No momento da retirada dos dispositivos, o agente de maior isolamento nas categorias nulíparas e primíparas foi bactérias Gram negativas, principalmente da família Enterobacteriaceae, apresentando uma frequência de 97,7% e 82,7%, respectivamente. Na categoria pluríparas isolou-se mais bactérias Gram positivas (66,6%) apesar de ter se encontrado também enterobactérias (32,5%). Estes resultados são muito próximos aos já descritos anteriormente, encontrados no fundo vaginal das fêmeas. No estudo Ramos (2016), foram analisados os dispositivos reutilizados e identificados diversos microrganismos comumente encontrados no conteúdo vulvovaginal, sendo *Proteus* spp. e *Bacillus* spp. os principais. Na comparação realizada pela mesma autora, entre dispositivos de primeiro uso e os reutilizados, as frequências encontradas para diversos agentes bacterianos foram sempre maiores nos dispositivos reutilizados, e aumentando também a quantidade de colônias isoladas, após a retirada dos mesmos.

Esses resultados confirmam a capacidade dos dispositivos em alterar a microbiota vaginal nativa dos animais que recebem o implante. Isto está de acordo com os estudos de Martinez-Ros et al. (2018), que relataram um aumento considerável de microrganismos no fundo vaginal de ovelhas que receberam implante de progesterona (esponjas e CIDR<sup>®</sup>), afirmado que esses dispositivos alteram a característica bacteriológica da microbiota vaginal dos animais, fato também observado e confirmado por Bragança et al. (2017).

De acordo com os resultados expostos pode-se afirmar a grande eficácia da esterilização dos dispositivos antes do primeiro uso, e a alta capacidade de transmissão de

agentes bacterianos a estes, com apenas uma utilização, já que as espécies identificadas foram as mesmas descritas no crescimento microbiano vaginal. Devido a isto comprova-se a importância em fazer a correta higienização dos dispositivos antes de reutilizá-los, pois possuem potencial de transmitir bactérias para as fêmeas bovinas.

Existem poucos estudos sobre a ação da P<sub>4</sub> dos dispositivos sobre a microbiologia da vagina dos animais. Porém autores como Manes et al. (2010) e Penna et al. (2013) mencionaram que os efeitos dos hormônios podem aumentar as chances dos animais de desenvolverem vaginite purulenta. Vasconcelos et al. (2016) supuseram que a presença do implante altera a microbiota vaginal, devido, além dos motivos já citados (contaminação por fezes com a presença da corda azul do dispositivo, diminuição da umidade e alteração de pH), à ação dos hormônios nesse período. Os mesmos autores explicaram que a ação hormonal da progesterona pode ser responsável pelo comprometimento do sistema imunológico do trato reprodutivo dos animais. Com a proliferação dos microrganismos potencialmente patogênicos e a diminuição da imunidade, os animais ficam mais susceptíveis ao aparecimento de doenças.

### 3.5 Teste de sensibilidade aos Antimicrobianos

A seguir encontra-se a tabela 5, com a frequência de microrganismos (Gram positivos e negativos) que foram sensíveis ou resistentes aos antibióticos testados.

**Tabela 5** – Percentual de sensibilidade das principais bactérias Gram+ e Gram- aos antimicrobianos testados, Ponta Grossa/PR, 2019

	GRAM + (n=9)		GRAM – (n=12)	
	% S*	% R**	% S	% R
<b>Ampicilina</b>	78	22	83	17
<b>Gentamicina</b>	100	0	100	0
<b>Amicacina</b>	***	-	100	0
<b>Cefuroxima</b>	-	-	83	17
<b>Cefepime</b>	-	-	100	0
<b>Cefoxitina</b>	-	-	100	0
<b>Ciprofloxacina</b>	100	0	100	0
<b>Meropenem</b>	-	-	100	0
<b>Sulfazotrim</b>	33	68	100	0
<b>Ceftazidima</b>	-	-	100	0
<b>Cefalotina</b>	-	-	100	0
<b>Bacitracina</b>	78	22	-	-

\*S: Sensível para o antibiótico testado

\*\*R: Resistente para o antibiótico testado

\*\*\*-: Antimicrobiano não testado para a bactéria

**Fonte:** A autora

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 5, pôde-se observar que a maioria dos antibióticos demonstrou ser efetiva para a grande parte dos microrganismos. Apenas o antibiótico ampicilina mostrou um percentual de resistência dos dois tipos de microrganismos (Gram positivos e negativos). Especificamente no grupo das bactérias Gram positivas, além da ampicilina, sulfazotrim e bacitracina também apresentaram certa resistência dos microrganismos testados; sendo a bacitracina um dos testes utilizados para classificação de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Através deste, pôde-se determinar que dos nove tipos de bactérias Gram positivas, sete foram *Streptococcus pyogenes* (78%), pois apresentaram sensibilidade à bacitracina (ANVISA, 2004). Das bactérias Gram negativas (enterobactérias), como já descrito anteriormente, os principais isolados foram *E.coli*, *Citrobacter* spp. e *Enterobacter* spp. e apenas ampicilina e cefuroxima apresentaram resistência intermediária destes microrganismos.

Uma possível justificativa para a sensibilidade dos microrganismos, diante de grande parte dos antibióticos testados, seria o fato de na Estação Experimental Fazenda Modelo do IAPAR/ Ponta Grossa não usarem indiscriminadamente diversos tipos de antibióticos e, quando usados, não variam muito de classe. Devido a isso, os possíveis problemas reprodutivos que surgem no rebanho seriam facilmente tratados.

Os resultados estão de acordo com os divulgados por Silva et al. (2011), que avaliaram a susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados da microbiota cérvico-vaginal de ovelhas. Estes isolados apresentaram sensibilidade a quase todos os antibióticos testados. Isto revela o potencial de aplicação desses princípios ativos, além da possibilidade de escolha, devido a inexistência de multirresistência.

#### **4. CONCLUSÃO**

De acordo com os achados deste estudo, os dispositivos intravaginais de liberação lenta de P<sub>4</sub> aumentam a proliferação de bactérias com potencial patogênico (enterobactérias) no fundo vaginal dos animais. A presença destes facilita a entrada de agentes externos através da cauda azul do dispositivo, que fica exposta no ambiente, aumentando o contato das fezes com o dispositivo, conseqüentemente com o fundo vaginal.

Os agentes microbianos isolados com maior frequência fazem parte da microbiota nativa das fêmeas bovinas, e o aumento no número de enterobactérias isoladas após a retirada dos dispositivos se dá pela proliferação dos mesmos, oriundos do trato gastrointestinal, que devido à anatomia vulvovaginal das vacas, facilita o contato com as fezes.

A maior susceptibilidade das nulíparas frente a diferentes tipos de microrganismo, e a ascensão especificamente de enterobactérias, pode ser devido à resistência ainda não estabelecida, perante aos agentes que não fazem parte da microbiota nativa.

O perfil de alta sensibilidade encontrado aos antimicrobianos testados, juntamente a ausência de multirresistência, demonstra que os microrganismos isolados dos animais, com potencial patogênico, seriam facilmente controlados caso ocasionassem alguma doença reprodutiva.

## 5. REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da Pecuária no Brasil** – Relatório Anual 2018. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/ExportacoesPorAno.aspx>> Acessado em: 02 abr. 2019.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. MÓDULO 4 – Gram-positivos. 2004. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/id\\_s ta2.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_s ta2.htm)>. Acessado em 14 de mai. 2019

ANDREWS, A.H.; BLOWEY, H.; EDDY, R. G. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. São Paulo: Roca Editora, 2008. 458 p.

BAZZAN, A.P. et al. Reutilização de um dispositivo intravaginal com progesterona na indução e sincronização do estro ovino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Santa Catarina, v. 108, n. 587-588, p. 143-146, jul-dez. 2013.

BRAGA, F.A. **Emprego de um novo dispositivo intravaginal para liberação de progesterona em programa de IATF em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BRAGANÇA, J.F.M et al. Influence of a device intravaginal to synchronization/induction of estrus and its reuse in sheep vaginal flora. **Comparative Clinical Pathology**, v.26, p.1369–1373, 2017.

CARVALHO, B.T.; ZEN, S. A cadeia de pecuária de corte no Brasil: evolução e tendências. **Revista iPecege**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 85-99, 2017.

CEPEA – Centro de estudos avançados em economia aplicada. **PIB do Agronegócio no Brasil**. 2017. Disponível em: <[https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Relatorio%20PIBAGRO%20Brasil\\_D EZEMBRO\\_CNA.pdf](https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Relatorio%20PIBAGRO%20Brasil_D EZEMBRO_CNA.pdf)> Acessado em 16 de abr. 2018

CESCA, S.C.; BRAGANÇA, J.F.M. **Influência de um dispositivo intravaginal para sincronização/indução de estros e sua reutilização na flora vaginal ovina**. In: XXI Seminário de Iniciação Científica, VIII Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e IV Mostra Científica. Editora UNOESC. 2015.

FISCHER-TENHAGEN, C.; VON KRUEGER, X.; HEUWIESER, W. Short communication: Evaluation of vaginal discharge following treatment with a progesterone insert. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.8, p.4447–4451, 2012.

GALVÃO, K.N.; SANTOS, J.E.P. Recent advances in the immunology and uterine microbiology of healthy cows and cows that develop uterine disease. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.38, p.577-588, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores Estatísticos**: estatística da produção pecuária. 2017. Disponível em <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie-historica>> Acessado em 02 de abr. 2019

LUQUE, A.T. et al. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the reproductive tract microbiota of cows and sows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Argentina, v. 55, p 13-19, 2017.

MANES, J. et al. Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. **Small Ruminant Research**, v.94, p.201-204, 2010.

MANES, J. et al. Changes in the vaginal microbiota in ewes after insertion of intravaginal sponges at different stages of the oestrous cycle. **Livestock Science**, v.208, p.55-59, 2017.

MARTINEZ-ROS, P. et al. Intravaginal device-type and treatment-length for ovine estrus synchronization modify vaginal mucus and microbiota and affect fertility. **Animals (Basel)**, v.8, p.226, 2018.

MCCLURE, M.W. **The vaginal microbiome related to reproductive traits in beef heifers**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – University of Arkansas, Estados Unidos da América, 2018.

MEDALHA, A.G. et al. Utilização do dispositivo intravaginal de progesterona, em até três usos, para inseminação artificial em tempo fixo de fêmeas *Bos indicus*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador – BA, v. 16, n. 2, p. 458-469, 2015.

MORENO, C.G. et al. Vaginal microbial communities from synchronized heifers and cows with reproductive disorders. **Journal of Applied Microbiology**, v.121, p.1232-1241, 2016.

MOTLOMELO, K.C. et al. Synchronization of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. **Small Ruminant Research**, v.45, p.45-49, 2002.

NASCIMENTO, M.L. **Análise do microbioma vaginal bovino por técnicas dependentes e independentes de cultivo**. 2015. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

OLIVEIRA, J.K. et al. Changes in the vaginal flora of goats following a short-term protocol of oestrus induction and synchronisation with intravaginal sponges as well as their antimicrobial sensitivity. **Small Ruminant Research**, v.113, p.162-166, 2013.

PATTERSON, D. J. Revisão de sistema de sincronização do estro utilizando a progesterona oral Acetato de Melengestrol. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS. 10., 2006, **Anais...**Uberlândia: CONAPEC Jr. 2006.

PENNA, B. et al. Progestin-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronization influences on goats vaginal flora and antimicrobial susceptibility. **Animal Reproduction Science**, v.142, n.1-2, p.71-74, 2013.

QUINN, et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed Editora, p.55-57, p.72-85, 2005.

RAMOS, G.B. **Frequência de microrganismos em conteúdo vulvovaginal de vacas tratadas com dispositivos intravaginais de progesterona**. 2016. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2016.

RODRIGUES, N. F. et al. Qualitative analysis of the vaginal microbiota of healthy cattle and cattle with genital-tract disease. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 2, p. 6518-6528, 2015.

SHELDON, I.M. et al. Uterine diseases in cattle after parturition. **Veterinary Journal**, Londres, v.176, p.115-121, 2008.

SILVA, V.F. et al. Microbiota cérvico-vaginal de ovelhas mestiças e sua susceptibilidade aos antibióticos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.31, n.7, p.586-590, 2011.

SILVA, L.M.V. et al. Staphylococcus coagulase negativa e Staphylococcus aureus em mastite subclínica bovina no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista MV&Z**, São Paulo, v.14, n.3, 2016.

SOUZA, J.M.G. **Reutilização de dispositivos intravaginais de progesterona autoclavados para indução e sincronização de estro em cabras da raça Toggenburg**. 2010. 87 f. Dissertação (Pós-Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

SUÁREZ, G. et al. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v.63, p.39-43, 2006.

SWARTZ, J.D. et al. Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. **Frontiers in Veterinary Science**, v.1, p.19, 2014.

VASCONCELOS, C.O.P. et al. Qualitative and quantitative analysis of bacteria from vaginitis associated with intravaginal implants in ewes following estrus synchronization. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.4, p.632-636, 2016.

WANG, L. et al. Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. **BMC Microbiology**, v.13, p.19, 2013.

WANG, L. et al. Studying the effects of reproductive hormones and bacterial vaginosis on the glycome of lavage samples from the cervicovaginal cavity. **PLoS One**, v.10, p.5, 2015.