

USO DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS PARA O AUXÍLIO DE DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITE EM UMA ÉGUA DA RAÇA CRIOULA.

CARVALHO, Camilla Cabaldi¹

DA SILVA, Aryadne Domingues¹

SIMÕES, Nathalia Pagaldy^{1*}

BIANCHI, Eloisa²

CORADINI, Márcia Goulart Lopes²

SANTOS, Amanda de Souza²

SIMÕES, Michele da Rosa Sholant²

RESUMO: O trabalho teve como objetivo, identificar micro-organismos de um lavado uterino de uma égua da raça crioula de 16 anos proveniente da cidade de Bagé-RS disponibilizado pela Dra. Liana Salles Van Der Linden. O diagnóstico de doenças bacterianas pode ser efetuado por diversos procedimentos microbiológicos, porém o diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento e identificação do agente bacteriano, normalmente por cultura. A endometrite é definido como a inflamação do endométrio em resposta a uma agressão, geralmente causada por micro-organismos, com destaque para *Escherichia coli*, *Streptococcus* do grupo C (EGC), em especial *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi*. Após obtenção do lavado uterino foi realizado Placas de Pétri de vidro, Cultivo na placa de petrifilm: *Stafilococos*, *E.coli* e *Coliformes* e por fim Técnica de Gram. As técnicas utilizadas foram eficientes, apesar da técnica de petrifilm ter obtido resultado negativo para a presença de cultura de *Stafilococos*, *E.colli* e *Coliformes*. A técnica de Gram auxiliou na confirmação do diagnóstico de endometrite, pois a partir dela que foi possível identificar o formato e coloração Gram-positiva levando a confirmação da doença por *Streptococos*, sendo essa bactéria a mais presente na raça crioula. Concluindo, o trabalho teve seus objetivos satisfatoriamente alcançados para aprendizagem teórico-prático, pois contribuiu para o diagnóstico da doença e identificação da bactéria.

Palavras-chave: fluído no lúmen uterino, infertilidade, patógeno, ambiente uterino

ABSTRACT: The assignment goal was to identify microorganisms from a 16 years old Crioulo breed female horse uterine lavage coming from Bagé-RS, provided by Dr Liana Salles Van Der Linden. The bacterial diseases diagnostic can be achieved by several microbiological procedures; however the definitive diagnosis is performed by isolating and identifying the bacterial agent, usually by culture. The endometritis is defined as an endometrium inflammation in response to an aggression, normally caused by microorganisms with emphasis on *Escherichia coli*, group C *Streptococcus* (EGC), *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus* and *Rhodococcus equi*. After obtaining the uterine lavage it was realized glass Pétri plates, growth in a petrifilm plate: *Staphylococcus*, *E.coli* and *Coliforms* then Gram's technique. The used techniques were efficient; despite the petrifilm technique got a negative result for the *Staphylococcus* culture presence, *E.colli* and *Coliforms*. Gram's technique supported the endometritis diagnosis, from which was possible to identify the shape and color of the positive Gram leading us to the *Streptococcus* disease confirmation, being the most present bacteria in the Crioulo breed. Concluding, the assignment had its goals satisfactorily achieved by theoretical-practical learning, for contributing for the disease diagnosis and bacterial identification.

Keywords: Uterine lumen fluid, infertility, pathogen, uterine environment.

¹ Discentes do Curso Medicina Veterinária, Nível 3 2018/1- Faculdade IDEAU – Bagé/RS. *E-mail para contato: nathaliapgdy@hotmail.com

² Docentes do Curso Medicina Veterinária, Nível 3 2018/1 - Faculdade IDEAU – Bagé/RS.

1. INTRODUÇÃO

A equideocultura cresce mundialmente, em principal razão da importância do cavalo na prática de diversos esportes e lazer e não mais apenas no transporte ou tração animal (MARIZ et al., 2008).

Os cavalos da raça Crioula têm papel importante na cultura do Rio Grande do Sul, por se entender que esses animais são originados na região do Pampa. Com o passar dos anos, a admiração pelos Crioulos tem se tornado um investimento rentável, conforme a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC).

As endometrites ocupam as maiores causas entre as doenças uterinas responsáveis pela infertilidade dos animais domésticos (BRINSKO et al., 2011). É definida como uma inflamação do endométrio. Pode-se alegar endometrite aguda ou crônica, infecciosa ou não infecciosa (BRITO e BARTH, 2003).

Normalmente esta enfermidade é diagnosticada através da ultrassonografia, onde é possível visualizar fluido no lúmen uterino, sendo esse, o principal indicativo de inflamação (PYCOCK, 2007).

Deste modo, a utilização de cultura bacteriológica de secreção do endométrio vem sendo muito utilizada, com objetivo de distinguir o microrganismo presente no útero do paciente (LEBLANC, 2003).

O método predominante utilizado em bacteriologia é o técnica de Gram. A coloração clássica de Gram foi originalmente desenvolvida por Christian Gram em 1884 (BIER, 1985). O auxílio da coloração de Gram no diagnóstico microbiológico é inestimável (GARDNER e PROVINE, 1978).

A técnica de Petrifilm é um método rápido de detecção e contagem a partir de sistemas prontos de meio de cultura que contém diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores adequados à recuperação de cada tipo de microrganismo pesquisado (3M, 2013).

Dentre as bactérias causadoras de endometrite, a *Streptococcus zooepidemicus* é o patógeno mais frequentemente isolado do ambiente uterino e é grande causadora de morte embrionária em éguas prenhas (FERREIRO et al., 1986; NIELSEN, 2005; RIDDLE, 2007; LEBLANC, 2007).

Em um estudo direcionado à raça Crioula, Fiala (1999), relatou o crescimento bacteriano em 30,6% (31/ 101) das amostras, onde os agentes mais frequentes foram o *Streptococcus*.

O presente trabalho teve como objetivo, identificar microrganismos de um lavado uterino de uma égua da raça crioula com suspeitas de endometrite, com base em técnicas de análise microbiológicas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Técnica de Gram

O diagnóstico de doenças bacterianas pode ser efetuado por diversos procedimentos. O diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento e identificação do agente bacteriano a partir de materiais clínicos colhidos adequadamente do sítio de infecção, conhecido normalmente como exame bacteriológico ou cultura (MARTINEZ; TADEI, 2005).

Na técnica de Gram um esfregaço fixado pelo calor é coberto com um corante básico cristal violeta, que impregna todas as células, esta é a primeira coloração. Após um curto período, o corante cristal violeta é lavado e o esfregaço é recoberto com iodo, quando o iodo é lavado, ambas bactérias gram-positivas e gram-negativas aparecem na cor violeta. A seguir a lâmina é lavada com álcool ou uma solução de álcool-acetona, esta é a solução descolorante. O álcool é lavado e a lâmina é então corada com o corante fucsina e o esfregaço é lavado novamente (TORTORA et al., 2003).

As bactérias Gram-positivos são aquelas que retêm o corante cristal violeta devido ao aumento na quantidade de ácido teicóico e a diminuição da permeabilidade na parede celular aos solventes orgânicos, por conterem menos lipídeos na parede celular. A parede das bactérias Gram-negativas apresenta grande quantidade de lipídeos, que aumenta a permeabilidade aos solventes orgânicos, permitindo a descoloração. Estes microrganismos perdem, portanto, o cristal violeta, corando-se com o ultimo corante a fucsina (MARTINEZ; TADEI, 2005, QUINN et al., 2005).

O isolamento de muitos patógenos envolve inoculação em placas de ágar sangue e ágar MacConkey, seguidos de incubação de 24 a 48 horas. A temperatura e a atmosfera (atm) de incubação são fatores determinantes para o desenvolvimento das culturas e identificação

dos microrganismos. Geralmente a temperatura de incubação utilizada para a maioria dos microrganismos gira em torno de 36 a 37 °C (MARTINEZ; TADEI, 2005).

2.2 Placas de PetriFilm 3M

Atualmente os métodos microbiológicos rápidos mais utilizados são as placas Petrifilm™, que são sistemas prontos de meio de cultura que contém diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores adequados à recuperação de cada tipo de micro-organismos pesquisados. A análise microbiológica fica restrita a três etapas simples e rápidas, que fornecem resultados consistentes e de fácil leitura, reduzindo as chances de erros, comuns nos métodos convencionais de plaqueamento (3M, 2009).

As placas são prontas para uso, eliminando as etapas de preparação dos meios de cultura e vidrarias necessários, ocupando menos espaço em incubadoras, geladeiras, armários, autoclaves, possuem descarte mais fácil, não quebram, não derramam e podem ser congeladas para contagem posterior ou reanálise (FRANCO; BELOTI, 1990).

A amostra, diluída ou não, é inoculada na superfície do filme base e o filme superior é sobreposto. Com o auxílio de uma pipeta, a amostra é espalhada em uma área determinada. Após solidificação da substância geleificante, a placa é incubada na temperatura e tempo indicados pelo fabricante. Após a incubação, as colônias visíveis são enumeradas e o resultado é expresso em UFC / mL (NERO et al., 2000).

2.3 Endometriose

O útero da égua é preservado livre de contaminantes através de mecanismos físicos, imunológicos e de um sistema linfático funcional. As barreiras físicas que impedem a entrada de microrganismos ao útero são a vulva (CASLICK, 1937; PASCOE, 1979), a prega vestibulo-vaginal (HINRICHS et al., 1988) e a cérvix (LEBLANC et al., 1995).

O principal fator de subfertilidade e infertilidade em éguas é a endometrite, que é definido como a inflamação do endométrio em resposta a uma agressão, geralmente causada por micro-organismos (BRITO & BARTH, 2003).

Segundo Hurtgen (2006) a inflamação e/ou infecção do útero pode ser definida como aguda, crônica, ativa, sub-clínica, de pós-parto, bacteriana, fúngica, viral, induzida pela cobrição ou persistente. A classificação de uma endometrite numa categoria não implica a

exclusão das restantes – a complexidade da infecção uterina permite a utilização de mais do que um dos termos para a caracterizar.

Estas infecções são frequentemente causadas por micro-organismos, com destaque para *Escherichia coli*, *Streptococcus* do grupo C (EGC), em especial *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi*, outras espécies de bactérias também relatadas são *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (LANGONI et al., 1994; RICKETTS et al., 1993).

Bactérias anaeróbias como *Bacteroides fragilis* estão associadas à infecção principalmente em éguas no período pós-parto e no cio do potro (RICKETTS & MACKINTOSH, 1987).

Uma égua saudável, compreendendo no que diz respeito ao sistema reprodutor, irá combater a contaminação uterina com uma resposta inflamatória transitória, que inclui a ativação do sistema humoral, recrutamento de células polimorfonucleares para fagocitose de bactérias, libertação de prostaglandinas e aumento da contração uterina. Assim, desta forma, as éguas que produzam eficazmente esta resposta sejam consideradas resistentes à endometrite. Éguas que não tenham uma resposta eficaz e rápida, são consideradas susceptíveis (BRINSKO et al. 2011).

O útero das éguas é frequentemente exposto a micro-organismos no momento da cobertura/inseminação artificial (CADARIO, 2011). A deposição de sêmen intrauterino causa um processo inflamatório transitório induzido pelos espermatozóides que tem por objetivo eliminar espermatozóides mortos, bactérias presentes no sêmen ou carregadas durante a monta natural ou inseminação artificial (TROEDSSON et al., 1995).

A endometrite infecciosa, geralmente é acompanhada de sinais inflamatórios como: secreções purulentas, acúmulo de líquido no lúmen uterino, entre outros, entretanto, uma única cultura uterina positiva não é resultado comprobatório (LEY, 2013).

2.4 Avaliação da integridade uterina

Os procedimentos para a avaliação da integridade uterina abrangem palpação transretal, ultrassonografia, histeroscopia, biópsia endometrial, citologia e cultura uterina (MELO et al., 2008).

Alterações na anatomia reprodutiva externa podem sugerir a falta de integridade da primeira barreira de defesa da égua e consequentemente maior probabilidade de patologia uterina (BENNETT, 1987).

Um exemplo de alteração facilmente observada (audível) é o som de entrada de ar quando separados os lábios da vulva, indicativo de pneumovagina que favorece uma susceptibilidade a ocorrência de endometrite (LEBLANC & MCKINNON, 2011). A presença de neutrófilos no endométrio é usada como meio indicativo de endometrite (OVERBECK, et al., 2011)

2.5 Resposta do sistema imunológico

Iniciado o processo inflamatório, uma série de mediadores pró-inflamatórios são liberados pelos neutrófilos realizando fagocitose, pelas células do endotélio vascular, por células endometriais lesadas e pelos macrófagos ativados pela inflamação. As principais funções desses mediadores são atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficiência na eliminação do agente agressor. As prostaglandinas atuam induzindo alterações na permeabilidade vascular, as citocinas mantendo a inflamação ativa e as collagenases, elastases e gelatinases favorecendo o aporte de células e iniciando imediatamente o processo de reparação. O óxido nítrico (ON) é responsável pela lise de bactérias no interior do neutrófilo (MACKAY, 2000).

O acúmulo de líquido dificulta a fagocitose por neutrófilos, devido ao ambiente uterino hostil (TROEDSSON et al., 1993b), levando a acúmulo de óxido nítrico (ON) liberado pelos neutrófilos degenerados. Nessas condições o óxido nítrico atua reduzindo a contratilidade da musculatura lisa uterina, gerando assim um ciclo vicioso (ALGHAMDI & TROEDSSON, 2002).

A defesa uterina começa com a destruição local de agentes externos por leucócitos, prosseguindo a eliminação e neutralização por anticorpos uterinos e terminando na remoção física dos produtos resultantes, através da drenagem pela cérvix e pela via linfática (TROEDSSON et al. 1995).

As imunoglobulinas (Igs) são a parte, do sistema imune que inicia a resposta inflamatória e a amplifica. A sua produção é principalmente local, já que a difusão passiva de Igs no útero é mínima. As Igs mais frequentemente encontradas são IgG e a IgA, havendo também a presença de IgM. A concentração de imunoglobulinas não varia conforme a

condição do ciclo uterino, nem a sua concentração é relevante para determinar se uma resposta é eficaz ou não (TIBARY et al., 2007; TROEDSSON, 1999; KATILA, 1996; VARNER et al., 1990).

Os neutrófilos (células polimorfonucleares) são células essenciais na defesa do hospedeiro. Através de estímulos quimiotáticos provocados pela presença de agentes exógenos (bactérias, espermatozóides, endotoxinas, etc), os neutrófilos deslocam-se rapidamente pela corrente sanguínea, ligam-se a estes agentes, efetuam endocitose e seguidamente fagocitose (TIBARY et al., 2007, VARNER et al., 1990).

A eficiência da fagocitose pelos neutrófilos é muito dependente da presença de opsoninas no local de infecção. Estas opsoninas, substâncias que interagem com os agentes exógenos de forma a torná-los mais susceptíveis à fagocitose, são principalmente IgG e sistema do complemento (VARNER et al., 1990).

2.6 Coleta de material para diagnóstico

O diagnóstico desta enfermidade normalmente é feito através da ultrassonografia, onde é possível visualizar fluído no lúmen uterino, sendo esse, o principal indício de inflamação, entretanto, o diagnóstico definitivo da endometrite bacteriana é realizado a partir do exame citológico e microbiológico (TROEDSSON, 2011; PYCOCK, 2007).

O estudo citológico do material coletado com o auxílio de swab's ou flushes tem sido indicado para avaliar o ambiente uterino, uma vez que, a presença de neutrófilos no lúmen é um importante indicador de inflamação (ASBURY et al., 1984; CAUSEY et al, 2006). O swab endometrial é o método mais utilizado para a coleta de amostras a serem submetidas a exames laboratoriais (LYLE, 2003).

Além da coleta através de swab's, amostras podem ser adquiridas através de lavagem uterina com baixo volume de solução salina (LEBLANC & MCKINNON, 2011), a qual abrange grande porção do útero, preservando íntegras as células capturadas, porém, este procedimento causa irritação moderada ao endométrio (COCCHIA et al., 2012).

2.7 Tratamento

O tratamento tradicional consiste no lavado uterino com solução fisiológica aquecida, quando tivermos grande quantidade de secreção ou restos placentários (THOMASSIAN, 2005).

A função da lavagem uterina é colaborar para a limpeza do órgão, estimular os fluxos sanguíneo e linfático uterinos, reduzir o número de bactérias, fungos ou leveduras que possam existir, dissolver seus produtos metabólicos em potencial, e convocar novos neutrófilos para se redirecionarem para os tecidos endometriais e para dentro do lúmen uterino, dessa maneira, estimulando a resposta de defesa celular. Uma grande melhora no ambiente uterino e no tratamento da endometrite se dá através da lavagem sem a inclusão de antibióticos no protocolo de tratamento (LEY, 2013).

Apesar de a endometriose ser uma patologia degenerativa irreversível, existem estudos que avaliam a eficácia de alguns tratamentos para essa afecção uterina. Um dos tratamentos para endometriose em éguas mais recentemente que tem sido estudado é com o uso de células tronco mesenquimais (ALVARENGA et al., 2016, MAMBELLI et al., 2014).

Algumas terapias alternativas para o tratamento da endometrite têm sido utilizadas, como o plasma ou infusões de sangue total, que atuam imunologicamente junto ao endométrio, sendo essas terapias mais utilizadas em éguas com endometrite crônica pós cobertura, porém, pesquisas afirmam que um número relativamente pequeno se beneficiou das opsoninas adicionais para auxílio da função dos neutrófilos uterinos (THOMASSIAN, 2005; LEY, 2013).

Quadro 1- Drogas prescritas, por via intrauterina, para o tratamento da endometrite.

Drogas	Doses	Observações
Sulfato de amicacina	2g	Volume igual de tampão de bicarbonato de sódio 7,5%
Ampicilina	3g	Usar Preparação solúvel
Carbenicilina	6g	Algumas <i>Pseudomonas</i> são sensíveis
Ceftiofur	1g	Amplo espectro, incluindo <i>B. fragilis</i>
Sulfato de gentamicina	1 – 2 g	Espectro contra Gram-negativas
Sulfato de Kanamicina	1 – 2 g	Muitas cepas de <i>E. coli</i> são sensíveis
Neomicina	4g	<i>E. coli</i> e <i>Klebsiella</i> são sensíveis
Penicilina G	5 milhões UI	Sódica ou Potássica. Para <i>Streptococcus</i> .
Polimixina B	1 milhão UI	Algumas cepas de <i>Pseudomona ssp.</i> e <i>Klebsiella sp.</i> são sensíveis
Ticarcilina	6g	Amplo espectro
Ticarcilina/Ác. Clavulânico	6g/200mg	Amplo espectro

Fonte: Causey, 2007

3. METODOLOGIA

Para a realização das análises microbiológicas foi utilizado um lavado uterino de uma égua da raça crioula de 16 anos, proveniente da cidade de Bagé-RS disponibilizado e realizado pela Dra. Liana Salles Van Der Linden.

Através da anamnese foi descoberto que a égua denominada Debochada pesa aproximadamente 400kg, gerou no mínimo 9 crias. Não havia apresentado problemas reprodutivos nas temporadas anteriores, porém quando inseminada, 4 vezes na temporada 2017/2018, esteve sempre apresentando fluído intra-uterino pós inseminação. Após 48 horas da última tentativa de inseminação foi realizado exame ultra-sonográfico onde foi identificado presença de cistos endometriais, onde optou-se pela realização de um lavado uterino.

Para obtenção do lavado uterino, procedia-se a higienização da região perineal e vulva, com água corrente e pvpí degermante, e secagem com papel toalha. Em um procedimento semelhante a inseminação artificial, introduzia-se a sonda do tipo foley montada com aplicador, protegida com camisa sanitária pelo canal cervical até o corpo do útero, infundia-se, então, 1 litro de solução ringer com lactato. A recuperação do líquido foi feita realizando-se massagem uterina e aspiração com seringa, descartável e esterilizada, acoplada a porção terminal da sonda.

3.1 Método de inoculação de superfície

Materiais utilizados na inoculação nas placas de Petri de vidro foram: Placas de Petri de vidro; Pipeta, bastão de vidro, Becker, bico de Bunsen. Foram colocados no autoclave a 121°C por 20 minutos.

Após a esterilização foi preparado o meio de cultivo plate count ágar e com auxílio de um Becker, foi adicionado 300 ml de água destilada e 6,6 g de plate count ágar que foi pesado em uma balança de precisão. A seguir foi levado ao fogo mexendo com o bastão de vidro até obter uma solução homogênea. Após obter a solução o Becker foi envolvido por papel pardo e fita 3M e foi levada ao autoclave a 121°C por 20 minutos. Feito isso, foi colocado o meio de cultura em placas de Petri de vidro após o meio estar consistente com auxílio de uma alça de platina esterilizada. Com o auxílio da alça foi coletado uma amostra do lavado e passado em movimento de zig-zag sob o ágar. As placas foram levadas a estufa a 37°C por 48 horas, Sendo analisadas a cada 24 horas.

A inoculação em superfície foi utilizada para produzir colônias para posteriormente serem diferenciadas pela coloração de Gram.

3.2 Cultivo na placa de Petrifilm 3M: *Stafilococos*, *E.coli* e *Coliformes*

Foi colocado a Placa Petrifilm 3M em uma superfície plana a seguir o filme superior foi levantado com a pipeta perpendicularmente à Placa Petrifilm 3M, colocamos 1 ml da amostra do lavado no centro do filme inferior. E o filme superior foi colocado cuidadosamente para evitar a formação de bolhas de ar. Foi pressionado o difusor delicadamente para distribuir o inóculo antes do gel se formar.

As placas foram incubadas na estufa com a face transparente para cima a temperatura de 37°C durante 48 horas, sendo analisadas a cada 24 horas.

3.3 Técnica de Gram

Na realização da técnica com auxílio da alça de platina foi coletado uma amostra de colônia bacteriana da inoculação de superfície realizando um esfregaço em uma lamina, para a fixação do mesmo foi utilizado uma lamparina laboratorial. Logo após a lamina foi corada com corante Cristal Violeta por 1 minuto e em seguida lavado em água corrente, a lamina foi corada novamente com Lugol por 1 minuto e descorado com álcool, a seguir contracorado com Fucsina. Após secar, a lamina foi analisada no microscópio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados adquiridos da análise microbiológica utilizando as Placas de Petrifilm 3M foram negativos para *Staphylococcus*, *E.coli* e *Coliformes*, eliminando a presença destas culturas.

A partir da bibliografia pesquisada, era esperado encontrar bactérias aeróbicas, como *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi* (LANGONI et al., 1994; RICKETTS et al., 1993).

Através das análises microbiológicas, inoculação em placas de Petri foi possível o cultivo de cultura pura. Técnica de Gram foi possível a identificação de características morfológicas: formato coccus e coloração Gram-positiva, confirmando pela microscopia ótica somente a presença de *Streptococcus* no lavado uterino.

Ao comparar os resultados obtidos, com os resultados da pesquisa de Chaves (2011), estudo da microbiota vaginal de éguas, onde avaliou setenta e sete éguas da raça Mangalarga Paulista e Quarto de Milha, com idade entre 5 e 18 anos, sendo estas doadoras de embrião em programas de TE e com histórico reprodutivo normal. As coletas foram realizadas através de swab's vaginal e swab's uterino (swab estéril com meio de transporte acoplado a uma pipeta de inseminação artificial), através dos quadros disponibilizados pelo autor, com os resultados das coletas foi possível constatar que os resultados das análises realizadas neste trabalho foram positivos, portanto de acordo com Fiala (1999), *Streptococcus* é agente bacteriano mais frequente em amostras uterinas para diagnostico de endometriose equina da raça Crioula.

Quadro 1: Prevalência de microrganismos na vagina de éguas.

MICRORGANISMOS	SWAB VAGINAL
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	42%
<i>Escherichia coli</i>	25%
<i>Streptococcus alfa hemolítico</i>	15%
<i>Candida sp</i>	6%
<i>Enterobacterspp</i>	3%
<i>Bacillus SP</i>	3%
<i>Streptococcus beta hemolítico</i>	3%
<i>Pseudomonas</i>	3%

Fonte: Chaves, 2011.

Quadro 2: Prevalência de microrganismos no útero de éguas.

MICRORGANISMOS	SWAB UTERINO
Negativo	39%
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	26%
<i>Escherichia coli</i>	15%
<i>Candida</i>	11%
<i>Streptococcus alfa hemolítico</i>	6%
<i>Enterobacter</i>	3%

Fonte: Chaves, 2011.

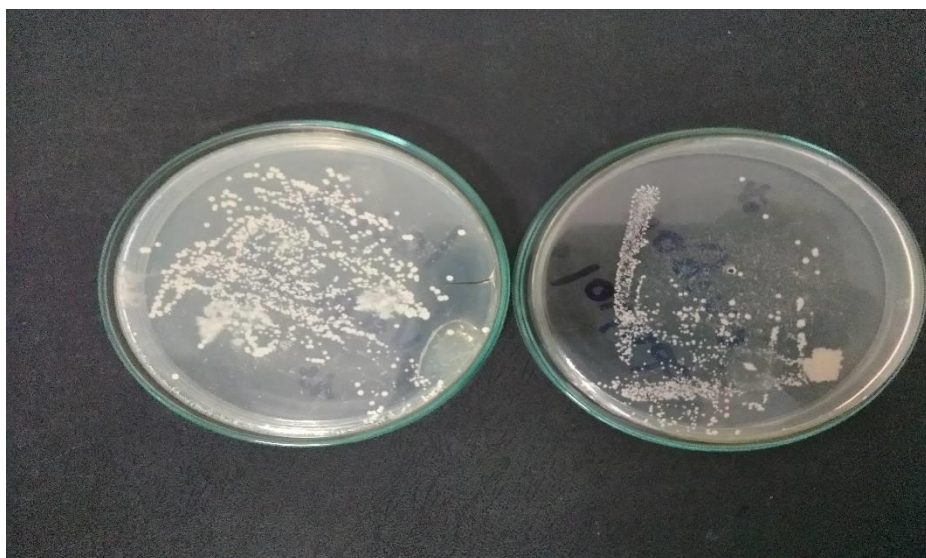


Figura 1 Placas de Petri, após 48 horas de inoculação. Foto: SIMÕES, N.P., 2018. Faculdade Ideau- Bagé, RS

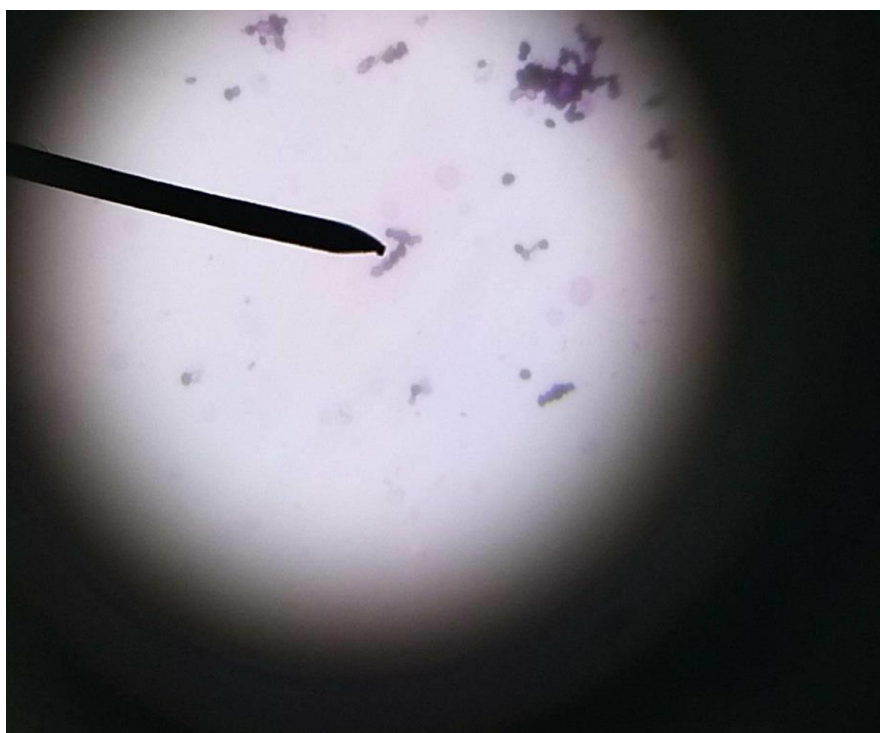


Figura 2 Lâmina após coloração de Gram, *Streptococcus*. Foto: SIMÕES, N.P., 2018. Faculdade Ideau- Bagé, RS.

5. CONCLUSÃO

Embora ocorram de diferentes maneiras, as endometrites causam deficiências reprodutivas em algumas éguas e, por consequência, perdas significativas na economia equestre. É necessário que os especialistas em reprodução de equinos utilizem melhor as técnicas microbiológicas para um diagnóstico preciso, mantendo-se constantemente atualizados sobre os diversos modos de tratar a doença para que possam reduzir sua ocorrência diminuindo os prejuízos causados por ela.

Conclui-se que o projeto de aperfeiçoamento teórico prático teve seus objetivos alcançados, pois obteve um resultado positivo e contribuiu para o diagnóstico e identificação da bactéria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILMTM. **Guia de interpretação para contagem de aeróbios**. Campinas, 2013.

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILMTM - **Guia de interpretação para contagem de E coli e Coliformes**, USA, 2009. Disponível em: <multimedia.3m.com/mws/media/.../guia-interpr-petrifilm-ecoli-e-coliformes.pdf>. Acessado em: 15/04/2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CAVALOS CRIoulos. **Ano de bons negócios para a raça Crioula**. Pelotas/Rio Grande do Sul/Brasil, 2005.

ALVARENGA M. A., CARMO M. T., SEGABINAZZI L. G., GUASTALI M. D., MAIA L. & LANDIM-ALVARENGA F. C. 2016. Feasibility and safety of endometrial injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 42, 12-18.

ASBURY, A.C.; GORMAN, N.T.; FOSTER, G.W. Uterine defense mechanisms in the mare: serum opsonins affecting phagocytosis of Streptococcus zooepidemicus by equine neutrophils. **Theriogenology**, v. 21, n. 2, p. 375-385, 1984.

BENNETT D.G., 1987, Diagnosis and treatment of equine bacterial endometritis, **Journal of Equine Veterinary Science** 7, 345-352.

BRINSKO, S.P., et al. **Endometritis**. In: Manual of Equine Reproduction, 3 ed. Estados Unidos: Mosby Elsevier, 2011. cap. 6, p. 73-84.

BRINSKO S.P, BLANCHARD T.L, VARNER D.D, et al. 2011, **Endometritis**, Manual of equine reproduction, 3rd edition, Mosby Elsevier, 59-68

BRITO L. F. C.; BARTH A. D. Endometritis in mares. **Large Animal Veterinary Rounds**, v.3, n.9, p.1-6, 2003. <http://www.larounds.ca/crus/laveng_1103.pdf>. Acessado em: 25/03/2018.

CADARIO, M.E. Endometritis. In: CARLETON, C.L. Blackwell's five minute Veterinary Consult Clinical Companion Equine. **Theriogenology**. Estados Unidos: Blackwell, 2011. cap. 26, p. 220-234.

CASLICK E.A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare. **Cornell Vet**, v.27, p.178-187, 1937.

CAUSEY, R.C.; **Uterine therapy for mares with bacterial infections. Current therapy in equine reproduction**. Cap.15, p.105-115, 2007.

CAUSEY, R.C.; WEBER, J.A.; EMMANS, E.E.; STEPHENSON, L.A. HOMOLA, A.D. KNAPP, K.R. et al. The equine immune response to *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* during uterine infection. **Vet. Rec.**, v. 172, p. 248-257, 2006.

COCCHIA, N.; PACIELLO, O.; AULETTA, L., et al. Comparison of cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**. v. 77, p. 89-98, 2012.

CHAVES M. M. B. C. **Estudo da microbiota vaginal de éguas com ênfase na pesquisa de lactobacilos**, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; BELOTTI, V. Repetibilidade e reprodutibilidade: importantes vantagens das placas Petrifilm™ de contagem de micro-organismos em alimentos. **Journal of AOAC**, n. 73, v. 2, p. 242-248, 1990.

FERREIRO, L. et al. **Flora microbiana do conteúdo uterino de éguas PSI e quarto-demilha a partir de swabs cervicais obtidos no período de 1984-1986 em haras do RS, PR e SP**. 1986. Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre. v. 14. p.45-56.

FIALA, S.M.E. **Endometrite em éguas da raça Crioula**. 1999. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-graduação em Veterinária, Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária, UFPel, Pelotas.

GRAM, C. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpräparaten. **Fortschritte der Medicin**, v. 2, p. 185-189, 1884.

HINRICHS K, CUMMINGS M.R., SERTICH P.L, KENNEY R.M. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. **J Am Vet Med Assoc**, v.193, p.72-75, 1988.

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

KATILA T., Uterine defence mechanisms in the mare, **Animal Reproduction Science** 42, 197-204, 1996.

LANGONI, H.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; SAKAMOTO, C.; SIMON, J.J.; LISTONI, F.J.P.; CARREIRA, E. L. C. Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.46, n. 6, p. 623-636, 1994.

LEBLANC, M.M. **Persistent Mating-Induced Endometritis**. In: ROBINSON, N.E. Current Therapy in Equine Veterinary Medicine, 5 ed. Estados Unidos: Elsevier, 2003. cap. 5.5, p. 234-236.

LEBLANC M.M.; MCKINNON A.O. Breeding the Problem Mare. In MCKINNON A.O.; SQUIRES E.L.; VAALA W.E.; VARNER D.D. **Equine Reproduction**, 2 ed. Estados Unidos: Wiley-Blackwell, 2011 cap. 272, p. 2620-2642.

LEBLANC M.M, JOHNSON R.D, CALDERWOOD M.B, VALDERRAMA C. Lymphatic clearance of india ink in reproductively normal mares and mares susceptibles to endometritis. **Biol Reprod Mono**, n.1, p.501-506, 1995.

LEY, W.B. **Infectious Causes of Endometritis and Treatment Options**. In: Broodmare Reproduction for the Equine Practitioner. Estados Unidos: Teton, 2004. cap. 10, p. 161-178.

LYLE, S.K. **Endometrial Culture and Antimicrobial Therapy**. In: ROBINSON, N.E.; SPRAYBERRY, K.A. Current Therapy in Equine Veterinary Medicine, 5 ed. Estados Unidos: Elsevier, 2003. cap. 5.2, p. 229-231.

MACKAY R.J. Inflammation in horses. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v.16, p.15-27, 2000.

MAMBELLI L. I., MATTOS R. C., WINTER G. H., MADEIRO D. S., MORAIS B. P., MALSCHITZKY E., MIGLINO M. A., KERKIS A. & KERKIS I. 2014. Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. **PloS one**, 9, e97889.

MARIZ, T.M.A. ANJOS, A.G. FLOR, J.M. FLOR, L.M.A.M. LIMA, C.B. GIVISIEZ, P.E.N. AZEVEDO, P.S et al. Influências do Clima Sobre a Atividade Reprodutiva de Éguas da Raça Mangalarga Marchador no Estado de Sergipe. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. v.2, n.2, p.39-43; 2008.

MARTINEZ, M.B., TADEI. C.R. In: **Microbiologia**, TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F.4ª Ed, São Paulo: Atheneu, 2005, 718 p

MELO, U.P.; PALHARES, M.S.; FERREIRA, C.; FILHO, J.M.S. Endometrite equina: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília/DF, ano XIV, n.45, p.47-63, 2008.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de micro-organismos indicadores em leite - utilização no Brasil - **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n.1, p. 115 - 126, Londrina, Março, 2000.

OVERBECK W., WITTE T.S., HEUWIESER W, 2011 “Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares” **Theriogenology** 75, 1311-1318

PASCOE D.R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. **J Reprod Fertil Suppl**, n.27, p.299-305, 1979.

PYCOCK, J.F. **Therapy for Mares with Uterine Fluid**. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK J.F.; MCKINNON, A.O. Current Therapy in Equine Reproduction. Estados Unidos: Elsevier, 2007. cap. 14, p. 93- 101.

QUINN, P.J., MARKEY, B.K, CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1 ed., São Paulo: Artmed, 2005, 512p.

RICKETTS, S.W.; MACKINTOSH, M. E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. **J. Reprod. Fert. (Sup.)**, v. 35, p. 343-351, 1987.

RICKETTS, S.W.; YOUNG, A.; MEDICI, E.B. **Uterine and clitoral cultures**. In: MCKINNON A. O.; VOSS, J.L. (Ed). Equine Reproduction. Baltimore: Lea & Febiger, p. 234-245, 1993.

TIBARY A. & FITE C.L, 2007, **Reproductive Tract Infections**, in Sellon DC, Long MT Equine Infectious Diseases, Saunders Elsevier, 84-103

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. In: **Microbiologia**, 6a ed, São Paulo: Artmed, 2003, p.267-393.

THOMASSIAN E.F. **Enfermidades dos cavalos**. 4 edição. São Paulo: Livraria Varela, 2005, p. 258 - 259.

TROEDSSON, M.H.T. **Endometritis**. In: McKINNON A.O.; SQUIRES E.L.; VAALA W.E.; VARNER D.D. Equine Reproduction, 2 ed. Estados Unidos: Wiley-Blackwell, 2011 cap. 271, p. 2608-2619.

TROEDSSON M.H.T; Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare, **Theriogenology** 52, 461-471, 1999.

TROEDSSON M.H.T; Endometritis, in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.) **Equine Reproduction** 2nd edition, Wiley-Blackwell, 2608-2619, 2011.

TROEDSSON M.H.T & ALGHAMDI A.S, Concentration of nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis. **Theriogenology**, v.58, p.445-448, 2002.

TROEDSSON M.H.T, LIU I.K.M; Managing mares with chronic uterine inflammation, **Journal of Equine Veterinary Science** 15, 305-306, 1995.

TROEDSSON M.H.T, LIU I.K.M, THURMOND M. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis. **Biol Reprod**. v.49, p.507-514, 1993b.

TROEDSSON, M.H.T.; STEIGER, B.N.; IBRAHIM, N.M.; FOSTER, D.N.; CRABO, G. Mechanisms of sperm induced endometritis in the mare. **Boil. Reprod.**, v.52, p.307, 1995.

VARNER D.V & BLANCHARD T.L.; An update on uterine defense mechanisms in the mare, **Equine Veterinary Science** 10, 169-175, 1990.