

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DA MICROBIOTA VAGINAL DE ÉGUAS COM ÊNFASE NA  
PESQUISA DE LACTOBACILOS

MARIA MANOELA BARATA DE CASTRO CHAVES

Botucatu – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DA MICROBIOTA VAGINAL DE ÉGUAS COM ÊNFASE NA  
PESQUISA DE LACTOBACILOS

MARIA MANOELA BARATA DE CASTRO CHAVES

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós Graduação em  
Medicina Veterinária para obtenção de  
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio  
Alvarenga

Nome do autor: Maria Manoela Barata de Castro Chaves

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP  
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Castro Chaves, Maria Manoela Barata de.

Estudo da microbiota vaginal de éguas com ênfase na pesquisa de lactobacilos /  
Maria Manoela Barata de Castro Chaves - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de  
Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Capes: 50504002

1. Microbiologia veterinária

Palavras-chave: Égua; Lactobacilos; Microbiota; PCR; Vaginal

Título: ESTUDO DA MICROBIOTA VAGINAL DE ÉGUAS COM ÊNFASE NA PESQUISA DE LACTOBACILOS.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Dr. Marco Antonio Alvarenga

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Dra Eliane Melo Brolazo

Membro

Curso Biomedicina

UNIP - Jundiaí

Data da defesa: 12 de Janeiro de 2011

## **Dedico este trabalho...**

À minha mãe Ana, pelo Amor, amizade e carinho. Mesmo longe sempre estive tão presente, se tornando fundamental no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu avô, Lauro dos Santos Barata (in memoriam), por todo o "investimento", admiração e confiança que sempre depositou em mim.

**Em especial...**

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga, pessoa de grande importância na minha trajetória acadêmica, profissional e pessoal. Quem ajudou a dar os primeiros passos e lapidou meus conhecimentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga por todos os ensinamentos, conhecimentos e experiências. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Alexandre Secorum Borges pelos conhecimentos transmitidos e amizade.

A Dra Eliane Brolazo pela dedicação e ajuda no experimento 2.

Ao Dr. José Paes Filho pela ajuda, atenção e dedicação, fundamentais para realização do experimento 2.

Ao Médico Veterinário Marcelo Pessoa por ter aberto as portas de sua central para coleta dos dados, e ao colega Sergio pelo auxílio na coleta das amostras do experimento 1.

Ao Prof. Adj. Raphael Lucio Andreatti Filho pela oportunidade de iniciar o experimento e adquirir meus primeiros conhecimentos na área.

A Dra Edna pela atenção e dedicação durante o início do trabalho.

Ao Funcionário do Laboratório de Microbiologia, Fernando Listoni pela boa vontade para realização dos cultivos.

Ao Prof. Adj. Antônio Carlos Paes responsável pelo Laboratório de Microbiologia.

À Prof. Ass. Dra. Miriam Harumi Tsunemi pela análise estatística dos dados.

Ao Doutorando Eduardo Fioratti pelo auxílio na coleta das amostras.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-UNESP de Botucatu.

Aos colegas de Pós graduação pelo agradável convívio.

	Página
<b>SUMÁRIO</b>	
RESUMO .....	01
ABSTRACT .....	02
1. INTRODUÇÃO .....	03
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	06
2.1. Endometrite .....	06
2.1.1. Mecanismo de defesa uterino .....	06
2.1.2. Etiologia da endometrite .....	08
2.1.2.1 Endometrite Persistente pós cobertura .....	08
2.1.2.2. Endometrite infecciosa .....	10
2.2. Flora vaginal .....	14
3. OBJETIVO .....	19
4. MATERIAL E METODO .....	20
4.1. Experimento 1.....	20
4.1.1 Animais .....	20
4.1.2 Coleta das amostras .....	20
4.1.3 Cultivo .....	21
4.1.4 pH vaginal .....	22
4.2. Experimento 2.....	22
4.2.1 Grupos experimentais .....	22
4.2.2 Coleta das amostras .....	23
4.2.3 Cultivo .....	23
4.2.4 Extração de DNA e PCR .....	24
5. RESULTADOS .....	26
5.1. Experimento 1 .....	26
5.2. Experimento 2 .....	29
6. DISCUSSÃO .....	32
7. CONCLUSÕES .....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto de swab acoplado à pipeta de inseminação artificial .....	21
Figura 2: Foto de sonda de silicone revestindo o sistema de coleta .....	21
Figura 3: Foto de swab exposto, mimetizando coleta intrauterina .....	21
Figura 4: Porcentagem de microrganismos isolados da vagina de éguas .....	27
Figura 5: Porcentagem de microrganismo isolados do útero de éguas .....	28
Figura 6: Porcentagem de microrganismo isolados da vagina e útero .....	29
Figura 7: Porcentagem de isolamentos positivos de Lactobacillus e bandas positivas para Lactobacillus de amostras vaginais de éguas e mulheres .....	30
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose mostrando os fragmentos amplificados na PCR, amostras DNA extraídas de swabs vaginais de éguas e mulher.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de microrganismos na vagina de éguas .....	26
Tabela 2: Prevalência de microrganismos no utero de éguas .....	27
Tabela 3: Prevalência de microrganismos presentes na vagina e no utero de éguas...	28
Tabela 4: Porcentagem de isolamentos positivos de lactobacilos e bandas positivas para lactobacilos de amostras vaginais de éguas e mulheres .....	30

CASTRO CHAVES, M.M.B. **Estudo da microbiota vaginal de éguas com ênfase na pesquisa de Lactobacilos**. Botucatu, 2011. 45p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

Na égua o ambiente uterino saudável não apresenta microflora, diferente da vagina onde se sabe existir uma flora vaginal rica em microrganismos não patogênicos. Muitas bactérias da flora vaginal normal podem ser deslocadas para o interior do útero, podendo ser esta a causa principal de endometrites em éguas doadoras de embriões. A presença de *Lactobacillus spp* é considerada importante na flora vaginal de mulheres e tem sido pouco investigada em éguas. O presente trabalho tem como objetivo estudar a flora vaginal de éguas, doadoras de embriões, determinar os principais microrganismos presentes, relacionar os achados microbiológicos vaginais e uterinos, assim como determinar a prevalência de *Lactobacillus*. No experimento 1 foram utilizadas 77 éguas doadoras de embrião, 33 foram coletadas amostras vaginais e uterinas e 77 apenas vaginais. O experimento 2 contou com dois grupos (36 éguas e 10 mulheres) de swabs vaginais sendo um para cultivo e isolamento de *Lactobacillus* e outro para extração do DNA e PCR. As bactérias predominantes na vagina foram: *Streptococcus zooepidemicus* (42%), *Escherichia coli* (25%), *Streptococcus alfa hemolítico* (15%) *Candida* (6%), *Enterobacter spp* (3%), *Bacillus spp* (3%), *Streptococcus beta hemolítico* (3%) e *Pseudomonas* (3%).. Das 33 amostras coletadas do útero de éguas somente 39% (n=12) não apresentaram crescimento bacteriano ou fúngico. Tendo sido *Streptococcus zooepidemicus* o mais frequentemente encontrado (26%), seguido de *Escherichia coli* (15%), *Candida spp* (9%), *Streptococcus alfa hemolítico* (6%) e *Enterobacter* (3%). Os microrganismos isolados da vagina e que estavam concomitantemente presentes no útero de éguas foram: *Streptococcus zooepidemicus* (21%), *Escherichia coli* (12%), *Candida spp* (9%) e *Streptococcus alfa hemolítico* (6%). Em 83,3% houve concordância entre as amostras negativas na vagina e no útero ( $p < 0,05$ ). Em 73,7% das éguas houve concordância entre a presença de microrganismo na vagina e no útero ( $p < 0,05$ ). Das 35 amostras coletadas do grupo I apenas duas (5,7%) apresentaram cultivo positivo para *Lactobacillus spp* e oito (20%) apresentaram bandas positivas para presença de *Lactobacillus*. No grupo II 90% das mulheres tiveram *Lactobacillus* isolados da amostra vaginal, e todas as amostras de PCR, apresentaram bandas positivas. Baseado nos resultados do presente experimento podemos concluir, que a flora vaginal de éguas doadoras de embrião é rica em bactérias patogênicas e que *Lactobacillus* não faz parte da flora vaginal da maioria dos animais estudados.

**Palavras Chave: Égua; Vaginal; Microbiota; Lactobacilos; PCR.**

CASTRO CHAVES, M.M.B. **Study of mare vaginal microbiota with emphasis in research of Lactobacillus**. Botucatu, 2011. 45p. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## ABSTRACT

Different from the vagina, where a rich microflora is present, the uterine environment is considered free of microorganisms. One possibility for the installation of endometritis in mares is the ascendent contamination from the vagina. The presence of *Lactobacillus* on vaginal flora is considered important in woman however there is few information on mares. The present experiment aimed to study the vaginal microflora of embryo donor mares, to correlate the vaginal and uterine finds and also to determine the prevalence of *Lactobacillus* on vaginal environment. On experiment 1 a total of 77 mares were used and vaginal samples collected from 33 of these mares both vaginal and uterine samples were collected. On experiment 2 vaginal swabs from 36 mares and 10 women were collected for culture and isolation of *Lactobacillus*, DNA extraction and PCR. The predominant bacteria isolated from the vagina were: *Streptococcus zooepidemicus* (42%), *Escherichia coli* (25%), *Streptococcus alfa hemolítico* (15%) *Candida* (6%), *Enterobacter spp* (3%), *Bacillus spp* (3%), *Streptococcus beta hemolítico* (3%) e *Pseudomonas* (3%). From 33 samples collected from the uterus only 39% (n= 12) did not show any microorganism on culture. *Streptococcus zooepidemicus* was the most frequent isolated microorganism (26%), followed by *Escherichia coli* (15%), *Candida spp* (9%), *Streptococcus alfa hemolítico* (6%) e *Enterobacter* (3%). When evaluated the microorganisms isolated from both vaginal and uterine samples *Streptococcus zooepidemicus* (21%), *Escherichia coli* (12%), *Candida spp* (9%) e *Streptococcus alfa hemolytic* (6%) were the most frequent isolated bacteria. The agreement between swabs taken from both uterus and vagina was 83.3% ( $p < 0,05$ ) for negative cultures and 73,7% for positive cultures ( $p < 0,05$ ). From 35 samples collected on group I *Lactobacillus spp* was isolated in only two (5,7%) eight (20%) samples showed positive bands on PCR for *Lactobacillus*. On group II 90% of woman vaginal samples was possible to isolated *Lactobacillus* and all samples showed positive bands on PCR. Based on the results of the present experiment we can concluded that the vaginal flora from embryo donor mares is rich on pathogens and that *Lactobacillus* is not present of vaginal flora from most of these mares.

**Key Word: Mare; Vaginal; Microbiota; Lactobacillus; PCR.**

## 1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva da fêmea equina está diretamente relacionada com a capacidade uterina de manter um ambiente adequado para o desenvolvimento embrionário e crescimento fetal.

Na égua o ambiente uterino saudável não apresenta microflora, diferente da vagina onde se sabe existir uma flora vaginal rica em microrganismos não patogênicos. Durante a monta natural ou Inseminação Artificial (IA), muitas bactérias da flora vaginal normal podem ser deslocadas para o interior do útero, podendo ser esta a causa principal de endometrites em éguas doadoras de embriões.

A endometrite, desordem uterina que envolve inflamação e muitas vezes infecção do endométrio, tem sido reconhecida como a principal causa de baixa fertilidade em éguas em programa de Transferência de Embrião e as infecções bacterianas ocorrem em 25-60% das éguas problemas. Geralmente a incidência dos problemas uterinos é maior em doadoras de embrião, provavelmente por serem estas submetidas a uma manipulação excessiva do trato genital. A maioria das infecções uterinas em éguas envolve apenas o endométrio.

Bactérias patogênicas que causam aborto ou morte fetal, como *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, foram isoladas da fossa clitoriana e vestibulo vaginal de éguas, representando um fator de risco de infecção bacteriana ascendente, devido à manipulação do trato reprodutivo durante procedimentos de inseminação, coleta de material uterino, infusões e transferência de embriões.

A presença de espermatozoides no ambiente uterino causa uma reação inflamatória levando a uma endometrite fisiológica, considerada um processo normal

quando solucionada em até 36 horas sem nenhum tratamento. Esta inflamação fisiológica e transitória serve para retirar espermatozóides mortos e outros contaminantes do útero através de uma rápida migração de neutrófilos para o lúmen uterino. Além da presença do sêmen, o processo de IA pode carrear bactérias ou fungos da flora vaginal para dentro do útero, o que juntamente com repetidas inseminações, pneumovagina, má formação vulvar ou sistema imune incompetente levam a um quadro de endometrite.

Éguas susceptíveis à endometrite não conseguem debelar a inflamação de forma eficiente, o que pode tornar a endometrite infecciosa persistente ou com resolução tardia. O ambiente uterino torna-se desfavorável para o embrião, devido à contaminação microbiana, restos celulares e principalmente células inflamatórias, as quais sabidamente liberam substâncias citotóxicas, que inviabilizam o desenvolvimento embrionário.

Acredita-se que refluxo de antibióticos e desinfetantes utilizados em repetidos tratamentos uterinos, possam alterar a flora vaginal, levando a um desequilíbrio da microbiota, tornando o meio propício para desenvolvimento de agentes patogênicos, como os fungos, ocorrendo contaminação ascendente via cervix. Infecções fúngicas têm sido diagnosticadas em éguas com histórico de endometrite crônica apresentando alta recidiva e resistência às drogas terapêuticas.

Infecções micóticas em éguas vazias têm sido mais frequentes por uso indiscriminado de antibióticos e por aumento da manipulação do trato reprodutivo em programas de criação de equinos. Outros fatores que facilitam a colonização do útero por fungos incluem má conformação perineal, pneumovagina, excessiva manipulação intrauterina e baixa resposta imunológica.

Apesar da baixa incidência, a endometrite fúngica é uma importante causa de sub fertilidade em éguas, pois são mais resistentes ao tratamento do que infecções bacterianas e apresentam um prognóstico ruim.

Os elementos fúngicos que causam doenças reprodutivas em égua são geralmente oportunistas e o reservatório primário destes agentes infecciosos é o trato reprodutivo caudal, incluindo a vagina e a genitália externa. As espécies mais frequentemente isoladas em cultivo de secreções uterinas são *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, mas outras leveduras têm sido relatadas.

A presença de *Lactobacillus* spp na flora vaginal de éguas foi relatada em apenas um trabalho. *Lactobacillus* spp e *Enterococcus* spp encontrados na flora vaginal de éguas com bom histórico reprodutivo, mostraram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como para *E.coli* e *S.aureu*.

São necessários experimentos para elucidar a flora vaginal em éguas sadias e em éguas problemáticas para melhor compreensão dos mecanismos de instalação e colonização de microorganismos no ambiente uterino para no futuro estabelecer novas estratégias de controle e tratamento das endometrites.

O presente trabalho tem como objetivo estudar a flora vaginal de éguas, doadoras de embriões, determinar os principais microrganismos presentes, relacionar os achados microbiológicos vaginais e uterinos, assim como determinar a prevalência de *Lactobacillus* sp no ambiente vaginal de éguas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 ENDOMETRITE**

#### **2.1.1 Mecanismo de defesa uterino**

O ambiente uterino sadio deve oferecer condições ideais para o transporte espermático ao sítio de fecundação, e ao desenvolvimento embrionário (Mcrae et al.,1988). Barreiras físicas como vulva, vestibulo, vagina e cervix protegem o útero de contaminações externas, e qualquer comprometimento destas barreiras pode predispor a égua a infecções (Troedsson et al.,1999).

O transporte dos espermatozóides do útero para o oviduto se completa em quatro horas após cobertura ou IA, e apenas uma pequena porção do sêmen depositado no útero atinge o oviduto (Brinsko et al.,1991; Scott et al.,1995). O aumento da contração do miométrio uterino, em resposta à cobertura ou IA, é também responsável pela rápida eliminação dos espermatozóides do útero pela cérvix (Katila et al.,2000), porém nem todos os espermatozóides são removidos do útero por este mecanismo (Troedsson et al.,2008).

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 carreadas durante a monta natural ou inseminação artificial (Troedsson et al.,1995).

A inflamação induzida apresenta mecanismo semelhante à endometrite causada por agentes infecciosos, envolvendo ativação do sistema complemento. O sistema complemento é um mediador de reações biológicas, que servem de defesa uterina contra agentes externos. Reações que incluem: aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização para fagocitose, ativação de lipases de membrana e lise do

organismo alvo (Troedsson et al.,2008). O aumento da permeabilidade vascular permite que o exsudato extravase para o tecido agredido, ocasionando um edema local com migração de células de defesa para o tecido lesado. Os neutrófilos e os eosinófilos são os primeiros a transpor a parede vascular, devido a sua maior mobilidade no sangue (Collins et al.,1999).

O mecanismo de defesa celular é representado principalmente pelos neutrófilos, que são as primeiras células atraídas pelos mediadores inflamatórios, responsáveis pela fagocitose dos antígenos (Galindo et al.,2003). Os macrófagos, ao contrário dos neutrófilos, são capazes de realizar atividade fagocítica prolongada e repetida, além de secretarem moléculas (citocinas) que amplificam a resposta imune, controlam a inflamação e contribuem para o reparo tecidual através da remoção do tecido danificado (Tizard et al.,1998).

A resposta uterina rápida contra um antígeno é realizada por mediadores quimiotáticos resultando em influxo de células polimorfonucleares (neutrófilos) para o lúmen uterino. Os neutrófilos são atraídos por produtos inflamatórios complementares como Leucotrieno B4 (LTB4), Prostaglandina E, Prostaglandina F2 alfa e Interleucina 8 (Troedsson et al.,2008).

Durante a inflamação pós cobertura, é liberada prostaglandina F2 alfa que provoca contrações do miométrio o que ajuda a remover produtos inflamatórios liberados durante a fagocitose e apoptose (morte celular programada) de neutrófilos. Esta defesa física ou mecânica do útero é o ponto chave para prevenção da inflamação persistente e alterações endometriais (Troedsson et al.,2008).

O Óxido Nítrico é um subproduto do processo infamatório produzido por neutrófilos, macrófagos e células endoteliais. É encontrado no fluido uterino após a

cobertura podendo causar relaxamento do miométrio e dificultar a remoção de restos celulares e limpeza do útero quando em alta concentração. Porém, é uma substância importante para que a resposta inflamatória não seja exacerbada por ser um mediador da inflamação (Moirá et al.,1998).

Éguas com sistema imunológico funcional debelam a inflamação pós cobertura em 24 a 36 horas (Katila et al.,1995). Quando há falha no sistema de defesa, a inflamação persiste tornando o útero um ambiente incompatível para o desenvolvimento embrionário e pré disposto a infecções secundárias (Troedsson et al.,2008).

Várias classes de imunoglobulinas já foram isoladas do útero de equinos (IgGa, IgGb, IgGc, IgGf, IgGT, IgA e IgM), sendo a IgA predominante no muco cervicovaginal e a IgG no lúmen uterino. A transudação de imunoglobulinas para dentro do útero é mínima e a IgA e IgG são produzidas localmente pelo trato genital (Troedsson et al.,1999; Threfall & Immegart, 2000).

LeBlanc et al (1991) avaliaram a concentração de imunoglobulinas no fluido uterino após infusão de *Streptococcus zooepidemicus*, e concluíram que as éguas incapazes de eliminar as bactérias apresentavam altas concentrações de anticorpos, quando comparadas com éguas resistentes.

## **2.1.2 Etiologia da Endometrite**

### **2.1.2.1 Endometrite Persistente Pós Cobertura**

A endometrite persistente pós cobertura é uma inflamação fisiológica que serve para limpeza do excesso de espermatozóides e outros contaminantes uterinos (TROEDSSON, 1999). Após quatro horas da inseminação artificial ou monta natural, a maioria dos espermatozóides presentes no lúmen uterino deve ser

eliminada através de um processo inflamatório transitório (CAMPBELL & ENGLAND, 2006).

A inflamação promove a liberação de prostaglandina F2alfa responsável pelas contrações miométriais, essenciais para a limpeza uterina (TROEDSSON et a., 2001). Nas éguas susceptíveis há um maior acúmulo de fluido no interior do útero que pode atuar como meio de cultura para microrganismos oportunistas, levando a um processo infeccioso (LEBLANC, 2003).

A endometrite persistente é causada por alterações degenerativas que ocorrem continuamente no útero de éguas em resposta à idade e ao número de partos. Geralmente os animais afetados são múltiparos com mais de 14 anos de idade (LEBLANC, 2003).

As citocinas são proteínas responsáveis pelo estímulo das defesas humoral e celular e pela ativação de células que realizam a fagocitose. Dentre as citocinas, as secretadas pelos linfócitos são denominadas de linfocinas. Algumas são denominadas interleucinas, essas podem ser secretadas por outras células diferentes dos leucócitos e que não fazem parte do sistema imune, mas possuem a capacidade de afetar a resposta celular principalmente ligada a funcionalidade dos leucócitos (TIZARD, 1998).

Éguas susceptíveis apresentam no útero maior expressão de interleucinas pró-inflamatórias durante as fases de estro e diestro quando comparadas as éguas resistentes a endometrite persistente. A expressão dessas interleucinas aumenta após a inseminação artificial e para as éguas susceptíveis continuam aumentadas por período de até 8 dias, caracterizando a inflamação uterina persistente (Fumuso et al.,2003). Fumuso et al (2007) constataram que as éguas susceptíveis apresentam menor expressão de interleucina anti inflamatória (IL-10), atrasando a resolução da inflamação, e maior

expressão de interleucina pró inflamatória (IL-8), prorrogando e exacerbando a reação inflamatória.

#### **2.1.2.2 Endometrite Infeciosa**

Endometrite causada por infecção bacteriana tem sido a maior causa de queda reprodutiva em éguas. Bactérias envolvidas na endometrite equina são, na maioria, consideradas microrganismos oportunistas: são capazes de colonizar o trato genital baixo como uma variedade de locais extra genitais. Normalmente são barrados por via ascendente, pela cervix e pelas defesas uterinas, em particular pela proteção endógena da flora vaginal e atividade local do sistema imune inato e adquirido (Wittenbrink et al.,2008).

Defeitos anatômicos da região vulvar e perineal que levam a pneumovagina e a contaminação fecal, são alterações que predispõem a endometrite infecciosa (Lebalc et al.,1997).

Além disso, a conformação perineal (inclinada), partições e idade avançada podem levar a um relaxamento do suporte estrutural uterino, o que resulta em um útero penduloso, que acaba piorando a drenagem dos fluidos uterinos pela cervix (LEBLANC et al, 1998). Segundo Watson (2000), mecanismos de defesa uterino defeituosos podem contribuir para a persistência da infecção.

*Escherichia coli* é a bactéria mais frequentemente associada com problemas de fertilidade em éguas e o *Streptococcus* beta hemolítico o segundo mais frequente. As endometrites causadas por *E.coli* não apresentam sinais clínicos, estando mais associado com repetidos cios. Já infecções do endométrio causadas por *Streptococcus* beta

hemolítico apresentam vários sinais clínicos. Nesse mesmo estudo, fungos foram o terceiro microrganismo mais encontrado em éguas com problemas de fertilidade (Albihn et al.,2003).

Apesar da baixa incidência, infecções uterinas causada por fungos têm sido atualmente observadas com maior frequência. Langoni et al (1999) e Aguiar et al (2005) isolaram *Candida albicans* em 2% e 4% respectivamente, em amostras de endometrite eqüina.

O termo fungo se refere às duas formas morfológicas de apresentações: levedura e hifa. As leveduras são arredondadas, células únicas, enquanto hifas são compostas por várias células, formando estruturas longas, filamentosas e septadas. Alguns fungos, como *Candia albicans*, são dimórficos e sua morfologia depende das condições do ambiente (Carter & Chengappa, 1995).

Os agentes fúngicos que causam infecções reprodutivas são geralmente oportunistas e estão presentes na flora vaginal e intestinal de animais saudáveis. O trato reprodutivo caudal, incluindo a vagina e genitália externa (vulva e clítoris), é o principal reservatório de agentes infecciosos que colonizam o útero. Isto explica porque as endometrites fúngicas estão geralmente associadas com históricos de má conformação perineal, pneumovagina e excessivas manipulações intrauterinas (coleta de amostra para exame citológico/histopatológico/microbiológico, IA, lavagens uterinas, infusão de antibióticos). Além disso, éguas com baixo mecanismo de defesa uterino apresentam alto risco para desenvolver endometrite fúngica (Troedsson et al.,1997; Dascanio et al.,2001).

Stout (2008) verificou, em um estudo envolvendo 128 casos de éguas com endometrite fúngica, que os fatores mais frequentes associados a este tipo de infecção

são: prévio tratamento uterino com antibiótico (85%), pneumovagina (39%) e grande acúmulo de fluido intra uterino (33%). No mesmo estudo, a incidência de endometrite fúngica foi significativamente maior em éguas problemas (74%) comparada com éguas jovens (9%). A maioria das éguas que apresenta endometrite micótica é idosa, com histórico de endometrite crônica, doadoras de embriões por várias estações consecutivas. Estas éguas são submetidas a uma manipulação excessiva do trato genital durante ciclos consecutivos, pré dispendo a infecções ascendentes (Alvarenga & Coutinho da Silva, 2010).

Vários estudos em mulheres mostraram que a microflora vaginal normal apresenta um papel importante na prevenção de vaginites causadas, principalmente, por *Candida albicans* (Reid & Bruce, 2006). Espécies de *Lactobacillus*, encontrados na flora vaginal de mulheres, são produtores de ácido láctico e peptídeos bactericidas, que inibem o crescimento de patógenos prevenindo sua adesão na parede da vagina (Sobel, 1996). A utilização de antibioticoterapia causa diminuição da população de *Lactobacillus*, resultando em um desequilíbrio da flora e conseqüente crescimento de *Candida spp* (Witkin et al, 2007)

Em estudo recente e pioneiro os autores isolaram *Lactobacillus* da vagina de 70% de éguas saudáveis, confirmando a hipótese que distúrbios na flora vaginal pré dispõe ao crescimento de patógenos, que podem infectar o útero causando endometrite (Fraga et al.,2008).

Acredita-se que prolongados tratamentos com infusões de antibióticos no útero de éguas causem um distúrbio no mecanismo de defesa uterino que, em condições normais, impediram o desenvolvimento fúngico. Ainda não está claro como a administração de antibióticos intrauterino pré dispõe a infecções fúngicas, já que não existe uma flora uterina normal para ser desequilibrada (Stout, 2008).

O ambiente uterino não apresenta microflora, diferente da vagina, onde se sabe existir uma flora vaginal rica em microrganismos não patogênicos e patogênicos que permanecem em equilíbrio (Hinrichs et al.,1988). Repetidos tratamentos uterinos com antibióticos e desinfetantes podem provocar refluxo para vagina, alterando a flora vaginal e levando a um desequilíbrio da microbiota. Isto pode tornar o meio propício para o desenvolvimento de agentes patogênicos, como os fungos, ocorrendo contaminação ascendente via cervix (Fraga et al.,2008).

Microrganismos comumente associadas à endometrite por resistência a antibióticos são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp e leveduras (LeBlanc et al., 2008).

*Candida* é o fungo mais frequentemente associado com formação de biofilme. Os biofilmes são formados por material polimérico extracelular combinado com uma densa rede de leveduras, hifas e pseudohifas. O biofilme pode ser um importante fator envolvido no aumento da resistência a drogas antifúngicas e a capacidade de resistir a defesas imunes do útero. Sendo importante para aspecto de limpeza e esterilização dos materiais de transferência de embriões, como os cateteres. Os biofilmes também proporcionam uma forte habilidade adesiva a superfícies epiteliais evitando ou dificultando sua eliminação (Chandra et al.,2001). Entre as várias espécies de *Candidas*, a *Candida albicans* apresenta melhor habilidade para aderir a células epiteliais vaginais da mulher, o que pode ser um fator importante na sua patogenicidade (Sobel & Chaim, 1996).

A capacidade de mudar da forma de levedura para forma filamentosa (hifa) é um importante fator responsável pela disseminação da *Candida albicans* em diferentes

tecidos. A forma filamentosa é mais invasiva do que a leveduriforme, conseqüentemente mais difícil de ser tratada e eliminada (LeBlanc, 2008).

*Aspergillus* é o segundo fungo mais importante relatado em éguas com endometrite micótica, aparentemente é capaz de causar maior prejuízo ao endométrio por produzir e liberar enzimas, como a elastase, por ser um fungo filamentoso tem melhor habilidade para penetrar tecidos, provocando, conseqüentemente uma infecção mais profunda (Pugh et al.,1986).

Os sinais clínicos provocados por invasão micótica no útero de éguas variam em severidade de quase assintomático a uma endometrite purulenta persistente e infertilidade crônica. Secreção vaginal purulenta pode também ser observada em alguns casos (Blue, 1987).

## **2.2 FLORA VAGINAL**

A microbiota vaginal representa um dos mais importantes mecanismos de defesa da função reprodutora, mantendo o meio saudável e impedindo a proliferação de microrganismos patogênicos (Linhares et al., 2009).

A flora bacteriana vaginal, associada à presença de diversos componentes da imunidade inata e adquirida, constituem importante mecanismo de defesa para evitar a invasão/proliferação de patógenos microbianos (Linhares et al., 2009).

A imunidade inata na superfície das mucosas exerce a primeira linha de defesa contra os microrganismos patogênicos aos qual o hospedeiro é normalmente exposto (Lima, 2008).

As células epiteliais exercem um papel importante na indução da resposta imune inata no trato genital feminino (Valore et al., 2002). Essas células que recobrem as superfícies mucosas não atuam apenas como barreira física, mas também participam

ativamente da secreção de substâncias antimicrobianas e fatores imunes 13\*- (O'Neil, 1999).

A composição da flora vaginal não é constante, sofrendo variações em respostas a fatores exógenos e endógenos (Priestley et al., 1997; Eschenbach et al., 2001). As alterações que ocorrem no meio vaginal podem aumentar ou diminuir as vantagens seletivas para microrganismos específicos (Linhares et al., 2009).

Os antibióticos podem alterar a ecologia vaginal, induzir um desequilíbrio na microflora endógena, desencadeando proliferação seletiva de microrganismos que estavam sendo inibidos e que possam ser prejudiciais para a saúde de vagina e do útero (Linhares et al., 2009).

Sob condições normais, a microbiota vaginal de fêmeas bovinas apresenta composição e número variável e os microrganismos encontrados estão presentes também na pele e fezes, com propriedades invasivas, podendo estar em pequeno número no útero de vacas saudáveis. Grande parte das bactérias isoladas do conteúdo vaginal constitui-se de bastonetes Gram-negativos provenientes do trato gastro intestinal, especialmente *Escherichia coli* e Gram-positivos como *Streptococcus spp.* (Hafez, 1993; Arthur, 1996; Kunz, 2002)

Segundo Oba et al., (1992) a flora vaginal de búfalas é composta por *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus sp*, *Corynebacterium sp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Micrococcus sp*, *Proteus sp*, *Staphylococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus alfa hemolítico*, *Streptococcus alfa hemolítico* e *Streptococcus beta hemolítico*.

*Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli* e leveduras foram isoladas da vagina de cadelas, podendo ser considerados como parte normal da flora vaginal canina (Gunay et al., 2010). O mesmo estudo mostrou que o ambiente uterino é

estéril e que o isolamento de bactérias em cadelas saudas é importante, pois essas podem se tornar patogênicas o que vai influenciar na fertilidade do animal.

*Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia coli* podem estar presentes na vagina e no útero de cadelas saudas, mas não necessariamente das doentes. Nesse estudo as bactérias encontradas na vagina de cadela saudas também estavam presentes na vagina de cadelas com piometra (Carneiro, 2005).

Segundo Dhaliwal et al (1998) é possível que o útero de cadelas com piometra esteja estéril, e sugeriram que nem sempre as bactérias estão envolvidas na patogenia da doença. Ferreira e Lopes (2000) mostraram que em apenas 5% dos casos de piometra o conteúdo apresentava-se asséptico.

Na fêmea suína sadia a flora vaginal é constituída por bactérias anaeróbicas e aeróbicas, sendo as mais representativas: *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*, *Enterobacter*, *Corynebacterium spp*, *Micrococcus spp* e *Actinobacillus spp* (Maes, 1998).

Poucos trabalhos na literatura sobre flora vaginal da fêmea equina foram encontrados. Newcombe (1978) e Hinrichs et al.,(1988) relataram uma flora rica em microrganismos não patogênicos. Bactérias patogênicas que causam morte embrionária ou fetal, como *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, foram isoladas da fossa clitoriana e vestibulo vaginal de éguas saudáveis, representando um fator de risco de infecção bacteriana ascendente (Hinrichs et al., 1988). Scott et al.,(1971), estudando material coletado de éguas de matadouro, observaram que cerca de 80% delas apresentaram crescimento de

bactérias patogênicas no fundo vaginal. Tendo sido também predominante o isolamento de *Streptococcus zooepidemicus*.

Na mulher a produção de ácido láctico por *Lactobacillus sp* parece ser essencial para a manutenção de um ecossistema saudável. O pH ácido resultante previne a proliferação excessiva de microrganismos potencialmente patogênicos (Linhares et al., 2009).

No trato genital da mulher, as defesas imunes inatas incluem o epitélio de barreira, a presença de muco, o pH ácido em torno de 4,5 e mediadores solúveis como proteínas do complemento e peptídeos antimicrobianos (Lima, 2008). Os peptídeos antimicrobianos podem ter um papel fundamental na defesa vaginal de mulheres com baixa concentração de ácido láctico e alto pH vaginal (Valore et al., 2002).

Os avanços nos métodos não cultiváveis de amplificação de genes para a identificação de bactérias têm possibilitado tentativas de caracterizar um quadro mais definitivo da composição de ecossistema vaginal (Linhares et al., 2009).

Fraga et al., (2008b) isolou *Lactobacillus* da flora vaginal em 97% das cadelas. A presença na vagina sugere a ocorrência de transferência dessa bactéria do intestino para a vagina. Bactérias produtoras de ácido láctico foram isoladas da vagina de cadelas saudáveis e doentes incluindo animais tratados com antibióticos, sugerindo que a microbiota produtora de ácido láctico é estável em diversas condições, porém o pH vaginal de cadelas saudáveis variou de 6 a 7.5.

Em recente e inédito estudo Fraga et al., (2008) isolaram *Lactobacillus ssp.* da flora vaginal de 70% das éguas normais, mais baixo do que o encontrado em mulheres. Trabalhos mostram que mulheres saudáveis em período reprodutivo apresentam

predominância de *Lactobacillus* na flora vaginal e a proliferação de bactérias patogênicas na vagina é suprimida pela ação de ácido láctico produzido pelos *Lactobacillus* ssp. (Witkin et al.,2007) . O pH ácido vaginal em mulheres é reconhecido como um importante mecanismo de defesa contra a proliferação de diferentes patógenos microbianos (Witkin et al.,2007) e está diretamente relacionado à presença de *Lactobacillus* (Reid et al.,2001) . Determinando grande importância dessas bactérias na microbiota vaginal humana, sendo sua presença considerada benéfica (Aslim et al.,2006; Witkin et al.,2007; Fraga et al.,2008). O pH vaginal em éguas normais é 7.0 (Fraga et al.,2008) e em mulheres 4.5 (Reid et al.,2001). A presença e abundância de lactobacilos explica a diferença do pH vaginal entre humanos e equinos (Fraga et al.,2008).

### 3 **OBJETIVOS**

- 1) Determinar os principais microrganismos presentes na flora vaginal de éguas.
- 2) Relacionar os achados microbiológicos vaginais e uterinos.
- 3) Determinar a prevalência de *Lactobacillus sp* no ambiente vaginal de éguas.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Experimento 1: Estudo da flora vaginal de éguas**

#### **4.1.1 Animais**

O material foi coletado em propriedades localizadas no município de Botucatu e Bauru durante a estação de monta de 2008/2009. Foram utilizadas setenta e sete éguas da raça Mangalarga Paulista e Quarto de Milha, com idade entre 5 e 18 anos, doadoras de embrião em programas de TE e com histórico reprodutivo normal. As quais foram distribuídas em dois grupos conforme a seguir:

GRUPO I: 77 éguas para coleta de amostra vaginal.

GRUPO II: 33 éguas para coleta de amostras vaginal e uterina.

A concordância da presença da bactéria no útero e na vagina foi analisada através do teste phi, pois são ambas variáveis binárias. Valores de p menores que 0,05 indicam que a concordância das observações entre a vagina e o útero é estatisticamente significativa.

#### **4.1.2 Coleta das amostras**

Exame ultra-sonográfico utilizando aparelho SIU 5500 (nome empresa) equipado com transdutor linear de cinco megahertz (MHz) foi realizado para confirmação do estro, avaliação do útero e ovários antes da colheita do material. A amostra vaginal foi coletada através de um swab estéril com meio de transporte para cultivo microbiológico. Para obter amostra uterina foi desenvolvido um sistema para minimizar a contaminação vaginal durante a coleta, utilizando swab estéril com meio de transporte acoplado a uma pipeta de inseminação artificial (Provar, Produtos

Veterinários, São Paulo-SP), recoberta por uma mangueira de silicone previamente esterilizada a 120°C por 20 minutos em autoclave (Figuras 1, 2 e 3).



Figura 1: swab acoplado à pipeta de IA.

Figura 2: sonda de silicone revestindo o sistema.



Figura 3: swab exposto, mimetizando coleta intrauterina.

#### **4.1.3 Cultivo**

As amostras do material vaginal e uterino para cultivo microbiológico foram enviadas para o Serviço de Diagnóstico Microbiológico do Hospital Veterinário da

FMVZ, UNESP Botucatu, junto à disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais. As amostras foram semeadas em meios de Macconkey, Sabouraud e Agar Sangue com 7% de sangue de ovino desfibrinado. Foram incubadas em aerobiose a 37°C por um período de observação entre 24, 48, 72 e 96 horas. Para identificação das bactérias nas amostras foram realizadas observações microscópicas, bioquímicas e morfotintoriais (método de Gram) e classificadas dentro de seus bioquímicos referentes.

#### **4.1.4 pH Vaginal**

O pH vaginal das éguas foi determinado através de fita de pH (PAP INDIC PH 0-14) colocada no fundo da vagina, onde permaneceu por dois minutos. A leitura da fita foi feita com base na tabela do fabricante.

## **4.2 Experimento 2: Tentativa de isolamento de *Lactobacillus sp* da flora vaginal de éguas**

### **4.2.1 Grupos Experimentais**

Foram coletadas amostras vaginais de dois grupos experimentais:

Grupo I: 36 éguas sem raça definida, com idade entre 4 a 12 anos. Os animais foram escolhidos de forma aleatória, independente da fase do ciclo estral, do histórico reprodutivo e da conformação perineal. Exame ultra-sonográfico utilizando aparelho SIU 5500 equipado com transdutor linear de cinco megahertz (MHz) foi realizado para determinar a fase do ciclo estral, avaliando útero e ovários antes da colheita do material.

Grupo II: 10 mulheres voluntárias com idades entre 24 e 35 anos. As amostras vaginais foram coletadas pelas próprias.

#### **4.2.2 Coleta das amostras**

A amostra vaginal, do grupo I, foi coletada através de um swab estéril acoplado a uma pipeta de inseminação artificial (Provar). Foram feitos dois swabs de cada égua, um transportado em meio Aimes com carvão (CB Products, Corumbataí, Brasil) e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher na UNICAMP Campinas-SP, resfriado a 5 °C por um período de três horas; e o outro foi transferido para um tubo tipo eppendorf com 500 µL de PBS (tampão fosfato-salino 1X, pH 7,2) e mantido refrigerado durante transporte (máximo 12 horas) ao Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária-UNESP-Botucatu, onde foi armazenado à -20°C até o processamento.

Dois swabs vaginais foram coletados de cada mulher do grupo II: um transportado em meio Aimes com carvão (CB Products, Corumbataí, Brasil) e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher na UNICAMP, resfriado a 5 °C por um período de três horas; e o outro foi transferido para um tubo tipo eppendorf com 500 µL de PBS (tampão fosfato-salino 1X, pH 7,2) e mantido refrigerado durante transporte (máximo 12 horas) ao Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária-UNESP-Botucatu, onde foi armazenado à -20°C para posterior extração do DNA e PCR.

### **4.2.3 Cultivo**

As amostras coletadas em meio de transporte Amies com carvão (CB Products, Corumbataí, Brasil), foram semeadas em ágar seletivo De Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) e incubadas a 37°C por 24-48 horas, em atmosfera anaeróbica. As colônias isoladas foram previamente identificadas com base nas características morfotintoriais (bacilos Gram positivos) e reação negativa a catalase (Fraga et al.,2007).

### **4.2.4 Extração do DNA e PCR**

As amostras colhidas em swabs conservados em PBS foram destinadas a extração de DNA para posterior amplificação da sequência parcial (250 pares de base) do RNA ribossomal 16S, com “primers” específicos (Lacto Forward, 5’ – TGG AAA CAG RTG CTA ATA CCG - 3’ e Lacto Reverse, 5’ – GTC CAT TGT GGA AGA TTC CC- 3’) previamente descritos (Byun et al.,2004) para o gênero *Lactobacillus* spp, por PCR.

O DNA da bactéria foi extraído com o “kit” QIAamp DNA Mini Kit (QIagen<sup>®</sup>), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. O tubo eppendorf de 2 mL com o swab foi agitado em Vortex (Sieger<sup>®</sup>) por 5 minutos, em seguida o swab foi desprezado e a amostra centrifugada a 10.000 G a 21°C durante 8 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e o “pellet” formado resuspendido com 200 µL de PBS 1X pH 7,2 e centrifugado a 13.000 G a 21°C por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado, 80 µL de tampão para lysozima (USB<sup>®</sup>) foi adicionado e tubo agitado com Vortex (Sieger<sup>®</sup>) até a suspensão completa do “pellet”. Em seguida, para lisar a parede bacteriana foi adicionado 20 µL (4.000 UI) de Lysozyme (USB<sup>®</sup>) e a mistura incubada a 37° C por 30 minutos (Sakamoto et al., 2003). Após, foi adicionado 20 µL de proteínase K (QIagen<sup>®</sup>), a amostra incubada a 56°C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de buffer AL (QIagen<sup>®</sup>) e o tubo incubado a 70°C por 10

minutos. Foi adicionado a amostra 200  $\mu\text{L}$  de etanol 100% e a amostra transferida para coluna QIAamp Mini Spin (QIagen<sup>®</sup>) e centrifugada a 6.000G por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo de 2 mL e submetida a dois procedimentos de lavagem com os buffer AW1 e AW2 (QIagen<sup>®</sup>). Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo 2 mL e centrifugada a 19.000G por 1 minuto para remoção total dos tampões. Imediatamente após, foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de buffer AE (QIagen<sup>®</sup>) à coluna, que foi centrifugada a 6000G por 1 minuto. A coluna foi desprezada e todas as amostras de DNA obtidas foram quantificadas e analisadas por espectrofotometria (Nanodrop<sup>®</sup> 2000).

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 20  $\mu\text{L}$  contendo 4  $\mu\text{L}$  de DNA (“template”), 0,6  $\mu\text{L}$  de cada “primer” (“forward” e “reverse”), 10  $\mu\text{L}$  da GoTaq Green Master Mix (Promega<sup>™</sup>) e 4,8  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O livre de nucleases. A amplificação foi realizada no termociclador EP-Gradient (Eppendorf<sup>®</sup>) sob as condições a seguir: 94 °C / 5 min (denaturação inicial); 40 ciclos de 94 °C / 30 s, 62 °C / 30 s e 72 °C / 60; e extensão final de 72 °C / 5 min.

As amostras de PCR foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% corados com GelRed<sup>™</sup> (Biotium<sup>™</sup>) e com marcador de peso molecular de 100 pb (Norgen<sup>®</sup>). Após a eletroforese as amostras foram lidas sobre luz ultravioleta (ImageQuant<sup>™</sup>, GE Healthcare). As amostras com bandas únicas de aproximadamente 250 pb foram consideradas positivas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Experimento 1

Das 77 amostras de secreção vaginal de éguas coletadas para análise microbiológica, seis (7,7%) não apresentaram crescimento e 71 (92%) amostras apresentaram crescimento. As bactérias predominantes foram: *Streptococcus zooepidemicus* (42%), *Escherichia coli* (25%), *Streptococcus alfa hemolítico* (15%) *Candida* (6%), *Enterobacter spp* (3%), *Bacillus spp* (3%), *Streptococcus beta hemolítico* (3%) e *Pseudomonas* (3%). Os dados citados podem ser observados na Tabela 1 e representados graficamente na figura 4.

Tabela 1: Prevalência de microrganismos na vagina de éguas

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>SWAB VAGINAL</b>
<b>Streptococcus zooepidemicus</b>	<b>42%</b>
<b>Escherichia coli</b>	<b>25%</b>
<b>Streptococcus alfa hemolítico</b>	<b>15%</b>
<b>Candida sp</b>	<b>6%</b>
<b>Enterobacter spp</b>	<b>3%</b>
<b>Bacillus SP</b>	<b>3%</b>
<b>Streptococcus beta hemolítico</b>	<b>3%</b>
<b>Pseudomonas</b>	<b>3%</b>

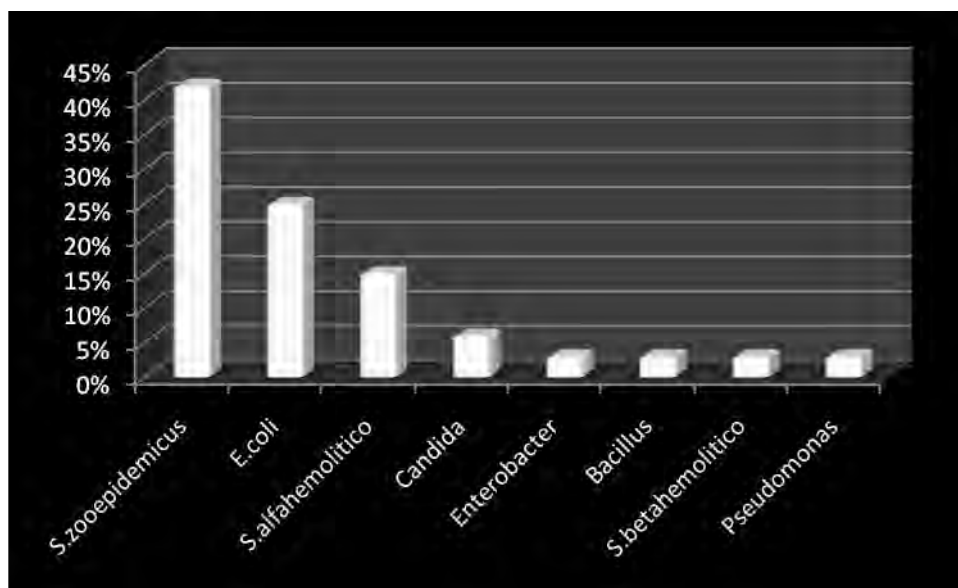


Figura 4: porcentagem de microrganismos isolados da vagina de éguas

Das 33 amostras coletadas do útero de éguas 39% (n=12) não apresentaram crescimento bacteriano ou fúngico. Tendo sido *Streptococcus zooepidemicus* o mais frequentemente encontrado (26%), seguido de *Escherichia coli* (15%), *Candida spp* (9%), *Streptococcus alfa hemolítico* (6%) e *Enterobacter* (3%) conforme descrito na tabela 2 e representado graficamente na figura 5.

Tabela 2: Prevalência de microrganismos no útero de éguas.

MICROORGANISMOS	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%

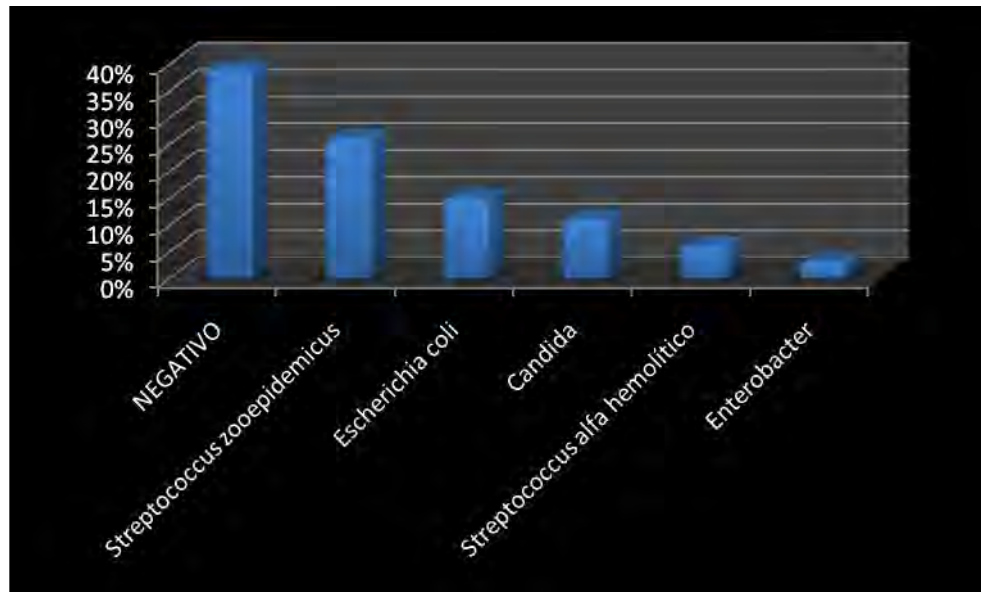


Figura 5: porcentagem de microrganismo isolados do útero de éguas

A partir das análises realizadas pode-se observar que os microrganismos isolados da vagina e que estavam presentes no útero de éguas foram: *Streptococcus zooepidemicus* (21%), *Escherichia coli* (12%), *Candida spp* (9%) e *Streptococcus alfa hemolítico* (6%). Em 14,2% (n=5) das amostras o resultado foi negativo, conforme descrito na tabela 3 e representado na figura 6.

Tabela 3: Prevalência de microrganismos presentes na vagina e no útero de éguas.

MICROORGANISMO	PRESENÇA VAGINA E UTERO
S.zooepidemicus	21%
Negativo	15%
E.coli	12%
Candida spp	9%
S.alfa hemolítico	6%

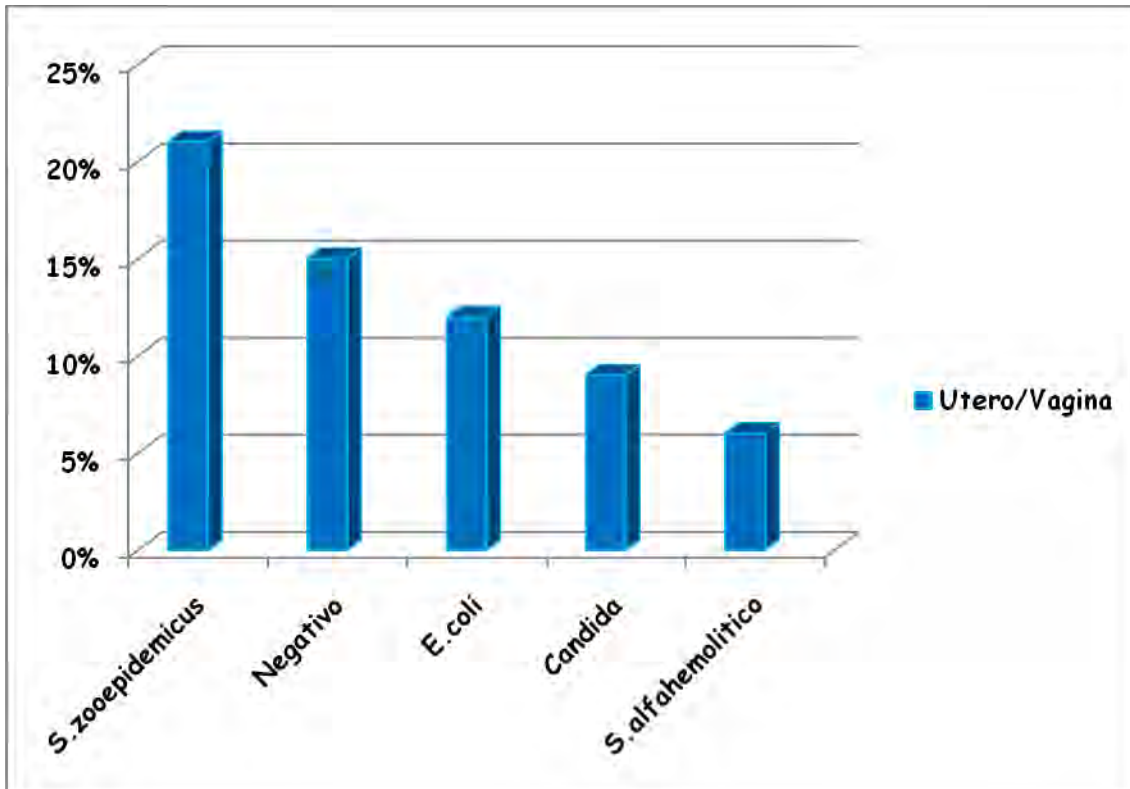


Figura 6: porcentagem de microrganismo isolados da vagina e útero de éguas

Em 83,3% houve concordância entre as amostras negativas na vagina e no útero ( $p < 0,05$ ). Em 73,7% das éguas houve concordância entre a presença de microrganismo na vagina e no útero ( $p < 0,05$ ).

Na avaliação dos dados para a presença de uma, duas ou três bactérias na vagina e útero, observou-se concordância quanto ao tipo da bactéria em 50%, 26,7% e 33% respectivamente, entre as éguas estudadas ( $p < 0,05$ ).

A média do pH vaginal das 77 amostras de éguas foi 7,3.

## 5.2 Experimento 2

Das 35 amostras coletadas do grupo I apenas duas apresentaram cultivo positivo para *Lactobacillus spp* (5,7%) e oito (20%) apresentaram bandas únicas de

aproximadamente 250 pb, sendo consideradas bandas positivas para presença de *Lactobacillus spp.*

No grupo II 90% das mulheres tiveram *Lactobacillus spp* isolado da amostra vaginal, e todas as amostras de PCR, submetidas à corrida eletroforética, apresentaram bandas positivas (Tabela 4).

Tabela 4: Porcentagem de isolamentos positivos de *Lactobacillus spp* e bandas positivas para *Lactobacillus spp* de amostras vaginais de éguas e mulheres.

	<b>ISOLAMENTO +</b>	<b>PCR +</b>
<b>ÉGUA</b>	<b>5.7%</b>	<b>20%</b>
<b>MULHER</b>	<b>90%</b>	<b>100%</b>

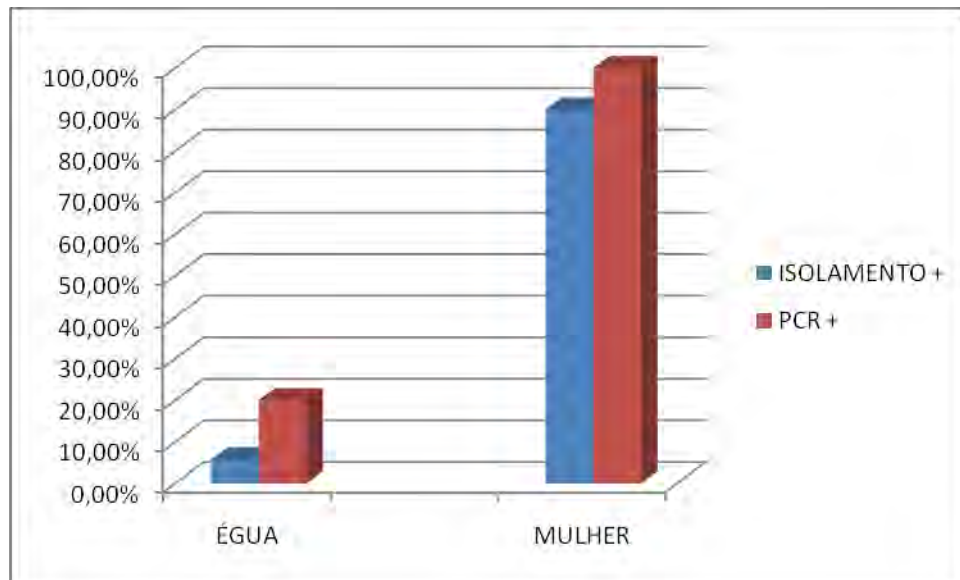


Figura 7: Porcentagem de isolamentos positivos de *Lactobacillus spp* e bandas positivas para *Lactobacillus spp* de amostras vaginais de éguas e mulheres.

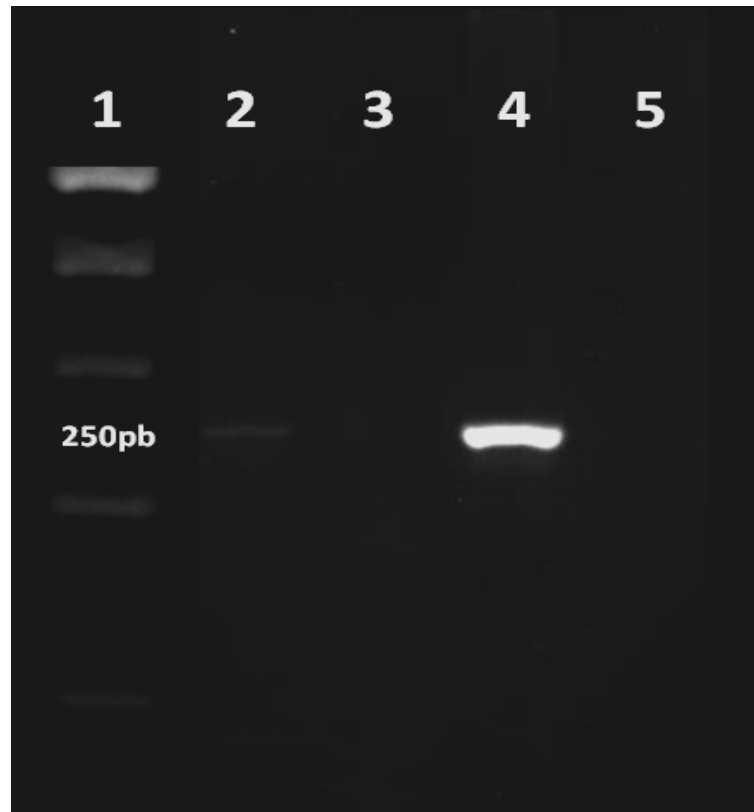


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com GelRed™ (Biotium™) mostrando os fragmentos amplificados (aproximadamente 250pb) na PCR, utilizando os primers Lac-Forward e LAC-Reverse e amostras DNA extraídas de swabs vaginais de éguas e mulher. Linha 1. marcador de peso molecular de 100 pb (Norgen®), linha 2 (DNA égua 18), linha 3 (DNA égua 27), linha 4 (DNA mulher 8) e linha 5 (controle negativo – “no template”). Imagem do gel registrada sobre luz ultravioleta (ImageQuant™, GE Healthcare).

## 6. DISCUSSÃO

Uma grande variedade de bactérias foi observada na flora vaginal das 77 éguas avaliadas no presente estudo com algumas divergências a outros poucos trabalhos que se preocuparam em estudar a flora vaginal de fêmeas equinas. Hinrichs et al.,(1988) relataram uma flora rica em microrganismos não patogênicos, os quais foram isolados em sua grande maioria da fossa clitoriana e do vestibulo vaginal, tendo sido poucas as isoladas do fundo vaginal. Bactérias patogênicas, como *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, foram somente isoladas da região clitoriana e vestibular, representando um fator de risco de infecção bacteriana ascendente. Afirmando estes autores que a dobra vulvo vaginal seja a principal barreira a contaminação ascendente do trato genital.

Na flora vaginal das éguas estudadas foram encontrados *Streptococcus zooepidemicus* (42%), *Escherichia coli* (25%), *Streptococcus alfa hemolítico* (15%), discordando com Hinrichs (1988) onde relatou que esses microrganismos não são comuns da flora vaginal clinicamente normal. Jacob et al.,(2002) observaram uma predominância de *E.coli* em amostras da fossa clitoriana de éguas. Os achados do presente estudo e do anteriormente citado indicam contaminação vaginal ascendente, provavelmente por excesso de manipulação (varias inseminações durante o ano, lavados intrauterino para coleta de embriões) do trato reprodutivo durante o programa de transferência de embriões o qual as éguas doadoras são submetidas.

Concordando com nossos achados Scott et al.,(1971), estudando material coletado de éguas de matadouro, observaram que cerca de 80% delas apresentaram crescimento de bactérias patogênicas no fundo vaginal. Tendo sido também predominante o isolamento de *Streptococcus zooepidemicus*. Por outro lado, Newcombe

(1978) isolou de um grande número de amostras (2252) coletadas da vagina somente 877 positivas (24.5%), dentre estas a grande maioria de bactérias não patogênicas.

A grande divergência entre os poucos trabalhos encontrados podem estar relacionados ao tipo de animais utilizados, onde Scott et al (1971) utilizou animais post mortem, no caso do nosso experimento as éguas eram doadoras de embrião, as quais eram submetidas a excesso de manipulação.

Em 6% das amostras do conteúdo vaginal isolamos *Candida spp*, fungo mais comumente associado à endometrite infecciosa em éguas. Este mesmo percentual tem sido reportado como isolado do útero de éguas por outros autores (Langoni et al.,1999; Dascanio et al.,2001). Tratamentos intrauterinos prolongados são um achado rotineiro no histórico reprodutivo de éguas com infecções fúngicas, nesta linha de raciocínio Coutinho da Silva & Alvarenga (2010) propõem que o refluxo de antibióticos do útero para a vagina altere a microbiota comensal vaginal, propiciando a colonização por fungos e bactérias patogênicas. Discordando dos achados de outros autores que estudaram a flora vaginal de éguas (Scott, 1971; Newcomb, 1978; Hinrichis, 1988), cultivando swabs do útero, vagina, vestíbulo e fossa clitoriana.

O ambiente uterino saudável não apresenta microflora, diferente da vagina onde se sabe existir uma flora vaginal rica em microrganismos não patogênicos. Durante a monta natural ou Inseminação Artificial, muitas bactérias da flora vaginal podem ser deslocadas para o interior do útero, podendo ser esta a causa principal de endometrites em éguas doadoras de embriões.

A despeito de terem sido utilizadas éguas com bom histórico reprodutivo, ou seja, boa taxa de recuperação embrionária, 61% apresentaram isolamento de algum

microrganismo intra uterino, o que não está de acordo com os achados de Hinrichs et al.,(1988), os quais observaram que na maioria das amostras coletadas do útero (69%) não houve crescimento bacteriano. O percentual de amostras negativas (39%) também foi próximo ao encontrado por Langoni et al.,(1999) que relataram 45% de amostras negativas quando as culturas eram incubadas em condições aeróbicas.

O microrganismo mais frequentemente isolado do útero foi *Streptococcus zooepidemicus* (26%), seguido de *Escherichia coli* (15%), *Candida spp* (11%), *Streptococcus alfa hemolítico* (6%) e *Enterobacter* (3%). A alta ocorrência do agente E.coli, coincide com outros estudos conduzidos na investigação da etiologia das endometrites equinas (Moreno et al., 1995; Silva et al.,1999; Albihn et al.,2003; Aguiar et al.,2005). E pode ser atribuída a fatores predisponentes, como manobras ginecológicas inadequadas, defeitos de conformação vulvar que levam a pneumovagina (acúmulo de ar na vagina), urovagina (acúmulo de urina na vagina), favorecendo a veiculação de material fecal para o trato genital interno. Os mais frequentes patógenos envolvidos em endometrite equina são *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli* ou leveduras (Dimock & Edwards 1928), mas anaeróbios também têm papel importante (Ricketts & Mackintosh 1987). Entre esses, *Streptococcus zooepidemicus* é o mais comum, estando presente em 66% das infecções uterinas (Watson, 1988). Segundo Watson & Stokes (1990), a presença do *S. equi* subsp. *zooepidemicus* está associada aos casos persistentes de endometrites. Em éguas com clearance uterino tardio, defeito no mecanismo imune uterino, possa contribuir para a persistência da infecção (Watson 1987; Watson 1988).

Albihn et al.,(2003) afirmam que *Escherichia coli* é a bactéria mais frequentemente associada com problemas de fertilidade em éguas e o *Streptococcus*

beta hemolítico o segundo mais frequente. As endometrites causadas por *E.coli* não apresentam sinais clínicos, estando mais associado com repetidos cios, concordando com Jacob et al.,(2002) que isolaram 30% de *Enterobacter* e 23% de *E.coli* do útero de éguas que se apresentavam vazias ao término da estação de monta. Já infecções do endométrio causadas por *Streptococcus* beta hemolítico apresentam vários sinais clínicos. No mesmo estudo, fungos foi o terceiro microrganismo mais encontrado em éguas com problemas de fertilidade (Albihn et al.,2003).

Quando avaliada a concordância entre microrganismos isolados da vagina e também presentes no útero de éguas novamente: *Streptococcus zooepidemicus* (21%), *Escherichia coli* (12%), *Candida spp* (9%) foram os microrganismos mais encontrados. Achado este que vem de encontro com a hipótese de que a contaminação e colonização vaginal são importantes para uma posterior contaminação uterina. Newcombe (1978) também encontrou uma alta relação entre o tipo de bactéria isolada do útero e vagina.

Alguns microrganismos podem estar presentes tanto em cadelas sadias quanto nas portadoras de piometra. *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia coli* podem estar presentes na vagina e no útero de cadelas sadias. Nesse estudo as bactérias encontradas na vagina de cadela sadias também estavam presentes na vagina de cadelas com piometra (Carneiro, 2005). Sabidamente a contaminação vaginal em cadelas é importante para uma posterior contaminação uterina e instalação da piometra.

Mulheres saudáveis em período reprodutivo apresentam predominância de *Lactobacillus* na flora vaginal e a proliferação de bactérias patogênicas na vagina é suprimida pela ação de ácido láctico produzido pelos *Lactobacillus spp* assim como peróxido de nitrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Witkin et al.,2007), sendo também o pH ácido vaginal em mulheres reconhecido como um importante mecanismo de defesa contra a

proliferação de diferentes patógenos microbianos (Witkin et al.,2007), estando diretamente relacionado com a presença de Lactobacilos (Reid et al.,2001) .

No presente trabalho a presença de *Lactobacillus spp* na flora vaginal de éguas foi observada em apenas 20% (8/35) das amostras, discordando dos achados do único trabalho encontrado na literatura sobre o assunto (Fraga et al.,2008a). Neste estudo os autores isolaram *Lactobacillus ssp* da flora vaginal de 70% das 26 éguas avaliadas.

Segundo Fraga et al, (2008) o pH vaginal em éguas normais é 7.0, estando de acordo com o encontrado no presente trabalho, porém em mulheres o pH é aproximadamente 4.5 (Reid et al.,2001). A abundância de *Lactobacillus* na flora vaginal de mulheres explica a diferença de pH. É de se estranhar que no trabalho de Fraga et al (2008) mesmo com abundância de Lactobacilos o pH tenha se mantido próximo do neutro. O mesmo grupo também isolou Lactobacilos em cadelas onde o pH vaginal se manteve próximo do neutro (6 a 7.5).

O uso da técnica de PCR se mostrou em trabalho recente mais sensível que o cultivo microbiológico (Ferris et al.,2010). Nesse trabalho foi identificada a presença de DNA bacteriano no útero de éguas em 33% das amostras, contra 22% das mesmas amostras enviadas para cultivo microbiológico. Esse estudo corrobora com os achados do presente trabalho onde observou que o PCR foi mais sensível em detectar a presença do *Lactobacillus* em éguas como em mulheres.

## 7. CONCLUSÕES

Foram encontradas bactérias patogênicas na flora vaginal de éguas doadoras de embrião.

Houve concordância na presença de microrganismo na vagina e no útero corroborando com a hipótese de infecção uterina ascendente devido ao excesso de manipulação do trato reprodutivo de éguas doadoras.

A prevalência de *Lactobacillus spp* em éguas é baixa não sendo seu papel fundamental no equilíbrio da microbiota vaginal de éguas.

## 8. REFERÊNCIAS

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

ALVARENGA, M.A; MATTOS, M.C.F.I. Eficiência da escova ginecológica “Cytobrush” na colheita de material endometrial em éguas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.42, p.67-68, 1991.

ALVARENGA, M.A., IAWMA DE MATTOS, M.C.F., FABRIS, V.E. 1998. Comparison between the gynecological brush, cotton swab and aspiration techniques for endometrial cytology in mares. *Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology*, p. 163.

ASBURY, A.C. Endometritis in mare. *Current Therapy in Theriogenology*. 2.ed. Philadelphia, 1986

ASLIM, B.; KILIC, E. Some probiotic properties of vaginal Lactobacillus isolated from healthy women. **Jpn J Infect Dis**, v.59, p.249-253, 2006.

BLUE, M.G. Mycotic endometritis in mares: review and clinical observations. **New Zealand Veterinary Journal**, v.35, p.181-183, 1987.

BYUN, R; MANGALA, A; NICHOLAS, A; HUNTER, N. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.7, p.3128-3136, 2004.

CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p.965-979, 2000.

CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M. 1995. "Introduction to the fungi and fungous infections." In *Essentials in Veterinary Microbiology*, edited by Carter, G.R., Chengappa, M.M., Roberts, A.W., Claus, G.W., Rikihisa, Y. pp. 251-256. Williams & Wilkins, Philadelphia.

CHANDRA, J., KUHN, D.M., MUKHERJEE, P.K., HOYER, L.L., MCCORMICK, T., GHANNOUM, M.A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology* 183(18):5385-5394.

COLLINS, T.; CONTRAN, R.S.; KUMAR, V. Robbins Pathologic Basic of Disease. 6<sup>a</sup> ed., Ed WB Saunders, 1999.

COUTINHO DA SILVA, M.A., ALVARENGA, M.A., CARNEVALE, E.M. 2000. Diagnosis of fungal endometritis in mares: Efficacy of cytology, histology and stain. *Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology*, p. 171.

COUTINHO DA SILVA, M.A., ALVARENGA, M.A. 2010. Fungal endometritis in mares. *Equine Reproduction*, 2<sup>nd</sup> edition, McKINNON, A.O. chapter 224, 2010.

DASCANIO, J.J., SCHWEIZER, C., LEY, W.B. 2001. Equine fungal endometritis. *Equine Veterinary Education* 13(6):324-329.

DASCANIO, J.J. Tratamento f fungal endometritis. In: SAMPER, J.C; PYCOCK, J.F.; McKINNON, A.O., eds. *Current therapy in equine reproduction*. St Louis: Saunders Elsevier, 2007; 116-120.

DELUCCHI, L; FRAGA, M; PERELMUTER. K; CIDADE, E; ZUNINO, P. Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of in vitro probiotic activity of selected isolates. *CVJ* v.49, p.991-994, 2008.

ESCHENBACH, D.A; THWINN, S.S; PATTON, D.L; HOOTON, T.M; STAPLETON, A.E; AGNEW, K. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge and microflora. **Clin Infect Dis**, v. 30, p.901-907, 2000.

FUMUSO, E.A.; GIGUÈRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELA-DORNA, I.; BOWDEN, R.A. Endometrial IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 31-41, 2003.

FUMUSO, E.A.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; RIVULGO, M.; WADE, J.; ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, p. 30-39, 2007.

FRAGA, M., PERELMUTER, K., DELUCCHE, L., CIDADE, E., ZUNINO, P. 2008 . Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. **Antonie van Leeuwenhoek** 93:71-78.

GALINDO, A.S.D.; KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA, B.D. Mecanismos de defesa uterinos na fêmea bovina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.9, n.30, p.49-58, 2003.

HESS, M.B., PARKER, N.A., PURSWELL, B.J., DASCANIO, J.D. 2002. Use of lufenuron as a treatment for fungal endometritis in four mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 15:266-267.

HINRICHS, K; CUMMINGS, MR; SERTICH, PL; KENNEY, RM. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule and clitoral fossa of clinically normal mares. **J Am Vet Med Assoc** 193: 72-75.

HURTGEN, J.P., CUMMINGS, M.R. 1982. Diagnosis and treatment of fungal endometritis in mares. **Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology**, p. 82.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. **Biol.Reprod. Monogr.**, v.1, p.515-517, 1995.

LANGONI, H. et al. Participação de bactérias aeróbicas, microaerófilas e anaeróbicas na endometrite eqüina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.1, p.44-51, 1999.

LEBLANC, M.M.; WARD, L.; TRAN, T. Identification and opsonic activity of immunoglobulins recognizing *Streptococcus zooepidemicus* antigens in uterine fluids of mares. **J. Reprod.Fert.**, v.44, p.284-296, 1991.

LEBLANC, M.M.; MAGSIG, J.; STRONBERG, A.J. Use of low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v.68, p. 403-412, 2007.

LINHARES, I.M; GIRALDO, P.C; BARACAT, E.C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Ver Assoc Med Bras**, 56(3): 370-374, 2010.

LOSINNO & ALVARENGA, M.A. Fatores críticos em programa de transferência de embriões em eqüinos no Brasil e Argentina. **Acta Scien Vet**, v.34, p.39-49, 2006.

MAX, M.; HOELZLE, K.; HOELZLE, L.E. What's new in bacteriology of the mare's genital tract. **Pferdeheilkunde** v.24, p.53-55, 2008.

MOIRA,K.O. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. **Fertil. Steril.**, v.70, n.6, p.1143-1147, 1998.

NEWCOMBE Jr. Comparison of the bacterial flora of three site in the genital tract of the mare. **Vet. Rec**, v.102, p.169-170,1978.

PRIESTLLEY, C.F.J; JONES, B.M; DHAR, J; GOODWIN, L. What is normal vaginal flora? **Genitourin med**, v73, p.23-28, 1997.

PUGH, D.G., BOWEN, J.M., KLOPPE, L.H., SIMPSOM, R.B. 1986. Fungal endometritis in mares. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 8:S173-S181.

REID, G; BRUCE, A.W; FRASER, N; HEINEMANN, C; OWER, J; HENNING, B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. **Immunol Med Microbiol**, v.30, p.49-52, 2001.

REID, G. ; BRUCE, A. W. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. **World. J. Urol.** 24: 28-32, 2006.

SAKAMOTO, M; TAKEUCHI, Y; UMEDA, M; ISHIKAWA, I; BENNO, Y. **Journal of Clinical Microbiology**, v.52, p.79-89, 2003.

SCOTT, P; DALEY, P; GILDLEY BAIRD, G; STURGESS,S; FROST, A.J. The aerobic bacterial flora of the reproductive tract of the mare. **The veterinary record**, v.88, p.58-61, 1971.

SOBEL, J.D.; CHAIM, W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. **Jou.Clin.Micr.** p.2497-2499, 1996.

STOUT, T.A.E. 2008. Fungal endometritis in the mare. *Pferdeheilkunde* 24(1):83-87.

THRELFALL, W.R.; IMMEGART,H.M. Doença uterine e tratamento. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro. Editor Guanabara Koogan, 2000.

TIZARD, I.R. Resistência às bactérias. **Imunologia veterinária**. 5 ed. São Paulo. Editora Roca, 1998. P.294-309.

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.

TROEDSSON, M.H.T. Diseases of the uterus. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. 4 ed. Philadelphia: W.B Saunders, 1997. P.517-524.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; CRABO, B.G. Sperm transport and survival in the mare: a review. **Theriogenology**, v.50, p.807-818, 1998.

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

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.P. Persistent breeding-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**, v.24, p.56-60, 2008.

WITKIN, S.S.; LINHARES, I.M.; GIRALDO, P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. **Best Pract Res Clin Obstet Gynecol**, v.21, p.347-354, 2007.

ZHOU, X; BENT, S.J; SCHNEIDER, M.G; DAVIS, C.C; ISLAM, M.R; FORNEY, L.J. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. **Microbiology**, 150, p.2565-2573, 2004.

Elsevier's global community of editors and editorial boards ensures the highest level of expertise in our publications. Our primary research journals are peer reviewed and independently edited by acknowledged experts in their fields.

The following Guide has been designed to help you get published in an Elsevier publication as quickly and easily as possible. While certain journals have longer publication schedules, and there can be unforeseen delays, there are several things you can do as an author to expedite the process.

For detailed instructions for an individual journal, please go to the journal page and visit their 'Guide for Authors' section.

### **Steps to submitting your paper for publication**

#### **1. Decide to publish with Elsevier**

We recognize that you have a choice when deciding where to publish your paper. Let us show you the reasons why Elsevier is the best choice.

#### **2. Choose a Journal and Download 'Guide to Authors'**

Each Elsevier journal has its own Guide to Authors and its own set of rules and requirements for publication. Be sure to find your journal and examine the Guide to Authors carefully to avoid unnecessary delays.

#### **3. Draft a cover letter**

All submissions must be accompanied by a cover letter detailing what you are submitting. Please indicate:

- The author to whom we should address our correspondence (in the event of multiple authors)
- A contact address, telephone/fax numbers and e-mail address (Elsevier is gradually introducing a service for authors to receive PDF proofs by e-mail).
- Please include details of any previous or concurrent submissions.
- It is also useful to provide the Editor-in-Chief with any information that will support your submission (e.g. original or confirmatory data, relevance, topicality).

*Note: When your manuscript is received at Elsevier, it is considered to be in its final form. Therefore, please check your manuscript carefully before you submit it to the editor.*

#### **4. Proofread your manuscript**

As a scientific or medical professional, your published works are a reflection upon your knowledge and expertise in a given field. However, not all authors are also experts in language, especially those writing in a language that is not native to them. Therefore, it is important to *very carefully* proofread your document. Elsevier provides several items to assist with the proofreading process, including:

- A proofreading style sheet (Download PDF)
- Style guides and Instructions (link)
- Language, Editing & Translation Services (link)

#### **5. Format your document**

In addition to being properly proof-read, your document must also be properly formatted.

- We can accept most word-processing formats (but we prefer Microsoft Word or WordPerfect).
- Please see your journal's Guide for Authors to check the style of the individual journal, and particularly the reference style. By submitting a

paper in the journal's preferred style, fewer changes will have to be made later on, which reduces the possibility of errors being introduced.

- Most formatting codes are removed or replaced when we process your article, so there is no need for you to use excessive layout styling.

*Please do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references).*

- You may use bold face, italic, subscripts, superscripts, etc., as appropriate.

- When preparing tables, if you are using a table grid, please use only one grid for each separate table and not a grid for each row. If no grid is being used, use tabs to align columns instead of spaces. When you create your manuscript, please make sure it is in the following order:

a) Title

b) Authors

c) Affiliation

d) Abstract

e) Keywords

f) Main Text

g) Acknowledgement

h) Appendix

i) References

j) Vitae

k) Figures

l) Legends

m) Tables

Note: Do not import the Figures into the text file. If you use LaTeX to write your articles, we have separate **LaTeX instructions**.

## **6. Language editing**

International Science Editing, Asia Science Editing and SPI Publisher Services provide language and copyediting services to authors who want to publish in scientific, technical and medical peer-reviewed journals and need assistance with language and style editing before they submit their article for peer review or before it is accepted for publication. To find out more about these services, please visit:

[International Science Editing \(opens a new window\)](#)

[Asia Science Editing \(opens a new window\)](#)

[SPI Publisher Services \(opens a new window\)](#)

For more information about language editing services, please contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com).

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or advertised on this website. For more information please refer to our **Terms & Conditions**.

## **7. Prepare your graphics, photos and charts.**

Do not import the Figures into the text file. If you use LaTeX to write your articles, we have separate **LaTeX instructions** for graphics. Otherwise, you may use the **instructions for graphics materials**.

## **8. Recheck your chosen journal's Guide to Authors to ensure proper formatting and preparation of your submission.**

In the end, your preparation beforehand will save much time and many delays in the publishing process.

### **9. Submit your manuscript**

For initial submission of your paper for review most journals will still accept a printed copy. Please see the individual Guide for Authors for further information.

#### **Disk Submission**

Elsevier now publishes all manuscripts using electronic production methods and therefore needs to receive the electronic files of your article along with the hardcopy of the accepted version. To ensure fast and easy processing of your submission, please adhere to the following guidelines:

- Save text and graphics on separate disks
- Label all disks with your name, a short version of the article title, the journal to be published in, and the filenames. Please also include details of the software platform (PC, Mac, Unix, etc) used to create your files
- Ensure that the files on the disk match the hardcopy exactly. In cases of a discrepancy, the hardcopy version will be used as the definitive version by the production team

#### **Online Submission**

To speed up the submission process, Elsevier is introducing online submission for its journals. To see if the journal you have chosen allows this new feature, please check the journal home page.

#### **Where to send your paper**

Each journal has its own editors and editorial boards for submission of papers. To find the editorial address for the publication you are interested in, go to that journal's homepage and check the journal's Guide for Authors.

Trabalho a ser enviado para a revista Journal of Equine Veterinary Science.

Identification of lactobacillus on mare vaginal flora by microbiological and molecular techniques.

Maria Manoela B Castro Chaves<sup>a</sup>; Alexandre Secorun Borges<sup>b</sup>; Jose Paes Filho<sup>b</sup>; Eliane Melo Brolazo<sup>c</sup>, Marco Antonio Alvarenga<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology – College of Veterinary Medicine and Animal Science, FMVZ, UNESP, Botucatu, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratory of Molecular Biology of School of Veterinary Medicine and Animal Science, FMVZ, UNESP, Botucatu, Brazil.

<sup>c</sup>Microbiology Laboratory of Center of Integral Attention to Women Health - University of Campinas, UNICAMP, Brazil.

Corresponding author: Maria Manoela B. Castro Chaves - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Distrito de Rubião Junior, s/nº, zip code 18618-970, Botucatu, SP, Brazil, phone/fax 055 14 38116249. E-mail: mariamanoela@uol.com.br

#### Abstract

Different from the vagina, where a rich microflora is present, the uterine environment is considered free of microorganisms. One possibility for the installation of endometritis in mares is the ascendant contamination from the vagina. The presence of *Lactobacillus* on vaginal flora is considered important in woman however there is few information on mares. The present work aims to determine the occurrence of *Lactobacillus spp* in mares'

vaginal microbiota. A total of 36 crossbred mares, aging between 4 and 12 years, were used. Two vaginal swabs were obtained from mares: one of them was transported on Aimes medium with charcoal for *Lactobacillus* isolation. the other swab was transferred to an sterile plastic tube containing 500 µl of PBS for PCR analysis. Ten voluntary women, aged between 24 and 35 years, were used as control, each voluntary women self-collected two vaginal swabs. *Lactobacillus* spp. was isolated in 5.7 % (2/35) of the vaginal samples from mares and 90 % (9/10) of the woman vaginal samples. Bacterial DNA was detected by PCR in 22.9% (8/35) of mares vaginal samples and all vaginal samples (10/10) from woman were positive in PCR analysis. The prevalence of *Lactobacillus spp.* in mares is low, indicating that this bacteria may not have a fundamental role in the equilibrium of mares' vaginal flora.

Keywords: Mare; Vaginal microbiota; Lactobacillus; PCR.

## 1. Introduction

There are only few controversial studies concerning the mare vaginal flora. Newcombe (1978) [1] and Hinrichs et al. (1988) [2] described a rich flora of non-pathogenic microorganisms. Scott et al. (1971) [3], studying material collected from mares of slaughterhouse, observed that around 80% of them showed pathogenic bacterium growth on vagina, and *Streptococcus zooepidemicus* was the predominant bacteria. Pathogenic bacteria that causes embryonic or fetal death, like *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*

were isolated from clitoris cespit and vaginal vestibule of healthy mares, which represents a risk factor of bacterial ascendant infection [2].

Endometritis is a uterine disorder that involves endometrium inflammation and endometrium infection, and has been recognized as the main cause of low fertility in mares included in embryo transfer programs, and bacterial contamination occurs in 25 to -60% of problem mares. Generally, the incidence of uterine problems is higher in embryo donors, probably because these animals are submitted to an excessive manipulation of genital tract. Most of uterine infections in mares involve only the endometrium [4].

Lactobacillus is considered the primary microbiological barrier against women genital pathogens. Between 50 to 90% of the aerobic bacterias present on women vaginal flora are facultative lactobacillis [5]. In woman, production of lactic acid by Lactobacillus spp seems to be essential to maintenance of a healthy ecosystem, which are able to inhibit the growth of pathogens mainly by lowering the pH, due to the production of lactic and acetic acid and also for the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [6][7]. Only recently the presence of *Lactobacillus* mare vaginal microbiota was reported, on this experiment lactobacillus was isolated from vaginal flora of 18 out 26 (69%) mares.

It is also postulated that antibiotics reflow and disinfectants used in repetitive uterine treatments can modify vaginal flora, inducing microbiota imbalance, creating a favorable environment to development of pathogenic agents like fungus, occurring ascendant contamination by cervix [8].

Despite of low incidence, fungal endometritis is an important cause of subfertility in mares, because they are more resistant to treatment than bacterial infections and show a bad prognostic [9].

The acid vaginal pH (4.5) in women is recognized as an important defense mechanism against proliferation of different antimicrobial pathogens and directly related with the presence of *Lactobacillus* [10] [11] [12]. However on a recent study isolated *Lactobacillus* from vaginal flora of mares with an alkaline vaginal pH (7) [13].

The present work aims to determine the occurrence of *Lactobacillus spp* in mares' vaginal microbiota.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Animals and Sample Collections

A total of 36 crossbred mares, aging between 4 and 12 years, were used. All mares had a good reproductive history and were randomly selected, independent of estrous cycle period and reproductive historic. Ultra sonography evaluations were performed contains a linear transducer of five megahertz (MHz) were realized to determine estrous cycle period, evaluation of uterus and ovaries before samples collection.

The vaginal samples were collected from mares using a sterile swab protected with a sterile silicone tube. The protected swabs were inserted using a latex sterile glove. Two vaginal swabs were obtained from mares: one of them was transported on Aimes medium with charcoal (CB Products, Corumbataí, Brazil) and was transported at 5 °C for a period of 3 h to a reference center for *Lactobacillus* isolation (Microbiology Laboratory of Center of Integral Attention to Women Health) at University of Campinas (UNICAMP); the other swab was transferred to an sterile plastic tube containing 500 µl of PBS (saline-phosphate buffer 1X, pH 7.2) and it was sent to the Laboratory of

Molecular Biology of School of Veterinary Medicine and Animal Science – UNESP, where it was stored at -20°C for posterior DNA extraction. Vaginal samples from 10 voluntary women, aged between 24 and 35 years, were used as control, each voluntary women self-collected two vaginal swabs for *Lactobacillus* spp. isolation and PCR analysis. Woman vaginal samples were stored and were tested using the same methodology previously described. Mares' pH were determined using commercial strips (Merck, Germany) placed inside of the vagina, where it stayed for 2 minutes.

## 2.2. Isolation of *Lactobacillus* spp.

Vaginal samples, collected on Amies transport medium with charcoal (CB Products, Corumbataí, Brazil) were inoculated on deMan Rogosa and Sharpe (MRS) (Oxoid, Basingstoke, England) agar plates by method previously describe [14]. MRS agar plates were incubated at 37 °C for 48 h in anaerobic atmosphere (Forma Anaerobic System, Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA) with 5% CO<sub>2</sub> (Forma Series II Water Jacketed CO<sub>2</sub> incubator – Thermo Electron Corporation). Morphologically distinct and well isolated colonies were examined for cultural and morphological characteristics. Size, shape, colour and texture of the colonies were recorded. Bacterial isolates were tested for catalase production by catalase test and by growth at 15°C and 45°C. Cell morphology was examined after Gram staining [15].

## 2.4. Bacterial DNA extraction

Bacterial DNA was isolated from mare and woman vaginal swabs, conserved in PBS medium, using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®), following the manufacturer

recommendations with some modification describe below. Samples were vortexed for 5 min, then, swab was removed and the sample was centrifuged for the pellet formation (10,000 G for 8 min.). The supernatant was removed and the bacterial cell pellet obtained was then resuspended in 80 µl of Lysozyme Buffer (10 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.2% of sodium deoxycholate, 0.5% of N-Lauroylsarcosine, pH 7.2) and 20 µl (4,000 IU) of Lysozyme (USB®). After incubation at 37°C for 30 min, 20 µL of proteinase K (Qiagen®) was added and the mixture was incubated at 56 °C for 10 min. Then, 200 µl Buffer AL to the sample, mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min to lyse bacterial wall. Briefly, the lysate sample was transferred to a **column** QIAamp Mini Spin (Qiagen®) and bacterial DNA was adsorbed onto the QIAamp silica membrane during a brief centrifugation. Briefly, to complete removal of any residual contaminants DNA bound to the QIAamp membrane was washed with 2 centrifugation steps with Buffer AW1 and Buffer AW2 (Qiagen®), respectively. Immediately after, purified DNA was eluted from the QIAamp Mini spin column in a concentrated form in 30 µl of Buffer AE (10 mM TrisCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0). The relative quality of the isolated bacterial DNA was determined by spectrometry and the ratio of A260–A280 nm exceeded 1.8 for all preparations (Nanodrop® 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™).

#### 2.5. PCR analysis and sequencing of *Lactobacillus* spp. 16S ribosomal RNA gene.

PCR reactions were performed in duplicate in a total of 20 µl each, which contained 4 µl of template DNA, 0.3 µM of each lacto forward and lacto reverse primers, 10 µl of GoTaq® Green Master Mix (Promega™) and 4.8 µl nucleases-free water. In addition, a “no template” control in duplicate was performed to show that contamination was

absent. PCR conditions on EP-Gradient thermocycler (Eppendorf®) were set as follows: initial denaturation 94 °C for 5 min and 40 cycles at 94 °C for 30 s (denaturation), 62 °C for 30 s (annealing) and 72 °C for 60 (extension), followed by a final extension of 72 °C for 5 min. In PCR were used specific primers (Lacto Forward, 5' – TGG AAA CAG RTG CTA ATA CCG - 3'; and Lacto Reverse, 5' – GTC CAT TGT GGA AGA TTC CC- 3') to amplification [≈230 base pairs (pb)] of region V2.1-V3 of *Lactobacillus* spp. 16S ribosomal RNA gene previously described [16].

The PCR products were analyzed by 1.5 % agarose gel electrophoresis (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) stained by GelRed™(Biotium™, Hayward, CA, USA) and visualized under ultraviolet light (ImgeQuant™, GE® Healthcare, USA). Molecular weights were estimated by comparison with a known molecular weight marker of 100 bp (Norgen®, Ontario, Canada). PCR products with predicted size of 230 bp were submitted purified using the QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen®, Valencia, CA, USA). After purification, DNA purity and quality were evaluated at 260/280 nm by Biophotometer® (Eppendorf®, Hamburg, Germany).

Automated direct sequence analysis with 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was performed in duplicate using 5 µl each forward or reverse primers and 10 µl PCR product. The sequences and electropherograms obtained were analyzed using Sequencing Analysis 5.3.1 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and aligned using the CLUSTAL X software (Larkin et al., 2007). Sequence obtained was blasted (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq>) to verify sequence homology against previously available sequences deposited in GenBank™ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 3. Results

In the present study, *Lactobacillus* spp. were isolated from vaginal swabs of healthy mare and woman. *Lactobacillus* spp. was isolated in 5.7 % (2/35) of the vaginal samples from mares and 90 % (9/10) of the woman vaginal samples. These positive samples were found catalase negative and Gram positive rods, producing no gas and acid from ribose and no growth was observed at 15 °C. Bacterial DNA was detected by PCR in 22.9% (8/35) of mares vaginal samples, moreover the two samples with positive culture were also positive in molecular study. All vaginal samples (10/10) from woman were positive in PCR analysis.

DNA sequence obtained from mares and woman positive PCR products were blasted (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq>) with genome sequence deposited in GenBank™, and it was determined that all DNA sequences had 100% identity to *Lactobacillus* spp 16S ribosomal RNA gene.

The mare vagina showed a mean pH value of 7.

### 4. Discussion

In this study, the presence of *Lactobacillus* spp on vaginal flora of mares were observed in only 5.7% (2/35) of the culture samples these data are in contrast to a recent publication [13], in which the authors isolated *Lactobacillus* spp from vaginal flora of 70% from 26 evaluated mares. Also the expression of lactobacillus was low in our

studied mares, in only 22% (8/35) of mares *Lactobacillus* DNA were detected on PCR. The reasons for the discrepancy between ours and Fraga et al (2008) [13] study are difficult to explain since the same techniques were used to isolate lactobacillus from vaginal collected samples. It is important to point out that on our positive control group of 10 women 90% of the samples cultured were positive to Lactobacillus.

The data presented here, obtained using molecular methods, support a recent study in which traditional PCR technique showed to be more sensitive than microbiological cultivation (Ferris et al.,2010). In this work the authors identified the presence of DNA in the uterus of mares in 33% of samples, against 22% of the same samples sent to microbiological culture. We also observed that PCR was more sensible in detect the presence of *Lactobacillus* in both mares and women fluid vaginal sample.

In this study on most of women vaginal samples culture (9/10) was possible to isolated lactobacillus. Which is in agreement with other publications in women were *Lactobacillus* is routinely isolated and are the dominant bacterial species found in the vaginal microbiota [14].

According to Fraga et al. (2008) [13], vaginal pH of normal mares is 7.0, which agrees with the findings of the present work. However, pH in women is approximately 4.5 [10], what in part can explain the difference on abundance of Lactobacillus on vaginal flora between human and equines, it is very well known that an important function of Lactobacillus is to acidify vaginal environment. Rodriguez et al (2010) [17] isolated a very low number of lactobacillus from cows vaginal samples, concluding that lactobacillus is not directly related with the healthy state of cows reproductive tract as in women. The normal vaginal PH of cows is also around 7 [18] which is another indication of a low prevalence of lactobacillus on the vaginal enviroment of this species

In conclusion, the prevalence of *Lactobacillus spp.* in mares is low, indicating that this bacteria may not have a fundamental role in the equilibrium of mares' vaginal flora.

#### Acknowledgments

This study was supported by FAPESP.

#### References

- [1] Newcombe Jr. Comparison of the bacterial flora of three sites in the genital tract of the mare. *Vet. Rec*, v.102, p.169-170,1978.
- [2] Hinrichs K; Cummings MR; Sertich PL; Kenney RM. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule and clitoral fossa of clinically normal mares. *J Am Vet Med Assoc* 193: 72-75, 1988.
- [3] Scott P; Daley P; Gildley; Baird G; Sturgess S; Frost A.J. The aerobic bacterial flora of the reproductive tract of the mare. *The veterinary record*, v.88, p.58-61, 1971.
- [4] Losinno & Alvarenga M.A. Fatores críticos em programa de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. *Acta Scien Vet*, v.34, p.39-49, 2006.
- [5] Dembélé T; Obdrzatek V; Votava M. Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. *Zentralbl Bakteriol* 288 (3): 395-401, 1998.
- [6] Linhares I.M; Giraldo P.C; Baracat E.C. New findings about bacterial flora. *Ver Assoc Med Bras*, 56(3): 370-374, 2010.

- [7] Hess M.B., Parker N.A., Purswell B.J., Dascanio J.D. 2002. Use of lufenuron as a treatment for fungal endometritis in four mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 15:266-267.
- [8] Coutinho da Silva M.A., Alvarenga M.A. 2010. Fungal endometritis in mares. *Equine Reproduction*, 2<sup>nd</sup> edition, McKINNON, A.O. chapter 224, 2010.
- [9] Stout T.A.E. 2008. Fungal endometritis in the mare. *Pferdeheilkunde* 24(1):83-87.
- [10] Reid G; Bruce A.W; Fraser N; Heinemann C; Ower J; Henning B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *Immunol Med Microbiol*, v.30, p.49-52, 2001.
- [11] Aslim B.; Kilic E. Some probiotic properties of vaginal *Lactobacillus* isolated from healthy women. *Jpn J Infect Dis*, v.59, p.249-253, 2006.
- [12] Witkin S.S.; Linhares I.M.; Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol*, v.21, p.347-354, 2007.
- [13] Fraga M., Perelmutter K., Delucche L., Cidade E., Zunino P. 2008 . Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:71-78.
- [14] Brolazo EM; Simões JA; Nader MEF; Tomás MST; Grgoracci GB; Marconi c. Prevalence and characterization of vaginal *Lactobacillus* species in women at reproductive age without vulvovaginitis. *Rev.Bras.Ginecol.Obstet* 31 (4): 189-195, 2009.
- [15] Harrigan, W. F. and M. E. McCance, 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press, London, UK.
- [16] Byun R.; Nadkarni M.A.; Chhour K.L.; Martin F.E.; Jacques N.A.; Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J. Clin. Microbiol.*, 42(7):3128-3136, 2004.
- [17] Rodríguez C; Cofré JV; Sánchez m; Fernández P; Boggiano G; Castro E. *Lactobacilli* isolated from vaginal vault of dairy and meat cows during progesterone

stage of estrous cycle. *Anaerobe* 1 - 4, 2010.

[18] Schilling E; Zust J. Diagnosis of oestrus and ovulation in cows by pH-mensurements in vagina and by apparent viscosity of vaginal mucus. *J Reprod Fert* 15: 307-311, 1968.