

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**FREQUÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM CONTEÚDO  
VULVOVAGINAL DE VACAS TRATADAS COM  
DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS DE PROGESTERONA**

**Gabriela Bim Ramos**  
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL  
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**FREQUÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM CONTEÚDO  
VULVOVAGINAL DE VACAS TRATADAS COM  
DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS DE PROGESTERONA**

**Gabriela Bim Ramos**

**Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL  
Março de 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- 
- R175f  
2016      Ramos, Gabriela Bim, 1985  
            Frequência de microrganismos em conteúdo vulvovaginal de vacas tratadas com dispositivos intravaginais de progesterona / Gabriela Bim Ramos. - 2016.  
            99 f. : il.
- Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
            Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Vaca - Inseminação artificial - Teses. 3. Bacteriologia veterinária - Teses. 4. Reprodução animal - Teses. I. Lima, Anna Monteiro Correia. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**GABRIELA BIM RAMOS - Bauru, São Paulo, 06 de Setembro de 1985.** Médica Veterinária graduada pela Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes - PR (2011) e especialista em Medicina Veterinária Preventiva, pelo Programa de Residência Multiprofissional e Uniprofissional da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2014). Em março de 2014, ingressou no programa de Pós-graduação (Mestrado) em Ciências Veterinárias, na área de Saúde Animal, pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

*“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*(Madre Teresa de Calcutá)*

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à família abençoada que Deus me deu, especialmente, aos meus pais Ademar e Angela que, com todo o amor do mundo, contribuíram para que essa conquista deixasse de ser apenas um sonho.

Vocês são parte de mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, acima de tudo, a Deus por ter me dado força nos momentos mais difíceis, e a Nossa Senhora, que sempre me protegeu e me guiou.

Agradeço aos meus pais, que não mediram esforços para que eu concluísse essa etapa tão importante, pela confiança, zelo e amor incondicionais. Vocês são a minha fortaleza.

Ao Jú, meu irmão, por torcer sempre por mim, pelo carinho e amizade. Ao Rapha, que além de irmão e amigo, foi meu parceiro nessa pesquisa; agradeço a paciência, as horas dedicadas, os ensinamentos, a oportunidade única e, principalmente, por acreditar em minha capacidade, o que despertou em mim a vontade de querer aprender sempre mais.

Ao Tio Neto pelo aprendizado, experiência, disponibilidade e por toda ajuda para a realização desse estudo.

À Tia Aidê e ao tio Mauro pelos momentos únicos e porque meus domingos não teriam a mesma graça se não fossem os encontros em família na sua casa.

À “Tia” Marisa pela amizade e por nos presentear com o Arthur.

À Lala, minha prima-irmã, pela alegria constante a cada encontro.

Às minhas cunhadas, Thais e Vanessa, pelo carinho e por me permitirem ser madrinha da Noemi e do Pietro, que são minha alegria, minhas preciosidades.

Ao Rafa, meu amigo, companheiro e, agora, meu marido, por seu amor, por me acalmar com seu abraço e me incentivar a tentar mais uma vez, quando nem tudo dava certo.

Aos meus padrinhos, Odete e Armando, pelo carinho e pelas orações.

À Tiana por me querer tão bem.

Aos meus sogros, Riberto e Ângela, e à minha cunhada Nayara pelas energias positivas, pelo afeto e pela amizade.

À equipe da Fazenda Conquista por “abrir as portas” para que essa pesquisa fosse colocada em prática.

À professora Anna pela amizade e orientação nessa fase tão decisiva.

À UFU pela oportunidade da pós-graduação.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas pela amizade somada a momentos de risada e descontração.

À Marília, que me acolheu em sua casa como uma filha.

Ao professor Reginaldo e à Lígia pela paciência, dedicação e por me ajudarem tanto com o PCR, que demorou a dar certo.

À professora Daise pela doação dos *primers*, e à Eliane pela colaboração com a interpretação dos resultados da biologia molecular.

À professora Veridiana do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais – UFU, e à técnica Marina pela ajuda para quantificar o DNA.

Obrigada a todos que, de forma direta ou indireta, estiveram envolvidos na realização deste trabalho.

Por fim, agradeço aos animais, afinal, sem eles a pesquisa não seria possível, e aos meus de estimação, que me fizeram descobrir o que hoje me faz uma pessoa realizada: a paixão pela Medicina Veterinária.

Minha conquista é de todos vocês!

Eternamente, minha gratidão.



## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	17
1.1 Anatomia do sistema reprodutor feminino de bovinos .....	17
1.2 Microbiota endógena do sistema reprodutor de vacas .....	19
1.3 Infecções mais comuns do sistema reprodutor feminino de bovinos .....	20
1.4 Sensibilidade antimicrobiana .....	21
1.5 Infecções mais comuns do sistema reprodutor feminino de bovinos .....	23
1.6 Controle endócrino do ciclo estral das vacas.....	25
1.7 Inseminação Artificial em Tempo Fixo.....	28
1.8 Dispositivos intravaginais de progesterona.....	29
1.9 Vantagens e desvantagens da reutilização de dispositivos intravaginais de progesterona .....	30
1.10 Custo-benefício da reutilização de dispositivos intravaginais de progesterona .....	31
REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2 – ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS DE AMOSTRAS DE CONTEÚDO VULVOVAGINAL DE VACAS TRATADAS COM DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS DE PROGESTERONA .....	48
Resumo .....	48
Abstract .....	49
2.1 Introdução .....	50
2.2 Material e Métodos.....	51
2.2.1 Desenho do estudo .....	51
2.2.2 Coleta das amostras .....	52
2.2.3 Análises microbiológicas .....	53
2.2.4 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana .....	56
2.2.5 Análises dos resultados .....	56
2.3 Resultados e Discussão .....	57
2.3.1 Frequência de microrganismos na região vulvovaginal de vacas .....	57
2.3.2 Frequência de microrganismos em dispositivos intravaginais de progesterona .....	60
2.3.3 Perfil antimicrobiano .....	63

2.3.4 Correlação dos dispositivos reutilizados e novos com as taxas de prenhez .....	67
2.4 Conclusão .....	69
REFERÊNCIAS.....	71
CAPÍTULO 3 - VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> PROVENIENTES DE AMOSTRAS VULVOVAGINAIS DE VACAS TRATADAS COM DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS DE PROGESTERONA .....	81
Resumo .....	81
Abstract .....	82
3.1 Introdução .....	83
3.2 Material e Métodos.....	84
3.3 Resultados e Discussão .....	87
3.4 Conclusão .....	90
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXOS .....	97
ANEXO A - Protocolo utilizado no tratamento hormonal das vacas de corte Guzerá participantes do programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo .....	97
ANEXO B - Protocolo utilizado no tratamento hormonal das vacas mestiças leiteiras participantes do programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo .....	98
ANEXO C - Análise Final da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) .....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American type culture collection  
AZI - azitromicina  
BHI - Brain Heart Infusion  
BVD - diarreia viral bovina  
CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais  
CL - corpo lúteo  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
DNTP - deoxinucleotídeo trifosfatado  
DOX - doxiciclina  
eCG - gonadotrofina coriônica equina  
ECP – cipionato de estradiol  
ENO - enrofloxacin  
ERI - eritromicina  
FSH - hormônio folículo estimulante  
GEN - gentamicina  
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina  
IA - inseminação artificial  
IATF - inseminação artificial em tempo fixo  
IBR - rinotraqueíte infecciosa bovina  
LH - hormônio luteinizante  
μl - microlitros  
ml - mililitros  
P4 - progesterona  
PCR - Reação da polimerase em cadeia  
PEN - penicilina  
PGF2α - prostaglandina  
RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*  
SUT - sulfazotrim  
TBE - Tris/Borato/EDTA  
TET - tetraciclina  
TGI - trato gastrointestinal  
TSA - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*

UFC - unidade formadora de colônia

UV- Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

Tabela 1. Meios de cultura e provas bioquímicas usadas para identificação das espécies de enterobactérias lactose positiva .....	55
Tabela 2. Distribuição dos microrganismos isolados de conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite antes da introdução dos dispositivos intravaginais de progesterona e após sua retirada.....	58
Tabela 3. Distribuição dos microrganismos isolados de dispositivos intravaginais novos e reutilizados nos períodos anterior à sua introdução e posterior à sua retirada. ....	61
Tabela 4. Distribuição dos microrganismos isolados de dispositivos intravaginais reutilizados nos períodos anterior à sua introdução e posterior à sua retirada. ....	62
Tabela 5. Distribuição dos microrganismos isolados de dispositivos intravaginais novos nos períodos anterior à sua introdução e posterior à sua retirada. ....	63
Tabela 6. Perfil antimicrobiano de microrganismos isolados do conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite da Fazenda Conquista, Presidente Alves, SP. ....	64
Tabela 7. Perfil de sensibilidade das cepas isoladas de conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite da Fazenda Conquista, Presidente Alves, SP, que não engravidaram após a retirada dos dispositivos intravaginais de progesterona. ....	65
Tabela 8. Perfil de resistência das cepas isoladas de conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite da Fazenda Conquista, Presidente Alves, SP, que não engravidaram após a retirada dos dispositivos intravaginais de progesterona. ....	66
Tabela 9. Correlação dos dispositivos intravaginais de progesterona reutilizados e novos com as taxas de prenhez de vacas de corte Guzerá e de vacas leiteiras mestiças. ....	67

### Capítulo 3

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para análise, por RAPD-PCR, de 38 cepas de <i>E.coli</i> isoladas de conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite submetidas a tratamentos com dispositivos intravaginais de progesterona.....	85
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1. Aparelho reprodutor da vaca (vista lateral), mostrando sua posição dentro das cavidades pélvica e abdominal. .... 18
- Figura 2. Representação esquemática das variações na concentração dos principais hormônios que regulam o ciclo estral em bovinos. ....26
- Figura 3. Representação esquemática do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, responsável pelo controle hormonal no ciclo estral de fêmeas. ....27

### Capítulo 2

- Figura 1. Coleta de amostra de conteúdo vulvovaginal de vaca, com auxílio de *swab* estéril, para análise microbiológica. ....53
- Figura 2. Crescimento bacteriano de amostras de conteúdo vulvovaginal de vacas. ....54

### Capítulo 3

- Figura 1. Dendrograma de 38 isolados de *E. coli* oriundos de vacas de corte e de leite não gestantes da Fazenda Conquista, Presidente Alves-SP, pela técnica de RAPD-PCR com os *primers* 1247 e 1290, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) e método UPGMA com otimização de 85%, pelo programa Gel Compar. *Cluster* a com 87,6% de similaridade; *Cluster* b com 87,1% de similaridade; *Cluster* c com 86,7% de similaridade; *Cluster* d com 90,8% de similaridade; *Cluster* e com 89% de similaridade; *Cluster* f com 85,5% de similaridade; *Cluster* g com 87,5% de similaridade; *Cluster* h com 86,7% de similaridade; *Cluster* i com 87,4% de similaridade; e *Cluster* j com 87,1% de similaridade. ....88

## FREQUÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM CONTEÚDO VULVOVAGINAL DE VACAS TRATADAS COM DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS DE PROGESTERONA

**RESUMO** - A dissertação foi dividida em dois estudos. Com o primeiro, objetivou-se avaliar a ocorrência de microrganismos presentes na região vulvovaginal de vacas que receberam dispositivos intravaginais de progesterona durante os programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), e correlacionar os resultados com as taxas de prenhez. As amostras foram coletadas da região vulvovaginal de 30 vacas de corte Guzerá e 30 vacas leiteiras mestiças, e também dos dispositivos intravaginais, aleatoriamente. Das 120 amostras coletadas das vacas, 60 corresponderam ao período anterior à introdução do dispositivo (D0) e 60 ao posterior à retirada do mesmo (D9); obteve-se 100% de crescimento bacteriano, sendo que, na maioria das amostras, encontrou-se mais de um isolado. No D0, o agente de maior frequência foi a *Escherichia coli* (52%), e no D9, *Proteus* spp e *E.coli* foram os mais encontrados (32% e 28%, respectivamente). Em relação aos dispositivos intravaginais de progesterona, no D0 foram isolados 37 microrganismos, sendo predominantes os do gênero *Bacillus* (35%); já no D9 foram isoladas 41 unidades formadoras de colônias (UFC), sendo que 36,6% corresponderam ao *Proteus* spp. Para a análise do perfil antimicrobiano, realizou-se antibiograma por difusão do disco em ágar, e foram selecionadas as vacas que não engravidaram após a IATF, a título de tratamento futuro. Houve resistência de 100% à penicilina, e sensibilidade de, aproximadamente, 90% à gentamicina, tanto para os isolados obtidos das amostras das vacas de corte quanto para os obtidos das vacas de leite. Em relação à taxa de prenhez, das 30 vacas de corte, 11 foram diagnosticadas prenhes (36,7%), sendo 4 (36,4%) tratadas com dispositivos intravaginais reutilizados e 7 (63,6%) com dispositivos novos, que se mostraram mais eficazes. Das 30 vacas de leite, 15 (50%) engravidaram, sendo que 8 (53,3%) foram implantadas com dispositivos reutilizados e 7 (46,7%) com dispositivos novos, não havendo diferenças significativas entre as taxas de prenhez. Por se tratar de uma pesquisa, as fêmeas foram escolhidas ao acaso, e fatores como escore corporal, manejo nutricional e sanitário não foram prioridade. Com o segundo estudo, objetivou-se analisar a similaridade entre cepas, realizada pela técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR). A presença de *E.coli* e a ausência de prenhez foram os critérios de seleção utilizados. Diante dos resultados, observou-se

que a maioria dos isolados não foi filogeneticamente semelhante, uma vez que apresentaram similaridade inferior a 85%. O estudo ressaltou a importância da *E. coli* na microbiota vulvovaginal de vacas e a presença de caracteres fenotípicos e genotípicos dessa bactéria em possíveis problemas reprodutivos.

**Palavras-chave:** Bactéria, fêmea bovina, reprodução, dispositivos, RAPD



## FREQUENCY OF MICROORGANISMS PRESENT IN VULVOVAGINAL CONTENT OF COWS TREATED WITH INTRAVAGINAL PROGESTERONE DEVICES

**ABSTRACT** - The dissertation was divided in two studies. With the first, aimed to evaluate the occurrence of microorganisms present in the vulvovaginal region of cows that received intravaginal progesterone devices during the fixed-time artificial insemination (FTAI) programs, and correlate the results with pregnancy rates. Samples were collected from vulvovaginal region of 30 beef cows Guzerá and 30 crossbred dairy cows, and also intravaginal devices, randomly. Of the 120 samples of cows, 60 corresponded to the collections of the period prior to the introduction device (D0) and 60 to the subsequent withdrawal of it (D9); it yielded 100% of bacterial growth, whereas, in most samples, it was found more than one isolated. In D0, the most frequent agent was *Escherichia coli* (52%), and in D9, *Proteus* spp and *E. coli* were the most frequent (32% and 28%, respectively). Regarding intravaginal progesterone devices, in D0 were isolated 37 microorganisms, being predominant those of the genus *Bacillus* (35%); in D9, 41 colony forming units (CFU) were isolated, of which 36.6% corresponded to *Proteus* spp. For the analysis of the antimicrobial profile, susceptibility testing was performed by diffusion agar disk, and cows that did not became pregnant after FTAI program were selected, as a future treatment. There resistance 100% to penicillin, and sensitivity, approximately, 90% to gentamicin, both isolates obtained from samples of beef cows and obtained of dairy cows. Regarding pregnancy rate, the 30 beef cows, 11 were diagnosed pregnant (36.7%), 4 (36.4%) treated with reused devices and 7 (63.6%) with new devices, which showed more effective. Of the 30 dairy cows, 15 were pregnant (50%), 8 (53.3%) were implanted with reused devices and 7 (46.7%) with new devices, with no significant differences in pregnancy rates. Because it is a research, females were chosen at random, and factors such as body condition, nutritional management and health weren't priority. With the second study, aimed to analyze the similarity between strains, conducted by technical *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR). Presence of *E. coli* and the absence of pregnancy were selection criteria used. From the results, it was observed that most of the isolates wasn't phylogenetically similar, since they showed lower than 85% similarity. The study stressed the importance of *E. coli* in vulvovaginal microbiota of cows and the

presence of phenotypic and genotypic characters of this bacterium on possible reproductive problems.

**Keywords:** Bacteria, bovine female, reproduction, devices, RAPD

## **CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1.1 Anatomia do sistema reprodutor feminino de bovinos**

As estruturas macroscópicas do sistema reprodutivo de maior interesse para a fisiologia são: vulva, vagina, cérvix, corpo do útero, cornos uterinos, tubas uterinas e ovários (Figura 1).

De acordo com Ball e Peters (2006), a vulva localiza-se na porção externa do trato genital feminino e permite o alojamento do pênis no momento da cópula, monta natural ou da própria inseminação artificial (IA); a vagina possui formato tubular, comprimento médio de 30 cm e variados diâmetros internos, é órgão copulatório, onde o sêmen é depositado na sua porção final.

A cérvix é chamada colo do útero e está situada cranialmente à vagina, com aproximadamente 5 a 15 cm, porém seu tamanho, espessura e forma variam de animal para animal; tem como função proteger o canal durante a gestação (BALL; PETERS, 2006).

Além disso, caracteriza-se pela presença de uma camada muscular bem desenvolvida e rica em fibras elásticas, o que lhe confere alto poder de maleabilidade; além disso, destacaram a importância de seu estudo para auxiliar em aplicações da biotecnologia reprodutiva, a exemplo da inseminação artificial (HAFEZ; JAINUDDEN, 2000).

O útero, importante componente desse sistema, é dividido em outras duas partes, corpo e cornos, e, na espécie bovina, possui um septo que separa os dois cornos (septo intercornual), classificando-o como bipartido (HAFEZ; JAINUDDEN, 2000).

Segundo Pansani e Beltran (2009), o útero tem como principal função abrigar o embrião e, posteriormente, o feto, fornecendo proteção e nutrição adequada para seu desenvolvimento, além do transporte de espermatozoide e participação na regulação da função do corpo lúteo.

As tubas uterinas têm grande importância nos processos reprodutivos (JOSHI, 1988) e fornecem uma conexão entre o ovário e o corno uterino. Dividem-se em três segmentos: infundíbulo, ampola e istmo.

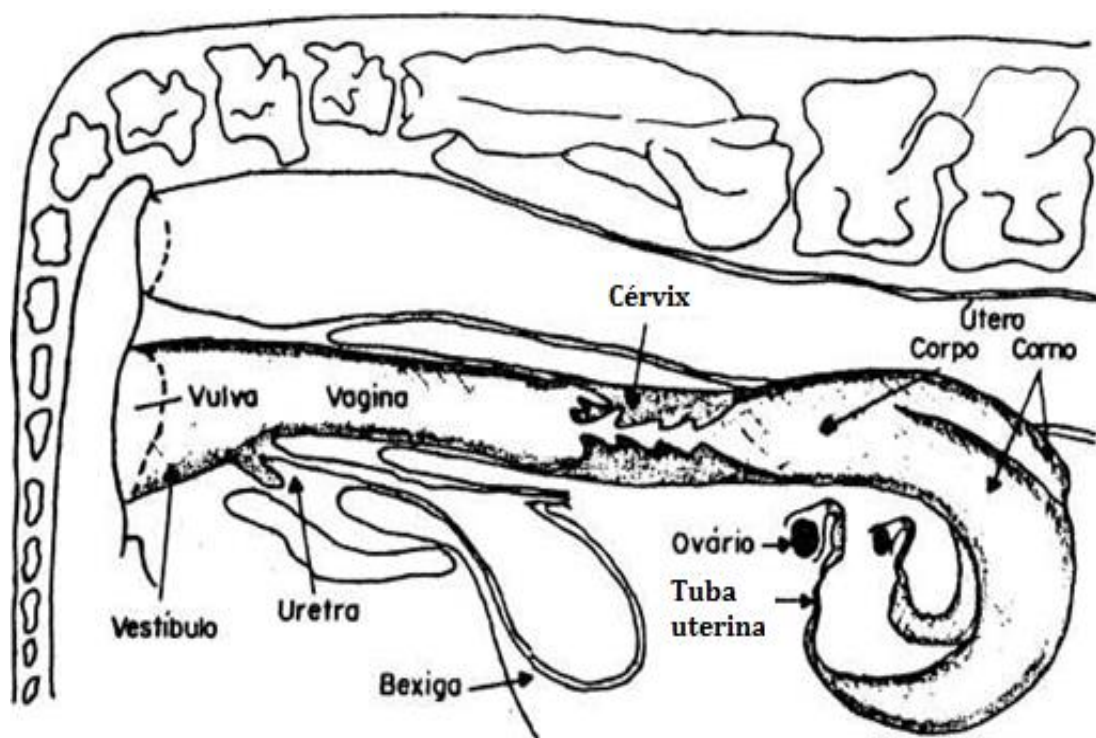
O infundíbulo apresenta fímbrias que se aderem ao ovário como um ponto de ancoragem (NICKEL; SCHUMMER; SEIFERLE, 1987). A ampola é a parte mais

larga da estrutura, onde ocorrem a maturação e a fecundação de ovócitos. O istmo age como um reservatório de esperma (YANIZ et al., 2000), além de proporcionar ambiente ideal para a maturação, fertilização dos gametas e capacitação espermática na reprodução dos mamíferos. Auxilia também no transporte dessas células sexuais e embriões (ELLINGTON, 1991; HUNTER, 2003) e suas contrações peristálticas ajudam a transportar seus conteúdos para o útero (LIEBICH, 1990).

Os ovários apresentam-se aos pares e encontram-se localizados na cavidade pélvica; pesam de 15 a 20 gramas, têm 4 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, e possuem função exócrina e endócrina: produção de células germinativas e secreção de estrógeno e progesterona (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Quando o assunto é biotecnologia com a finalidade de multiplicação genética, deve-se buscar constantemente a melhora dos índices técnicos, o desenvolvimento e uso da tecnologia, bem como a identificação dos parâmetros anatômicos e fisiológicos do sistema reprodutivo de fêmeas bovinas (PANSANI; BELTRAN, 2009). Daí a importância de se estudar e conhecer a anatomia e fisiologia desse sistema.

Figura 1 - Aparelho reprodutor da vaca (vista lateral), mostrando sua posição dentro das cavidades pélvica e abdominal.



Fonte: Adaptado de Ball; Peters (2004)

## 1.2 Microbiota endógena do sistema reprodutor de vacas

Paisley, Mickelsen, Anderson (1986) afirmaram que os microrganismos mais comuns isolados a partir de amostras do sistema reprodutor feminino de bovinos são *Streptococcus* hemolíticos, corinebactérias, *Staphylococcus*, coliformes e Gram-negativos anaeróbios, considerados patógenos facultativos. Oliveira (1995) citou que *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomices pyogenes* são considerados habitantes da vulva, vagina, pele e trato gastrointestinal, mas tais microrganismos possuem propriedades invasivas.

A vulva, devido à sua localização em ambiente externo, pode favorecer a chegada de bactérias à vagina e estabelecer a microbiota normal, originada da adaptação de agentes do trato gastrointestinal ao sistema genital feminino (TORRES; ENRIQUEZ; VIZMANOS, 1994). Do ponto de vista reprodutivo, é importante porque é nela que são observados os sinais externos de estro (UNIÓN, 2010).

Kreplin (1990) afirmou que as bactérias anaeróbias facultativas e obrigatórias podem atuar em parceria, possibilitando o crescimento e o aumento da patogenicidade.

Grande parte dos microrganismos isolados de conteúdo vaginal são bastonetes Gram-negativos, originados do trato gastrointestinal (TGI), especialmente *Escherichia coli*, e Gram-positivos como *Streptococcus* spp.; sob condições normais, os microrganismos encontrados na microbiota vaginal também estão na pele e fezes, com propriedades invasivas, podendo estar em pequeno número no útero de vacas sadias (KUNZ et al., 2002).

Os mesmos autores afirmaram, ainda, que as vacas não sofrem contaminações contínuas por tais agentes, porém estes colonizam o trato genital se houver oportunidade e, após o parto, a microbiota vaginal pode invadir o útero, através da cérvix, que está parcialmente aberta em decorrência da ação dos estrógenos liberados durante o parto.

Fêmeas bovinas podem se tornar susceptíveis aos microrganismos que alcançam o útero, porém barreiras físicas como vulva e cérvix dificultam o acesso dos patógenos oportunistas (ROCHA et al., 2004).

### 1.3 Infecções mais comuns do sistema reprodutor feminino de bovinos

Infecções bacterianas no trato urogenital estão entre os problemas frequentes da clínica médica veterinária e podem acontecer concomitante ou separadamente nos dois sistemas, variando desde infecções assintomáticas até muito severas (BARSANTI, 2006).

Muitos são os fatores relacionados com as doenças infecciosas e, dentre os determinantes importantes, destacam-se o estado geral de saúde do hospedeiro, contato prévio com determinados microrganismos, histórico médico, e uma variedade de agressões tóxicas, traumáticas, ou iatrogênicas; bactérias, leveduras, fungos, protozoários e vírus convivem com a microbiota da biosfera composta por microrganismos representados por diversos tipos, variedades, cepas, espécies e gêneros (ISENBERG; D'AMATO, 1995).

As doenças da reprodução podem ser de causa infecciosa, como os vírus, bactérias e parasitas, e não infecciosa, sendo consideradas de etiologia multifatorial (DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007).

Del Fava; Arcaro; Pozzi (2003) relataram a importância e necessidade de prevenir as doenças infectocontagiosas da reprodução animal como a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD), leptospirose, brucelose e neosporose, visto que estão muito disseminadas no rebanho nacional.

Aproximadamente 37% a 50% das perdas gestacionais em bovinos são associadas à IBR, BVD e leptospirose (AONO et al., 2013), que são muito expressivas nos rebanhos bovinos brasileiros, tanto de forma isolada quanto em associação (FLORES et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2006; TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

A IBR é muito preocupante porque causa perdas econômicas consideráveis; pode acometer os tratos respiratório e genital dos bovinos, sendo também associada à meningoencefalite. É causada pelo herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1), o qual tem sido relacionado a falhas reprodutivas como a morte embrionária precoce e abortos (OLIVEIRA et al., 2011).

Já a BVD é considerada uma das enfermidades mais comuns em bovinos, em todo o mundo, e está associada a múltiplas manifestações clínicas, incluindo diarreia aguda, doença das mucosas, diarreia crônica e problemas reprodutivos (PEREIRA et al., 2009).

A leptospirose, causada por bactérias do gênero *Leptospira*, é uma doença ainda negligenciada em muitas regiões, daí o grande número de surtos ocorridos no mundo; sua verdadeira extensão e incidência não são totalmente conhecidas, uma vez que sistemas de vigilância são altamente variáveis e frequentemente ausentes (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

Tem grande importância no setor pecuário, pois, além do impacto em saúde pública, é considerada a principal causa de perdas econômicas, sendo que a maioria das infecções é subclínica e associada a problemas reprodutivos como aborto, parto de natimortos e nascimento de neonatos fracos ou malformados (RADOSTITS et al., 2002).

A neosporose, causada pelo protozoário *Neospora caninum*, ocasiona grandes prejuízos na produção de leite e seus derivados, e acomete espécies como ovinos, caprinos, bovinos e bubalinos (DAGUER et al., 2004; DUBEY; SCHARES, 2011). Além disso, é responsável por problemas reprodutivos, isolados ou associados a outros agentes (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Seu impacto econômico global foi avaliado recentemente, e o aborto é o principal fator de prejuízo ao produtor. Em 10 países avaliados, as perdas econômicas na bovinocultura excedem dois bilhões de dólares anuais, sendo que, no Brasil, são estimadas em mais de 150 milhões de dólares no mesmo período (REICHEL et al., 2012).

A brucelose bovina, por sua vez, é uma zoonose cosmopolita causada pela bactéria *Brucella abortus*, sendo endêmica no Brasil; tem grande importância devido aos prejuízos resultantes da morte de animais, da diminuição no ganho de peso e da produção de leite, do descarte precoce e condenação de carcaças no abate (SOUZA et al., 2013).

#### **1.4 Sensibilidade antimicrobiana**

A microbiota vaginal de bovinos é variável quanto ao número e à composição de microrganismos (FLORIÃO; FRAGA, 2014). Diversos fatores podem influenciar a composição dessa microbiota, e um desequilíbrio pode causar infecções, sendo que, na maioria das vulvovaginites, o tratamento medicamentoso é capaz de destruir parcialmente a microbiota normal, podendo levar à seleção de microrganismos multirresistentes (SARAIVA et al., 2014).

Walsh, em 2003, definiu os antibióticos como compostos naturais ou sintéticos que podem inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias; quando causam a morte da bactéria, são chamados bactericidas, e quando promovem a inibição do crescimento microbiano, são denominados bacteriostáticos.

O uso indiscriminado de antimicrobianos na Medicina Veterinária tornou-se uma grande preocupação nos últimos tempos, visto que pode implicar no surgimento de bactérias resistentes a estes fármacos, como é o caso da *Escherichia coli*, habitante do trato gastrointestinal de animais, que pode ser transmitida ao homem pelo contato direto ou indireto, principalmente por produtos de origem animal (LEITE et al., 2013).

Assim, devem ser adotadas medidas para reduzir a ocorrência desta resistência, tais como: controle mais efetivo dos antibióticos, realização de estudos relacionados aos mecanismos genéticos de resistência, maiores informações quanto à sensibilidade microbiana e desenvolvimento de novas drogas (NASCIMENTO et al., 2000).

Alguns autores relataram o surgimento de bactérias que hospedam vários genes de resistência a antimicrobianos, sendo esses genes de resistência transmitidos por plasmídeos e/ou elementos genéticos (LEITE et al., 2013).

A resistência a três ou mais classes de antimicrobianos nos testes de sensibilidade pode ser classificada como multirresistência, mas se a resistência acontecer a diversos agentes pertencentes à mesma classe, quando determinada pelo mesmo mecanismo, não se trata de multirresistência (SCHWARZ et al., 2010).

A resistência bacteriana, de modo geral, pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca refere-se a uma característica inata do microrganismo, antes mesmo do uso da droga. A resistência adquirida ocorre após a exposição prévia ao antimicrobiano, por mecanismos variados, que podem ser resultantes de mutações cromossômiais ou da presença de plasmídeos (TENOVER, 2006).

Nas mutações cromossômiais, o antibiótico exerce pressão seletiva sobre os microrganismos, possibilitando que aqueles mutantes resistentes apresentem supercrescimento em relação aos sensíveis, e as novas gerações formadas serão compostas por células resistentes (SILVA, 1999).

A resistência a drogas pode ser carregada nos plasmídeos (LÁZÁR et al., 2014). Esses elementos extracromossômiais agem independentemente do cromossoma, e os genes de resistência podem ser transferidos do cromossoma ao



plasmídeo e vice-versa, e de uma bactéria para outra, possibilitando a disseminação (TENOVER, 2006; TRAVERS; BARZA, 2002).

A realização de estudos sobre a sensibilidade microbiana aos antibióticos é importante para a escolha dos fármacos no tratamento de eventuais infecções cujo agente etiológico foi confirmado por cultura. Estudos epidemiológicos baseados no rastreamento de cepas resistentes aos antibióticos ocorrem no intuito de propor e adotar estratégias para impedir que elas se disseminem entre o rebanho, além de fornecer conhecimento acerca do perfil de resistência das bactérias que circulam na região (BARCELLOS et al., 2012; TRAVERS; BARZA, 2002).

### **1.5 Técnicas moleculares na avaliação de microrganismos**

A aplicação de técnicas moleculares em estudos epidemiológicos e de tipagem de microrganismos são utilizadas para discriminar isolados não relacionados em um mesmo grupo epidemiológico (FONTANA et al., 2012).

Várias metodologias têm sido utilizadas para a tipagem molecular de microrganismos, como cariotipagem eletroforética, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), microsatélites, MLST (*Multilocus Sequence Typing*), DNA *fingerprinting* e PFGE (*Pulse-field Gel Electrophoresis*) (SOARES-RAMOS et al., 2003). Cada uma delas apresenta um poder discriminatório específico, vantagens e desvantagens, de acordo com a facilidade de execução técnica, custo, requerimentos básicos relacionados à equipamentos, e qualificação de recursos humanos.

A técnica de RAPD baseia-se no princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Protein Chain Reaction*) e pode ser utilizada na análise do polimorfismo bacteriano (PAZZINI, 2010). Foi descrita pela primeira vez em 1990, sendo uma das técnicas mais utilizadas para a diferenciação de microrganismos, pesquisas de diversidade genética e resolução de grupos taxonômicos (WELSH; McCLELLAND, 1990), dado seu poder discriminatório e custo menor em relação aos outros métodos, além de apresentar boa reprodutibilidade intralaboratorial. Além disso, é bastante utilizada pelas suas vantagens de facilidade de execução e por não haver necessidade do conhecimento prévio de sequência genética (SALEHI et al., 2008).

Essa técnica é uma modificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que utiliza oligonucleotídeos curtos de sequência aleatória capazes de amplificar segmentos de DNA de comprimentos variáveis (GORDON, 2010; KONEMAM et al., 2001).

As diferenças entre o tamanho das bandas formadas e do número de bandas podem ser diferentes entre cepas e entre espécies de microrganismos. Baseado nisso é possível discriminar isolados com características fenotípicas semelhantes, no entanto, com características moleculares diversas, tendo utilidade na triagem de fatores de virulência, resistência a antimicrobianos, ou mesmo para estudos epidemiológicos (HOPKINS; HILTON, 2001).

Serafini, Barros e Azevedo (2002) relataram que qualquer bactéria pode ser analisada pela RAPD sem que se tenha conhecimento prévio de seu genoma, o que é uma grande vantagem; por outro lado, a escolha dos *primers* necessita de muitos testes até que se produzam resultados satisfatórios e a técnica seja padronizada (MASLOW; MULLIGAN; ARBEIT, 1993).

O poder discriminatório do método varia conforme o *primer* e o protocolo adotado, e será maior quando forem utilizados dois ou mais *primers* na reação (HOPKINS; HILTON, 2001).

Estando a técnica padronizada e com os parâmetros estabelecidos, é possível caracterizar as cepas quanto à similaridade. Quando grupos são bem próximos geneticamente, eles recebem a denominação de *clusters* (ABRAHAM, 2011).

Para que bons resultados sejam obtidos, é necessário que estejam normalizadas as condições de amplificação como a temperatura de hibridização dos *primers* (ELLSWORTH; RITTENHOUSE; HONEYCUTT, 1993; LEVI; ROWLAND; HARTUNG, 1993) e as variáveis envolvidas, incluindo a concentração e a qualidade do DNA a ser amplificado (MURALIDHARAN; WAKELAND, 1993), a concentração de cloreto de magnésio, a sequência e a concentração do *primer* utilizado (PAN et al., 1997), a concentração do dNTP (STEVENS; WALL, 1997), a origem da Taq polimerase utilizada e da presença dos possíveis contaminantes na mesma (MEUNIER; GRIOMONT, 1993), o termociclador e o número de ciclos térmicos que será utilizado na reação da PCR (PENNER et al., 1993).

Dessa forma, é fundamental um alto nível de padronização da técnica, além do controle interno no laboratório, para que os dados obtidos possam ser analisados com confiabilidade e sejam reproduzíveis de forma segura (BLACK et al., 1992).

Estudos têm mostrado, pela técnica de RAPD-PCR, a diversidade microbiana encontrada em bovinos, tanto patogênica quanto colonizante. Como exemplo, no estudo realizado por Fontana et al. (2012) foram encontrados isolados do gênero *Staphylococcus* spp. geneticamente idênticos em diferentes animais de uma mesma propriedade, assim como entre isolados de vacas com mastite subclínica e da mão do ordenhador, evidenciando uma relação de contaminação e transferência cruzada entre cepas de origem animal e humana.

A técnica de RAPD, como se pode verificar, tem ampla aplicação e pode ser promissora em estudos epidemiológicos, e também na compreensão das vias de disseminação e rotas de infecção entre diferentes animais.

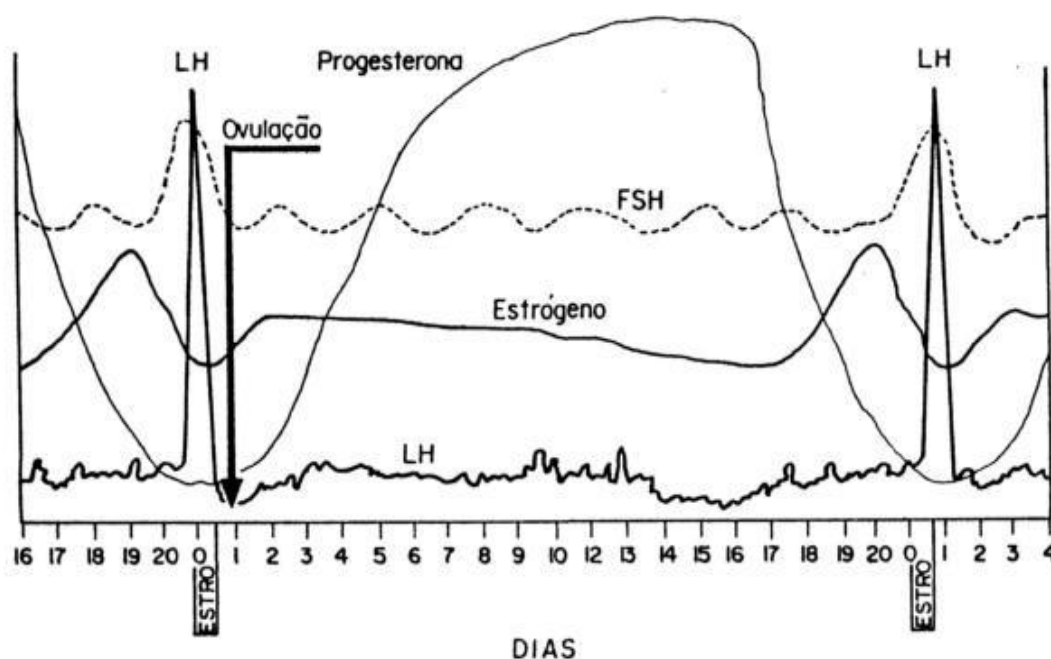
## **1.6 Controle endócrino do ciclo estral das vacas**

É de suma importância o conhecimento da fisiologia e endocrinologia do ciclo estral das vacas, para que decisões e ajustes possam ser feitos quanto aos tratamentos mais adequados para cada categoria animal (MADUREIRA; MATURANA, 2012).

O ciclo estral das vacas tem duração de 16 a 24 dias (média de 21 dias), e a ovulação de 24 a 30 horas após o início do cio, variando de uma fêmea para a outra (HAFEZ, 1995). Compreende as modificações cíclicas na fisiologia, na morfologia dos órgãos genitais e também no perfil dos hormônios relacionados (ANTONIOELLI, 2002) (Figura 2).

Mecanismos endócrinos e neuroendócrinos regulam o ciclo estral, principalmente os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteroides, secretados pelos ovários (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Nesse período, ocorre uma cadeia de eventos que se repetem até o impedimento da luteólise pela gestação (MORAES; SOUZA; GONSALVES, 2001).

Figura 2 - Representação esquemática das variações na concentração dos principais hormônios que regulam o ciclo estral em bovinos.



Fonte: Embrapa Gado de Corte, Ciclo Estral.

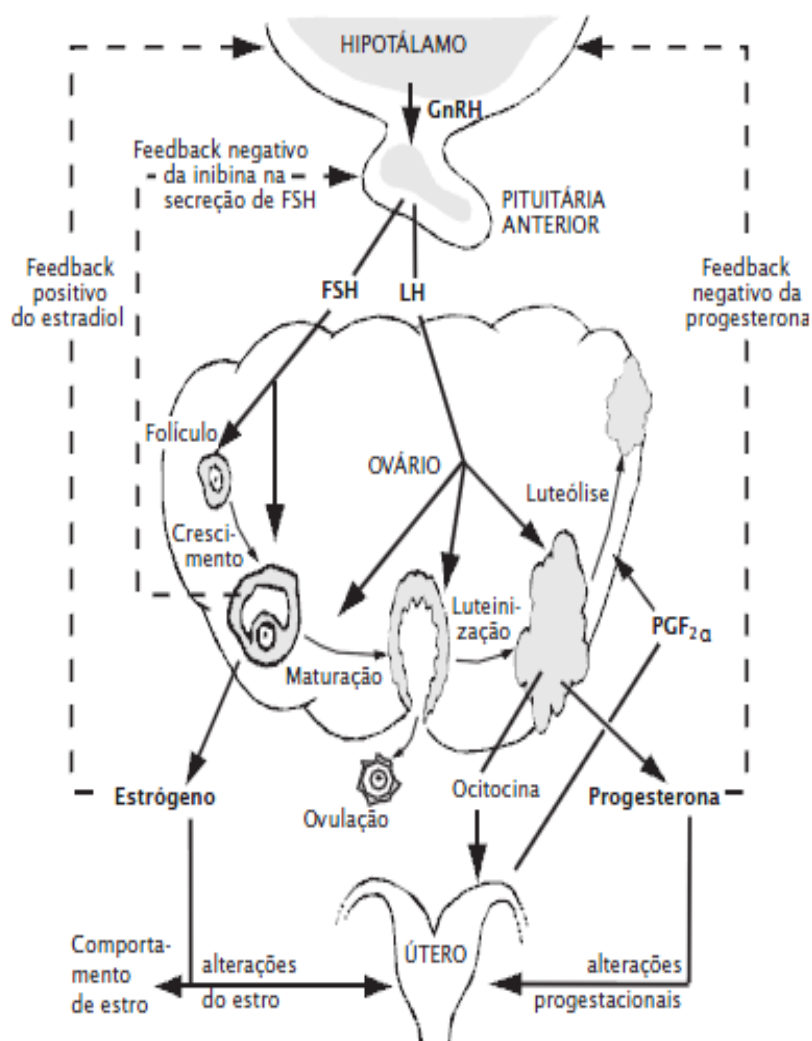
Disponível em: <<http://old.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc48/03cicloestral.html>>

De acordo com Antonioli (2002), o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) é secretado pelo hipotálamo através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário e é responsável por controlar a sequência de eventos que ocorrem no ciclo estral, estimulando a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), que por sua vez, estimulam o ovário a produzir ondas de desenvolvimento folicular (SENGER, 2003) (Figura 3).

O FSH tem como principal função estimular o desenvolvimento do folículo, e o LH atua no crescimento final deste até a ovulação, além de transformar o folículo em corpo lúteo. À medida que o folículo dominante cresce, há uma produção maior de estrógeno, responsável pelo comportamento do cio, e, quando as concentrações desse hormônio atingem um limite, uma onda de GnRH é disparada, estimulando a liberação do pico de LH, com consequente ovulação do folículo e liberação do ovócito (SENGER, 2003).

O mesmo autor cita que esse evento só é possível na ausência de progesterona (P4), que é produzida pelo CL e responsável por inibir a onda de GnRH; é a P4 que prepara e mantém o útero para a prenhez.

Figura 3 - Representação esquemática do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, responsável pelo controle hormonal no ciclo estral de fêmeas.



Fonte: Ptaszynska (2007)

Na ovulação, a membrana folicular se rompe e há a expulsão do ovócito, sendo que, imediatamente após, a parede do folículo ovulado é colapsada e a cavidade que se forma é invadida por linfa e sangue, provenientes dos capilares. Esse conjunto de componentes, juntamente com as células remanescentes do folículo ovulado, formará o CL (MARTIN; FERREIRA, 2009).

Se a vaca não engravidar, há liberação de prostaglandina (PGF<sub>2α</sub>) pelo útero, resultando na lise do corpo lúteo; esta exclui o efeito inibidor da progesterona na liberação da onda de GnRH, permitindo a liberação desse hormônio e estimulando o pico de LH, que matura o folículo dominante (SENGER, 2003).

## 1.7 Inseminação Artificial em Tempo Fixo

O aumento expressivo do consumo de carne bovina no mundo todo exige grande esforço do produtor para melhorar os indicadores de eficiência reprodutiva e produtiva de seus rebanhos, a taxa de desfrute e, conseqüentemente, o retorno econômico da atividade (FERREIRA et al., 2013).

Diante disso, houve a necessidade de se pesquisarem novas biotecnologias capazes de atender rapidamente essa demanda, destacando-se, assim, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que possibilita a inseminação artificial de um grande número de animais sem a observação de estro, facilitando o manejo e otimizando tempo e mão-de-obra (CARRIJO-JUNIOR; LANGER, 2006). Essas técnicas são consideradas um avanço da reprodução animal, pois permitem melhorias genéticas em rebanhos puros e comerciais através do uso de touros provados (BARUSELLI, 2013).

O aprimoramento de protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação tem sido constante, o que facilita seu uso e resulta em maiores taxas de gestação na IATF (BISINOTTO; SANTOS, 2012; SÁ FILHO et al., 2010). Tratamento de progesterona mais estrógeno, gonadotrofina coriônica equina (eCG) e PGF2 $\alpha$  possibilitam a otimização da eficiência reprodutiva (SÁ FILHO et al., 2010).

Apesar de apresentar uma série de vantagens sabidamente comprovadas, a IA vem sendo substituída gradativamente pela IATF em virtude das dificuldades encontradas a campo, como falta de mão-de-obra qualificada, problemas logísticos em grandes programas de IA, falhas na detecção de estros, custos para implantação do programa, não otimização da eficiência reprodutiva do rebanho (PATTERSON, 2006).

Muitas são as vantagens do uso da IATF e, dentre elas, está a possibilidade de inseminar as vacas e torná-las gestantes no início da estação de monta, encurtando o período de serviço e aumentando a eficiência reprodutiva do rebanho (BARUSELLI et al., 2002; MENEGHETTI; VASCONCELOS, 2008; MENEGHETTI et al., 2009). Pegorer et al., em 2011, destacaram como uma grande vantagem da IATF a possibilidade de uso de sêmen de touros com superioridade genética comprovada.

Para sincronizar o estro e a ovulação, são utilizados protocolos hormonais (BÓ; CUTAIA; BARUSELLI, 2004), com o objetivo de aumentar a produtividade (BARUSELLI et al., 2004).

Baruselli et al. (2002); Baruselli, Reis e Marques (2004); Penteado et al. (2005), em suas pesquisas, afirmaram a eficiência que os tratamentos com progesterona e progestágenos apresentaram ao induzir a ciclicidade no início da estação de monta e verificaram uma antecipação na gestação resultante da IATF, quando esta foi comparada a métodos mais tradicionais (touro ou inseminação convencional).

Estudos realizados recentemente mostram que as taxas de ovulações sincronizadas são superiores a 80%, e o maior desafio é aumentar a prenhez e a manutenção da gestação; assim, os programas reprodutivos aplicados ao manejo das propriedades comerciais com os protocolos de IATF visam facilitar e intensificar a aplicação dessas biotecnologias, além de adequá-los aos objetivos específicos de cada fazenda (SÁ FILHO, 2014).

Conforme citado por Oliveira (2012), o inseminador é fator determinante para o resultado final da IA; diante do tamanho dos rebanhos, o uso dos protocolos de IATF aumenta continuamente no Brasil e muitas vacas precisam ser inseminadas em um curto período de tempo; daí a necessidade dos inseminadores serem mais rápidos e eficientes.

Não há dúvidas de que os protocolos de IATF acrescentam muito para a pecuária brasileira, afinal, tal biotécnica já corresponde a mais de 50% das inseminações realizadas no Brasil, tendo sido um grande contribuinte para a reprodução animal como um todo (BARUSELLI, 2013).

## **1.8 Dispositivos intravaginais de progesterona**

Os dispositivos intravaginais são produzidos em matriz de silicone e impregnados com progesterona e têm como uma das principais utilidades a sincronização de estro em programas de inseminação artificial em bovinos; com o intuito de reduzir custos, surgiu a alternativa de reutilizá-los, porém exigem cuidados e devem ser estocados corretamente (GOOTTSCHALL et al., 2012; GUIDO et al., 1999; MOTLOMELO; GREYLING; SCHWALBACH, 2002).

Vários autores, em diferentes situações (COLAZO et al., 2007; GOOTTSCHALL et al., 2012; MENEGHETTI et al., 2009), relataram que a reutilização de dispositivos intravaginais de P4 para sincronização de estro registra

taxa de gestação semelhante àquela observada quando se utilizam dispositivos novos, seja para vacas leiteiras ou para vacas de corte.

Segundo Bó et al. (2006), em muitos protocolos a P4 é associada ao estrógeno para sincronizar o aparecimento de uma onda folicular e a ovulação; tal hormônio atua como agente luteolítico, enquanto que a progesterona inibe o desenvolvimento do CL, ou previne a ovulação quando usada próxima do final do ciclo estral. Wishart e Young (1974) afirmam que tal associação promove sincronização de uma nova onda folicular cerca de 4 a 5 dias após sua aplicação.

O tratamento hormonal é importante para um programa de IATF, porém, ainda são muitas as dúvidas sobre as vantagens e a viabilidade da reutilização de dispositivos intravaginais de P4 (PINTO-NETO et al., 2009).

### **1.9 Vantagens e desvantagens da reutilização de dispositivos intravaginais de progesterona**

Com o intuito de melhorar a relação do custo-benefício dos protocolos de IATF, a reutilização dos dispositivos intravaginais de progesterona tornou-se uma prática muito comum no Brasil (ALMEIDA et al., 2006; BARUFI et al., 2002; MOTLOMELO; GREYLING; SCHWALBACH, 2002).

Assim, uma alternativa para reduzir os custos dos protocolos é a reutilização dos dispositivos por três vezes (ALMEIDA et al., 2006), entretanto, a concentração reduzida de P4 desses dispositivos pode não ser suficiente para sincronizar adequadamente todas as fêmeas dentro do rebanho, prejudicando as taxas de concepção e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva (SANTIN, 2013).

Alguns estudos relataram que a reutilização de dispositivos intravaginais de progesterona em vacas (MARTINS et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2006), ovelhas (PINNA, 2008) e cabras (ZAMBRINI et al., 2004) não acarretam prejuízos na taxa de fertilidade dos animais.

Já Herrmann e Wallace (2007) afirmaram que vacas da Raça Holandesa estão condicionadas a maior ocorrência de vaginites, inclusive as de maior gravidade, quando dispositivos são reutilizados nos programas de IATF.

Essa reutilização pode colocar as fêmeas em risco, quanto aos aspectos sanitários. Diante disso, alguns autores propuseram alternativas para desinfecção ou



esterilização destes dispositivos quando reutilizados em bovinos, e obtiveram bons resultados (CERRI et al., 2009; COLAZO et al., 2004; ZULUAGA; WILLIAMS, 2008).

Colazo, Kastelic e Mapletoft (2003) acrescentaram que esses procedimentos de higienização dos dispositivos contribuem para minimizar os riscos de transmissão de doenças, entretanto, podem ocasionar perdas na concentração de progesterona.

Dentre as doenças que podem ser transmitidas pela reutilização dos dispositivos intravaginais estão IBR e BVD, que são muito preocupantes e responsáveis por grandes perdas econômicas; assim, pensando em eficiência de manejo, logística e biossegurança, há uma tendência cada vez maior de adesão a produtos de uso único para os programas de IATF (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006).

#### **1.10 Custo-benefício da reutilização de dispositivos intravaginais de progesterona**

Muitas são as pesquisas voltadas para as biotecnologias em busca de melhores indicadores produtivos, entretanto, ainda há uma deficiência de trabalhos relacionados com a real eficiência bioeconômica (TANURE; NABINGER, 2010). Conhecer os custos de produção e as vantagens de cada investimento é fator essencial para um planejamento estratégico e diferencial para se manter no mercado (FERREIRA; CARDOZO; LIMA, 2002).

Muitos são os gastos com protocolos hormonais realizados nos programas de IATF, sendo que os dispositivos intravaginais de P4 correspondem ao maior custo, na maioria das vezes, não sendo viáveis economicamente. Por esse motivo, muitos dispositivos são reutilizados (MOTLOMELO; GREYLING; SCHWALBACH, 2002), no intuito de reduzir os custos e possibilitar a utilização dos protocolos (ALMEIDA et al., 2006).

O custo-benefício da reutilização de dispositivos intravaginais de P4 para a sincronização de estro em bovinos deve basear-se em fatores como: taxa de prenhez após a realização do programa de IATF, custo e praticidade decorrentes da detecção de estro e das condições de manejo, disponibilidade de touros para monta natural e importância dos dados de concepção (COLAZO et al., 2007).

Thomazi et al. (2009) enfatizaram que, apesar da redução nos custos com o uso de dispositivos reutilizados, deve-se atentar para as doenças sexualmente transmissíveis, cujos estudos não estão totalmente elucidados.

Estudos têm mostrado que a reutilização do dispositivo de progesterona não afeta significativamente os índices de prenhez; assim, torna-se uma alternativa tecnicamente eficiente e economicamente viável, além de ajustar a relação custo-benefício no programa de IATF.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S. **Molecular characterization of commensal and pathogenic *Escherichia coli* that colonise human urinary tract and the porcine gastrointestinal tract and the development of whole cell biosensors to evaluate bacteriocin mediated bacterial interactions.** 2011. 170f. Doctor of Philosophy thesis, School of Biological Sciences, University of Wollongong, 2011.

ALMEIDA, A.B.; BERTAN, C.M.; ROSSA, L.A.F.; GASPAR, P.S.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H. Avaliação da reutilização de implantes auriculares contendo norgestomet associados ao valerato ou benzoato de estradiol em vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.43, n.4, p.456-465, 2006.

ANTONIOLLI, C. B. **Desenvolvimento folicular, ondas foliculares e manipulação.** 2002. 15f. Seminário (Seminário apresentado na disciplina de Endocrinologia da Reprodução do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquímica/posgrad/endocrino/foliculos.pdf>>. Acesso em: 04 set. 2015.

AONO, F.H.; COOKE, R.F.; ALFIERI, A.A.; VASCONCELOS, J.L. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submmited to fixed-time AI in Brazilian cow-calf operations. **Theriogenology**, New York, v.79, n.2, p.242-248, 2013.

BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. Anatomy. In: BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. **Reproduction in cattle.** 3.ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p.13-27.

BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. **Reprodução em bovinos.** 3.ed. São Paulo: Editora Roca, 2006. v.1. 240p.

BARCELLOS, D.E.S.N.; SOBESTIANSKY, J.; LINHARES, D.; SOBESTIANSKY, T.B. Uso de antimicrobianos. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds.) **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Canone Editorial, p. 855-871, 2012.

BARSANTI, J.A. Genitourinary infections. In: Greene C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3.ed. St Louis, Missouri: Saunders/Elsevier, 2006. p.935-961.

BARUFI, F.B.; MADUREIRA, E.H.; BARBUIO, J.P.; MIZUTA, K.; BINELLI, M.; ROSSA, L.A.F.; OLIVEIRA, C.A. de ; BARUSELLI, P.S. Sincronização do estro e da ovulação em bovinos de corte com Crestar, CIDR ou CIDR reutilizado, seguidos ou não pela administração de eCG. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.26, n.3, p.226-229, 2002.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; MADUREIRA, E.H.; CAMPOS FILHO, E.P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.218-221, 2002.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p.155-165.

BARUSELLI, P. S. Avanços conceituais aplicados à IATF em vacas de cria. In: JORNADA NESPRO, 8., 2013, Porto Alegre. **Anais da 8ª Jornada NESPRO**. Porto Alegre: Nespro, 2013. p.33-50.

BISINOTTO, R.S., SANTOS, J.E.P. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.258-266, 2012.

BLACK, W.C.I.V.; DUTEAU, N.M.; PUTERKA, G.J.; NECHOLS, J.R.; PETTORINI, J.M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-

PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: *Aphididae*). **Bulletin of Entomological Research**, v.82, p.151-159, 1992.

BÓ, G.A.; CUTAIA, I.; BARUSELLI, P.S. Programas de inseminación artificial y transferencia de embriones a tiempo fijo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 56-81.

BÓ, G.A.; COLAZO, M.G.; MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestagenos y diferentes ésteres de estradiol. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA – Biotecnologia da Reprodução de Bovinos, 2, 2006, Paraná. **Anais...** Paraná, 2006, 201p.

CARRIJO-JUNIOR, O. A.; LANGER, J. Avaliação de protocolo de inseminação artificial em tempo fixo utilizando eCG em vacas nelore puras e paridas. **Revista Eletrônica de Veterinária-REDVET**, v.7, n.2, 2006. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020206.html>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

CERRI, R.L.A.; RUTIGLIANO, H.M.; BRUNO, R.G.S.; SANTOS, J.E.P. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.56–70, 2009.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDRG based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v.60, p.855-865, 2003.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; WHITTAKER, P.R.; GAVAGA, Q.A.; WILDE, R.; MAPLETOFT, R.J. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.25-34, 2004.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; SMALL, J.A.; WILDE, R.E.; WARD, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. **The Canadian Veterinary Journal**, v.48, p.49-56, 2007.

DAGUER, H.; VICENTE, R.T.; COSTA, T.; VIRMOND, M.P.; HAMANN, W.; AMENDOEIRA, M.R. Soroprevalência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1133-1137, 2004.

DEL FAVA, C.; ARCARO, J.R.P.; POZZI, C.R. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.25-33, 2003.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E.M.; GENOVEZ, M.E. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: Experiência do Instituto Biológico. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.73-79, 2007.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology e control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.2, p.323-367, 2007.

DUBEY J.P.; SCHARES G. Neosporosis in animals: the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.90-108, 2011.

ELLINGTON, J.E. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. **Cornell Veterinarian**, v.81, p.313-328, 1991.

ELLSWORTH, D.; RITTENHOUSE, K.D.; HONEYCUTT, R.L. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. **Biotechniques**, v.14, p.214-217, 1993.

EMBRAPA GADO DE CORTE. Ciclo Estral. Disponível em:

<http://old.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc48/03cicloestral.html>>. Acesso em 12 set.2015.

FERREIRA, G; CARDOZO, O; LIMA, J.M.S. Modelo bio-econômico para tomada de decisões em engorde de novilhos a pastoreio. In: MODELOS PARA TOMADA DE DECISÕES NA PRODUÇÃO DE BOVINOS E OVINOS, 1. 2002. **Resumos...** Santa Maria: UFSM, 2002, p.121-145. 2002.

FERREIRA, M.C.N.; MIRANDA, R.; FIGUEIREDO, M.A.; COSTA, O.M.; PALHANO, H.B. Impacto da condição corporal sobre a taxa de prenhez de vacas da raça nelore sob regime de pasto em programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.4, p.1861-1868, 2013.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

FLORIÃO, M.M.; FRAGA, M.E. Microbiota fúngica de fluidos cérvico-vaginal de bovinos de uma criação orgânica em região tropical. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.36, n.1, p.85-89, 2014.

FONTANA, V.L.D.S.; GIANNINI, M.J.S.M.; FONTANA, C.A.P.; LEITE, C.Q.F.; STELLA, A.E. Caracterização molecular de estafilococos isolados de vacas com mastite subclínica e ordenhadores. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.4, p.469-476, 2012.

Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-16572012000400002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572012000400002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 04 fev. 2016.

GORDON, D. M. Strain Typing and the Ecological Structure of *Escherichia coli*. **Journal of Aoac International**, Arlington, v.93, p.974-984, 2010.

GOTTSCHALL, C.S.; ALMEIDA, M.R.; TOLOTTI, F.; MAGERO, J.; BITTENCOURT, H.R.; MATTOS, R.C.; GREGORY, R.M. Avaliação do desempenho reprodutivo de vacas de corte lactantes submetidas à IATF a partir da aplicação do GnRH, da manifestação estral, da reutilização de dispositivos intravaginais e da condição corporal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, p.1012-1022, 2012.

GUIDO, S. I.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; PAES BARRETO, M.B.D.; ARAUJO, E.P.M. Reutilização do controlled internal drug release (CIDR) e do programa syncro-mate-B para sincronizar o estro de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.367-369, 1999.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Editora Manole, 1995. 582 p.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo, Brasil: Manole, 7.ed., 2004, 513p.

HAFEZ, E.S.E.; JAINUDEEN, M.R. Reproductive Cycles. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000; p.55-66.

HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v.17, n.4, p.494–501, 2011.

HERRMANN, J.A.; WALLACE, R. L. The effect of new and reused CIDRs on serum progesterone concentrations in lactating dairy cows. **The Bovine Practitioner**, v.41, n.1, p.41-47, 2007.

HOPKINS, K.L.; HILTON, A.C. Use of multiple *primers* in RAPD analysis of clonal organisms provides limited improvement in discrimination. **Bio Techniques**, v.30, n.6, p.1262-1267, 2001.



HUNTER, R.H. Reflections upon sperm-endosalpingeal and sperm– zona pellucida interactions in vivo and in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.147-154, 2003.

ISENBERG, H.D.; D'AMATO, R. Indigenous and pathogenic microorganisms of humans. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLEN, M.A.; TENOER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. Washington, D.C.: ASM Press, 1995, p.5-18.

JOSHI, M.S. Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.249-261, 1988.

JUNQUEIRA, J.R.C.; ALFIERI, A.A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.2, p.289-298, 2006.

JUNQUEIRA, J.R.C.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina: Ciência Agrárias**, Londrina, v.27, n.3, p.471-480, 2006.

KONEMAM, E.W. ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. São Paulo: Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1466p.

KREPLIN, C.M. Infectious causes of reduced fertility in cattle. **Alberta Agriculture, Food and Rural Development**, v.1, p.31, 1990.

KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; GALINDO, A.D.S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n.8, p.28-36, 2002.

LÁZÁR, V.; NAGY, I.; SPOHN, R.; CSÖRG, B.; GYÖRKEI, A.; NYERGES, A.; HORVÁTH, B.; VÖRÖS, A.; BUSA-FEKETE, R.; HRTYAN, M.; BOGOS, B.; MÉHI, O.; FEKETE, G.; SZAPPANOS, B.; KÉGL, B.; PAPP, B.; PÁL, C. Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network. **Nature Communications**, v.5, p.1-12, 2014.

LEITE, D.S.; FERRAZ, M.M.G.Z.; RIBEIRO, M.G.; FRANCO, M.M.J.; MOTTA, R.G.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K. Resistência antimicrobiana e integrons em *E. coli* isoladas de leite bovino informalmente comercializado. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.2 (supl.1), p.155-156, 2013.

LEVI, A.; ROWLAND, J.; HARTUNG, J.S. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woods plants. **HortScience**, v.28, p.1188-1190, 1993.

LIEBICH, H.G. **Funktionelle Histologie**. Schattauer Verlag, Stuttgart. 1990.

MADUREIRA, E.H.; MATURANA, M. Avanços tecnológicos no emprego de fármacos para controle da reprodução de fêmeas bovinas destinadas à IATF. SIMCORTE, 8., 2012, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Suprema Gráfica, 2012. p.305-327.

MARTIN, I.; FERREIRA, J.C.P. Fisiologia da ovulação e formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, p.270-279, 2009.

MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U.; BARUSELLI, P.S. Follicular dynamics in heifers and cows (*Bos indicus*) treated with new or previously used intravaginal progesterone device associated or no to injection of progesterone. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.33 (supl.1), p.227, 2005.

MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E.; ARBEIT, R.D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**, New York, v.17, p.1543-1564, 1993.

MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J.L.M. Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.786-793, 2008.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179-189, 2009.

MEUNIER, J.R.; GRIMONT, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Research in Microbiology**, v.144, p.373-379, 1993.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONSALVES, P.B.D. Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos. In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Livraria Varela, 2001. cap.3, p.25-55.

MOTLOMELO, K.C.; GREYLING, J.P.C.; SCHWALBACH, L.M.J. Synchronization of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. **Small Ruminant Research**, v.45, p.45-49, 2002.

MURALIDHARAN, K.; WAKELAND, E.K. Concentration of *primer* and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR. **BioTechniques**, v.14, n.3, p.362-364, 1993.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J. ; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology** [online], v.31, n.4, p.247-256, 2000.

NASCIMENTO, V.A.; TORRES, C.A.A.; OLIVEIRA, M.M.N.F.; DIAS, M.; VASCONCELOS, A.M.; CARNEIRO, C.; OLIVEIRA, F.A.; SANTOS, L.V.L.

Synchronized ovulation protocols in nelore breed cows by the reutilization of the progesterone device. **Animal Reproduction**, v.3, n.2, p.292, 2006.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **Anatomie der Haustiere**. Verlag Paul Parey, Berlin. 1987.

OLIVEIRA, L.Z. **Utilização de diferentes touros na IATF: Características seminais e suas relações com as taxas de fertilidade a campo**. 2012. 196f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DIAS, M.M.; VELHO, F.A.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v.75, n.6, p.1139-1145, 2011.

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

PAISLEY, L.G.; MICKELSEN, W.D.; ANDERSON, P.B. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. **Theriogenology**, Stoneham, v.25, n.3, p.353-381, 1986.

PAN, Y.B.; BURNER, D.M.; EHRLICH, K.C.; GRISHAM, M.P.; WEI, Q. Analysis of *primer*-derived, nonspecific amplification products RAPD- PCR. **BioTechniques**, v.22, p.1071-1075, 1997.

PANSANI, M.A.; BELTRAN, M.P. Anatomia e fisiologia do aparelho reprodutor de fêmeas bovinas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.12, 2009. Disponível em: <[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/MBINAo2JHuZSrRY\\_2013-6-19-10-50-19.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/MBINAo2JHuZSrRY_2013-6-19-10-50-19.pdf)>. Acesso em: 23 dez. 2015.

PATTERSON, D. J. Revisão de sistema de sincronização do estro utilizando a progesterona oral Acetato de Melengestrol. In: NOVOS ENFOQUES NA

PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS. 10., 2006, **Anais...**Uberlândia: CONAPEC Jr. 2006.

PAZZINI, L.T. **Caracterização genotípica de microrganismos isolados de infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres em recém-nascidos.** 2010. 146f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração: Biologia de Parasitas e Microrganismos) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

PEGORER, M.F.; ERENO, R.L.; SATRAPA, R.A., PINHEIRO, V.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Neither plasma progesterone concentrations nor exogenous eCG affects rates of ovulation or pregnancy in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols for puberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v.75, p.17-23, 2011.

PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S.J.; FEDAK, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **PCR Methods and Applications**, v.2, p.341-345, 1993.

PENTEADO, L.; SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Eficiência reprodutiva em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes submetidas a diferentes manejos durante a estação de monta. In: REUNIÃO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2005. Goiânia. **Anais...** Goiânia, GO. 2005.

PEREIRA, H.M.; SOUSA, V.E.; CHAVES, N.P.; BEZERRA, D.C.; SANTOS, H.P. Frequência de anticorpos contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados na bacia leiteira da Ilha de São Luís - MA. **Ciência Animal Brasileira**, p.496-501, 2009.

PINNA, A.E. **Taxa de ovulação, concentração plasmática de progesterona e fertilidade de ovelhas submetidas à indução de estro utilizando implantes intravaginais novos ou reutilizados.** 2008. 124f. Dissertação (Mestrado em

Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.

PINTO-NETO, A.; SILVA, R.Z.; MOTA, M.F.; ALBERTON, J. Reutilização de implante intravaginal de progesterona para sincronização de estro em bovinos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.12, n.2, p.169-174, 2009.

PTASZYNSKA, M. **Compêndio de Reprodução Animal**. São Paulo: Intervet Sinervia, 2007. 399 p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.G.; BLOOD, P.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

REICHEL, M.P.; ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M.; GONDIM, L.F.; ELLIS, J.T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. **International Journal for Parasitology**, v.43, n.2, p.133-142, 2012.

ROCHA, A.A.; GAMBARINI, M.A.; ANDRADE, M.A.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; GOMES, F.A. Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas Girolando. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.4, p.215-220, 2004.

SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, J.N.S.; SANTOS, J.E.P.; PERRY, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.23-30, 2010.

SÁ FILHO, M.F. Biotécnicas da reprodução para melhorar a fertilidade da vaca leiteira. In: SIMPÓSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA, 1., 2014, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Gráfica Ufrgs, 2014. p.152-188.

SALEHI, T.Z.; MADANI, S.A.; KARIMI, V.; KHAZAELI, F.A. Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. **Brazilian Journal of Microbiology** [online], v.39, n.3, p.494-497, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151783822008000300015&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822008000300015&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 18 out. 2015.

SANTIN, T. **Emprego de dispositivos vaginais de único uso (monodose) ou de três usos para liberação sustentada de progesterona em vacas de corte: testes *in vitro*, *in vivo* e de dinâmica folicular**. 2013. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

SARAIVA, C.R.N.; VERAS, H.N.H.; ROCHA, J.E.; SILVA, A.C.A.; VERAS, H.N.H. Perfil de resistência aos antimicrobianos de microrganismos isolados em secreção vaginal em um laboratório de análises clínicas de Crato - CE. In: VI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACULDADE DE JUAZEIRO DO NORTE, 2014. **Anais...** Juazeiro do Norte, CE, Brasil, 2014.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A.P.; GAASTRA, W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Veterinary Microbiology**, v.141, p.1-4, 2010.

SENGER, P.L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2.ed. Pullman: Current Conceptions, Inc., 2003.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria**: Classificação de Bactérias Fitopatogênicas utilizando técnicas baseadas em DNA. Caxias do Sul: EDUSC, 2002. 463p.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia, um texto ilustrado**. 1.ed. Teresópolis: Editora Eventos, 1999. v.1. 531p.

SOARES-RAMOS, J.R.L.; RAMOS, H.J.O.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. Comparative molecular analysis of

*Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genetics and Molecular Biology** [online], v.26, n.4, p.537-543, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S141547572003000400019&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141547572003000400019&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 18 out. 2015.

SOUZA, M.A.; SOARES, P.M.; GANDA, M.R.; LOURENCETTI, M.P.S.; CIUFFA, A. Z.; LIMA-RIBEIRO, A.M.C. Serology of brucellosis and tuberculosis in cattle from Uberlândia and Ituiutaba. **Ars Veterinária**, v.29, n.4, 2013. Disponível em: <<http://revistas.bvsvet.org.br/ars/article/view/12338/13053>>. Acesso em: 04 dez. 2015.

STEVENS, J.; WALL, R. Genetic variation in populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random Amplified Polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.25, n.2, p.81 -97, 1997.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p.203-209, 2001.

TANURE, S.; NABINGER, C. Ferramentas de gerenciamento bioeconômico e suporte à decisão em empresas de pecuária de corte. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE LA CARNE BOVINA, 4., 2010, Asunción. **Anais...** Asunción: [s.n.]. 2010. Disponível em: <[http://www.agr.una.py/congreso/imagen/presentaciones/Soraya\\_Tanure/Palestra1.pdf](http://www.agr.una.py/congreso/imagen/presentaciones/Soraya_Tanure/Palestra1.pdf)>. Acesso em: 18 out. 2015.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v.119, n.6, p.3-10, 2006.

THOMAZI, S; PINTO-NETO, A; SILVA, R. Z; MOTA; M. F; MELLO, N. M; FONSECA, J. F. Dinâmica ovariana e concentração de progesterona de vacas nelore submetidas à IATF. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia. UNIPAR**, Umuarama, v.12, n.2, p.135-140, 2009.



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

TRAVERS, K.; BARZA, M. Morbidity of infections caused by antimicrobial resistant bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, n.34 (supl.3), p.131-134. 2002.

UNIÓN GANADERA REGIONAL DE JALISCO. 2010. **Características reproductivas de la vaca lechera**. S.f. (en línea). Disponível em: <[http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com\\_content&task=view&id=472&Itemid=76](http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=472&Itemid=76)>. Acesso em 10 dez. 2015.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**, ASM Press: Washington, 2003.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

WISHART, D.F.; YOUNG, I.M. Artificial insemination of progestin (sc 21009) treated cattle at predetermined times. **The Veterinary Records**, v.95, n.22, p.503-508, 1974.  
YANIZ, J.L.; LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; MULLINS. K.J. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. **The Anatomical Record**, v.260, n.3, p.268-278, 2000.

ZAMBRINI, F.N.; FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; VIANA, J.H.M.; PALHÃO, M.P.; SANTOS, A.F.A. Indução de estro em cabras com o uso de dispositivos intravaginais reutilizados. In: JORNADA DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIPAR, 9., 2004. **Anais...** Umuarama, PR, Brasil, 2004.

ZULUAGA, J.F.; WILLIAMS, G.L. High-pressure steam sterilization of previously used CIDR inserts enhances the magnitude of the acute increase in circulating progesterone after insertion in cows. **Animal Reproduction Science**, n.107, p.30-35, 2008.

## **CAPÍTULO 2 - ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS DE AMOSTRAS DE CONTEÚDO VULVOVAGINAL DE VACAS TRATADAS COM DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS DE PROGESTERONA**

**RESUMO** - Objetivou-se, com esse estudo, avaliar a ocorrência de microrganismos presentes na região vulvovaginal de vacas que receberam dispositivos intravaginais de progesterona durante os programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), e correlacionar os resultados com as taxas de prenhez. As amostras foram coletadas da região vulvovaginal de 30 vacas de corte Guzerá e 30 vacas leiteiras mestiças, e também dos dispositivos intravaginais, aleatoriamente. Das 120 amostras coletadas das vacas, 60 corresponderam ao período anterior à introdução do dispositivo (D0) e 60 ao posterior à retirada do mesmo (D9); obteve-se 100% de crescimento bacteriano, sendo que, na maioria das amostras, encontrou-se mais de um isolado. No D0, o agente de maior frequência foi a *Escherichia coli* (52%), e no D9, *Proteus* spp. e *E.coli* foram os mais encontrados (32% e 28%, respectivamente). Em relação aos dispositivos intravaginais de progesterona, no D0 foram isolados 37 microrganismos, sendo predominantes os do gênero *Bacillus* (35%); já no D9 foram isoladas 41 unidades formadoras de colônias (UFC), sendo que 36,6% corresponderam ao *Proteus* spp. Para a análise do perfil antimicrobiano, realizou-se antibiograma por difusão do disco em ágar, e foram selecionadas as vacas que não emprenharam após a IATF, a título de tratamento futuro. Houve resistência de 100% à penicilina, e sensibilidade de, aproximadamente, 90% à gentamicina, tanto para os isolados obtidos das amostras das vacas de corte quanto para os obtidos das vacas de leite. Em relação à taxa de prenhez, das 30 vacas de corte, 11 (36,7%) foram diagnosticadas prenhes, sendo 4 (36,4%) tratadas com dispositivos intravaginais reutilizados e 7 (63,6%) com dispositivos novos, que se mostraram mais eficazes. Das 30 vacas de leite, 15 (50%) emprenharam, sendo que 8 (53,3%) foram implantadas com dispositivos reutilizados e 7 (46,7%) com dispositivos novos, não havendo diferenças significativas entre as taxas de prenhez. Por se tratar de uma pesquisa, as fêmeas foram escolhidas ao acaso, e fatores como escore corporal, manejo nutricional e sanitário não foram prioridade.

**Palavras-chave:** Bactéria, fêmea, bovinos, reprodução, dispositivos, IATF

## CHAPTER 2 - BACTERIOLOGICAL ANALYSIS OF SAMPLES OF THE VULVOVAGINAL CONTENT OF COWS TREATED WITH INTRAVAGINAL PROGESTERONE DEVICES

**ABSTRACT** - With this study, aimed to evaluate the occurrence of microorganisms present in the vulvovaginal region of cows that received intravaginal progesterone devices during the fixed-time artificial insemination (FTAI) programs, and correlate the results with pregnancy rates. Samples were collected from vulvovaginal region of 30 beef cows Guzerá and 30 crossbred dairy cows, and also intravaginal devices, randomly. Of the 120 samples of cows, 60 corresponded to the collections of the period prior to the introduction device (D0) and 60 to the subsequent withdrawal of it (D9); it yielded 100% of bacterial growth, whereas, in most samples, it was found more than one isolated. In D0, the most frequent agent was *Escherichia coli* (52%), and in D9, *Proteus* spp. and *E. coli* were the most frequent (32% and 28%, respectively). Regarding intravaginal progesterone devices, in D0 were isolated 37 microorganisms, being predominant those of the genus *Bacillus* (35%); in D9, 41 colony forming units (CFU) were isolated, of which 36.6% corresponded to *Proteus* spp. For the analysis of the antimicrobial profile, susceptibility testing was performed by diffusion agar disk, and cows that did not became pregnant after FTAI program were selected, as a future treatment. There resistance 100% to penicillin, and sensitivity, approximately, 90% to gentamicin, both isolates obtained from samples of beef cows and obtained of dairy cows. Regarding pregnancy rate, the 30 beef cows, 11 (36.7%) were diagnosed pregnant, 4 (36.4%) treated with reused devices and 7 (63.6%) with new devices, which showed more effective. Of the 30 dairy cows, 15 were pregnant (50%), 8 (53.3%) were implanted with reused devices and 7 (46.7%) with new devices, with no significant differences in pregnancy rates. Because it is a research, females were chosen at random, and factors such as body condition, nutritional management and health weren't priority.

**Keywords:** Bacteria, female, cattle, breeding, devices, FTAI

## 2.1 Introdução

A pecuária brasileira é de importância fundamental para o desenvolvimento da economia do país e, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), o Brasil possui mais de 212 milhões de bovinos, sendo considerado o maior rebanho comercial do mundo, o que lhe confere a posição de segundo maior produtor e primeiro exportador mundial dessa carne (CONAB, 2015).

Isso mostra que o rebanho bovino brasileiro está em constante evolução e tem apresentado melhoria contínua dos seus índices zootécnicos, tornando-se cada dia mais produtivo e eficiente, permitindo que a pecuária brasileira seja cada vez mais sustentável, uma referência no mundo inteiro (ABIEC, 2015).

Diante dessas informações, faz-se cada vez mais necessário investir em pesquisas que aperfeiçoem as biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Cuidados devem ser tomados quando se utilizam protocolos hormonais como ferramenta para aumentar os índices reprodutivos (BARTOLOMEU et al., 2003; GONÇALVES et al., 2004), pois estudos enfatizaram que há a possibilidade de transmissão de doenças quando dispositivos intravaginais de progesterona são reutilizados em vacas, prática comumente adotada nos programas de IATF, com o intuito de reduzir custos (HERNÁNDEZ et al., 2008).

Muitos microrganismos, considerados não patogênicos, têm a capacidade de produzir infecção e doença, o que não depende somente dos fatores de virulência e carga microbiana, mas também dos mecanismos de defesa do hospedeiro, possibilitando um constante aumento na incidência de infecções (FINEGOLD; WEXLER, 1988; PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

Diversos autores relataram que *E. coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenica* e espécies de *Proteus* são patógenos uterinos conhecidos, e que estão associados com maior inflamação do endométrio e sinais mais graves de doença clínica no útero (BONNETT et al., 1991; SHELDON et al., 2002; WILLIAMS et al., 2005).

Fatores como mudanças bruscas de temperatura, nutrição deficiente, final de gestação e parto, geralmente, causam estresse aos animais e comprometem seu

sistema imunológico; com isso, microrganismos considerados habituais da vagina podem tornar-se patogênicos (KUNTZE; AURICH, 1995).

*Escherichia coli*, quando relacionada com as interações entre animais e seres humanos, pode ser dividida em dois grupos: bactérias comensais que habitam o intestino grosso de homeotérmicos e que podem causar infecções em indivíduos imunocomprometidos ou de maneira iatrogênica; e as patogênicas, que podem desencadear diversos tipos de infecções e ocasionar graves perdas econômicas, principalmente quando se trata de animais de produção (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; VERONESI, 2005).

Devido à presença de agentes com potencial infeccioso oportunista no trato genital e as dificuldades encontradas quanto à utilização correta de antimicrobianos, é de fundamental importância o conhecimento da microbiota estudada, bem como a determinação de sua susceptibilidade às drogas antimicrobianas, a fim de que a terapia mais adequada seja estabelecida.

Assim, objetivou-se, com esse estudo, avaliar a ocorrência de microrganismos presentes na região vulvovaginal de vacas submetidas a tratamento com dispositivos intravaginais de progesterona, durante os programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), e correlacionar os resultados com as taxas de prenhez.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Desenho do estudo**

Para o estudo, foram utilizadas 60 fêmeas bovinas em idade reprodutiva, selecionadas de forma aleatória, aparentemente sadias e participantes dos programas de inseminação artificial realizados na Fazenda Conquista, localizada no município de Presidente Alves, SP. Todas as vacas foram submetidas a tratamentos hormonais com protocolos de IATF (ANEXOS A e B). Também foram feitas análises bacteriológicas de dispositivos intravaginais impregnados com 1,0 grama de progesterona (Sincrogest® - Ouro Fino), escolhidos ao acaso.

O material foi coletado do conteúdo vulvovaginal de 30 vacas de corte da raça Guzerá e 30 vacas leiteiras mestiças, e do conteúdo presente nos dispositivos de progesterona. No total, foram 120 amostras das fêmeas bovinas, sendo 60

coletadas antes do tratamento hormonal e 60 após a retirada dos dispositivos; desses, coletaram-se 30 amostras, sendo 15 de dispositivos novos e 15 de dispositivos reutilizados.

Após a coleta, o material foi submetido ao cultivo bacteriano e, a partir do isolamento das cepas, foram identificados os microrganismos. As cepas isoladas das vacas que confirmaram ausência de prenhez, após o tratamento com os protocolos hormonais, foram avaliadas quanto à sensibilidade aos antimicrobianos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) - UFU, sob o número 129/14 (ANEXO C).

### **2.2.2 Coleta das amostras**

As coletas foram realizadas entre os meses de outubro de 2014 a maio de 2015, durante os programas de IATF, conforme a rotina da fazenda, que realiza tal atividade mensalmente, alternando os rebanhos de corte e leite.

Higienizou-se a região vulvar com papel toalha, e um auxiliar manteve abertos os lábios vulvares da fêmea para a realização das coletas; com o auxílio de *swab* estéril, posteriormente mantido em meio de transporte Stuart, foram feitos movimentos de rotação, visando obter maior quantidade possível de material para análise (Figura 1). O conteúdo dos dispositivos intravaginais de progesterona foi coletado da mesma forma, no intuito de pesquisar os microrganismos neles presentes.

Após, as amostras foram armazenadas sob refrigeração, por um período máximo de 24 horas, até serem encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde foram processadas.

Todos os dispositivos que foram reutilizados passaram, anteriormente, por um processo manual de lavagem com água corrente fria para remoção de muco e outras estruturas. Em seguida, para a desinfecção, foram imersos em solução de cloreto de amônio (CB-30 TA® - Ouro Fino) diluído na proporção 1:2000 (10 ml do produto em 20 litros de água). Após, foram colocados para secar à sombra, embalados em saco plástico e armazenados sob refrigeração, para conservar a integridade do produto, até sua reutilização.

**Figura 1:** Coleta de amostra de conteúdo vulvovaginal de vaca, com auxílio de swab estéril, para análise microbiológica.



Fonte: Arquivo pessoal (2015)

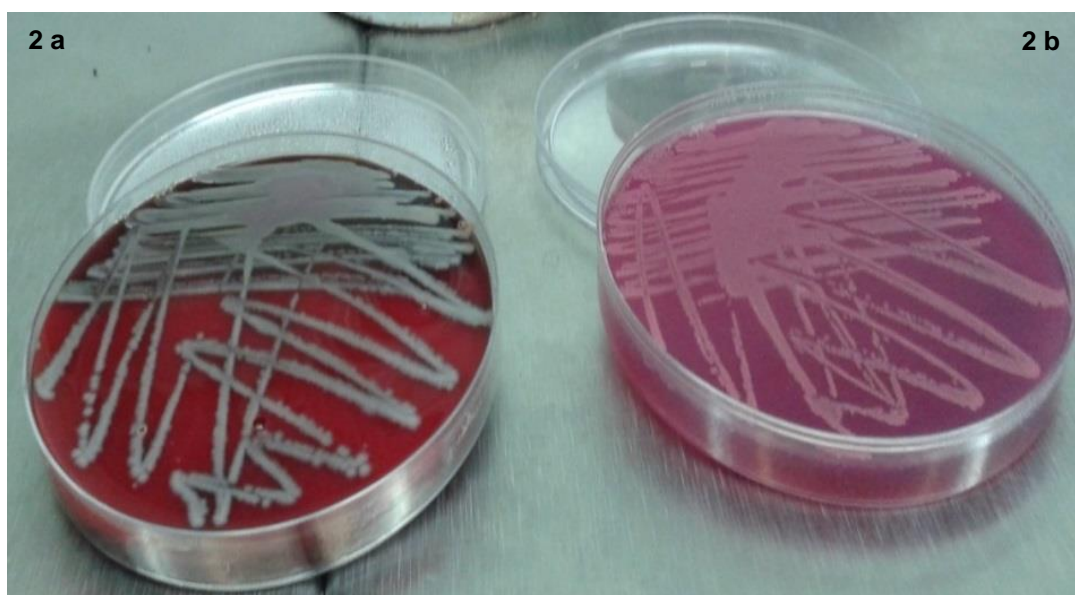
### 2.2.3 Análises microbiológicas

Para o isolamento e identificação dos microrganismos, realizou-se cultura convencional.

Assim que chegaram ao laboratório, as amostras foram armazenadas em caldo contendo BHI (*Brain Heart Infusion*, Himedia®), e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas (OPLUSTIL et al., 2004). Após esse período, pela técnica de esgotamento em placa, semeou-se uma alçada da amostra em Placas de Petri contendo ágar-sangue (Kasvi®) e outra alçada em placa de ágar MacConkey (Himedia®), incubando-as novamente em estufa, conforme descrito acima. Passadas 24 horas, cada placa foi analisada individualmente, podendo-se observar o crescimento de uma ou mais colônias (Figura 2). Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar.



**Figura 2:** Crescimento bacteriano de amostras de conteúdo vulvovaginal de vacas. 2a - Formação de colônia em ágar-sangue. 2b - Formação de colônia em ágar MacConkey.



Fonte: Arquivo pessoal (2015)

Assim, para identificação de bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas, as colônias foram submetidas à análise morfológica por Coloração de Gram (OPLUSTIL et al., 2004), com o kit da Newprov®, contendo soluções de corante Violeta Genciana, Fucsina, fixador Lugol e descorante à base de álcool-acetona, sendo o procedimento efetuado de acordo com as recomendações do fabricante.

A fim de identificar os microrganismos que não foram isolados e identificados, dilui-se a colônia em solução salina 0,85% e, pela técnica de esgotamento, semeou-a em placas contendo ágar específicos, como manitol salgado, CLED, XLD, que foram incubadas em estufa a 37°C/24h.

Para a identificação de cocos Gram-positivos, realizou-se o teste da Catalase a partir do ágar-sangue, segundo Oplustil et al. (2004). Em relação às bactérias Gram-negativas, a identificação foi realizada a partir do ágar MacConkey, e cada colônia foi testada com o Kit comercial de Meio de Rugai com Lisina da Newprov® (Tabela 1), analisado conforme as recomendações do fabricante.

Para a conservação dos isolados, após sua identificação, as amostras com crescimento bacteriano foram semeadas em microtubos estéreis de polipropileno, contendo caldo BHI (Himedia®) enriquecido com glicerol a 20% e mantidas em



ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  (MACHADO et al., 2010), para futuros estudos. A manipulação foi realizada com muito cuidado para evitar o risco de contaminação.

**Tabela 1:** Meios de cultura\* e provas bioquímicas usadas para identificação das espécies de enterobactérias lactose positiva.

Meio de Cultura *	Provas Bioquímicas	Reação Positiva	Reação negativa
<b>Rugai</b>	Desaminação do L-triptofano	Cor verde garrafa no ápice do tubo	Cor marrom no ápice do tubo
	Fermentação da sacarose	Cor amarela no ápice do tubo	Mantém-se a cor original do meio (verde azulada) no ápice do tubo
	Fermentação da glicose	Cor amarela na base do tubo	Mantém-se a cor original do meio na base do tubo
	Produção de gás	Formação de bolhas e/ou arrebentamento do meio	Mantém-se íntegro
	Hidrólise da ureia	Cor azul intensa na base do tubo	Mantém-se a cor original do meio (verde azulada) na base do tubo
	Produção de gás sulfídrico	Cor negra na base do tubo	Mantém-se a cor original do meio (verde azulada) na base do tubo
	Descarboxilação da Lisina	Qualquer cor diferente do amarelo	Cor amarela intensa no fundo do tubo
	Motilidade	Turvação do meio, qualquer crescimento além da picada	Crescimento apenas na picada
	Produção do Indol	Anel vermelho (Reativo de Kovacs)	Não se desenvolve coloração no reagente

\* Kit para identificação de enterobactérias (Newprov®)

### 2.2.4 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Após a identificação de todos os microrganismos, procedeu-se a realização dos testes de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, segundo o método de difusão do disco em ágar, de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), apenas para as amostras das vacas do programa de IATF que não emprenharam.

Para esse teste, as colônias foram diluídas em um tubo contendo 5 ml de solução salina estéril contendo cloreto de sódio (NaCl a 0,85%), até obter turbidez compatível à densidade 0,5 da escala padrão de McFarland. Em seguida, a suspensão foi inoculada, com auxílio de *swab* estéril, em placas de Mueller Hinton (Himedia®), que permaneceram entreabertas por aproximadamente 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente, até a absorção completa do inóculo pelo ágar antes da aplicação dos discos.

Foram testados os seguintes antibióticos: sulfazotrim (SUT 25 µg), gentamicina (GEN 10 µg), penicilina (PEN 10 U), tetraciclina (TET 30 µg), doxiciclina (DOX 30 µg), enrofloxacin (ENO 5 µg), azitromicina (AZI 15 µg), eritromicina (ERI 15 µg), todos da Laborclin®. Os discos foram distribuídos, simetricamente, nas placas, e essas foram incubadas em aerobiose a 37°C.

Os procedimentos acima descritos foram realizados em capela de fluxo laminar, ambiente totalmente estéril.

A leitura das placas foi feita após 24 horas, medindo-se o diâmetro (em milímetros) de cada halo de inibição formado em torno dos discos. Os resultados obtidos foram interpretados conforme especificação do protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013) sendo os microrganismos classificados como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano testado.

### 2.2.5 Análise dos resultados

Para o cálculo amostral, utilizou-se o Intervalo de Confiança da Prevalência, segundo a fórmula:  $\Delta = 1,96 \times \frac{\sqrt{p(1-p)}}{\sqrt{n}}$ , com  $\Delta = 5\%$  e  $p = 10\%$ .

Os resultados foram tabulados e submetidos à estatística descritiva. A frequência dos isolados encontrados e a análise do perfil antimicrobiano foram calculadas por porcentagem simples.

## **2.3 Resultados e Discussão**

### **2.3.1 Frequência de microrganismos na região vulvovaginal de vacas**

Das 60 vacas, foram coletadas 120 amostras (antes da introdução e depois da retirada dos dispositivos) e, após a análise, obteve-se 100% (120/120) de crescimento bacteriano, sendo que, na maioria das amostras, encontrou-se mais de um isolado. Foram obtidos 202 isolados no total das culturas bacteriológicas.

Desses, 102 foram provenientes de amostras coletadas da região vulvovaginal das vacas antes que essas fossem implantadas, e 100 resultaram da análise das amostras coletadas após a retirada dos dispositivos intravaginais de progesterona. No dia 0 (D0), antes da colocação dos dispositivos, o agente de maior frequência nas culturas foi a *Escherichia coli* (52%), e no dia 9 (D9), após sua retirada, *Proteus* spp e *E.coli* foram os isolados mais encontrados (32% e 28%, respectivamente). Em ambas as situações, outros microrganismos também foram isolados, porém em menor frequência (Tabela 2).

Na literatura consultada, são escassas as citações a respeito de bactérias encontradas em conteúdo vulvovaginal de vacas e em dispositivos intravaginais de progesterona.

Oliveira, em 1995, relatou que *Escherichia coli* está entre os microrganismos considerados habitantes da vulva; Kuntze e Aurich, no mesmo ano, afirmaram que as enterobactérias que predominam na vagina e vulva são oriundas do trato gastrointestinal e podem causar processos infecciosos; tais informações contribuem para os resultados encontrados neste trabalho.

Em contrapartida, Miller et al. (1983) e Ahmed, Sabry, Zaki (1998) consideram *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* os patógenos de maior importância para o trato genital, entretanto, no Brasil, a pesquisa dessas espécies em bovinos é pouco frequente, e nesse estudo não foi observada a ocorrência de nenhuma delas, sendo necessários meios de cultura específicos.

**Tabela 2:** Distribuição dos microrganismos isolados de conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite antes da introdução dos dispositivos intravaginais de progesterona e após sua retirada.

Microrganismos	Antes da introdução dos dispositivos (Dia 0)	Após a retirada dos dispositivos (Dia 9)
	N (%)	N (%)
<i>Escherichia coli</i>	53 (52,0)	28 (28,0)
<i>Staphylococcus</i> spp	21 (20,6)	19 (19,0)
<i>Bacillus</i> spp	11 (10,8)	13 (13,0)
<i>Citrobacter</i> sp	08 (7,8)	06 (6,0)
<i>Streptococcus</i> spp	04 (3,9)	02 (2,0)
<i>Proteus</i> spp	03 (2,94)	32 (32,0)
Bacilos corineiformes	02 (1,96)	00 (00)
Total	102 (100,0)	100 (100,0)

Ao que se refere às coletas de conteúdo vulvovaginal antes da inserção dos dispositivos intravaginais de P4, quando as vacas não tiveram nenhum contato prévio com os mesmos, notou-se alta frequência de *E. coli* (52%).

Assim, sabendo-se que é uma bactéria habitual do trato gastrointestinal dos animais, que quando eliminada nas fezes pode contaminar o ambiente e se disseminar, e que há a possibilidade de infecções oportunistas quando localizada extra intestinalmente, como no trato urinário (QUINN et al., 1994), pode-se supor que a *E.coli* teve sua origem na própria microbiota das vacas ou devido ao contato da vulva com urina e fezes do animal.

Os resultados obtidos nesse trabalho foram diferentes dos achados por Manes et al. (2010), que encontraram 90% de bactérias Gram-positivas, entre elas *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp, antes de inserir os dispositivos intravaginais de progesterona em ovelhas.

Fischer-Tenhagen, von Krueger e Heuwieser (2012), ao analisarem novilhas holandesas que receberam dispositivos intravaginais de P4, encontraram coliformes e *Streptococcus* spp. em 64% das amostras de swabs vaginais.

Cesca e Bragança (2015) relataram que agentes do gênero *Bacillus* sp. predominaram nas amostras do conteúdo vaginal de ovelhas coletadas no momento prévio à colocação dos dispositivos novos, com 93,3% de positividade, enquanto

que, antes de inserir os dispositivos reutilizados, *Staphylococcus* sp. foi o gênero mais encontrado (80%).

Os resultados desse estudo foram diferentes dos obtidos por Vasconcelos et al. (2016), que, ao pesquisarem bactérias em ovelhas, encontraram *Staphylococcus* spp em 68,2% das amostras vaginais no período anterior à inserção dos dispositivos intravaginais de P4.

Em relação aos resultados das coletas realizadas após a retirada dos dispositivos, houve contato de vulva e vagina com os mesmos, podendo *E.coli* e *Proteus* spp. serem naturais da microbiota ou os dispositivos estarem previamente contaminados, sendo carreadores de patógenos para o interior dos órgãos. Segundo Lázaro et al. (1999), as espécies do gênero *Proteus* estão muito difundidas no ambiente e envolvidas em infecções oportunistas extra intestinais.

Em um estudo com ovelhas, após a retirada de dispositivos intravaginais contendo progesterona e derivados, Manes et al. (2010) encontraram 79% de bactérias Gram-negativas, sendo *E.coli* a mais frequente.

*Arcanobacterium pyogenes*, coliformes e *Streptococcus* spp. foram os agentes mais isolados a partir dos swabs vaginais de novilhas (96%), após a retirada dos dispositivos intravaginais de progesterona (FISCHER-TENHAGEN; VON KRUEGER ; HEUWIESER, 2012).

No momento da retirada dos dispositivos novos, Cesca e Bragança (2015) verificaram agentes Gram-negativos em 100% das amostras, sendo a maioria pertencente ao gênero das Enterobactérias; já na retirada dos dispositivos reutilizados, Gram-negativos e positivos equilibraram.

Vasconcelos et al. (2016) relataram sinais clínicos de vaginite em todas as ovelhas após a remoção do dispositivo, sendo que os isolados predominantes pertenciam ao grupo dos coliformes, principalmente *Escherichia coli* (72,7%), valor muito superior quando comparado ao encontrado nesse estudo.

Peltier et al. (2012), em uma pesquisa feita com mulheres, consideraram que diversas bactérias são responsáveis por causarem infecções em membranas fetais, dentre elas a *E.coli*, destacando-se a presença de lipopolissacarídeos (LPS) em sua membrana, que são responsáveis pela indução da resposta inflamatória.

Esses resultados são importantes para os achados da pesquisa em fêmeas bovinas, já que *E.coli* foi encontrada em grande quantidade, alertando-se para a

possibilidade de ser uma das causas de problemas reprodutivos, podendo induzir infecções que refletirão em prejuízos para as taxas de prenhez.

Tal microrganismo tem sido relatado como um agente oportunista de vaginite bacteriana em ruminantes (MARTINS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013; PADULA; MACMILLAN, 2006; SARGISON et al., 2007; SHELDON et al., 2008).

Vale citar a pesquisa de Krohn et al. (1997) que relataram a colonização por *E. coli* em mulheres, fortemente associada ao parto prematuro, indicando a necessidade de tratar grávidas que têm tal microrganismo no trato genital.

Uma alternativa interessante seria a antibioticoterapia para as vacas diagnosticadas com *E.coli*, com exceção das que estiverem em lactação (para evitar prejuízos com o descarte de leite), no intuito de prevenir infecções bacterianas e evitar possíveis problemas reprodutivos.

De acordo com o programa de IATF adotado pela propriedade desse estudo, quando as vacas são diagnosticadas vazias após a IA, elas retornam ao programa 30 dias depois, mediante avaliação ginecológica; quando estão prenhes, 60 dias pós-parto, em média, já podem participar do programa novamente.

Diante disso, é importante atentar-se para os patógenos que podem aparecer, visto que *E. coli* é considerado o principal contaminante nos primeiros dias pós-parto (WILLIAMS et al., 2007), podendo permanecer por um tempo, e ela foi a bactéria encontrada em alta frequência, antes mesmo de iniciar um novo protocolo hormonal.

### **2.3.2 Frequência de microrganismos em dispositivos intravaginais de progesterona**

Dos 30 dispositivos analisados, 15 eram reutilizados e 15 eram novos, sendo que 07 eram de vacas de corte e 08 de vacas leiteiras, para ambas as situações (reutilizados e novos). Obteve-se crescimento bacteriano em 27/30 (90%).

Considerando o período anterior à introdução e o posterior à retirada dos dispositivos, foram obtidos 37 e 41 isolados, respectivamente. *Bacillus* spp (35%) foi o gênero mais encontrado antes da introdução dos dispositivos nas vacas, e *Proteus* spp (36,6%) foi o de maior ocorrência após a retirada dos mesmos (Tabela 3), assim como observado nas coletas do conteúdo vulvovaginal.

**Tabela 3:** Distribuição dos microrganismos isolados de dispositivos intravaginais novos e reutilizados nos períodos anterior à sua introdução e posterior à sua retirada.

Microrganismos	Antes da introdução dos dispositivos (Dia 0)	Após a retirada dos dispositivos (Dia 9)
	N (%)	N (%)
<i>Bacillus</i> spp	13 (35,0)	05 (12,2)
<i>Staphylococcus</i> spp	11 (29,7)	06 (14,6)
<i>Escherichia coli</i>	05 (13,5)	08 (19,5)
<i>Proteus</i> spp	02 (5,5)	15 (36,6)
<i>Enterobacter</i> sp	02 (5,5)	00 (00,0)
<i>Streptococcus</i> spp	01 (2,7)	01 (2,5)
<i>Citrobacter</i> sp	01 (2,7)	06 (14,6)
<i>Klebsiella</i> sp	01 (2,7)	00 (00,0)
<i>Salmonella</i> sp	01 (2,7)	00 (00,0)
Total	37 (100,0)	41 (100,0)

Baseando-se nos resultados obtidos das coletas dos dispositivos de progesterona reutilizados, antes de serem implantados nas vacas, foram isoladas 21 bactérias, sendo *Bacillus* spp (33,3%), *Staphylococcus* spp (28,5%) e *E.coli* (23,8%) as de maiores frequências, e após nove dias, quando retirados, 15 isolados foram encontrados, sendo *Proteus* spp (66,67%) o de maior ocorrência (Tabela 4).

Assim, a presença dessas bactérias pode ser explicada pelo descrito por Sheldon et al. (2008) e Petit et al. (2009), que consideram *Staphylococcus* spp e *Bacillus* spp como possíveis isolados de fêmeas saudáveis; muitos são os microrganismos oportunistas presentes no ambiente e entre eles está a *Escherichia coli* (PINTO, 2009).

A ocorrência de *Proteus* pode ser justificada por sua presença no conteúdo vulvovaginal das vacas nesse mesmo momento (pós-retirada dos dispositivos), já descrito anteriormente. É considerado habitante normal do intestino do homem e dos animais, mas também é encontrado no ambiente e alimentos (LÁZARO et al., 1999).

**Tabela 4:** Distribuição dos microrganismos isolados de dispositivos intravaginais reutilizados nos períodos anterior à sua introdução e posterior à sua retirada.

Microrganismos	Antes da introdução dos dispositivos (Dia 0)	Após a retirada dos dispositivos (Dia 9)
	N (%)	N (%)
<i>Bacillus</i> spp	07 (33,3)	00 (00,0)
<i>Staphylococcus</i> spp	06 (28,5)	01 (6,65)
<i>Escherichia coli</i>	05 (23,8)	01 (6,65)
<i>Enterobacter</i> sp	01 (4,8)	00 (00,0)
<i>Citrobacter</i> sp	01 (4,8)	03 (20,0)
<i>Salmonella</i> sp	01 (4,8)	00 (00,0)
<i>Proteus</i> spp	00 (00,0)	10 (66,7)
Total	21 (100,0)	15 (100,0)

Dos dispositivos novos, foram isolados 16 microrganismos antes do início do tratamento hormonal, sendo *Bacillus* spp (37,5%) e *Staphylococcus* spp (31,25%) os de maiores frequências. Após a retirada dos dispositivos novos, 26 bactérias foram encontradas, sendo *E.coli* (27%) a de maior ocorrência (Tabela 5).

A contaminação de bactérias do gênero *Bacillus* sp pode advir do contato direto ou indireto com solo e poeiras (MAIESKI, 2011), além da água, podendo permanecer viável durante longos períodos no ambiente e nos alimentos, devido a sua capacidade para formar esporos resistentes a condições severas (BHUNIA, 2007; RAJKOWSKI; BENNETT, 2003).

Raddi, Leite e Mendonça (1998) observaram maior frequência de bactérias do gênero *Staphylococcus* nas mãos de pessoas (41,7%), fato explicado por Lowburg (1982), Woodroffe e Shaw (1978), que associaram a proliferação de bactérias ao fator umidade, sendo que tais microrganismos podem se estabelecer como residentes da microbiota das mãos de pessoas, especialmente as que têm contato persistente com água. O encontrado no estudo é justificado por tais relatos, uma vez que uma higienização inadequada das mãos e luvas pode ter contaminado os dispositivos antes que eles fossem colocados nas vacas.



**Tabela 5:** Distribuição dos microrganismos isolados de dispositivos intravaginais novos nos períodos anterior à sua introdução e posterior à sua retirada.

Microrganismos	Antes da introdução dos dispositivos (Dia 0)	Após a retirada dos dispositivos (Dia 9)
	N (%)	N (%)
<i>Bacillus</i> spp	06 (37,5)	05 (19,2)
<i>Staphylococcus</i> spp	05 (31,25)	05 (19,2)
<i>Escherichia coli</i>	00 (00,0)	07 (27,0)
<i>Proteus</i> spp	02 (12,5)	05 (19,2)
<i>Enterobacter</i> sp	01 (6,25)	00 (00,0)
<i>Citrobacter</i> sp	01 (6,25)	03 (11,6)
<i>Salmonella</i> sp	01 (6,25)	00 (00,0)
<i>Streptococcus</i> spp	00 (00,0)	01 (3,8)
Total	16 (100,0)	26 (100,0)

Como não houve nenhum contato prévio dos dispositivos novos com as vacas, os resultados sugerem que essas bactérias tiveram origem no ambiente ou pela manipulação, causando a contaminação dos dispositivos, uma vez que foi feita análise dos mesmos em ambiente estéril e eles se apresentaram livres de microrganismos.

Em um experimento realizado por Rocha et al. (2004), de um total de 60 amostras cérvico-vaginais analisadas, 27,72% foram *Escherichia coli*, resultados semelhantes aos encontrados nas culturas dos dispositivos após sua retirada, o que pode ser associado ao contato dos dispositivos com vulva e vagina, sendo *E.coli* natural da microbiota vulvovaginal.

### 2.3.3 Perfil antimicrobiano

Para a análise do perfil antimicrobiano, foram realizados 55 testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), a partir dos isolados do conteúdo vulvovaginal das vacas que não emprenharam após o programa de IATF, a título de tratamento futuro.

Os resultados mostraram resistência de 100% à penicilina e sensibilidade de, aproximadamente, 90% à gentamicina, tanto para os isolados obtidos das amostras das vacas de corte quanto para os obtidos das amostras das vacas de leite (Tabela 6).

**Tabela 6:** Perfil antimicrobiano de microrganismos isolados do conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite da Fazenda Conquista, Presidente Alves, SP.

Antimicrobiano	Sensível N (%)	Intermediário N (%)	Resistente N (%)
Gentamicina (10 µg)	49 (89,1)	05 (9,1)	01 (1,8)
Doxiciclina (30 µg)	26 (47,3)	07 (12,7)	22 (40,0)
Enrofloxacina (5 µg)	18 (37,2)	25 (45,5)	12 (21,8)
Sulfazotrim (25 µg)	12 (21,8)	01 (1,8)	42 (76,4)
Azitromicina (15 µg)	04 (7,3)	15 (27,3)	36 (65,5)
Tetraciclina (30 µg)	04 (7,3)	03 (5,5)	48 (87,3)
Eritromicina (15 µg)	00 (00,0)	01 (1,8)	54 (98,2)
Penicilina (10 U)	00 (00,0)	00 (00,0)	55 (100,0)

N: número de isolados; %: porcentagem referente ao total em cada item.

Após a aplicação do protocolo hormonal, as bactérias mais frequentes nas vacas que não emprenharam foram *Proteus* e *E.coli*, com percentuais de 32,7% e 27,3%, respectivamente. Ambas apresentaram maior sensibilidade à gentamicina, 100% e 73,3%, nessa ordem (Tabela 7), e 100% de resistência à penicilina.

Oluoch et al. (2001), ao analisarem 674 cepas de *E. coli* isoladas de diversas infecções em cães, incluindo o trato geniturinário, observaram que 90,7% dos isolados apresentaram sensibilidade à gentamicina; os resultados encontrados neste estudo (73,3%) foram inferiores ao descrito por esses autores.

Diferentemente, em um estudo recente feito com ovelhas, *Escherichia coli* apresentou maior sensibilidade à sulfametazina, enrofloxacina e doxiciclina (92,9%), e o gênero *Staphylococcus* apresentou melhor sensibilidade à doxiciclina e enrofloxacina com percentuais de 93,8% e 90,6%, respectivamente (SILVA et. al, 2011), o que não foi corroborado por este atual estudo, sendo que esse mesmo gênero apresentou maior sensibilidade à gentamicina (80%) e, para doxiciclina e enrofloxacina, os valores foram 50% e 40%, respectivamente.

**Tabela 7:** Perfil de sensibilidade das cepas isoladas de conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite da Fazenda Conquista, Presidente Alves, SP, que não emprenharam após a retirada dos dispositivos intravaginais de progesterona.

Isolados	(N)	GEN	DOX	ENO	SUT	AZI	TET	ERI	PEN
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>Proteus</i> spp	18	100,0	16,7	55,6	11,1	5,5	0,0	0,0	0,0
<i>E.coli</i>	15	73,3	66,7	40,0	26,7	6,7	13,3	0,0	0,0
<i>Staphylococcus</i> spp	10	80,0	50,0	40,0	40,0	0,0	10,0	0,0	0,0
<i>Bacillus</i> spp	6	100,0	66,7	50,0	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0
<i>Citrobacter</i> sp	4	100,0	25,0	50,0	25,0	0,0	25,0	0,0	0,0
<i>Streptococcus</i> spp	2	100,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0

N: número de isolados; %: porcentagem de isolados sensíveis

O presente estudo parece ser o primeiro relato no qual *Proteus* foi o gênero de maior frequência isolado de conteúdo vulvovaginal de vacas que não emprenharam após a retirada dos dispositivos de progesterona, tendo apresentado 100% de sensibilidade à gentamicina.

Andrade et al. (2005) também encontraram maiores percentuais de sensibilidade à gentamicina para tratamentos de problemas reprodutivos em rebanhos de bovinos.

O percentual de amostras resistentes à penicilina, provavelmente, tem relação com uso indiscriminado e inadequado de antibióticos, que geralmente acontece sem a determinação da susceptibilidade dos microrganismos frente às drogas (CARDOSO; COSTA; SILVA, 2000; SILVA, BRAGA; COSTA, 1999).

A baixa sensibilidade dos microrganismos frente à penicilina já foi demonstrada por outros autores (FREITAS et al., 2005; FTHENAKIS, 1998; MACHADO; CORREA; MARIN, 2008; RIEDNER et al., 1987).

Jacob et al. (2002) avaliaram a susceptibilidade de bactérias isoladas de swab uterino e da fossa clitoriana de éguas e observaram que as bactérias Gram-negativas foram totalmente resistentes à penicilina, sendo os achados deste estudo semelhantes aos descritos por esses autores.

Quando há resistência a três classes de antimicrobianos, pelo menos, as cepas são consideradas multirresistentes, o que é muito preocupante, principalmente quando aparecem em bactérias Gram-negativas (POOLE, 2004).

A tabela 8 demonstra a frequência de resistência antimicrobiana. Pode-se observar que 100% das cepas isoladas apresentaram resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos.

**Tabela 8:** Perfil de resistência das cepas isoladas de conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite da Fazenda Conquista, Presidente Alves, SP, que não engravidaram após a retirada dos dispositivos intravaginais de progesterona.

Isolados	(N)	GEN	DOX	ENO	SUT	AZI	TET	ERI	PEN
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>Proteus</i> spp	18	0,0	77,8	0,0	83,3	89,0	100,0	100,0	100,0
<i>E.coli</i>	15	13,3	26,6	33,3	73,3	40,0	86,7	100,0	100,0
<i>Staphylococcus</i> spp	10	10,0	30,0	30,0	60,0	60,0	90,0	100,0	100,0
<i>Bacillus</i> spp	6	0,0	0,0	16,7	100,0	66,7	100,0	83,3	100,0
<i>Citrobacter</i> sp	4	0,0	50,0	25,0	75,0	75,0	75,0	100,0	100,0
<i>Streptococcus</i> spp	2	0,0	0,0	100,0	50,0	50,0	50,0	100,0	100,0

N: número de isolados; %: porcentagem de isolados resistentes

A resistência simultânea a vários tipos de antibiótico é considerada relativamente rara (FALLON et al., 2003); assim, as infecções tendem a responder cada vez menos à terapêutica, resultando em tratamentos mais longos, com custos mais elevados, e maior risco de morte; dessa forma, seu controle é um desafio para todos os profissionais de saúde (CASTANHEIRA, 2013).

Por mais que ainda seja muito escassa a literatura sobre o potencial zoonótico de bactérias multirresistentes e impactos que podem causar, tanto na Medicina Humana quanto na Veterinária (PORTNER; JOHNSON, 2010; WOODFORD et al., 2014), é preocupante a presença dessa multirresistência encontrada nesta pesquisa, uma vez que pode desencadear dificuldades na terapia.

Vista a dificuldade de acesso a laboratórios de microbiologia veterinária, a escolha dos antimicrobianos geralmente é feita com base na experiência profissional, no apelo comercial ou no custo de determinados produtos, entretanto,

diante dos resultados encontrados e do que já foi relatado em literaturas anteriores, a terapia das diferentes patologias deve fundamentar-se em testes de sensibilidade antimicrobiana (RIBEIRO et al., 2006), ser mais criterioso e cauteloso quanto ao uso de antimicrobianos, a fim de diminuir a resistência aos fármacos e obter mais sucesso nos tratamentos.

Em quadros infecciosos associados a bactérias multirresistentes, a escolha de antibióticos carbapenêmicos é priorizada por serem estes mais eficazes no tratamento, sobretudo para as enterobactérias (LEVINSON; JAWETZ, 1998).

#### 2.3.4 Correlação dos dispositivos reutilizados e novos com as taxas de prenhez

A análise dos resultados mostrou que das 30 vacas de corte, 11 foram diagnosticadas prenhes (36,7%), sendo 4 (36,4%) tratadas com dispositivos reutilizados e 7 (63,6%) com dispositivos novos. Em relação às 30 vacas de leite, 15 apresentaram-se prenhes (50%), sendo que 8 (53,3%) foram implantadas com dispositivos reutilizados e 7 (46,7%) com dispositivos novos (Tabela 9).

**Tabela 9:** Correlação dos dispositivos intravaginais de progesterona reutilizados e novos com as taxas de prenhez de vacas de corte Guzerá e de vacas leiteiras mestiças.

Animais	Total	Prenhes	Taxa de prenhez (%)	Taxa de prenhez (%)
		(%)	Dispositivos reutilizados (N)	Dispositivos novos (N)
Vacas de corte	30	11 (36,7)	36,4 (4)	63,6 (7)
Vacas de leite	30	15 (50,0)	53,3 (8)	46,7 (7)

(N): nº de animais prenhes

As taxas de prenhez resultantes dos programas de IATF adotados pela fazenda estão dentro do aceitável, quando comparadas à média nacional que varia de 25 a 70% (BORGES; FERREIRA; SIQUEIRA, 2008). Em uma pesquisa realizada por Brandão (2012), a taxa de prenhez, quando se utilizou “Shang” (desmame temporário), foi de 55,6%, valor superior ao encontrado para as vacas de corte

desse trabalho (36,7%), cujo protocolo foi semelhante; quando foi utilizado o hormônio eCG, a taxa de gestação foi de 59%, valor próximo ao obtido para as vacas de leite (50%).

Os resultados encontrados nesse estudo, referentes às taxas de prenhez a partir dos dispositivos novos, foram superiores aos descritos por Barufi et al. (2002) e Valentim (2004), que relataram 28,8% e 25,81% de gestação; já para os dispositivos reutilizados, os resultados obtidos para as vacas de corte (36,4%) aproximaram-se dos encontrados por aqueles autores (38,7% e 42,11%, respectivamente), enquanto que para as vacas de leite foram superiores (53,3%).

As taxas de gestação registradas neste trabalho foram bastante inferiores às encontradas por Baruselli et al. (2006) e Peixoto Júnior; Ulian (2007), que reutilizaram dispositivo intravaginal e obtiveram índices de fertilidade de 76% para novilhas e 75% de fertilidade em fêmeas de corte, respectivamente, justificando a reutilização do dispositivo e afirmando que não há diminuição na taxa de prenhez.

Os resultados obtidos, neste estudo, para as vacas de corte com dispositivos reutilizados (36,4%) foram semelhantes aos encontrados por Chesta et al. (2005) que reportaram taxas de prenhez igual a 37,7%, em fêmeas Hereford; já para as vacas de leite, foram superiores (53,3%); quando foram utilizados dispositivos novos, esses autores encontraram taxa de prenhez igual a 53,2%, valor inferior ao encontrado para as vacas de corte (63,6%) e superior ao obtido para as vacas de leite (46,7%) nesta pesquisa.

Vários relatos têm mostrado que, quando os dispositivos são higienizados corretamente, sua reutilização apresenta taxas de gestação semelhantes às aquelas observadas quando se utilizam dispositivos novos, seja em bovinos de leite ou de corte (BARTOLOMEU et al., 2003; RODRIGUES et al., 2009). Nesse estudo, esses relatos corroboram com os resultados obtidos em vacas de leite; em vacas de corte, pode-se observar uma diferença nas taxas de prenhez, sendo maior para os dispositivos novos.

Mesmo com os relatos de diferentes pesquisadores (BARTOLOMEU et al., 2003; COLAZO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009; VALENTIM, 2004) sobre reutilização dos dispositivos intravaginais de progesterona, informando que esta prática não afeta significativamente os índices de prenhez e é economicamente viável, deve-se atentar para o fato de que a reutilização desses dispositivos veicula microrganismos e facilita a transmissão de doenças, como vaginites e outras

infecções do trato reprodutivo, colocando em risco a saúde dos animais (curto e longo prazo), podendo diminuir o tempo de vida produtiva destes.

A temperatura ambiente no Brasil também favorece a manutenção e multiplicação de microrganismos, mesmo colocando os dispositivos sob refrigeração. Tempo, mão de obra e agentes desinfetantes também são gastos na limpeza dos dispositivos que serão utilizados novamente.

Uma alternativa seria o uso de luvas estéreis, uma boa higienização das mãos do manipulador, do aplicador de dispositivos, dos próprios dispositivos, a substituição do desinfetante, além de cuidados no momento de armazenar os dispositivos, a fim de manter o ambiente de armazenamento o mais estéril possível.

Os dispositivos intravaginais de progesterona de uso único têm apresentado resultados satisfatórios, com relação custo-benefício favorável e taxa de prenhez dentro da média nacional. Um estudo utilizando progestágeno monodose em novilhas registrou taxa de prenhez de 43% com a IATF (BONATO et al., 2015).

*E.coli*, apesar de ser uma bactéria que habita a microbiota intestinal dos bovinos, considerada tipicamente não patogênica, é um agente que apresenta fatores de virulência capazes de desenvolver doenças intestinais e extraintestinais, como infecções no trato geniturinário, meningites e septicemias (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Assim, uma hipótese que não pode ser descartada nesse trabalho é a infectividade da *E.coli*, visto que uma infecção bacteriana no trato genital pode ter sido um dos motivos da ausência de prenhez em muitas vacas.

## 2.4 Conclusão

Com o estudo, pode-se observar que não há um perfil padronizado de bactérias no conteúdo vulvovaginal de vacas submetidas a protocolo hormonal reprodutivo, nos dispositivos novos e nos reutilizados. Daí, a importância de se conhecer os microrganismos mais comumente encontrados na microbiota vulvovaginal de vacas, visto que infecções genitais têm grandes reflexos no que tange à reprodução da espécie. Quanto à sensibilidade a antimicrobianos, é importante ressaltar que a gentamicina deve ser o antibiótico de escolha, caso se julgue necessária a terapia em algum caso de utilização de dispositivo intravaginal de progesterona.

**AGRADECIMENTOS**

A NEWPROV® pela doação dos kits comerciais de Meio de Rugai com Lisina, que foram muito importantes para essa pesquisa.



## REFERÊNCIAS

ABIEC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Rebanho Bovino Brasileiro**. Disponível em:

<[http://www.abiec.com.br/3\\_rebanho.asp](http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp)>. Acesso em: 20 dez. 2015.

AHMED, A.; SABRY, M.; ZAKI, K.M. Possible role of Mycoplasmas in some reproductive disorders of cattle and buffaloes in Egypt. **Egyptian Journal of Veterinary Science**, v.32, p.115-122, 1998.

ANDRADE, J.R.A.; SILVA, N.; SILVEIRA, W.; TEIXEIRA, M.C.C. Estudo epidemiológico de problemas reprodutivos em rebanhos bovinos na bacia leiteira de Goiânia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.720-725, 2005.

BARTOLOMEU, C.C.; DEL REI, A.J.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SILVA, J.E. Inseminação artificial em tempo fixo de vacas leiteiras mestiças Holando-Zebu no pós-parto com emprego de CIDR reutilizado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.426-427, 2003.

BARUFI, F.B.; MADUREIRA, E.H.; BARBUIO, J.P.; MIZUTA, K.; BINELLI, M.; ROSSA, L.A.F.; OLIVEIRA, C.A. de ; BARUSELLI, P.S. Sincronização do estro e da ovulação em bovinos de corte com Crestar, CIDR ou CIDR reutilizado, seguidos ou não pela administração de eCG. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 226-229, 2002.

BARUSELLI, P.S.; AYRES, H.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; GIMENES, L.V.; TORRES JR, J.R.S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovino de corte. In: II SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA – Biotecnologia da Reprodução de Bovinos, 2, 2006, Paraná. **Anais...**, Paraná, 2006, p.113-128.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BHUNIA, A. K. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In: BHUNIA, A.K. (Eds.) **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**. West Lafayette, Springer, 2007.

BONATO, D.V.; HORST, E.H.; J HEKER JUNIOR, J.C.; FERREIRA, L.P.M.; POCZYNEK, M.; VRISMAN, D.P.; MARIANO, R.S.G.; UENO, R.K.; SILVA, M.R.H.; TEIXEIRA, P.P.M. Avaliação de novilhas Brangus e Nelore submetidas à IATF com progestágeno monodose. **Revista Investigação**, v.14, n.1, p.14-17, 2015.

BONNETT, B.N.; MARTIN, S.W.; GANNON, V.P.; MILLER, R.B.; ETHERINGTON, W.G. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.55, p.168–173, 1991.

BORGES, L.F.K.; FERREIRA, R.; SIQUEIRA, L.C. Sistema para inseminação artificial sem observação de estro em vacas de corte amamentando. **Revista Ciência Rural**, v.39, n.2, p.496-501, 2008.

BRANDÃO, K.M.A. **Taxa de prenhez em bovinos submetidos à IATF utilizando diferentes protocolos de sincronização de estro**. 2012. 52f. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CARDOSO, H.T.F.; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22, p.199-203, 2000.

CASTANHEIRA, B.A.M.G. **Mecanismos de resistência a antibióticos**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 57 f., 2013.

CESCA, S.C.; BRAGANÇA, J.F.M. **Influência de um dispositivo intravaginal para sincronização/indução de estros e sua reutilização na flora vaginal ovina.** In: XXI Seminário de Iniciação Científica, VIII Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e IV Mostra Científica. Editora UNOESC. 2015. Disponível em: <<http://editora.unoesc.edu.br/index.php/siepe/article/view/8559>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

CHESTA, P.; PINCINATO, D.; PEÑA, D.M.; PERES, L.C.; TRÍBULO, R.; BÓ, G.A. Efecto del tratamiento con DIB® de segundo o terceiro uso em protocolos de resincronización de la ovulación y inseminación artificial a tiempo fijo. In: IV SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL, 6, 2005, Córdoba. **Anais...**, Córdoba, 2005, 1p.

CLSI. Clinical Laboratory and Standard Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Third Informational Supplement M100-S23. Pennsylvania: CLSI; 2013.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; SMALL, J.A.; WILDE, R.E.; WARD, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. **The Canadian Veterinary Journal**, v.48, p.49-56, 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Indicadores da Agropecuária: Quadro de Suprimentos.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1538&t=2>>. Acesso em: 09 dez. 2015.

FALLON, R.; O’SULLIVAN, N.; MAHER, M.; CARROLL, C. Antimicrobial resistance of *cofi* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 277-281, 2003.

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

FINEGOLD, S.M.; WEXLER, H.M. Therapeutic implications of bacteriologic findings in mixed aerobic-anaerobic infections. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.32, n.5, p.611-616, 1988.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FTHENAKIS, G.G. Susceptibility to antibiotics of staphylococcal isolates from cases of ovine or bovine mastitis in Greece. **Small Ruminant Research**, v.28, p.9-13, 1998.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SILVEIRA, R.S.; FERREIRA, R. Anestro pós-parto em vacas de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004, p.105-116.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed, São Paulo, SP: Roca, 2008. 395p.

HERNÁNDEZ, C.W.S.; MENDOZA, J.H.; HIDALGO, C.G.; GODOY, A.V.; ÁVILA, H.R.V.; GARCIA, S.R. Reutilización de un dispositivo liberador de progesterone (CIDR-B) para sincronizar el estro en un programa de transferencia de embriones bovinos. **Técnica Pecuária en México**, v.46, n.2, p.119-135, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2014**. [online] Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2>>. Acesso em: 04 dez. 2015.

JACOB, J.C.F.; JESUS, V.L.T.; BARBOSA, H.P.; ZIMMERMAN, M.F.; SILVA, A.G.; MELO, C.M. Susceptibilidade antimicrobiana de swab uterino e da fossa clitoriana de éguas com subfertilidade. **Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v.22, n.2, p.109-114, 2002.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.123-140, 2004.

KROHN, M.A.; THWIN, S.S.; RABE, L.K.; BROWN, Z.; HILLIE, S.L. Vaginal Colonization by *Escherichia coli* as a Risk Factor for Very Low Birth Weight Delivery and Other Perinatal Complications. **The Journal of Infectious Diseases**, v.175, p.606-610, 1997.

KUNTZE, A.; AURICH, J. **Der Endometritis-Pyometra-Complex bei Tieren**. Vet Special, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart. 1995. 126p.

LÁZARO, N.S.; FARIA, R.S.; RODRIGUES D. P., HOFER, E. Enterobacteriaceae oriundas de fontes humanas e animal: produção de enterotoxina termooestável e nível de resistência a antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v.13, n.64, p.49-57, 1999.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 415p.

LOWBURG, E.J.L. Special problems in hospital antisepsis. In: RUSSEL, W. H.; AYLIFFE, G. A. (Eds.) **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1982. p.262-264.

MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.278-282, 2008.

MACHADO, T.F.; BRUNO, L.M.; BORGES, M.F.; OLIVEIRA, F.E.M.; PORTO, B.C.; SOUSA, C.T. Isolamento e caracterização bioquímica de *Salmonella* spp. em amostras de queijo coalho. CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS

GENÉTICOS, 1., 2010, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2010.

MAIESKI, L.M. **Os principais microrganismos patogênicos que afetam a qualidade do leite.** 2011. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Produção, Tecnologia e Higiene de Alimentos de Origem Animal) - Universidade Federal do Rio Grande Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/49725/000851317.pdf?sequence=1>>. Acesso em 22 out. 2015.

MANES, J.; FIORENTINO, M.A.; KAISER, G.; HOZBOR, F.; ALBERIO, R.; SANCHEZ, E.; PAOLICCHI, F. Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. **Small Ruminant Research**, v.94, p.201-204, 2010.

MARTINS, G.; FIGUEIRA, L.; PENNA, B.; BRANDÃO, F.; VARGESA, R.; VASCONCELOS, C.; LILENBAUM, W. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. **Small Ruminant Research**, v.81, p.182-184, 2009.

MENEGHETTI, M.; LOSI, T.C.; MARTINS Jr., A.P. Uso de protocolo de IATF associado a diagnóstico precoce de gestação e ressincronização como estratégia para maximizar o número de vacas gestantes por IA em estação de monta reduzida. **A Hora Veterinária**, v.147, p.25-27, 2005.

MILLER, R.B.; RUHNKE, H.L.; DOIG, P.A.; POITRAS, B.J.; PALMER, N.C. The effects of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity in cows. **Theriogenology**, v.20, p.367-373, 1983.

OLIVEIRA, J.K.; MARTINS, G.; ESTEVES, L.V.; PENNA, B.; HAMOND, C.; FONSECA, J.F.; RODRIGUES, L.; BRANDÃO, F.Z.; LILENBAUM, W. Changes in the vaginal flora of goats following a short-term protocol of oestrus induction and synchronisation with intravaginal sponges as well as their antimicrobial sensitivity. **Small Ruminant Research**, v.113, p.162-166, 2013.

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

OLUOCH, A. O.; KIM, C.H.; WIESIGER, R.M.; KOO, H.Y.; SIEGEL, A.M.; CAMPBELL, K.L.; BURKE, T.J.; MCKIERNAN, B.C.; KAKOMA, I. Nonenteric *Escherichia coli* isolates from dogs: 674 cases (1990-1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.218, n.3, p.381-384, 2001.

OPLUSTIL, C.P; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia clínica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 340p.

PADULA, A.M.; MACMILLAN, K.L. Effect of treatment with two intravaginal inserts on the uterine and vaginal microflora of early postpartum beef cows. **Australian Veterinary Journal**, v.84, p.204-208, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16821488>>. Acesso em: 07 jan. 2016.

PEIXOTO JUNIOR, K.C.; ULIAN, C.M.V. Avaliação da taxa de prenhez de vacas tratadas com dispositivos de progesterona reutilizados. **Pubvet**, v.1, n.4, 2007. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=57>> . Acesso em: 10 out. 2015.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed., São Paulo: Makron Books, 1997. v.2, p.22-40.

PELTIER, M.R.; DROBEK, C.O.; BHAT, G.; SAADE, G.; FORTUNATO, S.J.; MENON, R. Amniotic fluid and maternal race influence responsiveness of fetal membranes to bacteria. **Journal of Reproductive Immunology**, v.96, n.1-2, p.68-78, 2012.

PETIT, T.; SPERGSE, J.; ROSENGARTEN, R.; AURICH, J. Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. **Reproduction of Domestic Animals**, v.44, n.1, p.88-91, 2009.

PINTO, T. R. **Mastite: Revisão**. 2009. 34f. Monografia (Curso de Pós-graduação *Lato sensu* em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal), Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro- RJ, 2009.

POOLE, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v.10, n.1, p.12-26, 2004.

PORTNER, J.A.; JOHNSON, J.A. Guidelines for reducing pathogens in veterinary hospitals: disinfectant selection, cleaning protocols, and hand hygiene. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, v.32, n.5, p.1-11, 2010.

QUINN, M.E.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolf Publishing: London, 1994.

RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F.; MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.1, 1988.

RAJKOWSKI, K.T; BENNETT, R.W. *Bacillus cereus*. In: MILIOTIS, M.D; BIER, J.W. (Eds.) **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Nova York: Marcel Dekker, 2003.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; GARINO JÚNIOR, F.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F.J.P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.724-731, 2006.

RIEDNER S., ALBUQUERQUE A.J.D., BADKE M.R.T.; WEIBLEN R. Resistência de bactérias isoladas do leite de vacas frente a doze drogas antibacterianas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.11, n.3, p.251-260, 1987.

ROCHA, A.A.; GAMBARINI, M.A.; ANDRADE, M.A.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; GOMES, F.A. Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas Girolando. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.5, n.4, p.215-220, 2004.



RODRIGUES, L.A.; COSTA FILHO, L.C.C.; ALVES, L.G.C.; RIBEIRO, P.H.P.R.; DALLIGNEA FILHO, S.; SILVA, A.S.; NOGUEIRA, E. Efeito do implante de Progesterona (CIDR e CRONIPRESS MONODOSE) e da avaliação prévia com ultrassonografia na taxa de prenhez de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas à IATF. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46, 2009, Maringá. **Anais...**, Maringá: SBZ, 2009. CD-ROM.

SARGISON, N.D.; HOWIE, F.; MEARNES, R.; PENNY, C.D.; FOSTER, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* as a perennial cause of abortion in a closed flock of Suffolk ewes. **Veterinary Record**, v.160, p.875-876, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17586793>>. Acesso em: 07 dez. 2015.

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

SHELDON, I.M.; WILLIAMS, E.J.; MILLER, A.N.; NASH, D.M.; HERATH, S. Uterine diseases in cattle after parturition. **Veterinary Journal**, v.176, p.115-121, 2008.

SILVA, N.; BRAGA, C.E.; COSTA, G.M. Isolamento e teste de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias em infecções uterinas de éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.213-216, 1999.

SILVA, V.F.; DAMASCENO, T.E.F.; SOUZA, N.J.D.; FRANCO, I.; COSTA, M.M. Microbiota cérvico-vaginal de ovelhas mestiças e sua susceptibilidade aos antibióticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.7, p. 586-590, 2011.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

VALENTIM, R. **Concentrações plasmáticas de progesterona e eficiência reprodutiva de diferentes dispositivos de liberação lenta de progesterona**

**usados em inseminação artificial em tempo fixo.** Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

VASCONCELOS, C.O.P.; BRANDÃO, F.Z.; MARTINS, G.; PENNA, B.; SOUZA-FABIAN, J.M.G.; LILENBAUM, W. Análise qualitativa e quantitativa de bactérias da vaginite associadas com implante intravaginal em ovelhas após sincronização de estro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.4, p.632-636, 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v46n4/1678-4596-cr-46-04-00632.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

VERONESI, R.F. **Tratado de infectologia.** 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 2167p.

WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; ENGLAND, G.C.W.; DOBSON, H.; PFEIFFER, D.U.; SHELDON, I.M. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the inflammatory response to endometritis in cattle. **Theriogenology**, v.63, p.102-117, 2005.

WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; NOAKES, D.; ENGLAND, G.C.W.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v.68, p.549-559, 2007.

WOODFORD, N.; WAREHAM, D.W.; GUERRA, B.; TEALE, C. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, n.2, p.287-29, 2014.

WOODROFFE, R.C.S.; SHAW, D.A. Natural control and ecology of microbial populations on skin and hair. In: SKINNER, F.F.; CARR, J.A. (Eds). **The normal microbial flora of man.** London, Academic Press, 1978. p.13-34.

### **CAPÍTULO 3 - VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE AMOSTRAS VULVOVAGINAIS DE VACAS TRATADAS COM DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS DE PROGESTERONA**

**RESUMO:** Objetivou-se, com esse estudo, analisar a similaridade entre isolados de *Escherichia coli* realizada pela técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR), sendo a presença de *E.coli* e a ausência de prenhez os critérios de seleção utilizados para vacas de corte e leite. Foram selecionados 38 isolados de *E. coli* de amostras vulvovaginais de vacas que não emprenharam após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Esses isolados foram analisados pela RAPD-PCR, e observou-se similaridade genética entre cepas oriundas do mesmo lote, com mesma aptidão e identificadas na mesma coleta, e também similaridade entre isolados de diferentes lotes, aptidões e coletas, sugerindo que as estirpes tiveram, provavelmente, a mesma fonte, podendo existir uma relação de contaminação dos dispositivos intravaginais e dos aplicadores dos mesmos, devido falhas na higienização, não podendo descartar a possibilidade de transferência cruzada, partindo da ideia de que o ser humano pode ter sido o carreador de bactérias e que a cepa permaneceu circulante no ambiente. O estudo ressaltou a importância da *E. coli* na microbiota vulvovaginal de vacas e a presença de caracteres fenotípicos e genotípicos dessa bactéria em possíveis problemas reprodutivos.

**Palavras-chave:** Vacas, microbiota vulvovaginal, progesterona, variabilidade genética, RAPD

### CHAPTER 3 - GENETIC VARIABILITY BETWEEN *Escherichia coli* ISOLATED FROM VULVOVAGINAL SAMPLES FROM TREATED COWS WITH INTRAVAGINAL PROGESTERONE DEVICES

**ABSTRACT** - With this study, aimed to analyze the similarity among isolates of *Escherichia coli* using the technique *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD - PCR), the presence of *E. coli* and the absence of pregnancy were the selection criteria used for beef and dairy cows. 38 isolates were selected *E. coli* vulvovaginal samples from cows that did not became pregnant after fixed-time artificial insemination (FTAI). These isolates were analyzed by RAPD -PCR , and observed genetic similarity observed genetic similarity between strains derived from the same batch, with same fitness and identified in the same collection, and also similarity between isolates from different lots, skills and collections, suggesting that the strains had, probably, the same source, may be a contamination rate of intravaginal devices and devices applicators because of failures in hygiene, can not rule out the possibility of cross transfer, based on the idea that humans may have been the carrier of bacteria and the strain remained circulating in environment. The study stressed the importance of *E. coli* in vulvovaginal microbiota of cows and the presence of phenotypic and genotypic characters of this bacterium on possible reproductive problems.

**Keywords:** Cows, vulvovaginal microbiota, progesterone, genetic variability, RAPD

### 3.1 Introdução

As bactérias que causam infecção no trato reprodutor de bovinos incluem uma variedade de espécies, sendo *Escherichia coli* uma das mais frequentes, especialmente porque faz parte da microbiota do trato gastrointestinal (BONDURANT, 1999).

A técnica de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR) estuda a diversidade genética e é útil na pesquisa de relações de similaridade entre diferentes cepas, auxiliando na compreensão dos aspectos biológicos, como fatores de virulência relacionados à patogenicidade, e de aspectos epidemiológicos de diversos agentes infecciosos (BARRET et al., 1994; DAVIS et al., 2003; EWERS et al., 2005).

É utilizada para a tipagem molecular de bactérias de várias espécies e origens (SAHILAH et al., 2010), e é capaz de discriminar o perfil filogenético de estirpes de origem humana (VOGEL et al., 2000) e de animais (ARAÚJO; DE ANGELLIS; AZEVEDO, 2004; CHANSIRIPORNCHAI et al., 2001; FONTANA et al., 2012; GOMES et al., 2005; SALEHI et al., 2008; SOARES-RAMOS et al., 2003).

O princípio da RAPD-PCR baseia-se no fato de diferentes indivíduos produzirem diferentes perfis de fragmentos de amplificação, sendo que esses fragmentos produzidos com *primers* aleatórios têm identificado segmentos específicos do DNA, diferenciando os perfis genotípicos (BORÉM; dos SANTOS, 2002). A automatização do processo e a pequena quantidade de DNA requerida também são vantagens dessa técnica (THORMANN; OSBORN, 1992).

Dispositivos intravaginais de progesterona são frequentemente utilizados para a indução do estro ou sincronização, e são cruciais para a inseminação artificial em tempo fixo (AMIRIDIS; CSEH, 2012). No entanto, quando esses dispositivos são removidos, sinais clínicos de vaginite podem ser observados (PENNA et al., 2013) e, assim, desencadear infecções uterinas, com possível diminuição na taxa de prenhez (VASCONCELOS et al., 2016).

O efeito dos hormônios, bem como a presença dos dispositivos, pode predispor os animais a infecções (MANES et al., 2010;. PENNA et al., 2013.), que muitas vezes são decorrentes da proliferação da microbiota local (MANES et al., 2010).

Objetivou-se, com esse estudo, analisar a similaridade genética de isolados de *Escherichia coli*, oriundos de vacas de corte e de leite não prenhes, pela técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR).

### 3.2 Material e Métodos

Foram analisados 38 isolados de *E. coli* obtidos de amostras vulvovaginais de vacas de corte e de leite. As amostras, previamente armazenadas em BHI-glicerol, foram retiradas do ultrafreezer (-80°C) e mantidas em temperatura ambiente até seu total descongelamento. Em seguida, foram semeadas em placas de Petri contendo ágar-sangue (Kasvi®), permanecendo em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A partir desse ágar, três a cinco colônias puras de *E. coli* foram selecionadas, inoculadas em tubos contendo 5 ml de caldo BHI (Himedia®), e incubadas novamente em estufa, conforme descrito acima.

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia, pela técnica de RAPD-PCR.

Para a extração do DNA, foi utilizado o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega®), e os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações do fabricante, com algumas adaptações.

A partir da cultura em caldo, homogeneizada, 1,0 ml foi transferido para microtubos estéreis, identificados e centrifugados em centrífuga refrigerada (*Eppendorf® Centrifuge 5804R*) a 13000 x g por 2 minutos para peletizar as células.

O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet*, foram adicionados 600 µl da solução de lise (*Nuclei Lysis Solution®*). A mistura foi agitada e incubada no termobloco a 80°C por 5 minutos para lisar as células; após, foi mantida em temperatura ambiente. Foram adicionados 3µl de solução de RNAase, e a mistura foi incubada por 60 minutos a 37°C, em banho-maria; após, foi mantida em temperatura ambiente.

Na sequência, foram acrescentados 200 µl da *Protein Precipitation Solution®*, e essa mistura foi homogeneizada, sendo mantida em centrífuga refrigerada por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13000 x g por 3 minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para microtubos estéreis com 600 µl de álcool etílico, que foram gentilmente misturados por inversão, até se obter DNA na forma de massa visível. As amostras foram centrifugadas novamente

a 13000 x g por 2 minutos e o sobrenadante foi, cuidadosamente, descartado. Foram adicionados 600 µl de etanol 70% e o conteúdo dos tubos foi homogeneizado por inversão, várias vezes, para lavar o *pellet*; em seguida, foram centrifugados a 13000 x g por 2 minutos e o etanol foi descartado.

O excesso foi drenado em papel absorvente e os tubos foram armazenados em estufa a 37°C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µl da solução de reidratação do DNA (*DNA Rehydration Solution*®) aos microtubos, e esses foram mantidos *overnight*, na geladeira, a 4°C. Ao final, o DNA foi armazenado a 2-8°C.

A quantificação do DNA foi feita através do aparelho Biodrop (Biochrom®) em comprimento de onda de 260nm, observando sempre a relação 260/280 a fim de verificar a integridade do DNA (relação entre 1,8-2,0).

Os *primers* 1247 e 1290, descritos na Tabela 1, foram utilizados na reação de RAPD para os isolados de fêmeas bovinas de diferentes aptidões (corte e leite). O material genético da cepa de *E. coli* (ATCC 25922), cedida gentilmente pelo Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada-UFU, foi usada como controle positivo em todas as reações de amplificação. Para o controle negativo, utilizou-se água milli Q estéril adicionada à mistura de reação, em substituição ao DNA.

**Tabela 1:** *Primers* utilizados para análise, por RAPD-PCR, de 38 cepas de *E.coli* isoladas de conteúdo vulvovaginal de vacas de corte e leite submetidas a tratamentos com dispositivos intravaginais de progesterona.

<b><i>Primers</i></b>	<b>Sequência 5' → 3'</b>
1247	AAGAGCCCG
1290	GTGGATGCGA

Fonte: Hopkins e Hilton (2001)

O volume final utilizado para a amplificação foi de 25 µl, constituído por 1µl da solução de DNA bacteriano a 20ng e pelas seguintes quantidades dos reagentes: 2,5 µl de tampão 10x (200 mM de Tris-HCl; 500 mM de KCl); 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1,25 µl de *primer* (40 picomoles); 0,75 µl de desoxinucleotídeotrfosfatado (10 mM de cada DNTP); 0,25 µl de platinum Taq DNA polimerase a 1,25 U (Invitrogen®)

e água milli Q estéril (17,75 µl). Cada iniciador foi utilizado separadamente nas reações, e essas foram feitas em duplicata.

A amplificação foi realizada no aparelho termociclador *Select Cyclor* (Bioproducts®), baseando-se no seguinte protocolo: 1 ciclo inicial a 94°C por 4,5 minutos; 5 ciclos de amplificação com 3 etapas: 94°C por 30 segundos, 22°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos; 35 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: 94°C por 30 segundos, 28°C por 30 segundos, 72°C por 3 minutos, e 1 ciclo final de 72°C por 5 minutos (HOPKINS; HILTON, 2001).

Os produtos amplificados (10 µl) foram submetidos a corridas eletroforéticas em gel de agarose a 1,5% (Agargen®), utilizando o tampão de corrida TBE 5X concentrado, preparado com Tris-Base (54 g), ácido bórico (27,83 g), EDTA (3,725 g) e água destilada estéril (1000 ml), corado com 4 µl de solução SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen®).

O gel de agarose foi colocado ainda líquido em uma bandeja, e os pentes apropriados formaram as canaletas; solidificou-se e foi depositado em uma cuba de acrílico preenchida com tampão TBE, onde as amostras foram aplicadas. Após aproximadamente 120 minutos de corrida a 100W de potência, 80V de voltagem e 80 mA de corrente elétrica, os géis de agarose foram visualizados sob luz UV, no fotodocumentador (*Loccus Biotecnologia*®). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador de 100 pares de bases (*Norgen*®).

Para verificar a relação genética entre os isolados de *E. coli*, tomou-se por base o protocolo descrito por Hopkins e Hilton (2001), com modificações. Os dois *primers* foram utilizados simultaneamente para a construção do dendrograma. Os agrupamentos (*clusters*) identificados com similaridade superior a 85% foram considerados como pertencentes a um mesmo genótipo.

A análise computacional foi realizada no Programa Gel Compar II (*Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns*), versão 1.50, *Applied Maths Korthrijk, Belgium*. Foi utilizado o coeficiente de similaridade com correlação de Pearson para cada *primer*, separadamente; adotou-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) para a construção do dendrograma, e a análise final foi baseada na média de experimentos (*Average from experiments*).



### 3.3 Resultados e Discussão

Das 38 amostras de *E.coli* que foram analisadas, nenhuma apresentou 100% de similaridade com outra. A relação genética dos isolados para ambos os *primers* (1247 e 1290) está demonstrada no dendrograma (Figura 1).

Foram identificados 10 *clusters* com proximidade genética variando entre 85,5% e 90,8%, sendo que cada um deles agrupou dois isolados, e houve apenas um agrupamento com três isolados.

Os dois primeiros agrupamentos, representados pelas amostras 08 e 11, 01 e 03, nessa ordem, formaram os *clusters* “a” e “b”, cada um constituído por cepas de animais diferentes, porém ambos de corte e da mesma data da coleta (lote). Os isolados dos *clusters* “a” e “b” apresentaram similaridade de 87,6% e 87,1%, respectivamente.

O *cluster* “c” (cepas 48 e 79) apresentou 86,7% de similaridade, sendo as amostras oriundas de animais diferentes, de coletas e aptidões (corte e leite) distintas.

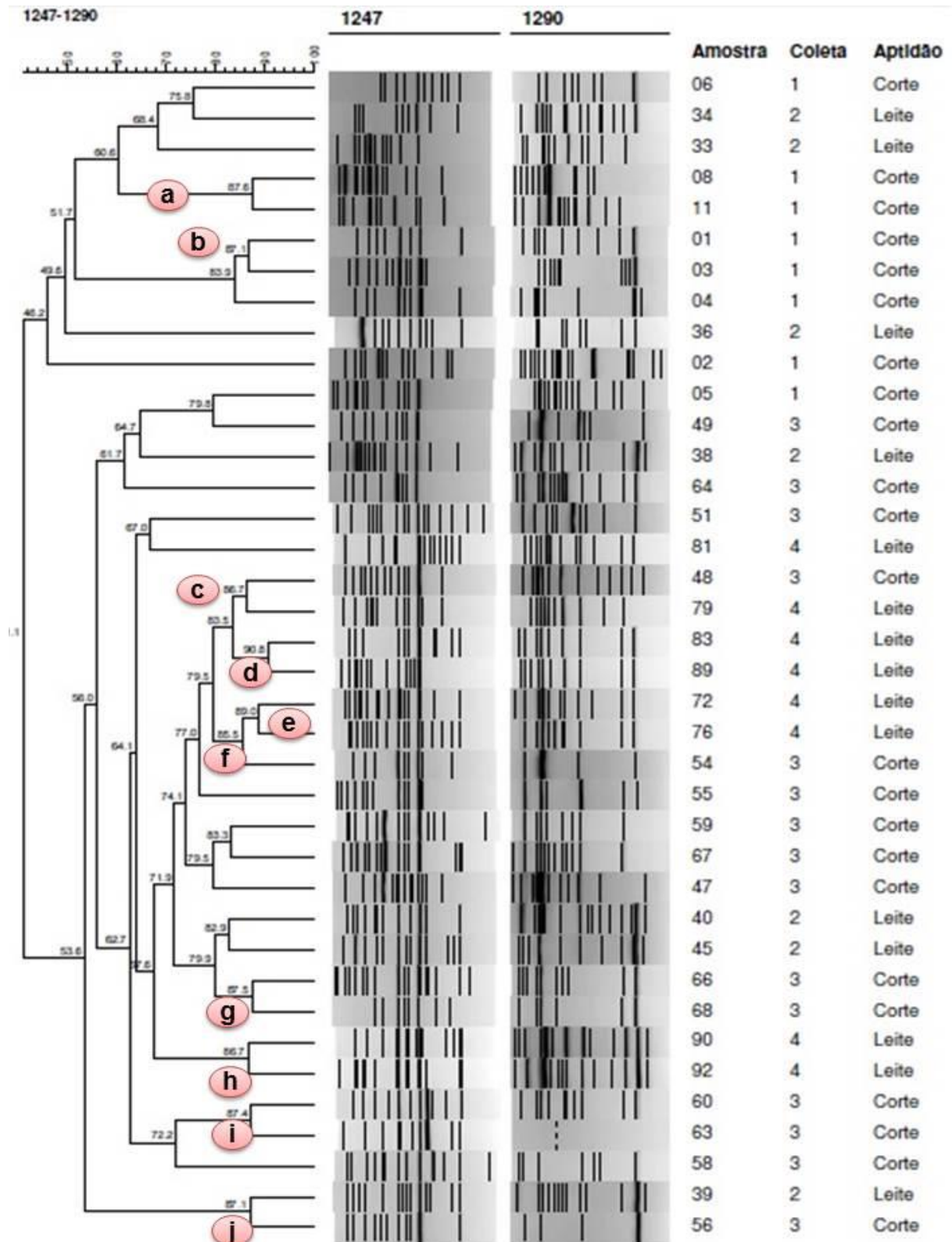
O *cluster* “d”, formado pelas amostras 83 e 89, foi o que apresentou maior similaridade genética, com 90,8%; o *cluster* “e” (amostras 72 e 76) registrou 89% de similaridade; e o *cluster* “h”, formado pelos isolados 90 e 92, apresentou similaridade de 86,7%. Todas as cepas foram de animais diferentes, mesma data de coleta, e mesma aptidão leiteira.

O *cluster* “f” foi o único que agrupou três cepas, 72, 76 e 54, sendo as duas primeiras de vacas de aptidão leiteira e mesma data de coleta, e a última de corte, com similaridade de 85,5%.

As amostras 66 e 68 formaram o *cluster* “g” e apresentaram similaridade de 87,5%; as amostras 60 e 63 formaram o *cluster* “i”, com similaridade de 87,4%, ambas do mesmo lote e aptidão de corte.

O último agrupamento, *cluster* “j”, apresentou 87,1% de similaridade genética entre as cepas 39 e 56, oriundas de animais diferentes, de coletas e aptidões distintas, leite e corte, respectivamente.

**Figura 1:** Dendrograma de 38 isolados de *E. coli* oriundos de vacas de corte e de leite não gestantes da Fazenda Conquista, Presidente Alves-SP, pela técnica de RAPD-PCR com os *primers* 1247 e 1290, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) e método UPGMA com otimização de 85%, pelo programa Gel Compar. *Cluster a* com 87,6% de similaridade; *Cluster b* com 87,1% de similaridade; *Cluster c* com 86,7% de similaridade; *Cluster d* com 90,8% de similaridade; *Cluster e* com 89 % de similaridade; *Cluster f* com 85,5% de similaridade; *Cluster g* com 87,5% de similaridade; *Cluster h* com 86,7% de similaridade; *Cluster i* com 87,4% de similaridade; e *Cluster j* com 87,1% de similaridade.



Fatores como ambientes e raças distintas podem explicar, segundo Oliveira (2013), a diversidade genética apresentada entre os isolados de *E. coli* de diferentes animais. Kuhnert, Boerlin, Frey (2000) completaram essa ideia sugerindo a possibilidade de trocas genéticas entre as cepas e entre espécies diferentes de bactérias.

Muitas bactérias, dessa forma, se adaptam facilmente a novos ambientes, evoluindo por transferência horizontal de genes. Elas podem adquirir fatores de virulência que podem estar envolvidos diretamente em infecções, e também na resistência antimicrobiana, e no aparecimento de diferentes *clusters* (DAM; DAS, 2006).

A ampla diversidade genética entre os isolados de *E. coli* observadas no presente estudo é corroborada por vários estudos. David et al. (2010) relataram considerável diversidade genética entre 281 cepas de *E. coli* isoladas a partir de bovinos, suínos, frango, equinos, caninos e felinos nos Estados Unidos, mostrando que essa espécie de bactéria apresenta alta variabilidade genética. Segundo os autores, pesquisas que buscam compreender esta diversidade podem ser importantes para relacionar virulência, patogenicidade, resistência antimicrobiana e capacidade de disseminação.

Alguns estudos, ao realizarem a comparação genotípica e fenotípica de *E. coli* isoladas de diferentes síndromes, também constataram elevada similaridade entre elas (FILHO, 2008; SMITH, FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

Pode ocorrer disseminação de bactérias entre os diferentes ambientes, humano e animal, e também entre objetos compartilhados e utilizados no manejo desses animais, como mostram alguns relatos.

Fontana et al. (2012), por exemplo, encontraram cepas idênticas do gênero *Staphylococcus* spp. nos tetos de diferentes animais de uma mesma propriedade, assim como houve semelhança genética entre cepas oriundas da mão do ordenhador e do animal, mostrando a variabilidade entre os isolados e também similaridade, sugerindo relação de contaminação e transferência cruzada entre as cepas de origem humana e animal.

Esses resultados podem ser comparados aos encontrados nesse trabalho com alguns dos isolados que apresentaram alta similaridade genética, oriundos de animais diferentes da mesma propriedade, sugerindo que, provavelmente, essas cepas tiveram uma mesma fonte.

Existe uma possível relação de contaminação dos dispositivos intravaginais de progesterona e dos aplicadores dos mesmos, devido falhas na higienização, não podendo descartar a possibilidade de transferência cruzada, partindo da ideia de que o ser humano pode ter sido o carreador de bactérias e que a cepa permaneceu circulante no ambiente. No entanto, devido este estudo envolver bactérias relacionadas à colonização, e em número relativamente pequeno, conclusões definitivas requerem novos estudos, envolvendo um número maior de isolados.

Muitos são os estudos voltados para a *E. coli*, seja de origem humana ou animal, patogênica ou não, que envolvem a análise do perfil de resistência, as características fenotípicas de sensibilidade a diversas drogas antimicrobianas, e detecção genética da resistência às principais classes de antimicrobianos, utilizando ensaios moleculares de similaridade genética das cepas (CLERMONT et al., 2011; MAYNARD et al., 2004; STENSKE et al., 2009; UNNO et al., 2011).

Entretanto, na literatura consultada, não foram encontradas citações relacionadas ao perfil de similaridade genética em isolados de *E.coli* que colonizam a mucosa vulvovaginal de vacas, como o encontrado no presente estudo.

A semelhança entre cepas oriundas de vacas de corte e leite pode ter acontecido devido ao manejo, pois mesmo vivendo em ambientes diferentes, os dispositivos intravaginais de progesterona utilizados nos programas de IATF são os mesmos, e o médico veterinário responsável pelas inseminações também. Assim, sugere-se que ocorreu uma contaminação cruzada causada pela mesma fonte de infecção.

Como perspectivas futuras, pretende-se realizar outros estudos que analisem a variabilidade genética de isolados de *E.coli* oriundos de vacas de corte e leite em diversos momentos do ciclo estral, e compará-los com a diversidade dos isolados nas condições que foram realizadas no presente estudo, a fim de evidenciar o efeito do tratamento hormonal sobre a microbiota do trato genital bovino e verificar o perfil de sensibilidade dos isolados aos antibacterianos.

### **3.4 Conclusão**

Diante dos resultados, conclui-se que há uma alta diversidade genética entre os isolados de *E. coli* de mucosa vulvovaginal de vacas de corte e de leite não prenhes, sendo que a maioria dos isolados não apresentou similaridade genética. A

semelhança entre isolados de vacas de lotes e aptidões distintas sugere que essas cepas muito próximas geneticamente tiveram a mesma origem e podem ter permanecido no ambiente entre uma coleta e outra, ou passaram a colonizar os animais a partir de uma fonte comum.

## REFERÊNCIAS

- AMIRIDIS, G.S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.130, p.152-161, 2012.
- ARAÚJO, W.L.; DE ANGELLIS, D.A.; AZEVEDO, J.L. Direct RAPD Evaluation of Bacteria without Conventional DNA Extraction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.2, p.375-380, 2004.
- BARRETT, T.J.; LIOR, H.; GREEN, J.H.; KHAKHRIA, R.; WELLS, J.G.; BELL, B.P.; GREENE, K.D.; LEWIS, J.; GRIFFIN, P.M. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and phage typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.12, p.3013-3017, 1994.
- BONDURANT, R.H. Inflammation in the bovine female reproductive tract. **Journal of Animal Science**, v.77, suppl.2, p.101-110, 1999.
- BORÉM, A.; dos SANTOS, F. R. **Marcadores Moleculares**. In: Biotecnologia Simplificada. Editora Suprema: Viçosa-MG, 249p., 2002.
- CHANSIRIPORNCHAI, N; RAMASOOTTA, P.; SASIPREEYAJAN, J.; SVENSON, S. B. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) analysis. **Veterinary Microbiology**, v.80, n.1, p.75-83, 2001.
- CLERMONT, O.; OLIER, M.; HOEDE, C.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S.; KEROUDEAN, M.; GLODT J.; PICARD, B.; OSWALD, E. DENAMUR, E. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p.654–662, 2011.

DAM, T.; DAS, P.P. Potencial tool for the investigation of the gene transfer in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.55, n.4, p.479-480, 2006.

DAVID, D.E.; LYNNE, A.M.; HAN, J.; FOLEY, S.L. Evaluation of Virulence Factor Profiling in the Characterization of Veterinary *Escherichia coli* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, n.22, p.7509-7513, 2010.

DAVIS, M.A.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; CALL, D.R. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.5, p.1843-1849, 2003.

EWERS, C.; JANBEN, T.; KIEBLING, S.; PHILIPP, H.; WIELER, L.H. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v.49, n.2, p.269-273, 2005.

FILHO, J.C.B.S. **Pesquisa de bactérias e sua sensibilidade aos antimicrobianos em cães com piometra, com especial interesse na caracterização de *Escherichia coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC)**. 2008. 69f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. UNIP/ São Paulo, 2008.

FONTANA, V.L.D.S.; GIANNINI, M.J.S.M.; FONTANA, C.A.P.; LEITE, C.Q.F.; STELLA, A.E. Caracterização molecular de estafilococos isolados de vacas com mastite subclínica e ordenhadores. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.4, p.469-476, 2012.

Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-16572012000400002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572012000400002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 04 fev. 2016.

GOMES, A.R.; MUNIYAPPA, L.; KRISHNAPPA, G.; SURYANARAYANA, V.V. S.; ISLOOR, S.; HUGAR, P.G. Genotypic characterization of Avian *Escherichia coli* by random Amplification of Polymorphic DNA. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v.4, n.6, p.378-381, 2005.

HOPKINS, K.L.; HILTON, A.C. Use of multiple *primers* in RAPD analysis of clonal organisms provides limited improvement in discrimination. **Bio Techniques**, v.30, n.6, p.1262-1267, 2001.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, n.1, p.107-117, 2000.

MANES, J.; FIORENTINO, M.A.; KAISER, G.; HOZBOR, F.; ALBERIO, R.; SANCHEZ, E.; PAOLICCHI, F. Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. **Small Ruminant Research**, v.94, p.201-204, 2010.

MAYNARD, C.; BEKAL, S.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R.C.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; LARIVIERE, S.; HAREL, J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial profiles of extraintestinal *E. coli* isolates of animal and human origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p. 5444-5452, 2004.

OLIVEIRA, R.P. **Fatores de virulência e similaridade genética de *Escherichia Coli* isoladas de úteros e urina em cadelas com e sem piometra**. 2013. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

PENNA, B.; LIBONATI, H.; DIRECTOR, A.; SARZEDAS, A.C.; MARTINS, G.; BRANDÃO, F.Z.; FONSECA, J.; LILENBAUM, W. Progestin-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronization influences on goats vaginal flora and antimicrobial susceptibility. **Animal Reproduction Science**, v.142, n.1-2, p.71-74, 2013.

SAHILAH, A.M.; AUDREY, L.Y.Y.; ONG, S.L.; WAN SAKEENAH, W.N.; SAFIYYAH, S.; NORRAKIAH, A.S.; AMINAH, A.; AHMAD AZUHAIRI, A. DNA profiling among egg and beef meat isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic



consensus-PCR (ERIC-PCR) and *Random Amplified Polymorphic DNA*-PCR (RAPD-PCR). **International Food Research Journal**, v. 17, p. 853-866, 2010.

SALEHI, T.Z.; MADANI, S.A.; KARIMI, V.; KHAZAELI, F.A. Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. **Brazilian Journal of Microbiology** [online], v.39, n.3, p.494-497, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151783822008000300015&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822008000300015&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 18 jan. 2016.

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M.; GUNTHER, N.W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, p.134-163, 2007.

SOARES-RAMOS, J.R.L.; RAMOS, H.J.O.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genetics and Molecular Biology** [online], v.26, n.4, p.537-543, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S141547572003000400019&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141547572003000400019&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 10 jan. 2016.

STENSKE, K.A.; BEMIS, D.A.; GILLESPIE, B.E.; STEPHEN, M.S.; OLIVER, P.; DRAUGHON, F.A.; MATTESON, K.J.; BARTGES, J.W. Prevalence of urovirulence genes *cnf*, *hlyD*, *sfa/foc*, and *papGIII* in fecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, n.11, p.1401-1406, 2009.

THORMANN, C.E.; OSBORN, T.C. **Use of RAPD e RFPL markers for gemplasm evaluation**. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. Minneapolis, 1992. p.9-11.

UNNO, T.; HAN, D.; JANG, J.; WIDMER, K.; KO, G.; SADOWSKY, M.J.; HUR, H.G. Genotypic and Phenotypic Trends in Antibiotic Resistant Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Humans and Farm Animals in South Korea. **Microbes and Environments**. v.26, n.3, p.198-204, 2011.

VASCONCELOS, C.O.P.; BRANDÃO, F.Z.; MARTINS, G.; PENNA, B.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; LILENBAUM, W. Análise qualitativa e quantitativa de bactérias da vaginite associadas com implante intravaginal em ovelhas após sincronização de estro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.4, p.632-636, 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v46n4/1678-4596-cr-46-04-00632.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

VOGEL, L.; VAN OORSCHOT, E.; MAAS, H.M.; MINDERHOUD, B.; DIJKSHOORN, L. Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, robotyping and serotyping. **Clinical Microbiology Infection**, v.6, n.2, p.82-87, 2000.

## ANEXOS

### ANEXO A - Protocolo utilizado no tratamento hormonal das vacas de corte Guzerá participantes do programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo

DATA	HORÁRIO	PROCEDIMENTO
<b>D0</b>	9 h	Dispositivo intravaginal de P4 (1g Sincrogest®, Ouro Fino) + 2 ml Benzoato de Estradiol (1mg/ml Sincrodiol®, Ouro Fino)
<b>D7</b>	9 h	2 ml de PGF2α (0,25 mg/ml cloprostenol – Sincrocio®, Ouro Fino)
<b>D9</b>	9 h	Retirar o dispositivo intravaginal de P4 + 0,5 ml de ECP (2 mg/ml - Zoetis®, Pfizer)
<b>RETIRAR BEZERROS</b> <b>("Shang")</b>		
<b>D11</b>	A partir das 13 h	Inseminação Artificial e Retorno dos bezerros

Adaptado de Meneghetti; Losi; Martins Jr. (2005).

**ANEXO B - Protocolo utilizado no tratamento hormonal das vacas mestiças leiteiras participantes do programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo**

<b>DATA</b>	<b>HORÁRIO</b>	<b>PROCEDIMENTO</b>
<b>D0</b>	9 h	Dispositivo intravaginal de P4 (1g Sincrogest®, Ouro Fino) + 2 ml Benzoato de Estradiol (1mg/ml Sincrodiol®, Ouro Fino)
<b>D7</b>	9 h	2 ml de PGF2 $\alpha$ (0,25 mg/ml cloprostenol – Sincrocio®, Ouro Fino)
<b>D9</b>	9 h	Retirar o dispositivo intravaginal de P4 + 0,5 ml de ECP (2 mg/ml - Zoetis®, Pfizer) + 2 ml de eCG (5000 UI - Sincro eCG®, Ouro Fino)
<b>D11</b>	A partir das 13 h	Inseminação Artificial

---

Adaptado de Meneghetti; Losi; Martins Jr. (2005).

**ANEXO C - Análise Final da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)**

Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315  
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;  
e-mail: [ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br); [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 013/15 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 129/14**

Projeto Pesquisa: "Prevalência de microrganismos em vulva de vacas utilizadas em programas de inseminação artificial em tempo fixo".

Pesquisador Responsável: Anna Monteiro Correia Lima.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

**SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.**

**OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

Uberlândia, 26 de janeiro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU