

PREVALÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE DE BACTÉRIAS VAGINAIS DE OVELHAS APÓS O USO DE ESPONJAS INTRAVAGINAIS

MARTINS, G.^{1*}; FIGUEIRA, L.²; BRANDÃO, F.², PENNA, B.¹; VARGES, R.¹; LILENBAUM, W.¹

¹Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Rua Prof. Ernani Pires de Melo, 101, 24210-130, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

² Departamento de Patologia Clínica e Reprodução, Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, Brasil.

Palavras chave: bactérias, ovelhas, vaginite, antimicrobianos.

1. Introdução

Vaginite é uma das doenças mais comuns que afetam o trato genital, e pode ser determinada por microrganismos que atuam como invasores oportunistas secundários (Suárez et al., 2006). Dentre estes, coliformes, principalmente *Escherichia coli*, tem sido frequentemente notificados, não apenas em ovelhas (Sargison et al., 2007), mas também em outras espécies, como vacas (Padula et al., 2006) e cabras (Ababneh & Degefa, 2006).

Espojas intravaginais embebidas com progesterona é o método mais frequentemente empregado na sincronização e indução do estro em ovelhas (Suárez et al., 2006). Não obstante, este uso tem sido relatado como um fator predisponente para infecções vaginais (Padula et al., 2006), podendo levar a vaginite e outras afecções do trato reprodutivo, onde eritema severo, secreção vaginal purulenta e abundância de leucócitos vaginais podem estar presentes (Donders et al., 2002).

Coliformes constituem um grupo de bactérias de origem fecal que podem atuar como patógenos oportunistas no trato reprodutivo. Apresentam um padrão altamente variável de susceptibilidade aos antimicrobianos, o que pode comprometer a eficácia da terapia antimicrobiana inicialmente instituída. Considerando a carência de estudos científicos a respeito do uso de antibióticos para o controle de infecções reprodutivas em ovelhas (Suárez et al., 2006), uma melhor compreensão das espécies bacterianas prevalentes na vaginite e sua susceptibilidade aos agentes antimicrobianos pode contribuir para o correto manejo da doença, bem como outras de infecções do trato reprodutivo em ovelhas.

2. Materiais e métodos

2.1. *Animais* – No início da estação de monta de 2007, 22 ovelhas múltiparas na raça Santa Inês do mesmo rebanho, livres de sinais clínicos de infecção do trato

reprodutivo, foram submetidos ao uso de esponjas intravaginais embebidas com medroxiprogesterona (Progespon[®]), como parte de um protocolo de sincronização e indução do estro. Animais com histórico recente de infecção no sistema reprodutivo ou que fizeram uso de antibiótico sistêmico ou local nos últimos 60 dias foram excluídos do estudo. Seis dias após esta aplicação, as esponjas foram removidas e um swab estéril foi utilizado para coher as amostras da mucosa vaginal posterior.

2.2. Cultura bacteriana – De cada animal colheu-se uma amostra, que foram encaminhadas para o laboratório em meio de transporte Stuart (Merck). Swabs foram então semeados em Agar sangue bovino a 5% (Merck) e incubados à 37°C. Não se empregou metodologia para o isolamento de bactérias anaeróbias. Se o crescimento ocorresse após 24 ou 48 horas de incubação, esfregaços eram feitos, corados pelo método de Gram e examinados microscopicamente. Amostras com morfologia condizente com bastonetes Gram-negativos foram transferidas para o meio EMB Agar-teague (Merck), enquanto que aquelas sugestivas de *Staphylococcus* sp. foram semeadas em meio Chapman Agar-manitol-salgado (Merck).

2.3. Identificação bacteriana – Após o crescimento, as bactérias foram identificadas com base nas características morfológicas da colônia, coloração de Gram, produção de pigmentos e reações bioquímicas, incluindo Agar TSI (Triple Sugar Iron), citrato, urease, indol, Vermelho de Metila (VM), Voges Proskauer (VP), nitrato e teste de motilidade; prova da catalase, teste da coagulase em tubo de ensaio (com plasma de coelho), e fermentação aeróbica de diversos carboidratos. As bactérias foram classificadas como descrito em estudos anteriores (Lilenbaum et al., 1999) e de acordo com o Manual Bergey's de Determinação Bacteriológica (Holt et al., 1994).

2.4. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos – A susceptibilidade a um plantel de oito agentes antimicrobianos foi determinada através do método de difusão em disco no Agar Mueller-Hinton (Merck), de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2003). Discos com, gentamicina (10 µg), cefalotina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), nitrofurantoína (300 µg), ampicilina (10 µg) e amoxicilina (10 µg) foram testados perante todos os isolados. Sulfametoxazol-tripetoprim (25 µg) foi testado apenas para bactérias Gram-negativas enquanto penicilina G (10 U) o foi apenas para os microrganismos Gram-positivos. Após a ação dos antibióticos nas amostras, os diâmetros dos halos de sensibilidade foram mensurados e as amostras foram classificadas como sensíveis ou resistentes.

3. Resultados

3.1. Prevalência bacteriana – No momento da coleta das amostras, todas as ovelhas apresentavam sinais visíveis de vaginite, como secreção purulenta

(amarelada) e inflamação local. Todas as amostras apresentaram um abundante crescimento bacteriano e, naqueles casos onde mais de um tipo de colônia bacteriana podia ser observada, a mais freqüente foi considerada como o agente infeccioso. Assim, para cada animal, uma amostra foi colhida e uma espécie bacteriana foi identificada. Dos 22 isolados, 16 (72,7%) foram identificados como *Escherichia coli*, quatro como *Klebsiella pneumoniae* (18,2%), que também pertencem ao grupo dos coliformes, e dois (9,2%) isolados foram classificados como *Staphylococcus aureus*, um coco Gram-positivo.

3.2. Susceptibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos – A resistência aos antibióticos foi frequentemente observada, e todos os isolados demonstraram resistência à pelo menos uma das drogas testadas. Em relação ao grupo dos coliformes, resistência para ampicilina (95%) e amoxicilina (80%) foi um achado comum. Resistência a outras drogas também foi observada, principalmente para tetraciclina (85%), gentamicina (70%) e cefalotina (70%). Os agentes antimicrobianos mais efetivos contra os coliformes isolados de vagina de ovelhas foram ciprofloxacina e sulfametoxazol-tripetoprim, perante os quais todos os isolados foram susceptíveis, seguidos de nitrofurantoína, que apresentou quatro amostras resistentes. Amostras de *Staphylococcus* apresentaram uma baixa freqüência de resistência às drogas e apenas dois isolados (100%) foram resistentes somente à penicilina G.

4. Discussão

Além da atuação direta como corpo estranho para o organismo do animal, esponjas intravaginais também são embebidas com progestágenos. Esta fonte exógena de hormônios promove um efeito imunossupressor local, reduzindo a proliferação linfocitária e diminuindo também a produção da PGF_{2a}. Conseqüentemente, a capacidade do organismo para prevenir ou combater infecções pode se tornar menos eficiente (Lewis et al., 2003).

Embora fabricantes de esponjas intravaginais hormonais não recomendem sua utilização quando sinais de inflamação local estão presentes, é sabido que seu uso pode atuar como um fator predisponente de vaginite causada por microrganismos oportunistas (Sargison et al., 2007). Estas alterações na microbiota vaginal da ovelha podem ser atribuídas à ação física e/ou à absorção constante e retenção das secreções vaginais pela esponja intravaginal, que, como conseqüência, predispõe ao crescimento bacteriano (Suárez et al., 2006).

Foi sugerido que o uso de esponjas intravaginais gera uma inflamação localizada e um aumento significativo na carga bacteriana, a qual pode aumentar em até 100 vezes, alcançando seu pico próximo ao quinto dia após sua inserção (Suárez et al., 2006). No presente estudo, todas as ovelhas submetidas ao uso de esponjas desenvolveram sinais clínicos de infecção vaginal; uma vez que as amostras foram colhidas no sexto dia após sua inserção, espera-se que a população bacteriana já tivesse alcançado seu pico em termos de número e diversidade.

Já em relação à etiologia de infecção, o presente estudo confirma a elevada predominância de coliformes como agentes da vaginite bacteriana seguinte à utilização das esponjas intravaginais. A elevada prevalência de membros deste grupo já foi reportada em ovelhas (Donders et al., 2002), bem como em outros ruminantes (Padula et al., 2006).

Com relação à susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras isoladas, alguns resultados inesperados e alarmantes foram observados. Todos os coliformes isolados (20 amostras) demonstraram resistência à pelo menos uma droga testada e somente duas drogas (ciprofloxacina e sulfametoxazol-tripetoprim) foram efetivas contra todos os isolados. Isto é particularmente alarmante, visto que um detalhado histórico do rebanho não demonstrou uma exposição prévia a nenhum dos antibióticos testados, o que poderia justificar a taxa de resistência observada.

Embora exista uma carência de estudos a respeito da susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias vaginais de ovelhas, nossos resultados estão de acordo com os experimentos conduzidos em ruminantes. Carson et al. (2008) notificaram a alta susceptibilidade dos coliformes à ciprofloxacina e ao sulfametoxazol-tripetoprim em vacas e uma elevada resistência dos isolados à tetraciclina. Não obstante, em ovelhas, um estudo recente (Suárez et al., 2006) indica cefalotina e gentamicina como sendo os antibióticos mais efetivos na prevenção do crescimento bacteriano após o uso de esponjas intravaginais hormonais, fato este que não corresponde aos resultados do nosso estudo.

5. Conclusão

Concluindo, sinais de vaginite foram verificados em todas as ovelhas avaliadas no sexto dia após a inserção das esponjas intravaginais. Coliformes representaram 90,9% dos isolados, e apresentaram uma alta taxa de resistência aos antimicrobianos. Ciprofloxacina e sulfametoxazol-tripetoprim foram as únicas drogas totalmente efetivas perante os microrganismos isolados.

Organismo	Amostras Resistentes	Padrão de Resistência Antimicrobiana (Nº ATBs)
<i>Escherichia coli</i>	16/16 (100%)	AP (15); AM (14); TE (13); CF (11); GN (13); NT (3)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4/4 (100%)	AP (3); AM (2); TE (2); CF (3) ; GN (1) ; NT (1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2/2 (100%)	PN (2)
TOTAL	22/22 (100%)	AP (18); AM (16); TE (15); CF (14); GN (14); NT (4); PN (2)

AP - ampicilina. AM - amoxicilina. TE - tetraciclina. CF - cefalotina. GN - gentamicina. NT - nitrofurantóina. PN - penicilina G.

Referências bibliográficas

- Ababneh, M.M., Degefa, T., 2006. Bacteriological findings and hormonal profiles in the postpartum Balady goats. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 12-6.
- Carson, C.A., Reid-Smith, R., Irwin, R.J., Martin, W.S., McEwen, S.A., 2008. Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* from 29 beef farms in Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 72, 119-28.
- Donders, G.G.G., Vereecken, A., Bosmans, E., Dekeersmaecker, A., Salembier, G., Spitz, B., 2002. Definition of a type of abnormal vagina flora that is distinct from bacterial vaginosis, aerobic vaginitis. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 109, 34–43.
- Holt, J.C., Krieg, N.K., Sneath, P.H.A., Stanely, J.F., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth ed. Williams and Milkins, Baltimore.
- Lewis, G.S., 2003. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 117.
- Lilenbaum, W., Esteves, A.L., Souza, G.N., 1999. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 448-52.
- Mavrogianni, V.S., Amiridis, G.S., Gougoulis, D.A., Fragkou, I.A., Fthenakis, G.C., 2007. Efficacy of difloxacin for the control of postpartum uterine infections of ewes. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30, 583-5.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard 8th ed. Document M2-A8. NCCLS, Wayne, Pa.
- Padula, A.M., Macmillan, K.L., 2006. Effect of treatment with two intravaginal inserts on the uterine and vaginal microflora of early postpartum beef cows. *Aust. Vet. J.* 84, 204-8.
- Sargison, N.D., Howie, F., Mearns, R., Penny, C.D., Foster, G., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* as a perennial cause of abortion in a closed flock of Suffolk ewes. *Vet. Rec.* 160, 875-6.