

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CITOLÓGICA DO ÚTERO DE VACAS REPETIDORAS DE CIO

(MICROBIOLOGICAL AND CYTOLOGICAL EVALUATION
OF UTERUS OF "REPEAT BREEDER" COWS)

A. S. D. GALINDO¹, M. L. GAMBARINI², B. D. OLIVEIRA FILHO², T. L. KUNZ¹,
* K. P. C. da SILVA³, R. A. MOTA⁴

RESUMO

A eficiência reprodutiva dentro de rebanhos leiteiros é um parâmetro de importância econômica fundamental. Falhas individuais na concepção raramente chamam atenção, entretanto quando as taxas de concepção são baixas, há um problema de rebanho. Neste ponto, destaca-se a repetição de cio, cuja ocorrência pode estar associada à falha de fertilização, à mortalidade embrionária precoce, às causas patológicas e às práticas de manejo, entre outras. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar as diferenças do conteúdo uterino de vacas repetidoras de cio e vacas normais, sob os aspectos microbiológico e citológico, a partir de amostras colhidas de animais de um mesmo rebanho, com histórico de função ovariana regular seguida de ovulação e formação do corpo lúteo, e considerando-se as condições de manejo ambiental e nutricional satisfatórias. Trinta e cinco vacas com idade que variava entre 2,5 e 5 anos foram distribuídas em dois grupos, sendo GI com vacas repetidoras de cio por três ou mais inseminações (n=15) e GII com vacas consideradas normais (n=20). Setenta análises microbiológicas foram realizadas, das quais 93,33% (GI) e 90% (GII) resultaram em cultivos positivos; os microrganismos de maior frequência foram *Staphylococcus spp.* (30,51%), *Bacillus spp.* (28,81%) e *Escherichia spp.* (27,12%). O diagnóstico citológico foi realizado pela da contagem de neutrófilos, que foi significativamente maior ($p < 0,05$) na fase do estro ($\bar{x} = 8,45$) que no diestro ($\bar{x} = 2,57$), com predominância de escores positivos (+ e ++) no GI (59,9%) para 15% no GII.

PALAVRAS-CHAVE: Repetição de cio. Útero. Microbiologia. Citologia. Vaca.

SUMMARY

The reproductive efficiency is a very important parameter for determining the profitability of dairy cattle production. Individual failures in the conception rarely call for attention, however when the conception rates are low there is a problem in this particular herd. Any cow that has not conceived with true estrus in herds of normal fertility is generally defined as a "repeat breeder"; As the conception rate decreases, the number of cows requiring additional services increases, and repeat breeding rapidly becomes a significant problem. The present study was developed with the objective of evaluate the differences in uterine samples of repeat breeder and normal cows, regarding microbiological and cytological, of cows in the same herd had regular cycles, normal ovarian function, i.e., follicular growth, ovulation and corpus luteum formation, and were under similar conditions of management. Thirty-five cows (2,5 to 5 years old) were divided into two groups; the first (GI), repeat breeder cow (three or more inseminations without conception, n=15) and the second, GII, including normal cows (conception after one or two services, n=20). It was made seventy microbiological analyses; 93,33% (GI) and 90% (GII) of them resulted in positive cultures, with prevalence of *Staphylococcus spp.* (30,51%), *Bacillus spp.* (28,81%) and *Escherichia spp.* (27,12%). The cytological diagnosis was made through the neutrophil counting, which was

1 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Goiânia, GO, End. Eletrônico: angeldia@bol.com.br

2 Professores do Departamento de Produção Animal, Escola de Veterinária-UFG, Caixa Postal 131, CEP:74001-970. mlgambarini@hotmail.com

3 Aluno de graduação, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

4 Professor, Universidade Federal Rural de Pernambuco

significantly larger ($p < 0,05$) in the estrus phase ($\bar{x} = 8,45$) than during diestrus ($\bar{x} = 2,57$), with predominance of positive scores (+ and ++) in GI (59,9%), versus 15% in GII.

KEY-WORDS: Repeat breeder. Uterine. Microbiological. Cytological. Cow.

INTRODUÇÃO

Apesar de toda evolução que ocorreu no campo da reprodução animal, especialmente na área de biotecnologia, os problemas reprodutivos continuam trazendo prejuízos aos sistemas de produção, particularmente àqueles que dependem do estabelecimento de taxas adequadas de prenhez e parição, como os sistemas de produção de leite. Nesse sentido, o período que antecede o parto, bem como o transcorrer das primeiras semanas após a parição, revestem-se de elevada significância para o sucesso de uma nova concepção da vaca leiteira (KOZIKI, 1991, BEKANA *et al.*, 1996). Segundo GRUNERT & GREGORY (1984), a maioria das causas de infertilidade em bovinos está relacionada com fatores ambientais e genéticos, sendo que os primeiros se subdividem em alimentação, manejo, distúrbios infecto-contagiosos, deficiência na inseminação ou cobertura.

Dentre essas disfunções, destaca-se a fêmea repetidora de cio (*repeat breeder cow*) que se caracteriza por apresentar ciclos estrais normais ou quase normais, que não revela lesão ou patologia dos órgãos genitais ao exame clínico, entretanto, quando inseminada ou coberta por touro comprovadamente fértil, falha em conceber por duas, três ou mais inseminações ou coberturas (GRADEN *et al.*, 1967, KHASATIYA *et al.*, 1998, LEVINE, 1999, SINGH *et al.*, 2000).

As causas que podem levar à repetição de serviços são inúmeras, dentre as quais, VINHA & ARIAS (1985) destacam os defeitos anatômicos congênitos, genéticos e/ou adquiridos do trato genital; defeitos genéticos e/ou adquiridos dos óvulos, espermatozoides ou do zigoto; processos inflamatórios, infecciosos ou traumáticos; disfunções endócrinas; deficiências nutricionais e de manejo; fatores ligados à incompatibilidade imunológica. Neste sentido, as investigações de MURTHY *et al.* (1974) demonstraram que vacas com histórico de repetição regular de cio, na maioria dos casos, apresentavam população bacteriana uterina, considerando, inclusive, que a presença de microrganismos, tais como *Escherichia spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium pyogenes*, podem tornar o útero um ambiente inviável para a sobrevivência do espermatozoide, pois provocam a desnudação da mucosa uterina, alterando o pH. Além disso, seus metabólitos podem causar endometrites e/ou cervicites que impedem a implantação do ovo no leito uterino. Em

contrapartida, STEVENS *et al.* (1995) obtiveram grande quantidade de cultivos positivos de conteúdo uterino de vacas consideradas normais, e sugeriram que isso acontece principalmente durante o período puerperal, fato que requer, segundo CAMPERO *et al.* (1992), a realização de estudos detalhados no âmbito bacteriológico, histopatológico e citológico, para correta abordagem do conjunto das alterações do ambiente uterino como fator iniciador da síndrome de repetição regular de cio.

PANANGALA *et al.* (1978) compararam exames microbiológicos do muco cérvico-vaginal de vacas normais e repetidoras de cio durante a fase de diestro e os resultados revelaram 25 espécies de bactérias em ambos os grupos, sendo os microrganismos predominantes: *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia spp.*, *Bacillus* e *Corynebacterium*. Os autores não observaram diferença significativa entre a ocorrência de diferentes espécies nos dois grupos de vacas, embora o número de microrganismos da família Enterobacteriaceae e do gênero *Corynebacterium* tenham sido relativamente mais altos no grupo de vacas repetidoras de cio. Esses achados levaram os autores à conclusão de que a população bacteriana presente no muco cérvico-vaginal pode ser normal, impossibilitando a avaliação do papel específico dessa microbiota nos problemas de repetição de estro.

Ainda assim, deve-se discutir o real ou determinante papel dessas bactérias na apresentação dos casos de repetição regular de cio, pois para GRUNERT & BERCHTOLD, (1982), KUNTZE & AURICH (1995) e LEWIS (1997), a presença de determinadas bactérias no útero pode desencadear um processo inflamatório, aumentando a permeabilidade capilar, sendo que as células lesionadas produzem substâncias químicas que vão atuar como agente quimiotático, atraindo grande número de células de defesa, principalmente neutrófilos à zona afetada. Os leucócitos estão presentes na maioria dos exsudatos inflamatórios e o seu número varia de acordo com a reação do hospedeiro diante do agressor.

A utilização da citologia uterina para avaliação de casos de inflamação crônica do órgão tem sido relatada e os resultados encontrados podem auxiliar na interpretação dos achados. Em um estudo feito por CORDEIRO *et al.* (1989), correlacionando a citologia com a microbiologia uterina de vacas com catarro genital de grau um a grau três, não foi observado relação entre presença de micror-

ganismos com leucócitos. De 59 vacas com exame citológico negativo, em amostras uterinas de 32 (54,2%) houve crescimento bacteriano, e de 41 com exame citológico positivo, 16 (39%) apresentaram exame bacteriológico negativo, sugerindo independência do grau de inflamação em relação à presença de microrganismos nas secreções cérvico-uterinas. Para HARTIGAN *et al.* (1972), exames bacteriológicos negativos com citologia positiva devem-se ao fato de que a infecção primária pode ocorrer, o agente ser eliminado, permanecendo as alterações citológicas no endométrio. Ainda para esses autores, exames bacteriológicos positivos associados a exames citológicos negativos podem ocorrer porque a presença do agente em determinado momento não foi capaz de produzir a reação inflamatória do endométrio, já que isto depende da susceptibilidade e resistência do animal mediante agente agressor no momento da infecção.

Dessa forma, e com base em questionamentos abordados na literatura científica especializada, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar as diferenças entre o conteúdo uterino de vacas repetidoras de cio e vacas normais, sob os aspectos microbiológicos e citológicos, a partir de amostras colhidas de animais de um mesmo rebanho, com histórico de função ovariana regular seguida de ovulação e formação do corpo lúteo, e considerando-se as condições de manejo satisfatórias.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido numa granja de produção de leite "tipo A", com 300 matrizes em lactação, pertencentes às raças Parda-suíça e Holandesa PO (pura de origem), com idade entre 2,5 e 5 anos, estabuladas em sistema "Free Stall". O acompanhamento reprodutivo era feito semanalmente por exame ginecológico por meio de palpação retal e com o auxílio de aparelho de ultrasonografia, e todas as fêmeas aptas eram submetidas à inseminação artificial.

A partir da avaliação do histórico reprodutivo das fêmeas, foi feita a amostragem seletiva, segundo GRADEN *et al.* (1967), ALMEIDA (1995), KHASATIYA *et al.* (1998), LEVINE (1999) e SINGH *et al.* (2000), estabelecendo-se dois grupos, denominados "Repetidoras de cio" (Grupo I, VRC) e "Controle" (Grupo II, VC), como segue:

- GRUPO I: (n=15) - vacas com histórico reprodutivo de repetição de cio após três ou mais inseminações consecutivas, sem evidências de patologias à palpação retal.
- GRUPO II: (n=20) - vacas com histórico reprodutivo de concepção até a segunda inseminação em prenhez (es) anterior (es), e que apresentaram parto normal, com pelo

menos um cio após o parto.

Após a determinação dos grupos experimentais, foram iniciadas as colheitas de acordo com a apresentação de cio. O material colhido constituiu-se de lavado uterino e esfregaço do endométrio. De cada fêmea, eram feitas duas colheitas completas de material, sendo uma na fase de estro (após a apresentação do cio) e outra no diestro (entre oito e dez dias após a ovulação).

Para obtenção do lavado uterino, procedia-se à higienização da região perineal e vulva, com água corrente e sabão neutro, e secagem com papel toalha. Em um procedimento semelhante à inseminação artificial, introduzia-se a sonda do tipo Foley montada com aplicador, protegida por camisa sanitária pelo canal cervical até o corpo do útero, infundiam-se, então, 60 mililitros de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%. A recuperação do líquido era feita realizando-se massagem uterina e aspiração com seringa (60 mL), descartável e esterilizada, acoplada à porção terminal da sonda. Da quantidade total de líquido recuperado, uma alíquota de dois mililitros era imediatamente transferida para tubos de ensaio identificados e esterilizados contendo cinco mililitros de Caldo de Infusão Cérebro Coração¹ (BHI), destinados aos exames microbiológicos.

Após a obtenção do lavado uterino, procedia-se à colheita do material celular endometrial, com o auxílio de uma escova ginecológica² descartável, de uso humano, acoplada a uma haste plástica flexível. Para evitar o contato da escova com as mucosas vaginal e cervical, a escova era acomodada no interior de uma bacia francesa utilizada para inseminação artificial, protegida por camisa sanitária. Esse conjunto era introduzido pelo mesmo procedimento anteriormente descrito e, já no corpo do útero, efetuava-se leve pressão através do reto, pressionando-se a parede uterina contra a escova ginecológica, ao mesmo tempo em que eram feitos movimentos de rotação desta, permitindo o contato com o endométrio e a colheita de células. O material obtido era depositado em lâminas de vidro, confeccionando-se esfregaços, submetidos à coloração rápida com corante tipo Panótico³, mergulhando-se a lâmina por cinco segundos em cada uma das seguintes soluções: Ciclohexadieno 0,1%, Azobenzenosulfônico 0,1% e Fenotiazina 0,1%, e armazenados para posterior avaliação em microscópio óptico.

O cultivo, isolamento e identificação dos microrganismos oriundos do lavado uterino eram realizados conforme técnica descrita por KONEMAN *et al.* (2001). As amostras eram incubadas em caldo BHI a 37°C por 24/48 horas para observação de turvação do meio, caracterizando crescimento bacteriano. Em seguida, alíquotas eram transferidas para placas de Petri com os meios de Ágar

Sangue⁴ enriquecido com 10% de sangue de carneiro desfibrinado e Ágar Levine⁵, e novamente incubadas em posição invertida, em condição de aerobiose a 37°C por 24 horas.

Após o tempo de incubação, observava-se os aspectos de crescimento das colônias e a produção, ou não, de hemólise em Ágar Sangue, assim como o crescimento em Ágar Levine. Amostras de colônias de aspecto, coloração, tamanho e formas distintas eram então colhidas e submetidas à coloração pelo método de Gram, com o objetivo de verificar as características morfológicas e classificação dos microrganismos. Em seguida, eram realizadas as provas bioquímicas para a classificação das enterobactérias: produção de indol, produção de gás sulfídrico, prova de motilidade, utilização do citrato de Simmons, prova de Vermelho de Metila (VM), prova de Voges Proskauer (VP), prova de TSI (Tríplice Açúcar Ferro), produção de urease, provas de fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose e manitol) e provas de utilização dos aminoácidos (lisina, ornitina e arginina).

A avaliação citológica das lâminas era feita em microscópio binocular, com aumento de 400X, percorrendo-se a lâmina em zigue-zague, tomando-se dez campos microscópicos das regiões de maior concentração celular, observando-se as células de descamação e leucócitos, segundo descrito por CORDEIRO *et al.* (1989), obedecendo-se os seguintes critérios:

- (Negativo): predomínio absoluto de células epiteliais, presença de 0 a 10 leucócitos em 10 campos microscópicos, independentes da fase do ciclo estral;
- (+): de 11 a 30 leucócitos em 10 campos microscópicos;
- (++) : de 31 a 50 leucócitos em 10 campos microscópicos;
- (+++) : acima de 50 leucócitos em 10 campos microscópicos.

Os resultados obtidos nos diferentes processamentos de material foram tabulados em planilhas e submetidos aos testes estatísticos não paramétricos Kolmogorov-Smirnov e Wilcoxon, segundo CURI (1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizados setenta cultivos e isolamentos microbiológicos em material oriundo de lavados uterinos de vacas, dos quais 64 (91,43%) apresentaram resultados positivos e as seis amostras restantes não apresentaram nenhum tipo de crescimento após 48 horas de incubação. Em 64 amostras positivas, 48 (75,75%) resultaram em cultivos mistos, ou seja, com crescimento de mais de um tipo de microrganismo por amostra.

Dez diferentes gêneros de microrganismos foram isolados, sendo os mais comumente encontrados

Staphylococcus spp. (30,51%), *Bacillus spp.* (28,81%) e *Escherichia spp.* (27,12%), que são considerados característicos da microbiota normal do útero de vacas, conforme relatos de OHTANI & OKUDA (1995), VERMA *et al.* (1997). GARVERICK & YOUNGQUIST (1993) consideraram que, com exceção do *Clostridium spp.* causador de grave metrite tóxica, outras espécies de bactérias podem ser encontradas no útero mas apresentam pequeno efeito deletério sobre a fertilidade.

O número e a frequência dos diferentes gêneros dos microrganismos encontrados nos 64 cultivos positivos, estão expostos na Tabela 1.

A maioria dos microrganismos obtidos nos cultivos aqui descritos tem sido denominados oportunistas, pelo fato de que são habitantes normais de vários órgãos, incluindo o trato urogenital. Quando o sistema imune do animal está debilitado devido a qualquer fator estressante, como problemas sanitários, superlotação e mudanças bruscas de temperatura provocando o estresse pelo calor, estes microrganismos encontram condições favoráveis para sua proliferação e podem tornar-se patogênicos. Na dependência da intensidade de proliferação, podem causar morte embrionária precoce ou problemas de repetição de cio (MURTHY *et al.*, 1974, VERMA *et al.*, 1997).

Os demais microrganismos encontrados, que ocorreram em menor frequência, foram: *Serratia liquefaciens* (3,39%), *Micrococcus spp.* (2,54%), *Hafnia alvei* (2,54%), *Streptococcus spp.* (1,69%), *Corynebacterium spp.* (1,69%), *Enterobacter agglomerans* (0,85%) e *Candida spp.* (0,85%), (Tabela 1). O isolamento desses gêneros de microrganismos tem sido frequente quando o material utilizado para cultivo é proveniente do trato genital de fêmeas bovinas (MURTHY *et al.*, 1974, CORDEIRO *et al.*, 1989, PANANGALA *et al.*, 1978, RAMAKRISHNA, 1996, CARVALHÊDO, 1998).

No Grupo I (VRC) foram processadas trinta amostras, das quais 28 (93,33%) resultaram em cultivos microbiológicos positivos, sendo quatorze (46,66%) obtidas no estro e quatorze (46,66%) no diestro. Estes resultados parecem elevados quando comparados aos achados de HARTIGAN *et al.* (1972), que isolaram microrganismos de material proveniente do útero de vacas repetidoras de cio em 34% dos casos, mas concordam com as observações de RODRIGUEZ *et al.* (1991), SANTANA *et al.* (1995), RAMAKRISHNA (1996), que relataram alta percentagem de isolamentos de microrganismos potencialmente patogênicos para o ambiente uterino, em fêmeas repetidoras de cio. Para SANTOS (1989), durante o período pós-parto o útero oferece condições ideais para o crescimento bacteriano e, dependendo das condições higiênicas de exploração e manejo, os agentes agressores podem se instalar no interior uterino, advindo daí manifes-

tações de processos infecciosos, que podem ter caráter benigno e passageiro ou tender à cronificação.

No Grupo II (VC) foram avaliadas quarenta amostras, das quais 36 (90%) resultaram em cultivo microbiológico positivo. Essa alta ocorrência de infecção em vacas clinicamente normais também foi observada por STEVENS *et al.* (1995), que encontraram positividade em 86,66% dos casos, mas em desacordo com os relatos de HUSSAIN & DANIEL (1992), GARVERICK & YOUNGQUIST (1993) e CARVALHÊDO (1998), que demonstraram que a maior parte dos úteros tornam-se livres de infecção com o passar do período puerperal e o processo de involução normal. Para LEWIS (1997), o conteúdo bacteriológico contido no fluido uterino é informativo, mas deve ser avaliado em conjunto com outros dados, pois somente esta informação não evidencia que a vaca deve ser tratada para infecção uterina sendo assim, a hipótese de que as infecções dependem do sinergismo entre patógenos parece plausível. A avaliação bacteriológica é um exame indireto para o diagnóstico de processos inflamatórios uterinos, pois o isolamento de bactérias não comprova necessariamente a presença de endometrite (CORDEIRO *et al.*, 1989).

A Tabela 2 traz o número e o percentual dos gêneros bacterianos isolados nas duas fases do ciclo, distribuídos nos Grupos I, vacas repetidoras de cio (VRC) e II, vacas controle (VC), considerando apenas os cultivos que resultaram positivos.

Pelos dados expostos na Tabela 2, observa-se similaridade entre os gêneros isolados nas amostras dos dois grupos estudados, da mesma forma que PANANGALA *et al.* (1978), que não encontraram diferenças significativas entre o número e gênero de microrganismos avaliados no muco cérvico-vaginal de vacas repetidoras de cio e normais, sugerindo que o achado de uma população bacteriana é normal no trato genital da fêmea bovina, dificultando a avaliação do papel específico desta microbiota nos casos de repetição de cio.

Para verificar se a simples presença de determinadas bactérias no útero pode desencadear um processo inflamatório, atraindo grande número de células de defesa, principalmente neutrófilos à zona afetada, foram colhidas amostras citológicas uterinas no mesmo dia em que se efetuou o lavado. O número médio de neutrófilos, obtido pela contagem em esfregaços, para os dois grupos está demonstrado na Tabela 3.

A variação do número de neutrófilos foi bastante ampla, o que pode ser notado pela expressão do desvio padrão da média, fato também observado por CORDEIRO *et al.* (1989). Esta variação individual mostra que a aplicação de um teste estatístico matemático não seria capaz de expressar a atividade biológica, tal como discutido por

CURI (1997), que descreveu ser o dado numérico um meio de objetivar os fenômenos, e não um fim em si mesmo. Desta forma, os dados de contagem neutrofilica foram submetidos ao teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov, por tratar-se de contagem não contínua. Os resultados obtidos mostraram não haver diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os Grupos I (VRC) e II (VC), considerando-se o número de neutrófilos durante o estro e o diestro ($z = 1,12$ e $z = 0,34$, respectivamente).

A grande variação individual não permite afirmações sob o ponto de vista biológico, fato também discutido por SUBANDRIO *et al.* (2000), cujos resultados mostraram diferenças significativas apenas quando estes foram comparados individualmente. *A priori*, animais na fase de estro tinham maior número de neutrófilos na superfície do útero que aqueles em fase de diestro. Embora a atuação dos neutrófilos como células de defesa predominantes nos processos inflamatórios seja bem conhecida, assim como seu aumento fisiológico no lúmen uterino durante o puerpério precoce e fase de estro, pouco se sabe sobre a regulação da migração e suas propriedades funcionais nesta região (ZERBE *et al.*, 1996).

O estudo comparativo entre a variação do número de neutrófilos nas lâminas obtidas no estro e no diestro, individualizando-se os grupos, com os dados expostos na Tabela 3, utilizando o teste de Wilcoxon, mostrou haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as fases do ciclo, nos dois grupos ($z = 2,72$ e $z = 2,31$, GI e GII, respectivamente), considerando-se as médias e desvios padrão ($10,6 \pm 10,9$, estro e $2,66 \pm 4,41$, diestro, GI; $6,85 \pm 8,31$, estro e $2,50 \pm 4,71$, diestro, GII). A elevação do número de neutrófilos durante o estro pode ser explicada pelo aumento do aporte sanguíneo devido às altas concentrações de estrógenos nesta ocasião. Neste sentido, LEWIS (1997) afirmou que a resposta leucocitária contra bactérias intra-uterinas parece ser menor no diestro que durante o estro. Durante a fase progesterônica, característica do diestro, o epitélio uterino está menos permeável, impedindo a estimulação do sistema leucocitário, retardando o aparecimento destes na luz uterina, fato que, para PAISLEY *et al.* (1986), caracterizava inibição dos mecanismos fisiológicos de defesa uterina.

Os resultados da contagem de neutrófilos foram submetidos à metodologia descrita por CORDEIRO *et al.* (1989), cujos escores são definidos em negativo (-), uma cruz (+), duas cruzes (+ +) e três cruzes (+ + +) e estão dispostos na Tabela 4.

Esta apresentação permite melhor visualização dos dados obtidos, já que confere qualidades biológicas às observações. Nesta tabela observa-se que houve associação maior entre escores citológicos + e + + e os animais do Grupo I, repetidores de cio, que nos animais do Grupo II, considerados normais.

A quantidade de exames com citologia negativa foi menor nos animais do Grupo I (n = 6, 40%) que naqueles do Grupo II (n = 17, 85%), ao passo que o escore de uma cruz (+) foi superior no Grupo I (n = 8, 53,3%) que no Grupo II (n = 2, 10%). O escore de duas cruzes (++) foi equivalente, 6,6% e 5%, Grupos I e II, respectivamente. O percentual de exames citológicos positivos no Grupo I corrobora os achados de CORDEIRO (1995), que obteve positividade em 57,2% dos casos de animais repetidores de cio.

Assim como descrito por GRUNERT & BERCHTOLD (1982), o aumento fisiológico de neutrófilos, porém pequeno, pode ocorrer no endométrio sadio, justificando a presença de pequeno número de escores positivos nos animais do Grupo II (n = 3, 15%), mesmo porque isso ocorreu nas amostras obtidas na fase do estro. A ausência de um número exacerbado de neutrófilos nas amostras obtidas do Grupo I (VRC), o que seria representado pelo achado de escores três cruzes (+++), concorda com CORDEIRO *et al.* (1989), que não encontraram diferença significativa no número médio de neutrófilos entre vacas com endometrite de primeiro e segundo grau (catarro genital de graus um e dois) e vacas clinicamente saudas, sugerindo cronificação dos processos inflamatórios em casos de repetição de cio, sendo que o maior número de neutrófilos ocorreria durante os processos agudos, quando a elevada quantidade de leucócitos estaria presente na camada superficial do endométrio.

As Figuras 1 e 2 mostram as células da superfície do endométrio nos esfregaços corados pelo método Panótico.

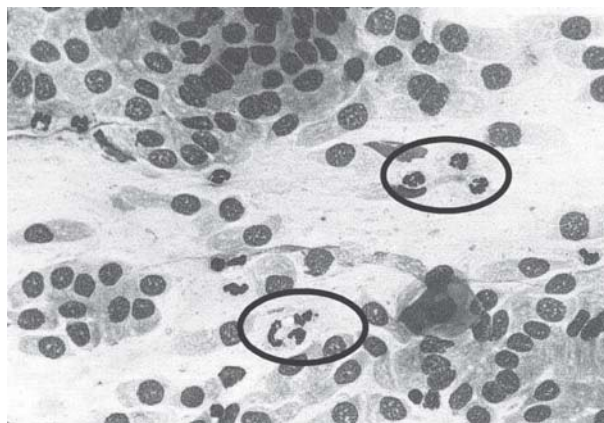


Figura 1 - Neutrófilos visualizados no esfregaço. Estro, X400.

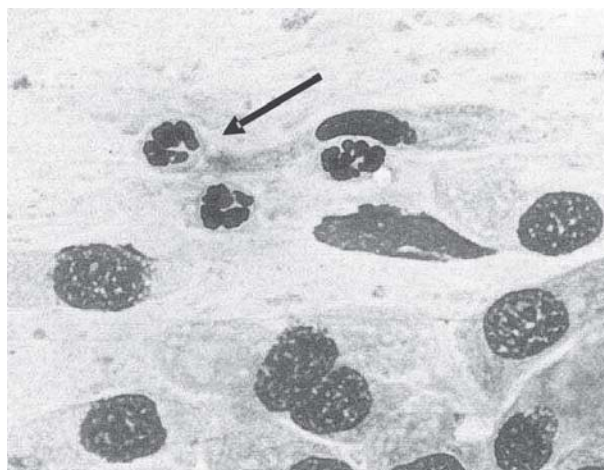


Figura 2 - Neutrófilos visualizados no esfregaço. Estro, sob imersão, X1000.

Tabela 1- Número e freqüência dos diferentes gêneros de microrganismos isolados do lavado uterino de vacas, de acordo com os grupos estudados (VRC e VC). Goiânia – GO, 2001.

MICROORGANISMOS	ISOLAMENTOS(Nº)	FREQUÊNCIA (%)
<i>Staphylococcus spp.</i>	36	30,51
<i>Bacillus spp.</i>	34	28,81
<i>Escherichia spp.</i>	32	27,12
<i>Serratia liquefaciens</i>	4	3,39
<i>Micrococcus spp.</i>	3	2,54
<i>Hafnia alvei</i>	3	2,54
<i>Streptococcus spp.</i>	2	1,69
<i>Corynebacterium spp.</i>	2	1,69
<i>Enterobacter aglomerans</i>	1	0,85
<i>Candida spp.</i>	1	0,85
TOTAL	118	100,00

Tabela 2 - Número e frequência dos gêneros de microrganismos isolados do lavado uterino de vacas, nas fases de estro e diestro do ciclo estral, de acordo com os grupos estudados (VRC e VC). Goiânia – GO, 2001.

MIGROORGANISMO	GRUPO I			GRUPO II		
	Estro	Diestro	Total	Estro	Diestro	Total
	Nº	Nº	%	Nº	Nº	%
<i>Staphylococcus spp.</i>	7	10	32,07	8	11	29,23
<i>Bacillus spp.</i>	10	7	32,07	9	8	26,15
<i>Escherichia spp.</i>	4	9	24,53	10	9	29,23
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	1	3,77	-	2	3,08
<i>Micrococcus spp.</i>	-	-	-	3	-	4,61
<i>Hafnia alvei</i>	1	-	1,89	2	-	3,08
<i>Streptococcus spp.</i>	-	-	-	1	1	3,08
<i>Corynebacterium spp.</i>	2	-	3,77	-	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	-	1	-	1,54
<i>Candida spp.</i>	-	1	1,89	-	-	-
TOTAL	25	28	100,00	34	31	100,00

Tabela 3 – Média e desvio padrão do número de neutrófilos obtidos no exame de citologia uterina de vacas durante as fases de estro e diestro do ciclo estral, de acordo com os grupos estudados (VRC e VC). Goiânia – GO, 2001.

GRUPO	NÚMERO DE NEUTRÓFILOS			
	Estro		Diestro	
	Média (\bar{X})	Desvio Padrão (s)	Média (\bar{X})	Desvio Padrão (s)
Grupo I	10,60	10,90	2,66	4,51
Grupo II	6,85	8,31	2,50	4,71
Total	8,45	9,54	2,57	4,56

Tabela 4 – Número e percentagem de vacas com citologia uterina negativa e positiva de acordo com os grupos estudados (VRC e VC). Goiânia – GO, 2001.

CITOLOGIA	GRUPO I		GRUPO II	
	Nº	%	Nº	%
	?	6	40,0	17
+	8	53,3	2	10,0
++	1	6,6	1	5,0
+++	0	0	0	0,0
TOTAL	15	100,0	20	100,0

CONCLUSÕES

Os resultados aqui descritos, nas condições em que este trabalho foi conduzido, permitem as seguintes conclusões:

· Não houve diferença entre os gêneros bacterianos de maior predominância isolados de amostras de lavados

uterinos de vacas repetidoras de cio e vacas consideradas normais, e tampouco na frequência dos mesmos, ou seja, constatou-se a presença de *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.* e *Escherichia spp.* de forma similar nos dois grupos e nas duas fases do ciclo estudadas e seu isolamento não permite concluir a presença de infecção uterina, sob o ponto de vista clínico.

· O exame de citologia uterina, por si só, não forneceu informações precisas sobre a ocorrência ou não de processos mórbidos uterinos crônicos.

· A associação de métodos de diagnóstico pode ser a melhor alternativa para a abordagem dos problemas de repetição regular de cio em vacas submetidas às mesmas condições de manejo.

ARTIGO RECEBIDO: Setembro/2002

APROVADO: Junho/2003

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.A.P. Early embryonic mortality in "repeat-breeder" cows. *Ars Veterinaria*, v.11, n.2, p.18-34, 1995.
- BEKANA, M., JONSSON, P., KINDAHL, H. Intrauterine bacterial findings and hormonal profiles in post-partum cows with normal puerperium. *Acta Veterinaria Scandinavia*, v.37, p.251-63, 1996.
- CAMPERO, C.M., CONOSCIUTO, G., ODRIOZOLA, E., MOREIRA, A., LODEIRO, R., BOUISSOU, R.G., HERNAIZ, R. Hallazgos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos em vacas lecheras, associados com problemas reproductivos. *Revista de Medicina Veterinária*, v.73, n.6, p.264-72, 1992.
- CARVALHÊDO, A.S. **Efeito da infusão uterina com biguanida polimérica em comparação com aplicação de análogo da PGF₂ no tratamento da metrite puerperal em vacas mestiças GirXHolandês**. Goiânia, GO. 1998. 73p. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
- CORDEIRO, J.L.F., NEVES, J.P., FAN, L.C.R., ALBUQUERQUE, A.J.D., BADKE, M.R.T., SILVA, J.H.S. Citologia cérvico-uterina para o diagnóstico de catarros genitais na vaca. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.13, n.1, p.53-70, 1989.
- CORDEIRO, J.L.F. Investigação clínica, bacteriológica, citológica e terapêutica de vacas repetidoras de serviço na região do Vale do Itajaí/SC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., Belo Horizonte, MG, 1995. *Anais...*, p.437.
- CURI, P.R. **Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas**. Botucatu: Tipomic, 1997.
- GARVERICK, H.A., YOUNGQUIST, R.S. Getting problem cows pregnant In: Missouri State University 1993 [on line em 30 de outubro de 2001] Internet: <http://mextension.missouri.edu/xplor/manuals/m00159.htm>.
- GRADEN, A. P., OLDS, D., MOCHOW, C. R., MUTTER, L. R. Causes of fertilization failure in repeat breeding cattle. *Journal of Dairy Science*, v.51, n.5, p. 778-81, 1967.
- GRUNERT, E, BERCHTOLD, M. **Fertilitätstörung beim weiblichen Rind**. Berlim, Verlag Paul Parey, 1982. 522p.
- GRUNERT, E., GREGORY, R.M. **Diagnóstico e terapêutica da infertilidade bovina**. 2.ed. Porto Alegre, Sulina, 1984. 163p.
- HARTIGAN, P.J., MURPHY, J.A., NUNN, M.A., GRIFFIN, J.F.T. An investigation into the causes of reproductive failure in dairy cows: I-Uterine infection and endometrial histopathology in clinically normal repeat breeder cows. *Irish Veterinary Association*, v.53, p. 245-47, 1972.
- HUSSAIN, A. M., DANIEL, R.C.W. Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows following normal and abnormal parturition. *Theriogenology*, v. 37, p. 1253-67, 1992.
- KHASATIYA, C.T., DHAMI, A. J., SHAN, R.G, KAVANI, F.S. Studies on palpable genital abnormalities and oestrous cycle pattern in repeat breeding bovines. *Indian Veterinary Journal*, v.75, p. 426-29, 1998.
- KONEMAN, E. W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C. WINN JR., W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. 2001, p.720-85.
- KOZICKI, L.E. Puerpério: porque é tão importante. **Gado Holandês**, v.57, p.15-19, 1991.
- KUNTZE, A., AURICH, J. **Der Endometritis-Pyometra-Komplex bei Tieren**. Stuttgart, Gustav Fischer, 1995. 126p.
- LEVINE, H.D. The repeat breeder cow. **The Bovine Practitioner**, v.33, n.2, p.97-105, 1999.
- LEWIS, G.S. Health problems of the postpartum cow: Uterine health and disorders. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.984-94, 1997.
- MURTHY, G.V.K., NANJIAH, R.D., MURTHY, B.S.K. Bacterial flora of cervical mucus in repeat breeding bovines. *Indian Veterinary Journal*, v.51, p.264-68, 1974.

OHTANI, S., OKUDA, K. Histological observation of endometrium in repeat breeder cows. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.57, n.2, p.283-86, 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**, v.25, n.3, p. 358-81, 1986.

PANANGALA, V.S., FISH, N.A., BARNUM, D.A. Microflora of the cervico-vaginal mucus of repeat breeder cows. **Canadian Veterinary Journal**, v.19, p.83-89, 1978.

RAMAKRISHNA, K.V. Microbial and biochemical profile in repeat breeder cows. **Indian Journal of Animal Reproduction**, v.17, n.1, p. 30-32, 1996.

RODRIGUEZ, I. G., GONZALEZ H. E., GALLEGO, M. I. M. Correlacion de la morfología endometrial con aislamientos bacteriológicos en vacas infértiles de la sabana de Bogota. **Revista Ica**, v.26, p.275-86, 1991.

SANTANA, A.B., OBA, E., LANGONI, H. Avaliação bacteriológica de vacas repetidoras de cio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, MG, 1995. **Anais...** p.436.

SINGH, J., SIDHU, S.S., DHALIWAL, G.S., PANGAONKAR, G.R., NANDA, A.S., GREWAL, A.S. Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. **Animal Reproduction Science**, v.59, p. 159-66, 2000.

STEVENS, R.P., DINSMORE, R.P., BALL, L. POWERS, B.E. Postpartum pathologic changes associated with a palpable uterine lumen in dairy cattle. **The Bovine Practitioner**, v. 29, p.93-7, 1995.

SUBANDRIO, A. L., SHELDON, I. M., NOAKES, D. E. Peripheral and intrauterine neutrophil function in the cow: the influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones. **Theriogenology**, v.53, n.8, p.1591-1608, 2000.

VERMA, H.K., JINDAL, S.D., SHARMA, D. K., PANGAONKAR, G.R., SINGH, J. Etiology and treatment of repeat breeding buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v.67, n.2, p.137-38, 1997.

VINHA, N.A., ARIAS, G.E.Z. Estudo clínico, bacteriológico e histopatológico da genitália de vacas repetidoras de cio. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6, Campinas, SP, 1985. **Anais...**, p.163-73.

ZERBE, H., SCHUBERTH, H.J., HOEDEMAKER, M., GRUNERT, E., LEIBOLD, W. A new model system for endometritis: basic concepts and characterization of phenotypic and functional properties of bovine uterine neutrophils. **Theriogenology**, v.46, p. 1339-56, 1996.