

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Identificação e caracterização molecular da flora vaginal
bacteriana do Burro de Miranda (*Equus asinus*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA
E TECNOLÓGICA

Sílvia Ferreira Carvalho

Orientadores:

Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta
Gilberto Paulo Peixoto Igrejas



Vila Real, 2015

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Identificação e caracterização molecular da flora vaginal
bacteriana do Burro de Miranda (*Equus asinus*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA
E TECNOLÓGICA**

Sílvia Ferreira Carvalho

Orientadores:

Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Gilberto Paulo Peixoto Igrejas

Composição do júri:

Vila Real, 2015

Orientadora:

Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta
Centro de Estudos em Ciência Animal e Veterinária (CECAV)
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

Co-Orientador:

Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas
Departamento de Genética e Biotecnologia
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

As doutrinas apresentadas no presente trabalho
são da exclusiva responsabilidade da autora.

Agradecimentos

Ao terminar este trabalho, desejo manifestar o meu agradecimento a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a sua realização:

À **Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro** e ao seu Magnífico Reitor, **Professor Doutor António Augusto Fontainhas Fernandes** pela disponibilidade e facilidades concedidas durante a realização deste trabalho;

À **Professora Doutora Patrícia Poeta** pela oportunidade e por toda disponibilidade, paciência e dedicação que mostrou ao longo da execução deste trabalho;

Ao **Professor Doutor Gilberto Igrejas** por todo o apoio que sempre demonstrou;

À **AEPGA** e ao **Dr. Miguel Nóvoa** por terem cedido as amostras e por se terem mostrado sempre disponíveis para qualquer coisa que eu precisasse;

Às **técnicas do laboratório de Microbiologia Médica** em especial à **Dona Fátima** por toda a disponibilidade e ajuda prestada e pela transmissão de conhecimentos;

A todos os **colegas de laboratório** por estarem sempre disponíveis para me ajudar e pelo bom ambiente de trabalho que proporcionaram;

À minha **família** e **amigos** por todo o carinho, ajuda, dedicação e força que sempre me deram;

A todos os que aqui não mencionei, mas que sempre me apoiaram, o meu muito obrigada!

Identificação e caracterização molecular da flora bacteriana vaginal do Burro de Miranda (*Equus asinus*)

Resumo

O Burro de Miranda é a única raça asinina autóctone portuguesa, originária do Nordeste de Portugal, encontrando-se de momento em vias de extinção. As mudanças na microbiota bacteriana genital fazem parte dos sinais mais comuns de problemas reprodutivos. Em equinos, e sobretudo no Burro de Miranda poucos estudos foram realizados. O estudo da microbiota em animais tem atingido cada vez mais importância, visto que estas comunidades microbianas podem ser cruciais para as funções normais do organismo.

O principal objectivo deste trabalho foi identificar e caracterizar bactérias provenientes de amostras vaginais de fêmeas de Burro de Miranda e estabelecer se estas podem conduzir a situações de infertilidade e abortos.

De um total de 54 amostras vaginais de 27 burras de Miranda foram obtidos 149 isolados. Entre estes isolados identificaram-se 130 bactérias Gram-positivas, 14 bactérias Gram-negativas e 5 bactérias sem Gram determinado. Os géneros mais isolados foram *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Rhodococcus* spp. (59 isolados), *Lactobacillus* spp. (32 isolados) e *Staphylococcus* spp. (21 isolados). Outras bactérias isoladas na flora foram identificadas como *Aerococcus viridans* (3 isolados), *Aeromonas hydrophila* (1 isolado), *Enterococcus faecium* (3 isolados), *Escherichia coli* (1 isolado), *Gemella haemolysans* (1 isolado), *Micrococcus* spp. (2 isolados), *Mycoplasma* spp. (5 isolados), *Neisseria* spp. (3 isolados), *Oligella urethralis* (1 isolado), *Pantoea Agglomerans* (2 isolados), *Pseudomonas chlororaphis* (6 isolados), *Streptococcus acidominimus* (1 isolado), *Streptococcus oralis* (2 isolados), *Streptococcus* spp. (3 isolados) e *Streptococcus zooepidemicus* (3 isolados). A flora bacteriana vaginal de burras que se apresentavam com problemas reprodutivos e sem problemas reprodutivos não diferiu entre si.

Testou-se a susceptibilidade a antibióticos pelo método da difusão em disco de acordo com as normas do CLSI nos isolados *Streptococcus oralis* e *Streptococcus zooepidemicus*, usando-se 9 antibióticos: ampicilina [10 µg], cefepima [30 µg], clindamicina [2 µg], cloranfenicol [30 µg], eritromicina [15 µg], linezolida [30 µg], quinupristina- dalbopristina [15 µg], tetraciclina [30 µg] e

vancomicina [30 µg]. Os isolados de *Streptococcus oralis* apresentaram-se susceptíveis a todos os antibióticos testados. Os isolados de *Streptococcus zooepidemicus* mostraram-se resistentes ou intermédios à tetraciclina e susceptíveis ao resto dos antibióticos testados.

Estudou-se, também, a presença de 5 genes codificadores de factores de virulência (*szeF*, *szeN*, *szeP*, *szm* e *szp*) nos isolados de *Streptococcus zooepidemicus* através da técnica de PCR com recurso a *primers* específicos. Os genes codificadores de factores de virulência mais detectados foram os genes *szeP* e *szp*, tendo sido detectados nos 3 isolados estudados. Os dois isolados de *Streptococcus zooepidemicus* provenientes de burras com problemas reprodutivos apresentaram os 3 genes codificadores de sAgs estudados neste trabalho (*szeF*, *szeN*, *szeP*), enquanto que no isolado da burra sem problemas reprodutivos apenas se detectou o gene *szeF*.

Este estudo deu a conhecer a flora bacteriana vaginal do Burro de Miranda e visto existirem poucos estudos realizados neste assunto e, especificamente nesta raça autóctone, os resultados obtidos neste trabalho poderão ser vantajosos para futuros trabalhos que se realizem nesta área.

Palavras-chave: Burro de Miranda, flora bacteriana vaginal, equinos, antibióticos, factores de virulência, *Streptococcus zooepidemicus*.

Identification and characterization of vaginal bacterial flora from Miranda Donkey (*Equus asinus*)

Abstract

The Miranda Donkey is the only Portuguese autochthonous donkey breed, native of northeastern of Portugal and it's currently in danger of extinction. Changes in genital bacterial flora are one of the common signs of reproductive problems. In equines, especially in Miranda Donkey, few studies were carried out on this subject. The study of the microbiota in animals has gained an increasing importance, since these communities may be crucial for the normal functions of the organism.

The main aim of this study was to identify and characterize bacteria from vaginal samples of jennies of Miranda Donkey and establish if these bacteria can lead to infertility and abortions.

From a total of 54 vaginal samples from 27 Miranda jennies we obtained 149 isolates. Among these isolates we identified 130 Gram-positive bacteria, 14 Gram-negative bacteria and 5 bacteria without Gram determined. The most isolated genera were *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Rhodococcus* spp. (59 isolates), *Lactobacillus* spp. (32 isolates) and *Staphylococcus* spp. (21 isolates). Other isolated bacterial flora were identified as *Aerococcus viridans* (3 isolates), *Aeromonas hydrophila* (1 isolate), *Enterococcus faecium* (3 isolates), *Escherichia coli* (1 isolates), *Gemella haemolysans* (1 isolates), *Micrococcus* spp. (2 isolates), *Mycoplasma* spp. (5 isolates), *Neisseria* spp. (3 isolates), *Oligella urethralis* (1 isolates), *Pantoea Agglomerans* (2 isolates), *Pseudomonas chlororaphis* (6 isolates), *Streptococcus acidominimus* (1 isolate), *Streptococcus oralis* (2 isolates), *Streptococcus* spp. (3 isolates) and *Streptococcus zooepidemicus* (3 isolates). We verified that the vaginal flora of the jennies with reproductive problems and without reproductive problems did not show great differences.

The susceptibility to antibiotics was tested by the disk diffusion method according to the CLSI standards in the isolates of *Streptococcus oralis* and *Streptococcus zooepidemicus*, using 9 antibiotics: ampicillin [10 µg], cefepime [30 µg], clindamycin [2 µg], chloramphenicol [30 µg], erythromycin [15 µg], linezolid [30 µg], quinupristin-dalfopristin [15 µg], tetracycline [30 µg] and vancomycin [30 µg]. The *Streptococcus oralis* isolates were susceptible to all antibiotics tested. The

Streptococcus zooepidemicus isolates were resistant or intermediate to tetracycline and susceptible to the rest of the tested antibiotics.

We also studied the presence of 5 genes encoding virulence factors (*szf*, *szN*, *szP*, *szm* and *szp*) in *Streptococcus zooepidemicus* isolates using PCR with specific primers. The most detected genes were *szf* and *szp*, being detected in the 3 isolates studied. The two *Streptococcus zooepidemicus* isolates coming from jennies with reproductive problems presented the 3 genes encoding sAgs studied in this work (*szf*, *szN*, *szP*), while in the isolate coming from a jenny without reproductive problems only presented the gene *szf*.

This study reported the vaginal bacterial flora of Miranda Donkey and since there are few studies on this matter, especially in this autochthonous donkey breed, the results of this study may be an asset for future studies that take place on this area.

Keywords: Miranda Donkey, vaginal bacterial flora, equines, antibiotics, virulence factors, *Streptococcus zooepidemicus*.

Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	VI
Índice de figuras.....	X
Índice de tabelas.....	XII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos usados.....	XV
1- Introdução.....	1
1.1- A raça Asinina de Miranda e sua presente situação.....	1
1.2- Características da microbiota vaginal equina.....	3
1.3- Endometrite: factores que a influenciam, categorias e diagnóstico.....	4
1.4- <i>Taylorella equigenitalis</i>	7
1.5- <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	9
1.5.1- Produção de factores de virulência por <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	10
1.5.1.1- Proteínas M-like.....	11
1.5.1.2- Superantigénios.....	13
1.6- Importância do uso de técnicas moleculares em microbiologia.....	13
2-Objectivos.....	15
3- Material e Métodos.....	17
3.1- Historial clínico dos animais estudados.....	17
3.2- Colheita e transporte das amostras vaginais.....	21
3.3- Processamento das amostras vaginais.....	21
3.4- Amostras de órgãos provenientes de um aborto.....	22
3.5- Isolamento das diferentes espécies de bactérias.....	23
3.6- Meios de cultura.....	23
3.7- Provas de identificação e técnicas de identificação usadas.....	24
3.7.1- Coloração de Gram.....	24
3.7.2- Prova do Hidróxido de Potássio 3%.....	25
3.7.3- Prova da Catalase.....	25
3.7.4- Prova da Oxidase.....	25

3.7.5- Galerias API [®] (bioMérieux).....	26
3.8- Estudo da sensibilidade a antibióticos.....	26
3.8.1- Antibióticos estudados.....	26
3.8.2- Determinação da sensibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar.....	27
3.9- Reacção em cadeia por acção da polimerase (PCR).....	27
3.9.1- Extracção de DNA.....	27
3.9.2- Preparação dos tubos de PCR.....	28
3.9.3- Primers e condições de PCR utilizadas.....	28
3.10- Electroforese em gel de agarose.....	30
3.11- Sequenciação.....	30
4- Resultados.....	31
4.1- Bactérias isoladas das amostras vaginais.....	31
4.2- Bactérias isoladas das amostras de órgãos provenientes de um aborto.....	36
4.3- Estudo de sensibilidade a antibióticos nos isolados de amostras vaginais de <i>Streptococcus</i> spp.	36
4.4- Resultados da sequenciação do gene 16s rDNA.....	37
4.5- Produção de factores de virulência em <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	37
5- Discussão.....	39
6- Conclusão.....	45
7- Bibliografia.....	47
8- Anexos.....	53

Índice de figuras

Figura 1- Burra de Miranda e seu burranco (Nóvoa, 2012).....	1
Figura 2- Meio de transporte Amies Charcoal (Remel).....	21
Figura 3- <i>Mycoplasma</i> spp. observado a partir da objectiva de 10x do microscópio óptico.....	22
Figura 4- Coloração de Gram de <i>Staphylococcus</i> spp. (Ampliação 100x).....	24
Figura 5- Identificação de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> a partir do sistema API 20 Strep. Os testes em que se obteve um resultado positivo foram: β GUR, PAL, LAP, ADH, RIB, SOR, LAC, AMD e GLYG.....	32
Figura 6- <i>Streptococcus zooepidemicus</i> em CNA com 5% de sangue de ovino.....	32
Figura 7- <i>Mycoplasma</i> spp. observado a partir da objectiva de 10x do microscópio óptico.....	35
Figura 8- Antibiograma do isolado <i>Streptococcus oralis</i> proveniente da amostra da burra Daina.....	36
Figura 9- Resultados da presença dos factores de virulência <i>szeF</i> , <i>szeN</i> , <i>szeP</i> , <i>szm</i> e <i>szp</i> dos isolados de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> após electroforese em gel de agarose. Na fotografia C- refere-se ao controlo negativo.....	38

Índice de tabelas

Tabela 1- Historial dos animais estudados.....	17
Tabela 2- Antibióticos usados em <i>Streptococcus</i> spp. e respectivo valor dos halos de inibição (CLSI, 2013).....	27
Tabela 3- Componentes e concentrações usadas para a reacção de PCR.....	28
Tabela 4 - Sequências de nucleótidos dos <i>primers</i> de PCR.....	29
Tabela 5- Bactérias Gram-positivas isoladas de amostras vaginais no decorrer do trabalho.....	33
Tabela 6- Bactérias Gram-negativas isoladas de amostras vaginais no decorrer do trabalho.....	34
Tabela 7- Frequência dos diferentes gêneros/espécies de bactérias isoladas consoante o número de burras estudadas.....	35
Tabela 8- Bactérias isoladas das amostras de órgãos provenientes de um aborto.....	36
Tabela 9- Genótipos dos factores de virulência detectados nos isolados de <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	37
Tabela 10- Meios de cultura utilizados durante o decorrer do trabalho.....	53

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos usados

°C- Grau Celsius

βGUR- β- Glucuronidase

μg- Micrograma

μl- Microlitro

μM- Micromolar

%- Percentagem

% w/w- Percentagem em massa

% w/v- Percentagem em massa/volume

ADH- Arginina DiHidrolase

AEPGA- Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino

AMD- Acidificação do amido

BHI- Infusão de Cérebro e Coração (*“Brain Heart Infusion”*)

bp- Pares de bases (*“base pair”*)

CEM- Metrite Contagiosa Equina

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute

cm- Centímetro

DNA- Ácido Desoxirribonucleico (*“Deoxyribonucleic Acid”*)

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

g- Grama

GLYG- Acidificação do glicogénio

IMViC- Testes indol, vermelho de metilo, Voges-Proskauer e citrato

kDa- Kilodalton

KOH- Hidróxido de Potássio

L- Litro

LAC- Acidificação da lactose

LAP- Leucina aminopeptidase

m- Metro

MBLS- Lipoproteínas ligadoras de metais

min- Minuto

ml- Mililitro

mM- Milimolar

M.O.- Microscópio Óptico

MSCRAMM- Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz
(*“Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”*)

NaCl- Cloreto de Sódio

ng- Nanograma

PAL- Fosfato alcalina

PCR- Reação em Cadeia por ação da Polimerase (*“Polimerase Chain Reaction”*)

pH- Potencial de hidrogénio iónico

PMIE- Endometrite persistente induzida por acasalamento (*persistent mating-induced endometritis*)

RIB- Acidificação da ribose

rpm- Rotações por minuto

s- Segundo

sAgs- Superantigénios

SOR- Acidificação do sorbitol

TBE- Tris Borato EDTA

TE- Tris EDTA

Tris- Tris- (hidroximetil)- aminometano

TSI- *“Triple Sugar Iron”*

UTAD- Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

V- Volt

x- Vezes

1- Introdução

1.1- A raça Asinina de Miranda e a sua presente situação

Em Portugal, assim como um pouco por todo mundo, e até um passado recente, o Burro foi sistematicamente subestimado e esquecido, não tendo sido desenvolvido qualquer programa de preservação ou melhoramento genético. No entanto, as características do nosso mundo rural, nomeadamente nas regiões de interior, permitiram que o efectivo de asininos se tivesse mantido até aos dias de hoje. Foi precisamente na zona mais remota de Trás-os-Montes que se conservou aquela que é, sem dúvida, uma das últimas raças autóctones de asininos no território nacional: a raça Asinina de Miranda. Esta raça é a única raça asinina oficialmente reconhecida em Portugal e desde 2003 que está listada como uma raça em perigo de extinção (Quaresma *et al.*, 2005 e NYT, 2015).

A raça Asinina de Miranda é caracterizada por uma altura média de 1,30 m, por uma pelagem castanha escura com gradações mais claras nos costados e face inferior do tronco geralmente longa, com manchas brancas à volta dos olhos e do focinho, bem como por uma robustez global- cabeça grande, orelhas longas e articulações robustas (Figura 1) (Nóvoa, 2012).



Figura 1- Burra de Miranda e seu burraco (Nóvoa, 2012).

A Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino (AEPGA) foi criada em 2001 com o intuito da preservação e protecção desta Raça e dos asininos em geral. Quando a AEPGA foi fundada, o Burro de Miranda ainda não tinha sido reconhecida como raça e pouco se sabia sobre este animal. Apenas um ano se tinha passado desde que se tinha concluído que existia uma população de burros com características particulares que faziam com que se distinguissem dos outros, e que era encontrada sobretudo no Planalto Mirandês. A AEPGA tem como objectivos a preservação e aproveitamento da Raça Asinina de Miranda de forma a salvar um património genético, ecológico e

cultural único no nosso país. Pretende também revalorizar a imagem do Burro a nível nacional, particularmente do Burro de Miranda, contribuindo para a recuperação do seu efectivo e potenciação de um modelo de aproveitamento socioeconómico que respeite e preserve o riquíssimo património cultural e natural da região do Nordeste Transmontano. Para além de cerca de 120 animais que a AEPGA cuida, tanto no centro de criação e no centro de acolhimento, a associação proporciona apoio técnico aos proprietários de burros da região. O centro de criação e promoção foi criado em Atenor, uma pequena aldeia no planalto mirandês e denomina-se de Centro de Valorização do Burro de Miranda. Actualmente, este centro é o lar de cerca de 60 burros (a maioria dos quais são fêmeas) e há cerca de 10 nascimentos por ano. Os burros são criados no centro até terem 6 a 12 meses e nessa altura é decidido se permanecem no centro ou se são vendidos. Uma das principais responsabilidades da AEPGA é gerir o livro genealógico e um dos maiores desafios é equilibrar o número de nascimentos que não é suficientemente alto (Quaresma *et al.*, 2005; Nóvoa, 2012; AEPGA, 2015).

Apesar da sua precocidade sexual (as fêmeas estão aptas para a reprodução ao ano e meio de idade e os machos aos dois), as fêmeas devem iniciar a sua vida reprodutiva apenas a partir dos três anos e os machos um ano mais tarde. O cio tem a duração aproximada de uma semana, variando entre os cinco e os oito dias, e uma ciclicidade de quinze a trinta dias. O período de cobrições estende-se de Abril a Junho e a gestação é de cerca de doze meses (Quaresma *et al.*, 2005). Foi apontado que o aumento do número de fêmeas reprodutoras, entrando estas em reprodução mais cedo que o habitual poderia levar a um aumento no número de partos. Como existe uma quantidade limitada de informação confirma-se a necessidade de uma investigação sobre a fisiologia reprodutiva do Burro de Miranda. A produção de leite é uma utilização potencial dos burros que tem sido, recentemente, explorada e poderia fornecer meios de prevenção de extinção de muitas raças, incluindo a raça asinina de Miranda, porém uma produção otimizada requer um maior conhecimento da fisiologia reprodutiva do burro de modo a aumentar as taxas de parto (Quaresma e Payan-Carreira, 2015).

Segundo dados fornecidos pela AEPGA, existem apenas cerca de 850 fêmeas reprodutoras e cerca de 40 machos inteiros distribuídos por todo o País. Infelizmente, calcula-se que o número de animais com capacidade reprodutiva que possam ser utilizados seja inferior. Muitas das fêmeas apresentam problemas reprodutivos, principalmente por idade avançada, assim como também ainda existe oposição dos proprietários em deixarem as burras reproduzirem-se, devido aos custos inerentes

em termos de trabalho. As dificuldades ao nível da multiplicação do efectivo atual surgem, também, pela falta de machos inteiros adultos disponíveis, pois a maioria dos machos são castrados quando atingem 1 ano de idade, de forma a facilitar o trabalho. O facto de se ter de transportar o burro reprodutor até às fêmeas reprodutoras também surge como uma limitação, o que chama a atenção para a expansão da utilização de técnicas de reprodução assistida.

Recentemente a AEPGA registou abortos e infertilidade em burras aptas para reprodução, algumas delas ainda jovens. Estes problemas põem em causa a possibilidade de extinção desta espécie. Com o intuito de tentar descobrir qual a razão para estas ocorrências foi-nos solicitado pela AEPGA a realização deste trabalho.

1.2- Características da microbiota vaginal equina

A microbiota comensal é uma comunidade complexa que coloniza vários sistemas orgânicos e órgãos em animais. Geralmente, esta comunidade confere protecção contra patógenos, bem como proporciona outros benefícios tal como modulação da resposta imune. Até agora, a microbiota equina não foi extensivamente caracterizada. Estas comunidades de microrganismos estão relacionadas com as funções normais dos seres vivos e a sua caracterização pode fornecer dados importantes sobre os benefícios dos microrganismos que poderão ser úteis para a promoção da saúde de equinos. Em éguas, os probióticos poderão melhorar a qualidade e quantidade de leite e os microrganismos isolados do trato vaginal poderão ser direccionados para a prevenção de problemas de fertilidade relacionados com endometrite. Muitos patógenos uterinos residem na vagina, portanto o conhecimento da flora bacteriana que reside no trato genital das éguas é importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de modo a controlar a doença (Fraga *et al.*, 2011).

A microbiota vaginal dos vertebrados é uma complexa associação de microrganismos em que as bactérias ácido-lácticas desempenham um papel fundamental. Em humanos, a presença de bactérias ácido-lácticas, particularmente os lactobacilos, é considerada um indicador do estado de saúde. Porém, pouco se sabe sobre a microecologia da vagina em éguas (Fraga *et al.*, 2011).

A flora genital varia de acordo com o animal e é dinâmica ao longo do tempo. Factores como a idade, número de gestações levadas a um estado gestacional estável e as hormonas afectam a composição da flora. A verdadeira flora genital é provavelmente mais complexa do que a actualmente reconhecida pois nem sempre são utilizados os métodos de cultura óptimos para organismos muito

exigentes. Em geral, a vagina contém uma flora composta, principalmente, de bactérias anaeróbias obrigatórias, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, incluem bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, micoplasmas e ureaplasmas. A flora vaginal normal ou transiente inclui espécies que podem contaminar o útero quando este se encontra comprometido. Um exemplo é *Streptococcus zooepidemicus*. O potencial destes organismos causarem doença não resulta simplesmente da sua presença, mas requer um nível crítico de replicação dominante sobre os outros organismos da flora, antes da doença ocorrer. Se a flora normal for perturbada, a vagina poderá ser reabitada com organismos mais resistentes que podem vir a afectar o útero. A flora residente da genitália externa inclui bactérias anaeróbias comensais, *Mycoplasma* spp., estreptococos α e β -hemotílicos, *Lactobacillus* spp., *Corynebacterium* spp. e estafilococos coagulase-negativos (McVey *et al.*, 2013).

1.3- Endometrite: factores que a influenciam, categorias e diagnóstico

As infecções bacterianas do trato genital são a principal causa de problemas reprodutivos em éguas. Organismos potencialmente patogénicos podem ser introduzidos durante o acasalamento, inseminação artificial, durante e após o parto e como resultado da insuficiência de barreiras físicas que levam à infecção (exemplo: Pneumovagina). Quando os mecanismos de defesa uterinos estão a funcionar correctamente, estes eliminam a infecção bacteriana sem interferirem com a reprodução. A maioria dos casos de infertilidade pode ser atribuída a uma falha da capacidade natural da égua conseguir eliminar bactérias contaminantes do útero após o acasalamento. Estudos anteriores mostraram que as causas bacterianas mais comuns de infecções uterinas incluem *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodococcus equi* (Frontoso *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2011).

A designação Pneumovagina refere-se à presença intermitente ou contínua de ar na vagina. As éguas propensas a desenvolverem pneumovagina tendem a ter um declive da vulva e o ânus com uma posição mais cranial. O encerramento inadequado dos lábios vulvares tem como consequência a aspiração de ar associada a contaminação da vagina com material fecal e bactérias, sendo um factor contributivo para o desenvolvimento de infecção no útero (Hurtgen, 2006; Newcombe, 2011; Lopes, 2013).

As bactérias que fazem parte da microflora genital equina são facilmente introduzidas no útero, por exemplo durante o acasalamento, mas só raramente dão origem a uma infecção no endométrio. Muitas bactérias comensais incluindo *Escherichia coli*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equisimilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. fazem parte da flora normal da genitália exterior de cavalos e não são considerados como patogénicos. No entanto, alterações da flora bacteriana na genitália exterior podem causar o crescimento de bactérias oportunistas tal como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus zooepidemicus* que podem causar infertilidade nas fêmeas. Os machos que possuam uma flora bacteriana anormal onde fazem parte bactérias patogénicas são portadores assintomáticos, no entanto, através do acasalamento, estas bactérias patogénicas podem causar endometrite e redução da fertilidade. As bactérias envolvidas na endometrite equina são na sua maior parte consideradas patógenos oportunistas. Estas bactérias são capazes de colonizar o tracto genital inferior bem como uma variedade de localizações extra genitais, mas geralmente são impedidas de ascender ao útero por defesas do hospedeiro, em particular por protecção da flora vaginal endógena e actividades locais do sistema imunitário inato e adquirido. Assim, as bactérias que são capazes de estabelecer endometrite diferem fisiologicamente da microflora genital por diversas características que promovem a colonização e a causa de danos no endométrio. O conceito de que alguns mecanismos de virulência são suficientes para explicar o porquê de uma bactéria causar endometrite pode simplificar a natureza complexa desta doença (Samper e Tibary, 2006; Wittenbrink *et al.*, 1997; Wittenbrink, 2012).

A endometrite equina resulta de interacções complexas entre potenciais patógenos bacterianos uterinos e factores do hospedeiro. Os factores do hospedeiro que podem exercer influências significativas sobre o desfecho clínico incluem a constituição genética e a situação hormonal da égua, a presença de defeitos anatómicos no tracto genital, idade e mecanismos de defesa tal como a fagocitose e mecanismos da imunidade humoral nas secreções uterinas. As deficiências no sistema imunológico uterino local associadas com o aumento das secreções uterinas ou remoção mecânica do fluido uterino parecem ser de grande importância na patogénese da endometrite equina. As éguas com estes problemas têm uma capacidade limitada de eliminar as bactérias que entram no útero (Wittenbrink *et al.*, 1997; Wittenbrink, 2012).

Embora muitas vezes a endometrite equina se baseie numa mono-infecção deve-se considerar que, por vezes, podem ocorrer infecções mistas. Estas infecções mistas e também

infecções provocadas por bactérias fastidiosas como *Mycoplasma* spp. ou mesmo pelo género *Chlamydia*, não podem ser detectadas por testes bacteriológicos comuns. A bactéria *Mycoplasma* spp. tem vindo a ser isolada a partir da genitália externa e do sémen de cavalos normais e inférteis, mas o seu papel na infecção uterina não é bem conhecida. Bactérias como *Mycoplasma equigenitalium*, *Mycoplasma subdolum* e *Acholeplasma* spp. têm sido associadas com infertilidade, endometrite, vulvite e aborto em éguas e a fertilidade reduzida e balanopostite em machos. As bactérias *Mycoplasma equigenitalium* e *Mycoplasma subdolum* foram isoladas do trato genital de éguas e fetos equinos de abortos. Porém a detecção de *Mycoplasma* spp. nem sempre é associada a fertilidade reduzida (Samper e Tibary, 2006; Wittenbrink, 2012).

Com base na etiologia e fisiopatologia, a endometrite pode dividir-se em várias categorias: endometriose (endometrite crónica degenerativa), doenças sexualmente transmissíveis, endometrite persistente induzida por acasalamento (PMIE) e endometrite crónica infecciosa. No entanto, estas categorias não são absolutas, podendo as éguas mudar de categoria durante as épocas de reprodução ou encaixar-se em várias categorias. A endometriose é uma condição crónica degenerativa do endométrio e supõe-se que seja irreversível. É caracterizada por um desenvolvimento fibroso no endométrio. Como em outros órgãos, a fibrose pode ser uma sequela patológica de muitas doenças inflamatórias crónicas. No entanto, os mecanismos etiológicos e fisiopatológicos envolvidos na endometriose ainda são controversos. As doenças sexualmente transmissíveis são as infecções agudas que são induzidas após o acasalamento com machos que são portadores de *Taylorella equigenitalis* e alguns serótipos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia*. Apesar de a endometrite ser um acontecimento fisiológico normal após o acasalamento, se a inflamação persistir não é possível assegurar o desenvolvimento da gestação, neste caso estamos na presença de PMIE. A PMIE pode estar associada a infecções bacterianas ou pode ocorrer em resposta ao sémen. Na maioria dos casos, a PMIE é o resultado da combinação de sémen e bactérias, pois as bactérias podem entrar no útero durante o acasalamento. Portanto, não é possível designar se o agente inflamatório é o sémen ou as bactérias. As éguas afetadas por PMIE, inicialmente na época de reprodução, podem desenvolver uma infecção uterina crónica. Em alternativa, as éguas que não apresentam história prévia de PMIE podem apresentar uma infecção uterina (Watson, 2000; Woodward *et al.*, 2012; Rebordão *et al.*, 2014).

Uma égua saudável, no que diz respeito ao sistema reprodutor, irá combater a contaminação uterina com uma resposta inflamatória transitória, que inclui a activação do sistema humoral, recrutamento de células polimorfonucleares para fagocitose de bactérias, libertação de prostaglandinas e aumento da contracção uterina. Isto faz com que as éguas que produzam eficazmente esta resposta sejam consideradas resistentes à endometrite. Éguas que não tenham uma resposta eficaz e rápida, são consideradas susceptíveis (Lopes, 2013).

O diagnóstico da endometrite baseia-se no historial da égua, exame físico e reprodutivo incluindo ultrasonografia, examinação vaginal, examinação do cérvix e diagnóstico laboratorial. Este último inclui cultura uterina, citologia, biópsia do endométrio e, em alguns casos, avaliação endoscópica do endométrio. Os sinais característicos da endometrite são o acúmulo de líquido intra-uterino, especialmente após o acasalamento. Além disso, vaginite, corrimento vaginal, intervalos entre estros curtos, citologia e cultura uterina positivas indicam, claramente, uma inflamação do útero. A cultura uterina e a citologia são técnicas comuns de diagnóstico da endometrite, através da detecção de patógenos uterinos e células inflamatórias (neutrófilos). Se uma égua tiver uma cultura positiva de um agente patogénico uterino e mais do que dois neutrófilos por campo (ampliação 400x)- citologia uterina positiva, pode ser diagnosticada como tendo endometrite (LeBlanc e Causey, 2009).

1.4- *Taylorella equigenitalis*

A metrite contagiosa equina (CEM) é uma infecção bacteriana do sistema reprodutivo de equinos que causou uma grande preocupação internacional desde que foi reconhecida pela primeira vez como uma doença venérea equina em 1977. O agente etiológico desta doença foi identificado como uma bactéria que nunca tinha sido descrita anteriormente e designada por *Taylorella equigenitalis* (Timoney, 2011).

A CEM é reconhecida como uma doença venérea associada à introdução da bactéria *Taylorella equigenitalis* durante o acasalamento com machos portadores desta bactéria, sendo que é considerada o único agente bacteriano venéreo transmissível em equinos. O resultado da exposição a *Taylorella equigenitalis* nos machos contrasta nitidamente com o que ocorre nas fêmeas sendo que os sinais clínicos de CEM apenas se manifestam nas fêmeas e não nos machos. Nos machos, esta bactéria coexiste como um organismo comensal e coloniza locais específicos na genitália externa. A

sua presença não resulta em sinais clínicos ou qualquer evidência de uma reacção inflamatória sistémica ou local. Uma exposição primária a *Taylorella equigenitalis* na fêmea resulta numa infecção limitada ao sistema reprodutor. O desfecho pode variar desde uma doença evidente de gravidade clínica variável a uma infecção assintomática. Após um período de incubação de 2 a 13 dias, as fêmeas afectadas com CEM apresentam uma descarga vaginal inodora mucopurulenta de cor branca acinzentada de origem uterina. Esta descarga pode variar em termos de volume e persistir por 2 semanas ou mais, em casos não tratados. A CEM é também acompanhada por endometrite, cervicite e vaginite de gravidade variável. A acumulação de líquido intra-uterino pode ser, muitas vezes, detectado através de uma ecografia. A maioria das fêmeas não consegue conceber após a exposição primária a *Taylorella equigenitalis* e voltam ao estro após um período de diestro mais curto. A infertilidade é de curto prazo, no entanto, não têm sido relatados efeitos adversos em éguas infetadas (Schulman *et al.*, 2013; Timoney, 2011; Wittenbrink, 2012).

A infecção por *Taylorella equigenitalis* numa fêmea grávida pode ser sintomática ou assintomática. As fêmeas infectadas que apresentam sintomas podem ou não apresentar descarga vaginal intermitente ao longo da gravidez. Alguns desses casos podem acabar por desenvolver placentite de baixo grau. A ocorrência de aborto no 7.º a 8.º mês de gestação é uma consequência muito rara da infecção. Embora a permanência de *Taylorella equigenitalis* na fêmea depois da recuperação da fase aguda não dure mais do que algumas semanas, algumas poderão continuar a ser portadoras por alguns meses ou até anos. Na maioria destas portadoras, a zona do clitóris funciona como reservatório desta bactéria (Schulman *et al.*, 2013; Timoney, 2011).

A bactéria *Taylorella equigenitalis* é classificada como Gram-negativa de crescimento lento, microaerófila não móvel e, frequentemente, apresenta-se na forma de cocobacilos pleomórficos ou bacilos. A sobrevivência de *Taylorella equigenitalis* fora de um organismo é aparentemente curta, sendo que é susceptível a vários desinfectantes, luz ultravioleta, temperaturas elevadas e a humidade reduzida. São reconhecidas dois biótipos de *Taylorella equigenitalis*: resistentes à estreptomicina e sensíveis à estreptomicina, ambas descritas como causadoras de CEM. O isolamento de *Taylorella equigenitalis* requer meios enriquecidos tal como Eugon Agar Chocolate, contendo uma selecção de agentes antimicrobianos de modo a controlar a maior parte das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas contaminantes que colonizam os locais de persistência de *Taylorella equigenitalis*. Para a cultura de *Taylorella equigenitalis* ter sucesso é também necessário manter as culturas incubadas em

condições de microaerofilia durante cerca de 7 dias. Em termos de propriedades bioquímicas, esta bactéria é relativamente não reactiva. É não fermentativa e não proteolítica mas positiva para a citocromo oxidase, catalase e fosfatase alcalina. Evidências mostram que *Taylorella equigenitalis* é um patógeno natural de equídeos, particularmente cavalos. Sob condições experimentais, esta bactéria foi transmitida com sucesso a burros mas não a bovinos, suínos, ovinos ou gatos. Não existem evidências que indiquem que esta bactéria seja transmissível a humanos (Schulman *et al.*, 2013; Timoney, 2011).

Em 2001 confirmou-se a existência de uma segunda espécie do género *Taylorella* isolada de burros machos, a qual se deu o nome de *Taylorella asinigenitalis* (Jang *et al.*, 2001). Esta bactéria não está associada até ao momento a CEM, não sendo distinguível de *Taylorella equigenitalis* por métodos microbiológicos, sendo necessário usar métodos moleculares para a distinção (Duquesne *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2001; Schulman *et al.*, 2013).

1.5- *Streptococcus zooepidemicus*

As infecções por estreptococos, nomeadamente as infecções uterinas provocadas por *Streptococcus zooepidemicus*, foram estabelecidas como a principal causa de endometrite causada por bactérias em éguas. A bactéria *Streptococcus zooepidemicus* é o agente mais importante na endometrite bacteriana em éguas sendo que possui uma taxa de mais de 50% de casos de endometrite (Wittenbrink, 2012). Esta bactéria também contribui significativamente para a perda fetal, sendo que é identificado como agente etiológico primário em 15-20% de abortos equinos. A grande prevalência de infecções genitais e extragenitais com *Streptococcus zooepidemicus* em cavalos aponta para uma adaptação desta bactéria piogénica para este hospedeiro (Wittenbrink *et al.*, 2008; Proietti *et al.*, 2011).

Streptococcus zooepidemicus é uma bactéria Gram-positiva, pertence ao grupo C de Lancefield, e pode causar doenças tanto em animais como em humanos, sendo considerado uma das principais espécies de estreptococos zoonóticos. Vários surtos de infeções humanas causadas por esta bactéria foram atribuídos ao consumo de produtos lácteos não pasteurizados e várias doenças clínicas foram relatadas, tais como meningite, septicemia, artrite purulenta, nefrite e endocardite. *Streptococcus zooepidemicus* é uma bactéria anaeróbia facultativa, catalase negativa, oxidase negativa e é nutricionalmente fastidiosa crescendo em meios ricos reforçados com a adição de sangue ou soro. As

colónias de *Streptococcus zooepidemicus* são grandes tendo mais de 0,5 mm de diâmetro e produzem β -hemólise em agar sangue. No que se refere à sua morfologia, esta ocorre em cocos em cadeias. A morfologia das colónias pode ser desde a mucóide translúcida a cinzenta mate ou branca. Reacções positivas nos testes da lactose e sorbitol são típicas da presença de *Streptococcus zooepidemicus*, enquanto que reacções negativas nestes testes são usualmente indicativas de *Streptococcus equi*. Esta bactéria pode ser encontrada na nasofaringe, nas amígdalas, no trato respiratório e nas membranas mucosas genitais de equinos e bovinos (Kuusi *et al.*, 2006; Proietti *et al.*, 2011; Lindahl, 2013; Piedade *et al.*, 2013; Pinho, 2014).

Embora esta bactéria tenha um alto grau de homologia de DNA com o seu biovar *Streptococcus equi*, estas diferem muito na sua biologia e patogenicidade. Ao contrário de *Streptococcus equi* que apenas causa doenças em cavalos, *Streptococcus zooepidemicus* é uma bactéria comensal oportunista e causa doenças em situações de infecções por vírus, stress por calor e lesões dos tecidos numa grande variedade de animais. A bactéria *Streptococcus zooepidemicus* partilha cerca de 80% de sequências idênticas de DNA com a bactéria *Streptococcus pyogenes*, um importante patógeno restrito a humanos que tem sido associado a diversas doenças (Timoney, 2004; Ma *et al.*, 2013; Waller e Robinson, 2013).

1.5.1- Produção de factores de virulência por *Streptococcus zooepidemicus*

A patogénese da endometrite induzida por *Streptococcus zooepidemicus* baseia-se nas interações entre os factores de virulência da bactéria e os tecidos do hospedeiro afectados (Wittenbrink *et al.*, 2008). Os factores de virulência estão associados com a virulência e a patogénese dos agentes infecciosos (Hong *et al.*, 2005). A bactéria *Streptococcus zooepidemicus* expressa muitas das mesmas proteínas e factores de virulência que *Streptococcus equi* (Ma *et al.*, 2013). A compreensão do papel desempenhado pelos factores de virulência pode ajudar a elucidar a compreensão da patogénese da infecção e a identificar potenciais pontos de tratamento ou vacinação (Barret, 2011).

Diversos componentes bacterianos têm sido relatados como factores de virulência de *Streptococcus zooepidemicus* incluindo proteínas M-like, lipoproteínas ligadoras de metais (MBLS), proteínas de ligação a imunoglobina e fibronectina. No entanto, os papéis funcionais destes factores na virulência ou na patogénese desta bactéria permanecem ainda desconhecidos. Sabe-se que a

bactéria *Streptococcus zooepidemicus* se liga às proteínas da matriz extracelular, bem como às células endoteliais e epiteliais. Porém, os mecanismos pelos quais esta bactéria invade o hospedeiro ainda não são claros (Hong *et al.*, 2005).

A hialuronidase é produzida por algumas estirpes de *Streptococcus zooepidemicus*, mas é questionável se deve ser considerada um factor de virulência pois a sua produção deve tornar o organismo mais sensível à fagocitose através da remoção da cápsula (Timoney, 2004).

Dada a variada antigenicidade de *Streptococcus zooepidemicus* e a natureza oportunista das infecções que causa, vacinas e regimes de vacinação serão difíceis de desenvolver (Timoney, 2004).

1.5.1.1- Proteínas M-like

A superfície bacteriana inclui proteínas que estão envolvidas na aderência bacteriana ou protecção (contra toxinas, condições ambientais ou respostas do hospedeiro). Algumas proteínas também disponibilizam às bactérias uma maior capacidade de adquirir nutrientes, permitir a interacção entre outras bactérias e competir por nichos ambientais específicos. Determinadas proteínas de superfície são também essenciais para o crescimento bacteriano, manutenção e divisão celular. Alguns exemplos incluem os componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz (MSCRAMM) que atuam como ligandos, as cápsulas bacterianas anti-fagocíticas, transportadores que auxiliam na aquisição de nutrientes e toxinas extracelulares que danificam ou perturbam o sistema imunitário do hospedeiro. Indiscutivelmente, as proteínas associadas à parede celular em estreptococos mais estudadas são a família das proteínas M de *Streptococcus pyogenes* e outras proteínas M identificadas nos grupos C e G de estreptococos (Barret, 2011).

As proteínas M associadas à parede celular de *Streptococcus pyogenes* foram descobertas pela primeira vez na década de 1920 e desde então a evidência das suas propriedades antifagocíticas levou ao desenvolvimento de um extenso estudo sobre estas proteínas. A designação *M-like* é aplicada às proteínas de superfície fibrilares de estreptococos que possuem uma variedade de interações do ligando mas com características estruturais comuns, incluindo o sinal e as sequências associadas à parede celular, regiões variáveis N-terminais, repetições C centrais conservadas e domínios C-terminais ricos em prolina. O termo proteína M deve ser usado para as proteínas *M-like* que induzem anticorpos específicos opsonicos para a estirpe da qual a proteína deriva. Estas proteínas com estas

características foram descritas pela primeira vez para estreptococos do grupo A de Lancefield e subsequentemente foram descobertas em estreptococos do grupo C e G. A actividade antifagocítica das proteínas *M-like* parece estar associada com duas propriedades: a capacidade de inibir a deposição do componente do complemento C3b na superfície da bactéria e a capacidade de se ligar ao fibrinogénio que posteriormente inibe a fagocitose (Timoney *et al.*, 1997; Harrington *et al.*, 2002).

Já há muito foi estabelecido que as proteínas M têm funções de virulência, principalmente por inibirem a fagocitose na ausência de anticorpos opsonicos. As estirpes que não expressam proteínas M não são virulentas (Barret, 2011).

A bactéria *Streptococcus zooepidemicus* expressa duas proteínas *M-like* conhecidas como SzP e SzM que são antigenicamente variáveis entre estirpes (Barret, 2011).

A proteína *M-like* SzP da bactéria *Streptococcus zooepidemicus* possui 40,1 kDa de massa atómica e é uma proteína ácido-resistente. Esta proteína não possui domínios de repetição A, B ou C como as proteínas *M-like* do grupo A, que parecem estar apenas relacionadas distantemente (Timoney *et al.*, 1997).

Ao contrário das proteínas M, que são extremamente variáveis dentro de 40 a 50 resíduos do N-terminal, a proteína SzP possui a região variável aproximadamente a 70 resíduos do N-terminal. Enquanto que o N-terminal das proteínas M contem epítomos específicos e epítomos opsonicos, a relação entre os segmentos hipervariáveis SzP e os tipos serológicos SzP ou a actividade opsonica de anticorpos ainda não foi estabelecida. É possível que as proteínas SzP tenham um papel antifagocítico análogo às proteínas M do grupo A de estreptococos, que é essencial no estabelecimento de infecção. Tanto as proteínas M e as proteínas SzP estimulam os anticorpos opsonicos, são protectoras em animais modelo e partilham semelhanças a nível estrutural (Nicholson *et al.*, 2000).

A proteína antifagocítica SeM é um factor de virulência importante e um antígeno protector da bactéria *Streptococcus equi*. Esta proteína liga-se ao fibrinogénio, o que reduz a deposição de C3b na parede celular bacteriana e causa resistência à fagocitose mediada pelos neutrófilos. O registo do genoma total da estirpe H70 de *Streptococcus zooepidemicus* revelou um gene homólogo parcial a *sem*, designado por *szm*. A proteína SzM da estirpe NC78 de *Streptococcus zooepidemicus* assemelha-se a SeM na sua estrutura secundária α -helicoidal, apresenta uma sequência de sinal quase idêntica, liga-se ao fibrinogénio, é opsonogénica e possui propriedades protectoras em ratos (Velineni e Timoney, 2013).

1.5.1.2- Superantigénios

Foram identificadas na década de 1980 estirpes de *Streptococcus pyogenes* com uma elevada mortalidade e morbilidade que produziam superantigénios (sAgs). Os sAgs interferem com o desenvolvimento da resposta imunitária protectora perturbando as respostas das células T específicas para o antígeno e inibindo a produção de anticorpos. Outras propriedades dos sAgs são a capacidade de interromper o mecanismo do complexo principal de histocompatibilidade bem como a capacidade de aumentar a actividade de endotoxinas e causar inflamação local. Anteriormente pensava-se que os sAgs estavam ausentes em *Streptococcus zooepidemicus* pois estirpes com actividade mitogénica foram escolhidas para verificar a presença de sAgs homólogos de *Streptococcus equi* e nenhum foi encontrado. No entanto foram identificados 3 novos sAgs (SzeF, SzeN e SzeP) de *Streptococcus zooepidemicus* (Paillot *et al.*, 2010; Barret, 2011).

A alta prevalência de genes que codificam sAgs em diversas estirpes de *Streptococcus zooepidemicus* sugere que possam existir estirpes em que estes genes residam dentro dos elementos funcionais do prófago e retenham a capacidade de transferência horizontal. Será interessante no futuro determinar se estes genes já foram transferidos para estirpes de *Streptococcus pyogenes* e se tais eventos afectaram a virulência deste patógeno humano importante (Paillot *et al.*, 2010).

1.6- Importância do uso de técnicas moleculares em microbiologia

Como resultado do uso generalizado da técnica de PCR e da sequenciação de DNA, na última década a sequenciação do gene 16S rDNA tem desempenhado um papel crucial na identificação precisa de isolados bacterianos e na descoberta de novas bactérias em microbiologia clínica. A sequenciação do gene 16S rDNA é particularmente importante para a identificação de bactérias com perfis fenotípicos incomuns, bactérias incomuns, bactérias de crescimento lento e bactérias incultiváveis. Entre os três domínios de seres vivos, a maior quantidade de sequenciação do gene rDNA diz respeito às bactérias. Através da sequenciação do gene 16S rDNA, numerosos géneros e espécies de bactérias foram reclassificados e renomeados, a classificação de bactérias incultiváveis foi possível, relações filogenéticas foram determinadas e a descoberta e classificação de novas espécies de bactérias foi facilitada (Woo *et al.*, 2008).

A sequenciação do gene 16S rDNA não só forneceu informações sobre etiologias de doenças infecciosas, mas também auxiliou na escolha de antibióticos e na determinação da duração dos procedimentos de controlo e tratamento de infeções. Com o uso desta técnica novas espécies foram descobertas, algumas destas pertencentes a novos géneros. Em geral, os resultados da sequenciação do gene 16S rDNA fornecem uma maior percentagem de identificação de espécies do que os métodos convencionais da análise microbiológica. A constatação de que a sequenciação do gene 16S rDNA pode ser usada para identificar rapidamente e com precisão a espécie de uma bactéria instaurou uma nova era na detecção e identificação bacteriana. (Woo *et al.*, 2008 e Wilson *et al.*, 2011).

2- Objectivos

Com a realização deste trabalho pretendeu-se como principal objectivo identificar e caracterizar bactérias provenientes de amostras vaginais de Burro de Miranda de modo a estabelecer se estas podiam conduzir a situações de infertilidade e abortos.

Em termos de objectivos específicos pretendeu-se:

- 1) Isolar e identificar bactérias de amostras vaginais de Burro de Miranda e amostras de órgãos de um aborto através de meios de cultura seletivos e não seletivos e provas bioquímicas (Prova da Catalase, Prova da Oxidase e Galerias API[®]);
- 2) Estudar a resistência a 9 antibióticos (Ampicilina, Cefepima, Clindamicina, Cloranfenicol, Eritromicina, Linezolida, Quinupristina- dalfopristina, Tetraciclina e Vancomicina) em *Streptococcus* spp.;
- 3) Analisar os resultados da sequenciação do gene 16S rDNA nos isolados de *Streptococcus* spp.;
- 4) Identificar através da técnica de PCR usando *primers* específicos, os genes codificadores de factores de virulência de *Streptococcus zooepidemicus* (*szeF*, *szeN*, *szeP*, *szm*, *szp*).

3- Material e Métodos

3.1- Historial clínico dos animais estudados

O historial das burras que foram estudadas encontra-se descrito na Tabela 1 (todas as informações e fotografias foram cedidas pela AEPGA).

Tabela 1- Historial dos animais estudados.

Nome	Nº de Registo	Data de nascimento	Data dos últimos partos	Observações
Albertina 	RZLA2819	2007	14-05-2014	-
Algosa 	RZLA2809	2005	31-08-2012 23-05-2014	-
B de Burra	RZLA2574	2006	28-09-2010 (morreu a cria ao 1º dia) 29-05-2011 (abortou)	Tem quistos uterinos.
Belfa 	RZLA2807	2006	15-05-2011 01-06-2014	-
Bruçó	RZLA2808	2006	21-05-2011 30-10-2014	-
Castanha	RZLA2816	2007	04-09-2012	-
Ceteira 	RZLA1787	1997	19-07-2008 11-04-2011	Burra adulta de idade avançada que não conseguiu engravidar nas últimas épocas de reprodução. Edema contínuo em cornos uterinos, ovários pequenos em apalpação transrectal e não tem bons folículos preovulatórios.

Tabela 1 (continuação)- Historial dos animais estudados.

Nome	Nº de registo	Data de nascimento	Data dos últimos partos	Observações
Chiquitita 	RZLA3080	2008	-	Nunca engravidou. Não conseguiu engravidar na última época de reprodução. Ciclo estral ecografico e liquido intrauterino normal.
Daina 	RZLA2817	2008	-	Estava grávida desde o dia 25-04-2014, mas abortou no dia 3 de Janeiro 2015.
Dália 	RZLA2820	2008	28-05-2013	-
Dora 	RZLA2810	2008	20-05-2012 11-06-2014	-
Franjinhas 	RZLA460	1998	12-06-2009 24-10-2010 14-09-2012 29-04-2014	Nas duas últimas épocas de reprodução chegou a terminar a gestação mas teve problemas na expulsão do burrango e precisou de ajuda por não fazer força na expulsão (o que nasceu a 2012-09-14 morreu durante o parto).
Filó 	RZLA2608	2011-09-05	11-05-2014	-
Gaiata 	RZLA2878	06-01-2011	-	Nunca engravidou. Não conseguiu engravidar na última época de reprodução. Ciclo estral ecografico e liquido intrauterino normal.

Tabela 1 (continuação)- Historial dos animais estudados.

Nome	Nº de registo	Data de nascimento	Data dos últimos partos	Observações
Gaivota 	RZLA2607	20-04-2011	-	Nunca engravidou. Aparentemente não tem problemas reprodutivos.
Gorongosa 	RZLA2996	29-07-2011	-	Nunca engravidou.
Hera 	RZLA3068	20-05-2012	-	Nunca engravidou.
Hortense 	RZLA2926	01-05-2012	-	Nunca engravidou.
Ifanes 	RZLA2570	2006	25-09-2012 23-06-2014	-
Irina 	RZLA3047	07-03-2013	-	Nunca engravidou.
Liberdade 	RZLA2811	25-04-2008	27-10-2012 03-05-2015	Aparentemente não tem problemas reprodutivos.

Tabela 1 (continuação)- Historial dos animais estudados.

Nome	Nº de registo	Data de nascimento	Data dos últimos partos	Observações
Maceda	RZLA2576	2005	20-02-2010 05-05-2012 09-04-2014	-
Meruma	RZLA2956	2008	07-11-2013	-
Nassa 	RZLA2813	2000	21-09-2009 10-05-2012	Abortou 2 meses antes da data prevista do último parto (2015-03-30): tinha um problema grave de laminite e estava medicada com tratamento prolongado com um anti-inflamatório não esteróides. Suspeita-se que o aborto tenha ocorrido devido às grandes dores que tinha e por causa da medicação.
Outeira 	RZLA2814	2006	28-02-2010 30-05-2012 06-03-2014 21-04-2015	-
Rosinha	RZLA3064	2007	18-06-2014	-
Serralves 	RZLA1784	2002	01-06-2006 06-03-2008 (gémeos com sucesso) 20-04-2011 05-06-2014	Em 2012 engravidou de trigémeos. Nenhum sobreviveu.

3.2- Colheita e transporte das amostras vaginais

As amostras foram recolhidas em Miranda do Douro pela AEPGA. Foi feita a colheita de amostras vaginais de 27 burras de Miranda do Douro entre Outubro de 2014 e Fevereiro de 2015. Antes da colheita da amostra foi efectuada a lavagem da zona genital com água de modo a eliminar possíveis contaminações. Para cada burra foram realizadas duas colheitas: uma das amostras foi transportada refrigerada até ao laboratório em meio Amies Charcoal (Remel)(Figura 2) de modo a preservar a viabilidade das bactérias presentes na amostra; a outra amostra foi transportada à temperatura ambiente até ao laboratório em Caldo nutritivo de modo a preservar a viabilidade de *Mycoplasma spp.*, se este estivesse presente.



Figura 2- Meio de transporte Amies Charcoal (Remel).

3.3- Processamento das amostras vaginais

Para as amostras transportadas em meio Amies Charcoal foi realizada a diluição em solução salina, antes de serem inoculadas através do método da estria nos meios de cultura:

- BHI sangue (para assegurar o crescimento de bactérias que se encontram normalmente no trato vaginal);
- MacConkey (para assegurar o crescimento de bacilos Gram-negativos);
- Chromocult (para assegurar o crescimento de bactérias coliformes);
- CNA (para assegurar o crescimento de bactérias Gram-positivas);
- Columbia Chocolate suplementado com sangue de cavalo 5% e estreptomicina e Columbia Chocolate suplementado com sangue de cavalo 5% e anfotericina B e cristal de violeta (de modo a assegurar o crescimento de *Taylorella equigenitalis*, caso esta estivesse presente na amostra);
- Cetrimida (de modo a assegurar o crescimento de *Pseudomonas spp.* caso estivesse presente na amostra).

Após a inoculação as placas foram incubadas na estufa entre 24 a 48 horas, a 37°C, com excepção das placas de Columbia Chocolate suplementado com sangue de cavalo 5% e estreptomicina e Columbia Chocolate suplementado com sangue de cavalo 5% e anfotericina B e

cristal de violeta, que foram incubadas na estufa a 37°C, durante cerca de 5 a 7 dias numa jarra de anaerobiose em condições de microaerofilia (10% de dióxido de carbono).

Nos tubos com meio Rappaport-Vassiliadis foi colocado 0,5 ml da diluição feita na solução salina (este meio foi utilizado para verificar se a amostra continha *Salmonella* sp.). A incubação destes tubos foi feita num banho maria a 37°C entre 24 a 48 horas. Se após este período o meio não apresentasse viragem de cor, estes eram descartados e considerava-se que *Salmonella* sp. não estava presente na amostra.

Para as amostras transportadas em Caldo nutritivo foi realizado o seguinte procedimento:

- Centrifugou-se a amostra (cerca de 10ml) a 3000 rpm/5 min;
- Aspirou-se, com uma seringa o sobrenadante;
- Com um filtro de 0,45 µm, ajustado à seringa, depositou-se sobre a superfície do meio Mycoplasma Agar Base com o suplemento Mycoplasma selective supplement-G SR0059C, 5 a 6 gotas e efectuou-se o método de inundação.

Após a inoculação as placas foram incubadas na estufa a 37°C durante 4 a 14 dias, numa atmosfera húmida (para se obter este efeito as placas foram colocadas dentro de uma saca plástica). As placas foram observadas ao microscópio e descartadas após 14 dias, se não se observasse as colónias típicas em forma de “ovo estrelado” (Figura 3).



Figura 3- *Mycoplasma* spp. observado a partir da objectiva de 10x do microscópio óptico.

3.4- Amostras de órgãos provenientes de um aborto

O produto de aborto da burra Daina de dia 3 de Janeiro de 2015 foi congelado pela AEPGA e transportado para Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD. A necrópsia foi realizada no dia 4 de Março e foram enviados para o Laboratório de Microbiologia Médica da UTAD amostras de líquido placentário, cordão umbilical, fígado, pulmão e medula óssea. Estas amostras foram processadas e inoculadas da mesma forma que as amostras vaginais.

3.5- Isolamento das diferentes espécies de bactérias

Após o período de incubação das placas na estufa, procedeu-se à observação e realização de colorações de Gram às diferentes colónias que as placas apresentaram. Após a observação da morfologia das colónias foram feitas repicagens sucessivas (para meios apropriados) de modo a obter-se culturas puras. Durante este processo foram também realizadas colorações de Gram de modo a verificar se a cultura estava pura. Quando as culturas se encontravam puras, uma colónia era repicada, se possível, para meio BHI agar para se realizar a prova da catalase e a prova da oxidase. Após a realização destas provas se as bactérias estivessem incluídas nos grupos de identificação das galerias API 20 Strep, API 20 E e API 20 NE procedia-se à realização de um destes sistemas de identificação de modo a tentar identificar qual a espécie da bactéria.

3.6- Meios de cultura

Durante o decorrer do trabalho utilizaram-se 12 meios de cultura selectivos e não-selectivos:

- BBL TM Columbia CNA Agar (Agar Columbia CNA) (BD) com 5% de sangue de ovino;
- Brain Heart Infusion Agar (BHI) (Liofilchem);
- Brain Heart Infusion Agar com 5% de sangue de ovino (BHI) (Liofilchem);
- Cetrimide- Agar (Merck);
- Chromocult[®] Coliform Agar (Merck);
- Columbia Agar Base Chocolate com 5% de sangue de cavalo, anfotericina B e cristal de violeta (Oxoid);
- Columbia Agar Base Chocolate com 5% de sangue de cavalo e estreptomicina (Oxoid);
- Mueller Hinton Agar (Liofilchem) com 10% sangue ovino;
- MacConkey Agar (Merck);
- Mycoplasma Agar Base (Oxoid) com suplemento Mycoplasma selective supplement- G SR0059C;
- Rappaport- Vassiliadis (RV) Enrichment Broth (Oxoid);
- Skim Milk Powder (Oxoid).

As respectivas funções, composição e preparação de cada meio podem ser consultadas em anexo na Tabela 10.

3.7- Provas de identificação e técnicas de identificação usadas

3.7.1- Coloração de Gram

Esta técnica de coloração diferencial de bactérias permite distinguir bactérias Gram-negativas de bactérias Gram-positivas com base nas diferenças que existem na parede celular, através de microscopia óptica. Auxilia na visualização da morfologia das bactérias e na previsão do género a que pertence a bactéria.

Procedimento:

1. Preparar o esfregaço, cobrir o mesmo com o corante violeta de metilo e deixar actuar durante um minuto;
2. Lavar com água destilada;
3. Cobrir o esfregaço com o mordente lugol e deixar actuar durante 30 segundos;
4. Descorar com álcool até que o produto da lavagem seja transparente e de seguida lavar com água destilada;
5. Cobrir o esfregaço com o corante vermelho neutro deixando actuar durante 2 minutos;
6. Lavar com água destilada;
7. Secar a lâmina em papel de filtro e observar com a objectiva 100x, com óleo de imersão.

As bactérias que são visualizadas a azul (Figura 2), são Gram-positivas, enquanto que aquelas que são visualizadas com uma cor avermelhada são Gram-negativas. Por vezes pode-se observar bactérias aparentemente Gram-negativas mas que na realidade são Gram-positivas. Este facto deve-se à presença de bactérias envelhecidas visto que estas perderam a capacidade de resistir à descoloração pelo álcool, sendo por isso importante efectuar o esfregaço a partir de culturas jovens, antes do término da fase de

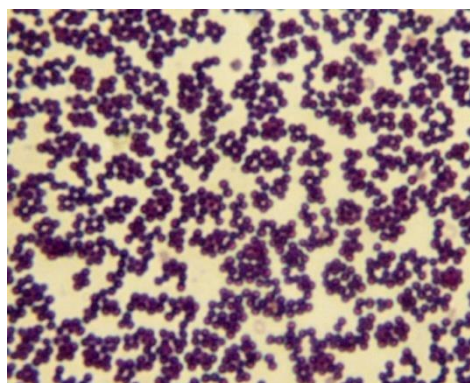


Figura 2- Coloração de Gram de *Staphylococcus* spp. (Ampliação 100x).

crescimento logarítmica. Quando não se tem a certeza se as bactérias visualizadas são Gram-negativas recorre-se à prova do hidróxido de potássio para verificar se estas são na realidade Gram-negativas ou Gram-positivas.

3.7.2- Prova do hidróxido de potássio 3%

Esta prova baseia-se no facto de se conseguir lisar facilmente a parede celular das bactérias Gram-negativas por uma solução alcalina diluída, e os restos de DNA libertados permanecerem agregados na suspensão, apresentando a formação de um filamento. As bactérias Gram-positivas por apresentarem uma parede celular mais resistente, não apresentam este aspecto.

Procedimento:

1. Colocar uma gota de KOH a 3% numa lâmina e fazer uma suspensão, bem homogeneizada, com uma ansa, levantando-se várias vezes 1 a 2 cm;
2. Observar se, ao levantar a ansa, ocorre a formação de um fio, a reacção é considerada positiva, indicando a presença de bactérias Gram-negativas.

3.7.3- Prova da catalase

Esta prova baseia-se na detecção da enzima catalase em microrganismos. Se o microrganismo possuir esta enzima degrada o peróxido de hidrogénio, havendo produção de efervescência. Esta prova é essencialmente utilizada para fazer a distinção entre *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp..

Procedimento:

1. Colocar uma gota de peróxido de hidrogénio numa lâmina e com o fio recto colocar a colónia em estudo na lâmina;
2. Observar se existe formação de bolhas de ar.

3.7.4- Prova da oxidase

Esta prova permite distinguir grupos de microrganismos tendo como base a actividade da enzima citocromo oxidase. Esta prova é muito útil para fazer a distinção entre enterobactérias e outros bacilos Gram-negativos não enterobactérias.

Procedimento:

1. Retirar com uma pipeta de *pasteur* de vidro uma colónia a testar e colocar numa tira de papel embebida no reagente da oxidase.
2. Observar se as colónias desenvolvem uma cor azul na tira de papel. Se tal acontecer a bactéria tem actividade da enzima citocromo oxidase.

3.7.5- Galerias API[®] (bioMérieux)

As Galerias API[®] são sistemas de identificação que se baseiam numa galeria de testes bioquímicos e numa base de dados. Neste trabalho foram utilizados os sistemas API 20 Strep (para identificação de estreptococos e bactérias relacionadas), API 20 E (para identificação de bacilos Gram-negativos, nomeadamente enterobactérias) e API 20 NE (para identificação de bacilos Gram-negativos não enterobactérias). Estes sistemas de identificação baseiam-se no facto de as provas bioquímicas testadas possuírem um resultado positivo ou negativo e no final obtêm-se um número, consoante o resultado das provas bioquímicas. Este número é consultado na base de dados e dá-nos o nome da espécie identificada.

3.8- Estudo da sensibilidade a antibióticos

3.8.1 - Antibióticos estudados

Foi determinada a sensibilidade aos seguintes antibióticos:

Streptococcus spp.:

- ❖ Ampicilina (10 µg);
- ❖ Cefepima (30 µg);
- ❖ Clindamicina (2 µg);
- ❖ Cloranfenicol (30 µg);
- ❖ Eritromicina (15 µg);
- ❖ Linezolida (30 µg);
- ❖ Quinupristina- dalfopristina (15 µg);
- ❖ Tetraciclina (30 µg);
- ❖ Vancomicina (30 µg).

Todos os antibióticos testados foram utilizados conforme as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013). Os halos de inibição de cada antibiótico estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2- Antibióticos usados em *Streptococcus* spp. e respectivo valor dos halos de inibição (CLSI, 2013).

Antibiótico	Halos de inibição (mm)		
	Resistente	Intermédio	Sensível
Ampicilina	-	-	≥24
Cefemima	-	-	≥24
Clindamicina	≤15	16-18	≥19
Cloranfenicol	≤17	18-20	≥21
Eritromicina	≤15	16-20	≥21
Linezolida	-	-	≥21
Quinupristina- dalfopristina	≤15	16-18	≥19
Tetraciclina	≤18	19-22	≥23
Vancomicina	-	-	≥17

3.8.2- Determinação da sensibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar

Este método foi realizado pela técnica de Kirby-Bauer e interpretado seguindo as normas do CLSI (CLSI, 2013).

Preparação do inóculo: a partir duma placa com a estirpe pura recolheram-se 3 a 4 colónias para um tubo de ensaio com soro fisiológico esterilizado (NaCl a 0,9%) até se obter uma turvação de 0,5 da escala de McFarland.

Inoculação da placa: com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada, semeou-se a superfície de uma placa de Mueller Hinton na sua totalidade, de uma forma homogénea. Com uma pinça, colocaram-se até 5 discos de antibiótico por placa. Incubaram-se as placas durante 24 horas a 37°C ao fim do qual se mediram os halos de inibição.

3.9- Reacção em cadeia por acção da polimerase (PCR)

Para a execução da técnica de PCR foi utilizada a metodologia e o material descrito seguidamente.

3.9.1- Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo InstaGene™ Matrix (Bio-Rad). Desta forma, suspenderam-se colónias de *Streptococcus* spp. de uma cultura pura, em 1 ml de água destilada

esterilizada num *eppendorf*. Seguidamente centrifugou-se durante 1 min a 12000 rpm e retirou-se o sobrenadante. De seguida, adicionaram-se 200 µl de resina de extracção ao *pellet* e colocaram-se os *eppendorfs* em banho-maria durante 20 minutos a 56°C. Agitou-se a suspensão no vortex e colocou-se num banho durante 8 min a 100°C. Por fim, agitou-se novamente no vortex e centrifugou-se 3 min a 12 000 rpm.

Após a extracção mediu-se a concentração de DNA usando um espectrofotómetro Nanodrop-1000. Como parâmetros óptimos definiu-se a concentração entre 300 e 600 ng. Finalmente o DNA extraído foi guardado a 4°C no frigorífico.

3.9.2- Preparação dos tubos de PCR

Cada tubo de PCR tem o volume final de 50 µl dos componentes descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Componentes e concentrações usadas para a reacção de PCR.

Componentes	Concentração	Volume por tubo
MyTaq™ HS Mix (MyTaq buffer, dNTPs, MgCl ₂)	2x	25 µl
<i>Primer Forward</i>	20 µM	1 µl
<i>Primer Reverse</i>	20 µM	1 µl
DNA	-	1 µl
Água MiliQ	-	Até perfazer 50 µl

Os *primers* utilizados foram sintetizados pela Invitrogen™ e o termociclador usado foi do modelo Biometra® T300. Em todas as reacções de PCR foi incluído um controlo negativo (sem DNA).

3.9.3- Primers e condições de PCR utilizadas

As sequências dos *primers*, condições de amplificação da reacção de PCR e o tamanho do amplicão, estão descritos, para cada caso, na Tabela 4.

Tabela 4- Sequências de nucleótidos dos *primers* de PCR.

Primers: sequência 5' a 3'	Condições	Referência
16SP0	95°C 5 min 1 ciclo	Leroy <i>et al.</i> , 2011
5'-GAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	95°C 30 s 56,5°C 30 s 72°C 2 min } 25 ciclos	
16SP6		
5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'		
16SP6	72°C 10 min 1 ciclo	
szeFF	95°C 15 min 1 ciclo	Paillot <i>et al.</i> , 2010
5' CATAAAGTTAGTCGTGCAGAG 3'	94°C 30 s 59°C 30 s 72°C 1 min } 35 ciclos	
szeFR		
5' CGATGACGATGATTCACATCA 3'		
16SP6	72°C 10 min 1 ciclo	
szeNF	95°C 15 min 1 ciclo	Paillot <i>et al.</i> , 2010
5' GACACCGGTAACATTTCAAGAG 3'	94°C 30 s 59°C 30 s 72°C 1 min } 35 ciclos	
szeNR		
5' GGGTTGACCACTCTTGTAG 3'		
16SP6	72°C 10 min 1 ciclo	
szePF	95°C 15 min 1 ciclo	Paillot <i>et al.</i> , 2010
5' TCCAGTTGAGAAATCCTGGC 3'	94°C 30 s 59°C 30 s 72°C 1 min } 35 ciclos	
szePR		
5' CCTAAAAATTTGACATCAAGTG 3'		
16SP6	72°C 10 min 1 ciclo	
szmF	95°C 2 min 1 ciclo	Velineni e Timoney, 2013
5' ATA AAG AAG TTC CTG TCA TTA 3'	94°C 30 s 55°C 30 s 72°C 1 min } 30 ciclos	
szmR		
5' CAA CAG ACA GGA GAC TGT TGC 3'		
16SP6	72°C 10 min 1 ciclo	
szpF	95°C 2 min 1 ciclo	Akineden <i>et al.</i> , 2005
5' ACA AAA GGG GAA TAA AAT GGC 3'	94°C 30 s 5°C 60 s 72°C 150 s } 30 ciclos	
szpR		
5' TTT ACC ACT GGG GTA TAA GGC TT 3'		
16SP6	72°C 5 min 1 ciclo	

3.10- Eletroforese em gel de agarose

Após a realização da técnica de PCR, procedeu-se à visualização dos amplicões obtidos através da eletroforese horizontal em gel de agarose.

Os géis foram preparados a uma concentração de agarose D-1, entre 1% e 2%, consoante o tamanho dos fragmentos esperados. O tampão utilizado foi TBE 1X (constituído por: TBE 5X: 54g/l Tris (hidroximetil) aminometano; 27,5 g/l ácido bórico; 20 ml EDTA 0,5M (pH 8).

A mistura foi aquecida num micro-ondas até à fervura da agarose e de seguida adicionou-se 10 µl de RedSafe™ (iNtRON BIOTECHNOLOGY) (20 000x). Colocou-se a mistura num suporte com um pente para formar os poços. Após o gel polimerizar, depositaram-se nos poços 10 µl do produto de PCR, juntamente com 2 µl de tampão de carga (constituído por 10% sacarose, 0,0025% azul de bromofenol em TE [10mM Tris (hidroximetil) aminometano, 1mM EDTA pH8]).

A eletroforese foi realizada a 96 V durante 45 minutos. Para visualizar e fotografar o gel foi utilizado o captador de imagem “Gel Molecular Imager® Gel Doc™ XR+” com o *software* “Image Lab™” (Bio-Rad).

3.11- Sequenciação

Para os isolados que, a partir de colorações de Gram, prova da catalase e prova da oxidase apontavam ser *Streptococcus* spp., foi realizada a sequenciação do gene 16S rDNA, de modo a identificar a espécie de cada isolado. Depois de visualizar os produtos de PCR, os amplicões do gene 16S rDNA foram sequenciados. A sequenciação foi realizada através do uso dos mesmos primers utilizados para a reacção de PCR. O serviço de sequenciação foi realizado pela Stab Vida.

A análise das sequências obtidas foram realizadas através de diversas ferramentas bases de dados que permitem obter o alinhamento de sequências, comparar e identificar as espécies das bactérias estudadas, alojadas nos seguintes links disponíveis na internet:

- <http://www.attottron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

4- Resultados

4.1- Bactérias isoladas das amostras vaginais

De um total de 54 amostras vaginais de 27 burras de Miranda foram obtidos 149 isolados. Entre estes isolados identificaram-se 130 bactérias Gram-positivas tais como 59 *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. ou *Rhodococcus* spp, 9 *Streptococcus* spp., 21 *Staphylococcus* spp. e 32 *Lactobacillus* spp.; 14 bactérias Gram-negativas tais como 3 *Neisseria* spp. e 6 *Pseudomonas* spp. e 5 *Mycoplasma* spp.. Constata-se que o número de bactérias Gram-positivas é muito maior que o número de bactérias Gram-negativas isoladas, sendo que cerca de 87% das bactérias isoladas são Gram-positivas.

As Tabelas 5 e 6 apresentam, respectivamente, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas, testes bioquímicos realizados e outras informações relevantes para a identificação destas bactérias. Como se pode ver na Tabela 6, o maior número de bactérias isoladas Gram-positivas pertence ao grupo dos *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. ou *Rhodococcus* spp., com 59 isolados, seguido de *Lactobacillus* spp., com 32 isolados e de *Staphylococcus* spp., com 21 isolados, respectivamente.

Verificou-se que a flora bacteriana vaginal não diferiu muito entre amostras, pois normalmente verificava-se sempre o crescimento de colónias pequenas hemolíticas (possivelmente *Streptococcus* spp.; de referir que nem sempre foi possível isolar estas colónias), colónias rugosas brancas (possivelmente *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. ou *Rhodococcus* spp.), colónias leitosas amarelas ou brancas (possivelmente *Staphylococcus* spp.) e colónias esbranquiçadas pequenas (possivelmente *Lactobacillus* spp.). Geralmente não se encontrava crescimento nos meios MacConkey, Chromocult, Cetrimida e Rappaport-Vassiliadis (meios selectivos para bactérias Gram-negativas), excepto em 4 amostras, onde se verificou um maior crescimento em alguns destes meios e não se verificou o crescimento de bactérias Gram-positivas como nas outras amostras. Segundo a AEPGA, estas amostras foram recolhidas mais rapidamente que o habitual e não se terá feito a lavagem da zona genital corretamente tendo ocorrido uma maior contaminação fecal das amostras.

Apesar de se ter obtido um total de 11 isolados que foram identificados, inicialmente, como *Streptococcus* spp. e seleccionados para sequenciação 16S rDNA, apenas se conseguiu recuperar oito isolados dos quais, posteriormente, três foram identificados como *Streptococcus zooepidemicus*, três isolados foram identificados como *Aerococcus viridans* e dois isolados foram identificados como

Streptococcus oralis. Não se isolou nenhuma bactéria compatível com *Taylorella equigenitalis* ou *Taylorella asinigenitalis*.

O maior patógeno causador de endometrite equina, *Streptococcus zooepidemicus* (Figura 6) foi isolado e identificado (Figura 5) três vezes nas amostras das 27 burras, sendo que duas destas três vezes, as amostras pertenciam a burras com problemas de infertilidade. Esta bactéria foi identificada através do sistema API 20 Strep, sendo que pelas três vezes foi obtida uma identificação excelente pela classificação da base de dados. Também se realizou sequenciação 16S rDNA nestes isolados, de modo a confirmar a espécie.



Figura 5- Identificação de *Streptococcus zooepidemicus* a partir do sistema API 20 Strep. Os testes em que se obteve um resultado positivo foram: βGUR, PAL, LAP, ADH, RIB, SOR, LAC, AMD e GLYG.

Verificou-se um crescimento da bactéria *Streptococcus oralis* em maioria na amostra que provinha da burra Daina. Na amostra proveniente da burra Hortense verificou-se um maior número de colônias de *Mycoplasma* spp. comparando com outras amostras que continham *Mycoplasma* spp. (Figura 7).



Figura 6- *Streptococcus zooepidemicus* em CNA com 5% de sangue de ovino.

Tabela 5- Bactérias Gram-positivas isoladas de amostras vaginais no decorrer do trabalho.

Bactéria putativa	Aspecto da coloração de Gram ao M.O.	Oxidase	Catalase	Hemólise	API realizado	Sequenciação 16S rDNA	Observações	Nº total	%
<i>Aerococcus viridans</i>	Cocos G+	(-)	(-)	α	API 20 Strep	Sim		3	2,31
<i>Bacillus spp.</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> ou <i>Rhodococcus spp.</i>	Bacilos Gram +/- Cocobacilos Gram +	(-)/(+)	(+)	-/ β	-	-	-	53	40,76
<i>Enterococcus faecium</i>	Cocos G+	(-)	(-)	α	API 20 Strep	-	-	3	2,31
<i>Gemella haemolysans</i>	Cocos G+	(-)	(-)	α	API 20 Strep	-	-	1	0,77
<i>Lactobacillus spp.</i>	Bacilos G+	(-)	(-)	-	-	-	-	32	24,61
<i>Micrococcus spp.</i>	Cocos G+	(+)	(-)	-	-	-	-	2	1,54
<i>Rhodococcus spp.</i>	Cocobacilos G+	(-)	(+)	-	-	-	Colônia mucosa de cor salmão	6	4,62
<i>Staphylococcus spp.</i>	Cocos G+	(-)	(+)	-	-	-	-	21	16,15
<i>Streptococcus acidominimus</i>	Cocos G+ em cadeias	(-)	(-)	α	API 20 Strep	-	-	1	0,77
<i>Streptococcus oralis</i>	Cocos G+ em cadeias	(-)	(-)	α / β	API 20 Strep	Sim	-	2	1,54
<i>Streptococcus spp.</i>	Cocos G+	(-)	(-)	β	API 20 Strep	-	-	3	2,31
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Cocos G+ em cadeias	(-)	(-)	β	API 20 Strep	Sim	-	3	2,31

Tabela 6-Bactérias Gram-negativas isoladas de amostras vaginais no decorrer do trabalho.

Bactéria putativa	Aspecto da coloração de Gram ao M.O.	Oxidase	Catalase	Hemólise	API realizado	Sequenciação 16S rDNA	Observações	Nº total	%
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bacilos G-	(-)	-	-	API 20 E	-	-	1	7,14
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos G-	(-)	-	-	API 20 E	-	-	1	7,14
<i>Neisseria spp.</i>	Cocos G-	(+)	(+)	-	-	-	Colónia amarela, que não cresce em MacConkey.	3	21,43
<i>Oligella urethralis</i>	Bacilos G-	(+)	-	-	API 20 NE	-	-	1	7,14
<i>Pantoea Agglomerans</i>	Bacilos G-	(-)	-	-	API 20 E	-	-	2	14,29
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Bacilos G-	(+)	-	-	API 20 NE	-	-	6	42,86

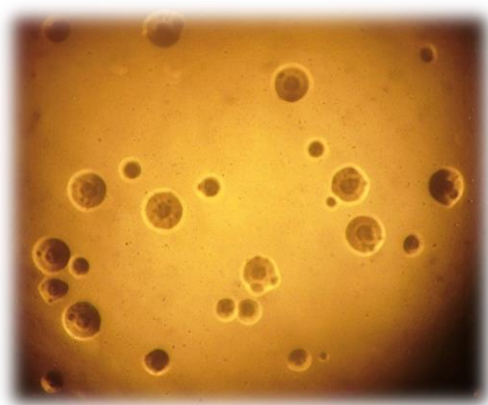


Figura 7- *Mycoplasma* spp. proveniente da amostra da burra Hortense observado a partir da objectiva de 10X do microscópio óptico.

A Tabela 7 apresenta a frequência dos diferentes géneros/espécies de bactérias isoladas consoante o número de burras estudadas. Verifica-se que as bactérias encontradas no maior número de burras pertencem ao grupo dos *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. ou *Rhodococcus* spp., onde se apresentaram em 22 das 27 burras estudadas, seguido de *Lactobacillus* spp. onde se apresentaram em 13 das 27 burras estudadas e de *Staphylococcus* spp. onde se apresentaram em 12 das 27 burras estudadas.

Tabela 7- Frequência dos diferentes géneros/espécies de bactérias isoladas consoante o número de burras estudadas.

Bactéria	nº de Burras	Nome das Burras
<i>Aerococcus viridans</i>	3	Algosa, Liberdade, Maceda
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	Dora
<i>Bacillus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp. ou <i>Rhodococcus</i> spp.	18	Albertina, B de Burra, Belfa, Castanha, Ceteira, Chiquitita, Daina, Dália, Franjinhas, Gaivota, Gorongosa, Hera, Hortense, Irina, Liberdade, Maceda, Meruma, Serralves
<i>Enterococcus faecium</i>	3	Outeira, Nassa, Rosinha
<i>Escherichia coli</i>	1	Dora
<i>Gemella haemolysans</i>	1	Ifanes
<i>Lactobacillus</i> spp.	13	Albertina, Algosa, B de Burra, Belfa, Castanha, Dália, Daina, Dora, Gorongosa, Hera, Hortense, Irina, Meruma
<i>Mycoplasma</i> spp.	5	Algosa, Dália, Dora, Hortense, Ifanes
<i>Micrococcus</i> spp.	2	B de Burra, Hera
<i>Neisseria</i> spp.	3	Dália, Gaiata, Maceda
<i>Oligella urethralis</i>	1	Dora
<i>Pantoea agglomerans</i>	2	Filó, Rosinha
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	3	Outeira, Nassa, Rosinha
<i>Rhodococcus</i> spp.	4	Chiquitita, Gaiata, Gaivota, Irina
<i>Staphylococcus</i> spp.	12	Albertina, Algosa, Bruçó, Castanha, Ceteira, Gaiata, Gorongosa, Hera, Ifanes, Maceda, Meruma, Serralves
<i>Streptococcus acidominimus</i>	1	Filó
<i>Streptococcus oralis</i>	2	Daina, Gaiata
<i>Streptococcus</i> spp.	3	Dora, Ifanes, Meruma
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	3	Castanha, Chiquitita, Gorongosa

4.2- Bactérias isoladas das amostras de órgãos provenientes de um aborto

Foram isoladas 18 bactérias das amostras provenientes do aborto da burra Daina, tais como sete isolados de *Streptococcus* spp., cinco isolados de *Staphylococcus* spp., dois isolados identificados como *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. ou *Rhodococcus* spp., um isolado de *Neisseria* spp., um isolado de *Micrococcus* spp. e dois isolados identificados como *Enterobacter* spp. ou *Klebsiella* spp. (Tabela 8). Tal como nas amostras vaginais foi encontrado um maior número de bactérias Gram-positivas do que bactérias Gram-negativas. Estes resultados obtidos não foram significantes de modo a que se pudesse afirmar que foi uma destas bactérias que causou o aborto.

Tabela 8- Bactérias isoladas das amostras de órgãos provenientes de um aborto.

Amostra	Bactérias isoladas
Cordão umbilical	1 <i>Neisseria</i> spp.; 1 <i>Micrococcus</i> spp.; 2 <i>Streptococcus</i> spp.; 1 <i>Bacillus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp. ou <i>Rhodococcus</i> spp.; 1 <i>Staphylococcus</i> spp.
Fígado	1 <i>Staphylococcus</i> spp.; 1 <i>Streptococcus</i> spp.
Líquido placentário	2 <i>Streptococcus</i> spp.; 1 <i>Bacillus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp. ou <i>Rhodococcus</i> spp.; 2 <i>Staphylococcus</i> spp.
Medula óssea	2 <i>Enterobacter</i> spp. ou <i>Klebsiella</i> spp.
Pulmão	2 <i>Streptococcus</i> spp.; 1 <i>Staphylococcus</i> spp.

4.3- Estudo de sensibilidade a antibióticos nos isolados de amostras vaginais de *Streptococcus* spp.

Apenas o isolado *Streptococcus zooepidemicus* proveniente da amostra da burra Chiquitita apresentou resistência a um antibiótico, nomeadamente à tetraciclina. Os isolados *Streptococcus zooepidemicus* provenientes das amostras das burras Castanha e Gorongosa apresentaram um fenótipo de resistência intermédio à tetraciclina. Os isolados *Streptococcus oralis* provenientes das amostras das burras Daina e Gaiata apresentaram-se susceptíveis a todos os antibióticos testados (Figura 8).



Figura 8– Antibiograma do isolado *Streptococcus oralis* proveniente da amostra da burra Daina.

4.4- Resultados da sequenciação do gene 16s rDNA

Nos oito isolados que apontavam ser *Streptococcus* spp. devido aos resultados obtidos nas provas bioquímicas e na coloração de Gram, foi realizada sequenciação do gene 16S rDNA e identificaram-se três isolados como sendo *Aerococcus viridans*, três isolados como sendo *Streptococcus zooepidemicus* e dois isolados como sendo *Streptococcus oralis*.

4.5- Produção de factores de virulência em *Streptococcus zooepidemicus*

Analisou-se nos isolados de *Streptococcus zooepidemicus*, através da técnica de PCR, a presença dos genes codificadores de factores de virulência *szeF*, *szeN*, *szeP*, *szm* e *szp*. O gene *szm* não foi detectado em nenhum dos três isolados de *Streptococcus zooepidemicus*. O gene *szp* e o gene *szeF* foram detectados nos três isolados de *Streptococcus zooepidemicus*. O gene *szeN* e o gene *szeP* foram apenas detectados nos isolados de *Streptococcus zooepidemicus* das amostras provenientes das burras Chiquitita e Gorongosa, não tendo sido detectados no isolado de *Streptococcus zooepidemicus* da amostra proveniente da burra Castanha (Figura 9). Na Tabela 9 apresentam-se os genótipos detectados nos isolados de *Streptococcus zooepidemicus*.

Tabela 9- Genótipos dos factores de virulência detectados nos isolados de *Streptococcus zooepidemicus*.

Genótipo de factores de virulência	nº de isolados
<i>szeF, szeN, szeP, szp</i>	2
<i>szeF, szp</i>	1

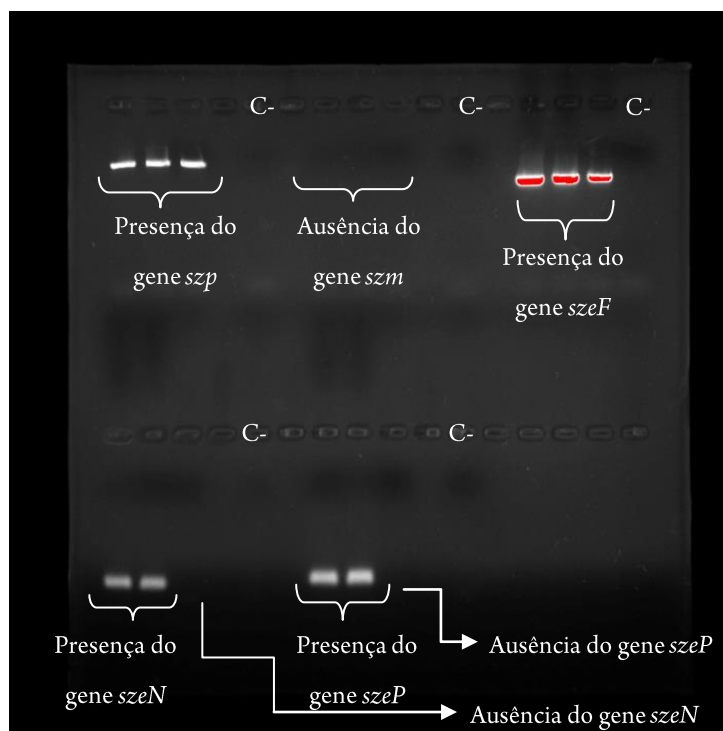


Figura 9- Resultados da presença dos factores de virulência *szeF*, *szeN*, *szeP*, *szm* e *szp* dos isolados de *Streptococcus zooepidemicus* após electroforese em gel de agarose. Na fotografia C- refere-se ao controlo negativo.

5- Discussão

O Burro de Miranda é a única raça asinina autóctone portuguesa, originária do Nordeste de Portugal, nomeadamente do Planalto Mirandês, encontrando-se em vias de extinção. O desaparecimento de uma raça levaria à perda de um património e a um desequilíbrio genético, cujo interesse pode parecer hoje em dia vão, mas num futuro próximo, pode ser a chave para abrir novas fronteiras ao desenvolvimento e defesa desta e doutras raças de asininos e equinos (Quaresma *et al.*, 2005).

De acordo com alguns estudos, as mudanças na microbiota bacteriana genital fazem parte dos sinais mais comuns de problemas reprodutivos (Mardanovna *et al.*, 2014). Com a realização deste trabalho pretendeu-se identificar a flora bacteriana vaginal do Burro de Miranda, e estabelecer se esta poderá ser a causa de casos de infertilidade e abortos neste asinino. A análise da presença de genes codificadores de factores de virulência nos isolados de *Streptococcus zooepidemicus* foi também um dos objectivos do nosso estudo.

Neste trabalho isolaram-se bactérias pertencentes a diferentes géneros. Os mais encontrados foram identificados como *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. ou *Rhodococcus* spp. (59 isolados), seguidos de *Lactobacillus* spp. (32 isolados) e *Staphylococcus* spp. (21 isolados). Outras bactérias isoladas foram identificadas como *Aerococcus viridans* (3 isolados), *Aeromonas hydrophila* (1 isolado), *Enterococcus faecium* (3 isolados), *Escherichia coli* (1 isolado), *Gemella haemolysans* (1 isolado), *Micrococcus* spp. (2 isolados), *Mycoplasma* spp. (5 isolados), *Neisseria* spp. (3 isolados), *Oligella urethralis* (1 isolado), *Pantoea Agglomerans* (2 isolados), *Pseudomonas chlororaphis* (6 isolados), *Streptococcus acidominimus* (1 isolado), *Streptococcus oralis* (2 isolados), *Streptococcus* spp. (3 isolados) e *Streptococcus zooepidemicus* (3 isolados).

Meruyert e colaboradores, em 2013, identificaram bactérias do género *Corynebacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. em amostras vaginais de éguas saudáveis e com problemas reprodutivos. Também identificaram outros géneros como *Escherichia coli* e *Bacillus* spp., mas apenas em éguas com problemas reprodutivos. Encontraram também, uma maior percentagem de bactérias possivelmente patogénicas e oportunistas e uma menor percentagem de *Lactobacillus* spp. em éguas com problemas reprodutivos e com uma idade mais avançada. No nosso estudo não se verificou um aumento do número de

bactérias patogénicas mas observou-se que o género *Lactobacillus* spp. foi isolado num maior número de burras sem problemas reprodutivos (Meruyert *et al.*, 2013).

Em 2014, Mardanovna e seus colaboradores, realizaram um estudo que consistiu em estudar a microflora vaginal de éguas que tinham contacto sexual sistemático com cavalos em que tinha sido realizado vasectomia e comparar com a microflora vaginal de éguas que não tinham contacto sexual com estes cavalos. Os autores não encontraram diferenças significativas na microflora vaginal de éguas que tinham ou não tido contacto com cavalos em que se tinha realizado vasectomia. Os géneros mais frequentemente isolados foram *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Sarcina* spp. e *Corynebacterium* spp.. Os autores também isolaram *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. mas menos frequentemente (Mardanovna *et al.*, 2014).

Um estudo semelhante ao nosso, onde se caracterizou a microbiota vaginal de Burras de Miranda, foi realizado por Martins em 2008. Porém, Martins não obteve os mesmos resultados que os encontrados no nosso estudo, sendo que as bactérias isoladas por esta autora pertenceram aos géneros *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp.. No nosso estudo foram utilizados nove meios de cultura (Columbia CNA Agar com 5% de sangue de ovino, BHI com 5% de sangue de ovino, Cetrimide-Agar, Chromocult Coliform Agar, Columbia Agar Base Chocolate com 5% de sangue de cavalo, anfotericina B e cristal de violeta, Columbia Agar Base Chocolate com 5% de sangue de cavalo e estreptomomicina, MacConkey Agar, Mycoplasma Agar Base (Oxoid) com suplemento Mycoplasma selective supplement- G SR0059C, Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth) para a inoculação e processamento das amostras enquanto que Martins apenas utilizou três meios de cultura (MacConkey agar, Slanetz-Bartley agar e Glutamato Amido Vermelho de Fenol). Sendo estes três meios considerados selectivos (MacConkey agar é selectivo para Bacilos Gram-negativos; Slanetz-Bartley agar selectivo para *Enterococcus* spp. e Glutamato Amido Vermelho de Fenol selectivo para *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp.) pode dizer-se que as bactérias isoladas por esta autora mediante os meios selectivos utilizados foram exclusivamente as esperadas. No nosso estudo foram utilizados ambos meios selectivos e meios não selectivos, o que permitiu não só o crescimento de bactérias previstas na flora vaginal como também outras bactérias que podem ou não ser encontradas na flora vaginal. Martins, utilizou na identificação das bactérias, colorações de Gram, prova da catalase, prova da oxidase, TSI e IMViC. No nosso trabalho, efectou-se, sempre que possível as galerias API[®], onde são testadas várias provas

bioquímicas de modo a identificar a espécie do isolado. Também se realizou sequenciação 16S rDNA nos isolados que se suspeitava serem *Streptococcus* spp., de modo a chegar à espécie. Martins também não refere no seu trabalho como foi realizada a colheita da amostra, sendo que no nosso estudo foi realizada uma lavagem da zona genital de modo a eliminar contaminações fecais (Martins, 2008).

No nosso trabalho foi isolado *Streptococcus oralis*, embora não seja usual a sua presença na flora vaginal. Esta bactéria pertence ao grupo *viridans* dos estreptococos e faz parte da microbiota oral e da faringe (Do *et al.*, 2009). Em 2009, Singh isolou *Streptococcus mitis* e *Streptococcus vestibularis* (espécies que também pertencem ao grupo *viridans* e fazem parte da microbiota oral) de amostras vaginais de éguas sem problemas reprodutivos e de éguas inférteis. O autor explica que o facto de tal ter acontecido não é surpreendente pois estas bactérias são, frequentemente, reportadas como invasoras do sistema reprodutivo de éguas com ou sem associação a patogénese (Singh *et al.*, 2009).

De referir que no nosso trabalho se isolou *Streptococcus oralis* em maioria da amostra da burra Daina, que tinha abortado uma semana antes da amostra ter sido enviada para o laboratório. Das amostras de órgãos provenientes deste aborto isolamos diferentes géneros de bactérias no entanto, não obtivemos nenhuma cultura pura, não podendo inferir se a causa do aborto foi bacteriológica. Segundo a AEPGA, o aborto terá sido congelado entre 6 a 10 horas após ter ocorrido, o que pode explicar o facto de se ter isolado diferentes géneros de bactérias. Segundo a necrópsia do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD, existia uma torção do cordão umbilical e poderá ter sido esta a causa do aborto. A torção do cordão umbilical pode ser uma causa de morte fetal e aborto e é usualmente observada em meados da gestação ou no final da mesma (Hong *et al.*, 1993; Mizushima, 2005). A burra Daina encontrava-se em gestação desde Abril de 2014 e abortou em Janeiro de 2015 ou seja, o aborto ocorreu no final da gestação.

Neste estudo, isolamos em amostras vaginais de 5 burras a bactéria *Mycoplasma* spp.. Estas 5 burras não apresentavam qualquer problema reprodutivo aparente. Várias espécies de micoplasma têm estado envolvidos em perturbações genitais e infertilidade de muitas espécies incluindo o Homem e cavalos e têm sido isolados a partir da vagina, colo do útero, clítoris, prepúcio, uretra e sémen de equinos com problemas reprodutivos bem como de equinos aparentemente saudáveis. No entanto, o seu papel como organismos comensais ou patogénicos no trato genital de equinos ainda não foi estabelecido (Moorthy *et al.*, 1977; Bermudez *et al.*, 1987; Spergser *et al.*, 2002; Baczynska *et al.*, 2007; Khurana *et al.*, 2015).

Streptococcus zooepidemicus é o patógeno mais frequentemente isolado do útero de éguas. Pensa-se que as estirpes de *Streptococcus zooepidemicus* que residem no sistema reprodutor inferior causem endometrite através duma infecção ascendente e de uma forma aleatória regida principalmente pelos mecanismos de defesa uterina da égua. O clítoris e a vagina têm sido sugeridos como possíveis reservatórios desta bactéria (Rasmussen *et al.*, 2013).

No nosso estudo apenas um isolado de *Streptococcus zooepidemicus* apresentou resistência à tetraciclina, sendo susceptível a todos os outros antibióticos estudados. Os outros dois isolados de *Streptococcus zooepidemicus* apresentaram-se, também, susceptíveis a todos os antibióticos estudados excepto à tetraciclina apresentando um fenótipo intermédio. Os isolados de *Streptococcus oralis* apresentaram-se susceptíveis a todos os antibióticos estudados. Os estreptococos β -hemolíticos são usualmente susceptíveis à maioria dos antibióticos. A resistência à tetraciclina é, frequentemente, observada nos grupos A, C e G de estreptococos β -hemolíticos (Kaplan, 1997; Lopardo, 2007).

No nosso estudo, obtivemos três isolados de *Streptococcus zooepidemicus*. Dois destes isolados provinham de burras que nunca conseguiram estabelecer gestação, mas também foi isolada de uma amostra proveniente de uma burra que se encontrava sem problemas reprodutivos. Quanto aos genes codificadores de factores de virulência estudados, existiram diferenças entre os isolados provenientes de burras com problemas reprodutivos do isolado proveniente da burra sem problemas reprodutivos. Nos isolados das burras que nunca conseguiram engravidar detectaram-se, em ambos os isolados, os três genes codificadores de sAgs estudados neste trabalho (*szeF*, *szeN*, *szeP*), enquanto que no isolado da burra sem problemas reprodutivos apenas se detectou um destes genes (*szeF*). Nos três isolados foi detectado um dos genes codificadores de proteínas *m-like*, o gene *szp*, não tendo o gene *szm* sido detectado em nenhum. Apesar de termos obtido diferenças nos genótipos dos factores de virulência de fêmeas com problemas reprodutivos e sem problemas reprodutivos, o número de isolados estudados é muito pequeno para que possamos chegar a qualquer conclusão. Em 2014, Rash e seus colaboradores, conduziram um estudo em que avaliaram a prevalência dos genes codificadores de sAgs (*szeF*, *szeN*, *szeP*) de modo a definir a ligação entre a sua presença e o tipo de doença. Os resultados principais mostraram que a presença destes genes está significativamente associada à formação de abscessos nos gânglios linfáticos que não estão relacionados com adenite equina, e a ausência destes está associada a infecções uterinas/abortos. A fim de investigar esta ausência de genes codificadores de sAgs em estirpes do sistema reprodutivo no contexto de infecções uterinas, os

autores também recolheram um número reduzido de estirpes de *Streptococcus zooepidemicus* da vagina e do clitóris de éguas sem problemas reprodutivos. Neste conjunto de estirpes comensais foram detectados genes codificadores de sAgs e os autores chegaram à conclusão que a sua prevalência era comparável ao conjunto de estirpes dos primeiros dados (excluindo as que provinham de infecções uterinas/abortos e as que provinham de abscessos nos gânglios linfáticos que não estão relacionados com adenite equina). Embora o número de estirpes comensais do sistema reprodutivo seja baixo, os resultados sugeriram que estirpes comensais de *Streptococcus zooepidemicus* que possuem genes codificadores de sAgs são capazes de colonizar o sistema reprodutivo. É possível que a ausência de genes codificadores de sAgs em estirpes de *Streptococcus zooepidemicus* que induzem infecção uterina seja mera coincidência. Um outro estudo realizado em 2008, por Webb e seus colaboradores, mostrou que as estirpes de *Streptococcus zooepidemicus* que causam infecções uterinas/abortos tendem a agruparem-se na análise feita com o *software* ClonalFrame, sugerindo que estão relacionadas e melhor adaptadas para colonizarem a vagina (e infectarem o útero oportunisticamente) (Webb *et al.*, 2008).

Rasmussen e seus colaboradores, em 2013, reforçaram esta teoria ao demonstrarem que as estirpes de *Streptococcus zooepidemicus* que causam endometrite pertencem a um grupo geneticamente distinto. O objectivo do estudo deste grupo foi comparar o genótipo de múltiplos isolados de *Streptococcus zooepidemicus* provenientes do útero, clitóris e vagina de éguas com e sem sintomas clínicos de endometrite, de forma a investigar se existia uma subpopulação de *Streptococcus zooepidemicus* associada a endometrite. Os resultados demonstraram que existia uma maior similaridade genética entre os isolados obtidos de éguas com endometrite comparativamente com os isolados provenientes do sistema reprodutivo inferior e que os isolados provenientes da vagina tinham uma maior similaridade genética aos isolados provenientes do útero da mesma égua do que os isolados uterinos de outras éguas. Rasmussen e colaboradores encontram-se a investigar a presença de genes codificadores de factores de virulência dos isolados de *Streptococcus zooepidemicus* do estudo de 2013 de forma a determinar se certos genes estão associados com estirpes que causam endometrite (Rasmussen *et al.*, 2013).

Apesar do nosso trabalho ter como objectivo principal o estabelecimento duma relação entre a flora bacteriana da vagina e casos de infertilidade e abortos no Burro de Miranda, não foi possível estabelecer qualquer relação, pois não se observaram diferenças na flora bacteriana entre as amostras

que provinham de burras sem problemas reprodutivos e burras com problemas reprodutivos que pudessem indicar problemas que conduzissem a infertilidade. No início do trabalho foi questionado à AEPGA a possibilidade de serem enviadas amostras provenientes do útero (uma vez que o problema com maior incidência é infertilidade em burras que ainda são jovens). Contudo, devido ao facto de não possuírem os meios próprios para fazer a colheita de amostras do útero e o facto de a colheita de amostras do útero ser mais difícil de realizar do que a colheita de amostras da vagina, não foi possível à AEPGA recolher e enviar amostras provenientes do útero.

O diagnóstico de infecções uterinas deve passar pela história de insucesso reprodutivo, isolamento de organismos patogénicos, identificação de burras susceptíveis através da detecção de líquido intra-uterino durante o estro ou após 6-48 horas do acasalamento, exame vaginal, detecção de corrimento vaginal, palpação transrectal, detecção de intervalos entre estros curtos, ultrasonografia do trato reprodutor, biópsia e citologia do endométrio. No entanto, alguns destes sinais podem estar ausentes em casos subclínicos. Sinais de endometrite subclínica incluem edema excessivo após o acasalamento e linhas brancas entre as pregas endometriais na ultrasonografia (Causey, 2006; LeBlanc, 2008; LeBlanc e Causey, 2009; Overbeck *et al.*, 2011). A quantidade de líquido intra-uterino e a ecotextura uterina são frequentemente usados como indicadores de endometrite. No entanto, o líquido intra-uterino também pode ser observado em condições normais e pode não ser fiável como único critério de diagnóstico. Também as culturas bacterianas podem levar a resultados falso-positivos ou falso-negativos originadas pela contaminação dos instrumentos de colheita da amostra, da genitália externa ou vagina. Assim o ideal é realizar-se culturas bacterianas uterinas e a citologia em conjunto de modo a que o diagnóstico seja preciso. Se o resultado dos dois for positiva uma égua pode ser diagnosticada, com bastante segurança, como tendo endometrite (LeBlanc, 2008; Defontis *et al.*, 2011; Overbeck *et al.*, 2011).

6- Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a flora bacteriana vaginal do Burro de Miranda é variada e pertence a vários géneros de bactérias. Em equinos, e sobretudo no Burro de Miranda poucos estudos foram realizados. O estudo da microbiota em animais tem ganho cada vez mais importância, visto que estas comunidades microbianas podem ser cruciais para as funções normais do organismo.

As principais conclusões a que chegamos com a realização deste trabalho foram:

- A flora bacteriana vaginal do Burro de Miranda é sobretudo constituída por bactérias Gram-positivas dos géneros *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Rhodococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Staphylococcus* spp.;
- Outras bactérias identificadas na flora foram identificadas como *Aerococcus viridans*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Gemella haemolysans*, *Micrococcus* spp., *Mycoplasma* spp., *Neisseria* spp., *Oligella urethralis*, *Pantoea Agglomerans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus* spp. e *Streptococcus zooepidemicus*;
- A flora vaginal de burras com e sem problemas reprodutivos não apresentou grandes diferenças, tendo-se isolado de ambas, bactérias potencialmente patogénicas, como *Streptococcus zooepidemicus*;
- Os isolados de *Streptococcus oralis* apresentaram-se susceptíveis aos antibióticos testados. Os isolados de *Streptococcus zooepidemicus* mostraram-se resistentes ou com sensibilidade intermédia à tetraciclina e susceptíveis ao resto dos antibióticos testados;
- Nos 3 isolados de *Streptococcus zooepidemicus* os genes codificadores de factores de virulência mais detectados foram os genes *szpP* e *szp*;
- Os dois isolados de *Streptococcus zooepidemicus* provenientes de burras com problemas reprodutivos apresentaram os 3 genes codificadores de sAgs estudados neste trabalho (*szfF*, *szfN*, *szfP*), enquanto que no isolado da burra sem problemas reprodutivos apenas se detectou o gene *szfF*.

É de realçar a importância da sequenciação 16s rDNA neste trabalho pois possibilitou-nos a identificação precisa ao nível da espécie de alguns isolados.

Este trabalho foi útil na medida em que deu a conhecer a flora vaginal bacteriana do Burro de Miranda. Em virtude deste animal se encontrar em vias de extinção e existirem poucos estudos realizados nesta área, os dados obtidos neste trabalho poderão ser vantajosos para futuras investigações. Por forma a descobrir qual a razão dos problemas de fertilidade no Burro de Miranda seria importante avaliar os pontos pelos quais deve passar o diagnóstico de infecções uterinas de modo a afastar a possibilidade de estes serem causados por uma infecção bacteriana. Seria também importante estudar a microbiota genital nos machos de Burro de Miranda, de modo a ter conhecimento se desta fazem parte bactérias patogénicas que poderão infectar as fêmeas aquando o acasalamento. Outros problemas não relacionados com microrganismos deverão também ser tidos em consideração no futuro, de forma a encontrar a verdadeira razão para os problemas reprodutivos e baixa natalidade nesta raça.

7- Bibliografia

AEPGA (2015) Quem somos. <http://www.aepga.pt/> [Acedido em 6 de Abril 2015]

Akineden, Ö., Hassan, A. A., Alber, J., El-Sayed, A., Estoepangestie, A. T. S., Lämmner, C., Weiss, R. e Siebert, U. (2005) Phenotypic and genotypic properties of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German North Sea during the phocine distemper outbreak in 2002. *Veterinary Microbiology* **110**: 147–152.

Baczynska, A., Fedder, J., Schougaard, H. e Christiansen, G. (2007) Prevalence of mycoplasmas in the semen and vaginal swabs of Danish stallions and mares. *Veterinary Microbiology* **121**: 138–143.

Barret, L. T. (2011) Investigation of the molecular basis of virulence of *Streptococcus equi*. Tese de M.Phil. University of Northumbria. 1: 23, 24, 25, 26, 33 e 34.

Bermudez, V. Miller, R., Johnson, W., Rosendal, S. e Ruhnke, L. (1987) Recovery of Mycoplasma spp. from the Reproductive Tract of the Mare during the Estrous Cycle. *Can Vet J.* **28(8)**: 519- 522.

Defondis, M., Vaillancourt, D e Grand, F. X. (2011) Comparison of three methods of sampling for endometrial cytology in the mare. *Tierärztliche Praxis Großtiere* **39 (G)**: 171–175.

Do, T., Jolley, K. A., Maiden, M. C. J., Gilbert, S. C., Clark, D., Wade, W. G. e Beighton, D. (2009) Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology* **155**: 2593–2602.

Duquesne, F., Pronost, S., Laugier, C. e Petry, S. (2007) Identification of *Taylorella equigenitalis* responsible for contagious equine metritis in equine genital swabs by direct polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* **82**: 47–49.

Carvalho, C. F. P M., Borba, H. R., Ribas, J. A. S. e Barros, R. R. (2011) Diagnóstico bacteriológico, citológico e histopatológico da endometrite equina. *R. bras. Ci. Vet.* **18(1)**: 19-22.

Causey, R. C. (2006) Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance. *The Veterinary Journal* **172**: 405–421.

Fraga, M., Perelmuter, K., Deluchi, L. e Zunuino, P. (2011) Equine Native Microbiota as a Source of Beneficial Microbes. *Horses: Biology, domestication and human interactions*, 01/2011: pages 111-120; Nova Science Publishers.

Frontoso, R., De Carlo, E., Pasolini, M. P., van der Meulen, K., Pagnini, U., Iovane, G. e De Martino, L. (2008) Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Research in Veterinary Science* **84**: 1–6.

- Harrington, D. J., Sutcliffe, I. C e Chanter, N.** (2002) The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. *Microbes and Infection* **4**: 501–510.
- Hong, C. B., Donahue, J. M., Giles, R. C., Petrites-Murphy, Jr. M. B., Poonacha, K. B., Roberts, A. W., Smith, B. J., Tramontin, R. R., Tuttle, P. A. e Swerczek, T. W.** (1993) Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 foaling seasons. *J Vet Diagn Invest* **5**:560-566.
- Hong, Z., Ma, Z., Yuan, J. e Fan, H.** (2013) Identification and Characterization of Putative Virulent Genes in *Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus*. *Journal of Integrative Agriculture* **12**(2): 327-333.
- Hurtgen, J. P.** (2006) Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. *Theriogenology* **66**: 560–566.
- Jang, S. S., Donahue, J. M., Arata, A. B., Goris, J., Hansen, L. M., Earley, D. L., Vandamme, P. A. R., Timoney, P. J. e Hirsh, D. C.** (2001) *Taylorella asinigenitalis* sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (*Equus asinus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 971–976.
- Kaplan, E. L.** (1997) Recent Evaluation of Antimicrobial Resistance in β -Hemolytic Streptococci. *Clinical Infectious Diseases* **24**(1):S89-92.
- Khurana, S. K., Garg, D. N. e Singh, Y.** (2015) Detection of *Mycoplasma equigenitalium* from Equines by Capture-ELISA. *Adv. Anim. Vet. Sci.* **3**(1): 33-37.
- Kuusi, M., Lahti, E., Virolainen, A., Hatakka, M., Vuento, R., Rantala, L., Vuopio-Varkila, J., Seuna, E., Karppelin, M., Hakkinen, M., Takkinen, J., Gindonis, V., Siponen, K. e Huotari, K.** (2006) An outbreak of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* associated with consumption of fresh goat cheese. *BMC Infectious Diseases* **6**: 36.
- LeBlanc, M. M.** (2008) When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology* **70**: 421–429.
- LeBlanc, M. M. e Causey, R. C.** (2009) Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reprod Dom Anim* **44**(3): 10–22.
- Leroy, P. D., Sabri, A., Heuskin, S., Thonart, P., Lognay, G., Verheggen, F. J., Francis, F., Brostaux, Y., Felton, G. W. e Haubruge, E.** (2011) Microorganisms from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies. *Nat. Commun.* **2**:348 doi: 10.1038/ncomms1347.
- Lindahl, S.** (2013) *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*- Upper Respiratory Disease in Horses and Zoonotic Transmission to Humans. Tese de Doutorado. Swedish University of Agricultural Sciences. 1: 19, 22, 23, 24 e 25.
- Lopardo, H.** (2007) Antimicrobial resistance in β -hemolytic streptococci in Argentina. In: Mendez-Vilas A (ed) Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. **2**:794-798.

Lopes, J. L. P. S. (2013) Endometrite na Égua. Relatório Final de Estágio- Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto. **1**: 2 e 4.

Ma, Z., Geng, J., Yi, L., Xu, B., Jia, R., Li, Y., Meng, Q., Fan, H. e Hu, S. (2013) Insight into the specific virulence related genes and toxin-antitoxin virulent pathogenicity islands in swine streptococcosis pathogen *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* strain ATCC35246. *BMC Genomics* **14**: 377.

Mardanovna, J. N., Kenesovna, T. Z., Nurmuhambetovich, J. M., Orynbay, T., Erbolatovna, A. M., Almurzaevich, I. A. e Amanjolovich, O. K. (2014) Vaginal microbiocenosis of mares bred by stallions after vasectomy. *Biology and Medicine* **6**(4): 1-5.

Martins, A. C. A. (2008) Caracterização da microbiota vaginal em burras de miranda. Relatório final de estágio- Licenciatura em Biologia. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

McVey, S. D., Kennedy, M. e Chegappa, M. M. (2013) *Veterinary Microbiology*. (3ª edição) Wiley-Blackwell.

Meruyert, A., Nursulu, J., Mardan, J., Gulmira, K. e Akhan, M. (2013) Microflora of the Mare Vagine in Norm and Abnormal. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **12**(3): 344- 351.

Moorthy, A. R. S., Spradbrow, P. B. e Eisler, M. E. D. (1977) Isolation of Mycoplasmas from the Genital Tract of Horses. *Australian Veterinary Journal* **53**: 167- 169.

Mizushima, C. (2005) Late-Term Abortion Associated With Umbilical Cord Torsion in the Mare: Case Report. *Journal of Equine Veterinary Science*. **25**(4): 162-163.

Nóvoa, T. (2012), The Miranda Donkey: A tale of heritage construction and rural revival. Comunicação não publicada apresentada em The Donkey Conference, SOAS, University of London.

Newcombe, J. R. (2011) Why Are Mares with Pneumovagina Susceptible to Bacterial Endometritis? A Personal Opinion. *Journal of Equine Veterinary Science* **31**: 174-179.

Nicholson, M. L., Ferdinand, L., Sampson, J. S., Benin, A., Balter, S., Pinto, S. W. L., Dowell, S. F., Facklam, R. R., Carlone, G. M. e Beall, B. (2000) Analysis of Immunoreactivity to a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* M-Like Protein To Confirm an Outbreak of Poststreptococcal Glomerulonephritis, and Sequences of M-Like Proteins from Isolates Obtained from Different Host Species. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**(11): 4126–4130.

NYT (2015) Hard Times for a Small (and Fuzzy) Group of Europeans. http://www.nytimes.com/2013/11/29/world/europe/despite-subsidies-hard-times-for-a-small-and-four-legged-group-of-europeans.html?ref=international-home&_r=2&pagewanted=all [Acedido em 6 de Abril 2015].

Overbeck, W., Witte, T. S. e Heuwiesir, W. (2011) Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology* **75**: 1311–1318.

Paillot, R., Darby, A. C., Robinson, C., Wright, N. L., Steward, K. F., Anderson, E., Webb, K., Holden, M. T. G., Efstratiou, A., Broughton, K., Jolley, K. A., Priestnall, S. L., Campi, M. C. M., Hughes, M. A., Radford, A., Erles, K. e Waller, A. S. (2010) Identification of Three Novel Superantigen-Encoding Genes in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *szeF*, *szeN*, and *szeP*. *Infection and Immunity* **78**(11): 4817–4827.

Piedade, I., Skive, B., Christensen, H. e Bojesen, A. M. (2013) Draft Genome Sequence of *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* Strain S31A1, Isolated from Equine Infectious Endometritis. *Genome Announcements* **1**(5): e00683-13.

Pinho, M. D. C. B. (2014) Lancefield group C and G streptococci in human infection: Molecular typing, virulence and antimicrobial susceptibility. Tese de Doutoramento em Ciências e Tecnologias da Saúde- Especialidade Microbiologia. Universidade de Lisboa- Faculdade de Medicina. **1**: 6.

Proietti, P. C., Bietta, A., Coppola, G., Felicetti, M., Cook, R. F., Coletti, M., Marenzoni, M. L. e Passamonti, F. (2011) Isolation and characterization of b-haemolytic-Streptococci from endometritis in mares. *Veterinary Microbiology* **152**: 126–130.

Quaresma, M., Nóvoa, M., Monteiro, A., Almeida, J. M. e Portas, M. (2005) A raça Asinina de Miranda. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* **100** (555-556): 227-231.

Quaresma, M. e Payan-Carreira, R. (2015) Characterization of the estrous cycle of Asinina de Miranda jennies (*Equus asinus*). *Theriogenology* **83**: 616–624.

Rash, N. L., Robinson, C., DeSouza, N., Nair, S., Hodgson, H., Steward, K., Waller, A. S. e Paillot, R. (2014) Prevalence and disease associations of superantigens *szeF*, *szeN* and *szeP* in the *S. zooepidemicus* population and possible functional redundancy of *szeF*. *Research in Veterinary Science* **97**: 481–487.

Rasmussen, C. D., Hauggard, M. M., Petersen, M. R., Nielsen, J. M., Pedersen, H. G. e Bojesen, A. M. (2013) *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from equine infectious endometritis belong to a distinct genetic group. *Vet. Res.* **44**:26.

Rebordão, M. R., Galvão, A., Szóstek, A., Amaral, A., Mateus, L., Skarzynski, D. J. e Ferreira-Dias, G. (2014) Physiopathologic Mechanisms Involved in Mare Endometrosis. *Reproduction in Domestic Animals*. **49** (4): 82- 87.

Samper, J. C e Tibary, A. (2006) Disease transmission in horses. *Theriogenology* **66**: 551–559.

Shulman, M. L., May, C. E., Keys, B. e Guthrie, A. J. (2013) Contagious equine metritis: Artificial reproduction changes the epidemiologic paradigm. *Veterinary Microbiology* **167**: 2–8.

- Singh, B. R.** (2009) Occurrence of Multiple Drug Resistant (MDR) Aerobic Bacteria in Vaginal Swabs of Mares and their Association with Infertility. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* **30**(2): 105-112.
- Spergser, J., Aurich, C., Aurich, J. E. e Rosengarten, R.** (2002) High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Veterinary Microbiology* **87**: 119–129.
- Timoney, J. F., Artiushin, S. C. e Boschwitz, J. S.** (1997) Comparison of the Sequences and Functions of *Streptococcus equi* M-Like Proteins SeM and SzPSe. *Infection and Immunity* **65**(9): 3600–3605.
- Timoney, J. F.** (2004) The pathogenic equine streptococci. *Vet. Res.* **35**: 397–409.
- Timoney, P. J.** (2011) Horse species symposium: Contagious equine metritis: An insidious threat to the horse breeding industry in the United States. *J. Anim. Sci.* **89**:1552–1560.
- Velineni, S e Timoney, J. F.** (2013) Characterization and Protective Immunogenicity of the SzM Protein of *Streptococcus zooepidemicus* NC78 from a Clonal Outbreak of Equine Respiratory Disease. *Clinical and Vaccine Immunology.* **20**(8): 1181- 1188.
- Waller, A. S. e Robinson, C.** (2013) *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus equi* evolution: the role of CRISPRs. *Biochem. Soc. Trans.* **41**: 1437–1443.
- Watson, E. D.** (2000) Post-breeding endometritis in the mare. *Animal Reproduction Science* **60–61**: 221–232.
- Webb, K., Jolley, K. A., Mitchell, Z., Robinson, C., Newton, J. R., Maiden, M. C. J. e Waller, A.** (2008) Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group. *Microbiology* **154**: 3016–3024.
- Wilson, B. A., Salyers, A. A., Whitt, D. D. e Winkler, M. E.** (2011) *Bacterial Pathogenesis- A Molecular Approach*. 3ª edição: 75, ASM Press.
- Wittenbrink, M. M., Hölzle, L. e Baumeister, A.** (1997) Mechanisms of Bacterial Pathogenesis in Equine Endometritis. *Pferdeheilkunde* **13** (5): 450- 452.
- Wittenbrink, M. M., Hoelzle, K. e Hoelzle, L. E.** (2008) What's new in bacteriology of the mare's genital tract. *Pferdeheilkunde* **24** (1): 53-55.
- Wittenbrink, M. M.** (2012) Bacterial infections of the equine genital tract. *Pferdeheilkunde* **28** (1): 30-32.

Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H. e Yuen, K. Y. (2008) Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* **14**: 908–934.

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Squires, E. L. e Troedsson, M. H. T. (2012) Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology* **78**: 495–501.

8- Anexos

Os meios de cultura que foram utilizados no decorrer deste trabalho estão a seguir descritos:

Tabela 10- Meios de cultura utilizados durante o decorrer do trabalho.

Nome do meio	Função do meio	Composição do meio	Preparação do meio
BBL™ Columbia CNA Agar (Agar Columbia CNA) (BD) com 5% de sangue de ovino	Meio de cultura selectivo utilizado para isolamento de microrganismos Gram-positivos, a colistina e o ácido nalidíxico inibem o crescimento de Enterobactérias e <i>Pseudomonas</i> spp.	▪ Digerido pancreático de caseína, 12,0 g/L ▪ Digerido péptico de tecidos animais, 5,0 g/L ▪ Extrato de leveduras, 3,0 g/L ▪ Extrato de carne, 3,0 g/L ▪ Amido de milho, 1,0 g/L ▪ Cloreto de sódio, 5,0 g/L ▪ Agar, 13,5 g/L ▪ Colistina, 0,01 g/L ▪ Ácido nalidíxico, 0,01 g/L ▪ Sangue de ovino 5%	▪ Pesar 42,5 g de meio e adicionar a 1 L de água destilada; ▪ Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; ▪ Esterilizar no autoclave à temperatura de 121°C durante 15 min; ▪ Deixar arrefecer até à temperatura de 45-50°C e distribuir por placas.
Brain Heart Infusion Agar (BHI) (Liofilchem)	Meio de cultura não selectivo, extremamente rico, usado para o crescimento de bactérias fastidiosas e não fastidiosas.	▪ Infusão de cérebro e coração, 17,5 g/L ▪ Peptona, 10,0 g/L ▪ Glucose, 2,0 g/L ▪ Cloreto de sódio, 5,0 g/L ▪ Fosfato dissódico, 2,5 g/L ▪ Agar, 15,0 g/L	▪ Pesar 52 g de meio e adicionar a 1 L de água destilada; ▪ Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; ▪ Esterilizar no autoclave à temperatura de 121°C durante 15 min; ▪ Deixar arrefecer até à temperatura de 45-50°C e distribuir por placas.
Brain Heart Infusion Agar com 5% de sangue de ovino (BHI) (Liofilchem)	Meio de cultura não selectivo, extremamente rico, usado para o crescimento de bactérias fastidiosas e não fastidiosas.	▪ Infusão de cérebro e coração, 17,5 g/L ▪ Peptona, 10,0 g/L ▪ Glucose, 2,0 g/L ▪ Cloreto de sódio, 5,0 g/L ▪ Fosfato dissódico, 2,5 g/L ▪ Agar, 15,0 g/L ▪ Sangue de ovino 5%	▪ Pesar 52 g de meio e adicionar a 1 L de água destilada; ▪ Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; ▪ Esterilizar no autoclave à temperatura de 121°C durante 15 min; ▪ Deixar arrefecer até à temperatura de 50°C, adicionar 5% de sangue de ovino e distribuir por placas.

Tabela 10 (cont.)- Meios de cultura utilizados durante o decorrer do trabalho

Nome do meio	Função do meio	Composição do meio	Preparação do meio
Cetrimide- Agar (Merck)	Meio de cultura selectivo usado para o isolamento de <i>Pseudomonas spp.</i>	▪ Peptona de gelatina, 20,0 g/L ▪ Cloreto de magnésio, 1,4 g/L ▪ Sulfato de potássio, 10,0 g/L ▪ Cetrimida, 0,3 g/L ▪ Agar-agar, 13,0 g/L ▪ Adicionar 10 ml/L de glicerina	▪ Pesar 45,3 g de meio e adicionar a 1 L de água destilada; ▪ Adicionar 10 ml de glicerina; ▪ Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; ▪ Esterilizar no autoclave à temperatura de 121°C durante 15 min; ▪ Deixar arrefecer até à temperatura de 45-50°C e distribuir por placas.
Chromocult® Coliform Agar (Merck)	Meio de cultura cromogénico, usado para o isolamento de bactérias coliformes.	▪ Peptona, 3,0 g/L ▪ Cloreto de sódio, 5,0 g/L ▪ Fosfato monossódico, 2,2 g/L ▪ Fosfato dissódico, 2,7 g/L ▪ Triptófano, 1,0 g/L ▪ Piruvato de sódio, 1,0 g/L ▪ Tergitol 7, 0,15 g/L ▪ Sorbitol, 1,0 g/L ▪ Agar-agar, 10,0 g/L ▪ 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranoside, 0,2 g/L ▪ Isopropil-β-D-tiogalactopiranoside, 0,1 g/L ▪ Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucurónico, 0,1 g/L	▪ Pesar 34,5 g de meio e adicionar a 1 L de água destilada; ▪ Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; ▪ Não autoclavar; ▪ Deixar arrefecer até à temperatura de 45-50°C e distribuir por placas.
Columbia Agar Base Chocolate com 5% de sangue de cavalo, anfotericina B e cristal de violeta (Oxoid)	Meio de cultura extremamente rico, usado para o crescimento de bactérias fastidiosas. Neste trabalho foi utilizado como propósito de isolar <i>Taylorella equigenitalis</i> . Adicionou-se anfotericina B de modo a eliminar os fungos da flora genital e o cristal de violeta para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas.	▪ Peptona especial, 23,0 g/L ▪ Amido, 1,0 g/L ▪ Cloreto de sódio, 5,0 g/L ▪ Agar, 10,0 g/L ▪ Sangue de cavalo, 5% ▪ Anfotericina B, 5 µg/ml ▪ Cristal de Violeta, 1 µg/ml	▪ Pesar 39 g de meio e adicionar a 1L de água destilada; ▪ Pesar 0,005 g de Anfotericina B e 0,001 g de Cristal de Violeta e adicionar ao meio base; ▪ Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; ▪ Esterilizar no autoclave à temperatura de 121°C durante 15 min; ▪ Deixar arrefecer até à temperatura de 50°C e adicionar o 5% de sangue de cavalo; ▪ Colocar em banho-maria a 80°C durante 10 min. Deixar arrefecer até à temperatura de 45-50°C e distribuir por placas.

Tabela 10 (cont.)- Meios de cultura utilizados durante o decorrer do trabalho.

Nome do meio	Função do meio	Composição do meio	Preparação do meio
Columbia Agar Base Chocolate com 5% de sangue de cavalo e estreptomicina (Oxoid)	Meio de cultura extremamente rico, usado para o crescimento de bactérias fastidiosas. Neste trabalho foi utilizado com o propósito de isolar <i>Taylorella equigenitalis</i> . Devido a algumas estirpes de <i>Taylorella equigenitalis</i> serem susceptíveis à estreptomicina, é necessário inocular outra placa em paralelo que não contenha estreptomicina. Este meio foi suplementado com estreptomicina de modo a suprimir o crescimento de bactérias Gram-negativas contaminantes.	▪ Peptona especial, 23,0 g/L ▪ Amido, 1,0 g/L ▪ Cloreto de sódio, 5,0 g/L ▪ Agar, 10,0 g/L ▪ Sangue de cavalo, 5% ▪ Estreptomicina, 200 µg/ml	▪ Pesar 39 g de meio e adicionar a 1L de água destilada; ▪ Pesar 0,2 g de estreptomicina e adicionar ao meio base; ▪ Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; ▪ Esterilizar no autoclave à temperatura de 121°C durante 15 min; ▪ Deixar arrefecer até à temperatura de 50°C e adicionar o 5% de sangue de cavalo; ▪ Colocar em banho-maria a 80°C durante 10 min. Deixar arrefecer até á temperatura de 45-50°C e distribuir por placas.
Mueller Hinton Agar (Liofilchem) com 10% sangue ovino	Meio de cultura utilizado para testar a susceptibilidade a antibióticos de <i>Streptococcus</i> spp.	▪ Extrato de carne, 2 g/L ▪ Ácidos Casamino, 17,5 g/L ▪ Amido, 1,5 g/L ▪ Agar, 15 g/L ▪ Sangue de ovino, 10 %	▪ Pesar 36 g de meio e adicionar a 1 L de água destilada; ▪ Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; ▪ Esterilizar no autoclave à temperatura de 121°C durante 15 min; ▪ Deixar arrefecer até á temperatura de 45-50°C e adicionar 10% de sangue de ovino; ▪ Distribuir por placas.
MacConkey Agar (Merck)	Meio de cultura selectivo e diferencial usado para o isolamento de bacilos Gram-negativos. Os sais biliares inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivas e a presença de lactose permite diferenciar as bactérias fermentadoras das não fermentadoras de lactose.	▪ Peptona de gelatina, 17,0 g/L ▪ Peptona de caseína, 1,5 g/L ▪ Peptona de carne, 1,5 g/L ▪ Cloreto de sódio, 5,0 g/L ▪ Lactose, 10,0 g/L ▪ Mistura de sais biliares, 1,5 g/L ▪ Vermelho neutro, 0,03 g/L ▪ Cristal de violeta, 0,001g/L ▪ Agar-agar, 13,5 g/L	▪ Pesar 50 g de meio e adicionar a 1 L de água destilada; ▪ Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; ▪ Esterilizar no autoclave à temperatura de 121°C durante 15 min; ▪ Deixar arrefecer até á temperatura de 45-50°C e distribuir por placas.

Tabela 10 (cont.)- Meios de cultura utilizados durante o decorrer do trabalho.

Nome do meio	Função do meio	Composição do meio	Preparação do meio
Mycoplasma Agar Base (Oxoid)com suplemento Mycoplasma selective supplement- G SR0059C	Meio de cultura utilizado para o isolamento de <i>Mycoplasma</i> spp.	- Peptona bacteriológica, 10,0 g/L 'Lab-Lemco' em pó, 10,0 g/L - Cloreto de sódio, 5,0 g/L - Suplemento mineral, 0,5 g/L - Agar, 10,0 g/L Composição do suplemento: - Soro de cavalo, 20 ml - Extrato de levedura(25% w/v) , 10 ml - Acetato de Tálho, 25 mg - Penicilina, 20 000 unidades	- Pesar 35,5 g de meio e adicionar a 1 L de água destilada; - Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; - Distribuir em volumes de 80 ml; - Esterilizar no autoclave à temperatura de 121°C durante 15 min; - Deixar arrefecer até á temperatura de 45-50°C e distribuir por placas; - Adicionar o suplemento previamente preparado. Preparação do suplemento: - Adicionar 20 ml de água destilada esterilizada a um frasco de suplemento e misturar bem.
Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth (Oxoid)	Meio de cultura de enriquecimento utilizado para o crescimento de <i>Salmonella</i> sp.	- Peptona de Soja, 5,0 g/L - Cloreto de Sódio, 8,0 g/L - Fosfato Monopotássico, 1,6 g/L - Cloreto de Magnésio, 40,0 g/L - Verde Malaquite, 0,04 g/L	- Pesar 30 g de meio e adicionar a 1L de água destilada; - Aquecer cuidadosamente até dissolver completamente; - Distribuir volumes de 10 ml por tubos e esterilizar no autoclave à temperatura de 115°C durante 15 minutos.
Skim Milk Powder (Oxoid)	Meio utilizado a 10% para guardar as bactérias no congelador.	- Humidade % w/w, <5,0; - Teor de gordura % w/w, ≤1,5; - Proteína % w/w, ≥34	- Misturar o pó com uma pequena quantidade de água destilada, adicionando gradualmente mais água até obter-se uma mistura 10% w/v; - Esterilizar no autoclave à temperatura de 121° C durante 5 min.