

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

Estudo Microbiológico e Citológico do Trato Genital de Gatas Domésticas

Juliana Braga de Andrade

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓSGRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

**ESTUDO MICROBIOLÓGICO E CITOLÓGICO DO TRATO GENITAL DE GATAS
DOMÉSTICAS**

JULIANA BRAGA DE ANDRADE

**Sob a Orientação da Professora
Vera Lúcia Teixeira de Jesus**

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Microbiologia Veterinária.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2006

Andrade, Juliana Braga de

Estudo microbiológico e citológico do trato genital de gatas domésticas. Dissertação. Seropédica, Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. 2006. 41 p.

Orientadora: Vera Lúcia Teixeira de Jesus.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Zootecnia.
Doutora em Ciência Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINARIA**

JULIANA BRAGA DE ANDRADE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós Graduação em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 20/02/2006.

Vera Lúcia Teixeira de Jesus - Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Tânia Góes de Pinho - Dra. UFF

Marcelo Elias Fraga - Dr. UFRRJ

*A Deus que permitiu que tudo isso fosse possível e aos
meus Pais Carlos Alberto e Sueli Braga,
pelo apoio, confiança e amor.*

AGRADECIMENTOS

À Professora VERA LÚCIA TEIXEIRA DE JESUS, meu agradecimento e reconhecimento pela orientação, apoio, compreensão, dedicação e paciência durante toda a realização deste trabalho.

À minha adorada amiga ADRIANA DA ROSA CHAVES, que sempre esteve ao meu lado e me apoiou, não só neste trabalho, mas em todos os aspectos tanto pessoais como profissionais.

À minha querida amiga ANDRÉA GONZAGA DOS SANTOS que me ajudou tanto durante o mestrado, me passando tranqüilidade e me representando nos momentos em que não poderia estar presente.

À Professora MILIANE MOREIRA, a amiga LÍGIA PORTUGAL e a todos do Laboratório de Bacteriologia pelo ajuda na análise bacteriana, o meu reconhecimento e gratidão.

Ao Professor Dr.MARCELO ELIAS FRAGA pela colaboração e orientação na identificação e isolamento de fungos filamentosos.

Ao Professor FRANCISCO BARONI pela ajuda na identificação das leveduras.

Ao PEDRO AFONSO pela paciência e dedicação na parte estatística e elaboração gráfica.

Ao professor WALTER TEIXEIRA FILHO pela coloração das lâminas para análise citológica.

A estagiária CARLA BUENO pela coloração das lâminas para a citologia vaginal.

A senhora REGINA GONZAGA DOS SANTOS pela atenção e presteza quando solicitada.

Ao meu namorado SERGIO NOVATO pela compreensão durante a conclusão deste trabalho.

À todos, que direta ou indiretamente me ajudaram, me oferecendo tranqüilidade nos momentos onde pensei, pelas dificuldades que não fosse conseguir concluir o meu propósito, o meu muito obrigado.

RESUMO

ANDRADE, Juliana Braga de. **Estudo microbiológico e citológico do trato genital de gatas domésticas**. 2006. 31p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

No presente estudo foi realizada a coleta de material vaginal para as avaliações microbiológicas e citológicas em 39 gatas domésticas, divididas em dois grupos, sendo o primeiro composto de 21 animais inteiros e outro com 18 fêmeas castradas, aparentemente saudáveis, com idade variando de seis meses a 12 anos, de diferentes raças, provenientes de criações domiciliares e particulares do município do Rio de Janeiro. Após a contenção mecânica das fêmeas e limpeza da região vulvar, iniciou-se o procedimento para o isolamento microbiológico, para tal foram necessários dois swabs pediátricos estéreis, previamente umedecidos com solução salina estéril a 0,9%. O primeiro swab foi utilizado para o isolamento bacteriano, sendo acondicionado em meio de transporte Agar Nutriente. O segundo swab para o isolamento fúngico, transportado em Água Peptonada a 1%. Após a coleta, ambos foram mantidos sob refrigeração e encaminhados para análise. Em seguida procedeu-se a coleta para análise citológica com a utilização da escova interdental fina. Os esfregaços foram fixados em álcool absoluto e corados pelo método de coloração rápida (Diff Quick®). Em relação aos dois grupos estudados observou-se diferenças quanto ao número e as espécies bacterianas encontradas. O primeiro grupo teve maior frequência de *Edwardsiella tarda* (19,04%) seguido de *Enterobacter* spp e *Streptococcus* spp, ambos com 17 isolados (16,19%). Em relação aos animais castrados do segundo grupo, houve maior predominância de *Enterobacter* spp (16,88%) e de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* com a mesma proporção (14,28%). No isolamento e identificação fúngica, foi possível também observar diferenças quanto aos isolados em relação aos grupos. No primeiro grupo houve 30,5% de *Candida* spp, seguido de *Aspergillus* spp (18,64%) e *Curvularia* (11,86%). No segundo grupo de animais castrados, houve maior frequência de *Penicillium* spp (25%), *Cladosporium* (18,75%) e *Candida* spp (16,66%). Sobre a associação entre os exames microbiológicos e colpocitológicos, observou-se uma concordância entre os dois métodos auxiliares de diagnóstico da microbiota vaginal de gatas somente em relação ao isolamento bacteriano, mas não em relação à fúngica.

Palavras chave: gatas, microbiota vaginal, citologia vaginal

aBSTRACT

ANDRADE, Juliana Braga de. **Microbiological and cytological study of the genital tract of female domestic cats.** 2006. 31p. Dissertation (Master Science in Veterinary Microbiology) Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

In this study vaginal material was collected for microbiological and cytological evaluation in 39 female domestic cats, divided into two groups. The first group consisted of 21 whole animals, and the second of 18 neutered cats. All animals were apparently healthy, with ages varying from six months to 12 years, and were of different breeds; they came from domestic and county breeding centers in Rio de Janeiro. After mechanical containment, and cleansing of vulvar area, the proceeding for the microbiological isolation begun, for this two sterile pedriatic swabs previously embedded in a 0,9% saline solution were necessary. The first swab was used for bacterial isolation and preserved in Nutrient Agar transportation medium. The second swab was used for the fungal isolation and transported in Peptonated Water 1%. Afterwards, the material of both collections was refrigerated and sent to analysis. After this, the collection for cytological analysis was performed using a small interdental brush. The smears were fixated in absolute alcohol and dyed by the quick dyeing method (Diff Quick ®). In both groups studied differences were observed as to the number and species of bacteria. The first group had a higher frequency of *Edwardsiella tarda* (19,04%), followed by *Enterobacter* spp and *Streptococcus* spp, both with 17 isolations (16,19%). In relation to the neutered animals of the second group there was a higher predominance of *Enterobacter* spp (16,88%) and of *Escherichia coli* and of aeroginous *Pseudomonas* in the same proportion (14,28%). In the fungal isolation and identification it was also possible to observe differences related to the isolated ones in relation to the groups. In the first group there were 30,5% of *Candida* spp followed by *Aspergillus* spp (18,64%) and *Curvularia* spp (11,86%). Whereas in the second group, with castrated animals, there was a higher frequency of *Penicillium* spp (25%), *Cladosporium* (18,75%) and *Candida* spp (16,66%). As to the association between the microbiological and colpocytological exams it was observed that there was an agreement between the two auxiliary methods of diagnostic of vaginal microbiota of female cats only in the bacterial isolation, but not in the fungal isolation.

Key words: cats, vaginal microbiota, vaginal cytology

LISTAS DE TABELAS

- 15 **Tabela 1** Caracterização das 39 gatas domésticas que foram submetidas à análise microbiológica e citológica vaginal.
- 17 **Tabela 2** Frequência absoluta e relativa dos isolamentos bacterianos de acordo com estado reprodutivo das 39 gatas domésticas submetidas à análise microbiológica e citológica vaginal.
- 19 **Tabela 3** Frequência absoluta e relativa dos isolamentos fúngicos de acordo com estado reprodutivo das 39 gatas domésticas submetidas à análise microbiológica e citológica vaginal.

LISTAS DE FIGURAS

- 21 **Figura 1** Quantidade de leveduras presentes nas lâminas avaliadas na citologia vaginal.
- 22 **Figura 2** Quantidade de fungos filamentosos presentes nas lâminas avaliadas na citologia vaginal.

SUMÁRIO

1	1 INTRODUÇÃO
2	2 REVISÃO DE LITERATURA
2	2.1 Microbiota Bacteriana Vaginal
4	2.2 Microbiota Fúngica Vaginal
5	2.3 Citologia Vaginal
5	2.4 Associação entre o Isolamento Microbiano e Citologia Vaginal
6	2.5 Avaliação Microbiológica Vaginal
6	2.5.1 Material utilizado
6	2.5.2 Métodos de coleta
7	2.5.3 Conservação das amostras
7	2.5.4 Isolamento e identificação bacteriana
7	2.5.5 Isolamento e identificação fúngica
7	2.6 Avaliação Citológica
7	2.6.1 Métodos de coleta
8	2.6.2 Fixação do esfregaço
8	2.6.3 Coloração do esfregaço
9	3 MATERIAL E MÉTODOS
9	3.1 Animais
9	3.2 Preparo dos Animais
10	3.3 Avaliação Bacteriana Vaginal
10	3.3.1 Material para coleta
10	3.3.2 Procedimento de coleta
10	3.3.3 Isolamento e identificação bacteriana
11	3.4 Avaliação Fúngica Vaginal
11	3.4.1 Material para coleta
11	3.4.2 Procedimentos de coleta
11	3.4.3 Isolamento e identificação fúngica
12	3.5 Avaliação Citológica Vaginal
12	3.5.1 Material para coleta
12	3.5.2 Procedimento de coleta
12	3.5.3 Análise do esfregaço
12	3.6 Associação entre o Isolamento Microbiano e Citologia Vaginal
13	3.7 Análise Estatística
14	4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

14	4.1 Caracterização dos Animais
14	4.1.1 Caracterização dos grupos 1 e 2
16	4.2 Avaliação Microbiológica Vaginal
16	4.2.1 Isolamento e identificação bacteriana
18	4.2.2 Associação das variáveis de caracterização dos animais com a microbiota bacteriana
18	4.2.3 Isolamento e identificação fúngica
20	4.2.4 Associação entre as variáveis de caracterização dos animais com a microbiota fúngica
20	4.2.5 Associação das variáveis de caracterização dos animais com o estado reprodutivo e a microbiota vaginal
20	4.2.6 Associação entre a microbiota bacteriana e fúngica vaginal
21	4.3 Avaliação Citológica

23 5 CONCLUSÕES

24 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

29 ANEXOS

29	A- Ficha dos Animais
30	B- Coloração de Gram
31	C- Coloração de Panótico

1 INTRODUÇÃO

A reprodução de pequenos animais é um campo da Medicina Veterinária que muito tem se desenvolvido, porém diversos aspectos reprodutivos ainda necessitam ser esclarecidos para que as biotécnicas possam ser aplicadas com sucesso, ampliando assim o ganho reprodutivo das espécies domésticas, principalmente cães e gatos.

O Brasil hoje é o segundo país no mundo em população de animais domésticos, o que exige um crescente desenvolvimento da Medicina Veterinária em diversas áreas. O gato doméstico além do seu valor afetivo, representa um interessante modelo para o estudo de uma série de patologias humanas e constitui um modelo acessível para as investigações na reprodução de felinos silvestres. Muitos estudos na medicina felina estão sendo realizados, porém informações a respeito da reprodução nessa espécie ainda são escassas.

A microbiota naturalmente encontrada na vagina de gatas híginas é um assunto que merece destaque quando se trata da reprodução desses animais. O isolamento e a identificação dos microrganismos normalmente encontrados no ambiente vaginal, é de extrema importância para se efetuar uma correta identificação daqueles envolvidos em processos patológicos como vaginite, abortamento, piometrite e morte neonatal. A interpretação dos resultados do isolamento torna-se difícil, uma vez que a microbiota sofre alterações em função da idade, estágio reprodutivo e fase do ciclo estral dos animais.

A citologia vaginal é um recurso amplamente utilizado na avaliação e no acompanhamento de fêmeas nas diversas espécies, auxiliando na reprodução assistida e no diagnóstico preventivo de processos infecciosos. A análise citológica possui diversas aplicações, entre elas a de verificar a existência de agentes microbianos que podem ou não ter relação com distúrbios reprodutivos. A associação da citologia vaginal com a microbiologia é um assunto ainda pouco estudado na Medicina Veterinária e sua correlação é importante para uma correta análise de resultados.

O objetivo deste trabalho foi de caracterizar a microbiota aeróbia vaginal de gatas domésticas híginas, fazendo a associação dos isolamentos bacterianos e fúngicos aos achados colpocitológicos, permitindo que esta seja uma ferramenta a ser aplicada na Medicina Veterinária Preventiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota Bacteriana Vaginal

Sob condições normais, a microbiota vaginal apresenta composição e número variável. Os microrganismos encontrados neste ambiente também podem estar presentes na pele, fezes e cavidade oral (RAMASWAMY et al., 1991; SHARDA et al., 1991; BALASSU et al., 1992; CAMPERO et al., 1992; KUNZ et al., 2002). No campo da microbiologia do trato reprodutivo feminino, o conhecimento dos microrganismos saprófitas pode ser considerado um requisito básico para se estabelecer diagnósticos apropriados e possibilitar indicações de tratamentos para as patologias infecciosas (DOYLE et al., 1991).

Os microrganismos habituais da vagina protegem este ambiente contra bactérias patogênicas e podem tornar-se patogênicos quando os animais apresentam o sistema imunológico comprometido, em decorrência do estresse causado por fatores variados tais como: súbitas mudanças de temperatura, nutrição deficiente, final de gestação, parto e doenças infecciosas (VERMA et al., 1994; LIANJUAN et al., 1995).

O maior número de microrganismos freqüentemente isolados da mucosa vaginal constitui-se de bastonetes gram-negativos provenientes do trato gastro-intestinal, especialmente *Escherichia coli* e gram-positivos como *Streptococcus* spp (RAMASWAMY et al., 1991; SHARDA et al., 1991; BALASSU et al., 1992; CAMPERO et al., 1992; KUNZ et al., 2002).

Alguns autores analisaram a microbiota naturalmente encontrada na vagina de gatas domésticas, como CLEMETSON & WARD (1990) que avaliaram 53 gatas saudáveis. Os animais foram divididos em três grupos de acordo com a idade e procedência. Foi possível verificar que 52 das 53 amostras vaginais houve crescimento bacteriano aeróbio. As bactérias mais isoladas foram: *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus canis* e *Escherichia coli* (56,0%, 52,0% e 44,0%, respectivamente). Não houve diferença significativa em relação à faixa etária dos animais, mas, quanto à procedência dos mesmos, obteve-se maior freqüência de isolamento nos animais provenientes de diferentes localidades, em comparação aos selecionados de um mesmo gatil. Segundo os autores, muitas bactérias encontradas no estudo em animais hípidos podem desenvolver patologias reprodutivas se a imunidade desses animais for alterada.

Outro estudo envolvendo fêmeas felinas foi desenvolvido por SCHOCKEN-ITURRINO et al. (1992b), no qual os autores realizaram o isolamento e identificação de 80 swabs vaginais procedentes de gatas adultas e inteiras, a fim de avaliar a microbiota vaginal normal nesta espécie. Entre os 223 isolados predominaram as bactérias gram negativas com 81/223 (36,32%), em segundo lugar os cocos gram positivos 70/223 (31,39%), depois bastonetes gram positivos 54/223 (24,21%) e por último os fungos com 18/223 (8,07%). Dentre as espécies bacterianas isoladas duas se destacaram, *Escherichia coli* isolada 67 vezes (83,75%) e *Streptococcus* spp isolados 40 vezes (50%).

Sobre a avaliação da microbiota vaginal em gatas adultas e inteiras realizado por JARDIM et al. (1992) em 12 animais saudáveis, os autores identificaram diversos gêneros bacterianos principalmente *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Lactobacillus* spp e

Enterobactérias em todas as amostras, e só em algumas amostras foram isolados além das anteriores: *Corynebacterium* spp, *Bacillus* spp e Leveduras.

No Brasil, NASCIMENTO & LOPES (1997) desenvolveram um trabalho sobre microrganismos normalmente encontrados na vagina de 28 gatas clinicamente saudáveis, com idades e raças variadas. A análise dos resultados obtidos demonstrou uma maior frequência de *Streptococcus* β hemolítico (30,4%), seguido de *Escherichia coli* (12,1%), *Escherichia coli* hemolítica (12,1%) e *Staphylococcus aureus* (12,1%), entre outros microrganismos em menor proporção.

Em estudo sobre a microbiota vaginal de felinos silvestres, GUIDO et al. (2000) realizaram o isolamento de 15 fêmeas mantidas em cativeiro, sem distúrbios reprodutivos, entre elas: três fêmeas de onça pintada, seis de gato do mato pequeno, quatro de jaguatirica e duas de gato maracajás. Os resultados obtidos com relação a microbiota vaginal foram: 33,3% de *Bacillus* spp, 33,3% de *Staphylococcus* spp em onças pintadas; 50% de *Staphylococcus* spp, 16,7% de *Escherichia coli*, 16,7% de *Proteus vulgaris* em gata do mato pequeno; 100% de *Escherichia coli* em jaguatiricas e 100% de *Proteus vulgaris* em gatas maracajás.

Sobre a caracterização da população bacteriana em gatas domésticas adultas, HOLST et al. (2003) utilizaram 66 animais, havendo o crescimento de bactérias aeróbias em 51 amostras, principalmente *Escherichia coli* hemolítica (32,0%), *Escherichia coli* (17,0%), *Streptococcus canis* (15,0%) e *Staphylococcus* spp (9,0%). Quanto à caracterização dos animais, não foi verificada diferença significativa para animais que haviam cruzado pelo menos uma vez. O fator idade influenciou no número de isolamentos, uma vez que o número de bactérias se mostrou maior em gatas jovens do que nos animais adultos utilizados neste estudo sem, no entanto, apresentar diferença significativa.

A vaginite representa uma importante doença com influência na reprodução, e o conhecimento relativo aos agentes microbianos que habitam contínua ou ocasionalmente o ambiente vaginal dos animais, é relevante para melhor entender essa patologia (MORAES, 2004). De uma maneira geral, observam-se poucos dados a respeito do impacto da vaginite e outras afecções do sistema genital de felinos domésticos (HOLST et al., 2003). Assim, devido ao risco potencial que os fungos e bactérias representam como fontes endógenas de infecções, entende-se ser necessária a identificação destes microrganismos na microbiota vaginal, contribuindo para o conhecimento de seu papel na vaginite e conseqüentemente na reprodução animal (MORAES, 2004).

Processos infecciosos do trato reprodutivo são comuns em gatas e cadelas, estas patologias são responsáveis por mortes de neonatos, representando um risco no processo de reprodução. A associação da microbiota vaginal patogênica com processos de infertilidades e septicemia neonatal já foi observada em cadelas, porém poucos são os dados sobre gatas domésticas (CLEMETSON & WARD, 1990).

O papel de bactérias e fungos no desenvolvimento de doenças reprodutivas não está totalmente elucidado, como conseqüência disso, gatas com distúrbios reprodutivos são tratadas com antibióticos e antifúngicos, especialmente quando estes microrganismos são encontrados em amostras vaginais, eliminando desta forma os agentes naturalmente encontrados neste ambiente e favorecendo a proliferação de bactérias e fungos patogênicos (HOLST et al., 2003).

Poucos são os dados a respeito da microbiota potencialmente patogênica em gatas. SCHOCKEN-ITURRINO et al. (1992a) realizaram o isolamento da microbiota vaginal de 10 gatas adultas durante oito semanas e entre as 223 culturas isoladas foram identificados vários

tipos de bactérias consideradas patogênicas para as vias urogenitais, podendo ocasionar doenças como endometrite, vaginite, cistite, pielonefrite, uretrite, entre outras, sendo elas:

Escherichia coli (30,0%), *Streptococcus* spp (17,9%), *Staphylococcus aureus* (7,2%), *Corynebacterium pyogenes* (5,8%) e *Proteus vulgaris* (2,3%). Os autores concluíram que as bactérias potencialmente patogênicas fazem parte da microbiota normalmente encontrada na mucosa vaginal dessas gatas.

Alguns trabalhos sobre a microbiota vaginal em fêmeas de diversas espécies foram descritos, porém a referência encontrada na literatura que descreve os microrganismos isolados de acordo com o estado reprodutivo foi o realizado por LING & RUBY (1978), onde houve a análise do material vaginal de 41 fêmeas caninas adultas divididas em dois grupos, sendo 20 animais não castrados e 21 castrados. Foi verificado um maior isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus canis* em todos os animais, sendo 70 e 35%, respectivamente, para o primeiro grupo e 55 e 45 %, respectivamente, para o segundo grupo. Analisando os resultados obtidos os autores observaram que não houve diferença significativa na frequência dos microrganismos encontrados entre os animais castrados e inteiros.

2.2 Microbiota Fúngica Vaginal

Os fungos têm sido encontrados no trato genital de animais desde 1920, quando SMITH (1920) descreveu isolamentos a partir de membranas fetais de útero bovino. A partir daí estes microrganismos têm sido descritos como habitantes naturais ou patogênicos dos órgãos genitais de diferentes espécies (MORAES, 2004). Em caninos observa-se que os fungos, principalmente as leveduras, fazem parte da microbiota vaginal normal, com variações de acordo com as fases do ciclo estral, podendo assim constituir uma fonte endógena de infecção (CLEFF et al., 2001).

Em relação aos achados fúngicos vaginais em gatas domésticas, SCHOCKEN-ITURRINO et al. (1992a) realizaram avaliações em 10 animais adultos e hípidos encontrando 18 isolados fúngicos, o que corresponde a 8,07% do total de microrganismos. JARDIM et al (1992), também no Brasil, isolaram leveduras do trato genital de 12 gatas consideradas saudáveis.

Devido à escassez de trabalhos na espécie felina, foi feita uma citação dos resultados encontrados nas outras espécies animais como observado por OLIVEIRA (1990) no Brasil, que estudou a microbiota aeróbia de 90 fêmeas caninas hípidas de diversas raças e idade. Dentre os isolados foi verificada a presença de fungos, sendo: 4,4% de *Penicillium* spp e 1,1% de *Mallassezia pachydermatis* nas amostras vaginais.

Em um trabalho sobre a prevalência de leveduras na cavidade vaginal de fêmeas caninas foram analisadas 299 amostras durante as diferentes fases do ciclo estral, de fêmeas mantidas em ambiente controlado e fêmeas alojadas em canis particulares. Isolaram com maior frequência *Candida* spp, *Rhodotorula* spp e *Malassezia pachydermatis* com 33,3% de frequência nos animais com ambiente controlado e 65,4 % para os animais de canis particulares, concluindo que estas leveduras fazem parte da microbiota vaginal de fêmeas caninas hípidas (CLEFF et al., 2001).

No estudo realizado no Brasil sobre colpocitologia preventiva em cadelas, CHAVES (2003), observou 162 exames citológicos de animais clinicamente saudáveis, provenientes de criações comerciais e particulares, com idade variando de um a 14 anos. Com relação aos achados micóticos vaginais, houve uma ocorrência de 17,4%, sendo identificadas pseudo-

hifas e conídeos nas lâminas da citologia, num total de 49 amostras que foram positivas para pelo menos um microrganismo.

MORAES (2004), realizou investigações sobre a reprodução de 25 fêmeas de micos-leões mantidas em cativeiro, com idade variando entre dois a 12 anos, sem histórico de doenças reprodutivas e julgadas livres de vaginite. Foram obtidos isolamentos fúngicos em 16 animais (64%), sendo 70,6% dos isolados de leveduras identificadas como *Candida* sp, principalmente *Candida glabrata* e 29,4% de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Trichosporon*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Segundo o autor a colonização da vagina de fêmeas de micos-leões por fungos é expressiva, e principalmente as leveduras podem ser consideradas integrantes da microbiota residente, enquanto os fungos filamentosos são colonizadores transitórios ou ocasionais.

As enfermidades fúngicas têm grande importância nos animais domésticos, tanto pela dificuldade na prevenção como na obtenção de um tratamento adequado (GARCIA & BLANCO, 2000). Poucos trabalhos são descritos na literatura sobre a microbiota vaginal fúngica potencialmente patogênica que pode estar associada direta ou indiretamente a distúrbios reprodutivos. O abortamento micótico por *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Zygomycetes* spp e outras leveduras e fungos filamentosos já foram descritos em bovinos e bubalinos (AINSWORTH & AUSTWICK, 1973), bem como casos de endometrites e cervicites determinadas por fungos (COLLINS, 1964; BLUE, 1983; PUGH et al., 1986). Em cadelas com alterações reprodutivas, MORENO et al. (1973), utilizaram 100 fêmeas e obtiveram 5,0 % dos isolados de *Candida albicans*. Neste mesmo trabalho foi verificada a associação entre os microrganismos bacterianos e fúngicos encontrados, constatando-se 16,0% para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, seguida de 8,0% de *Staphylococcus aureus*, *Aerobacter aerogenes* e *Candida albicans* e 4,0% para associação de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Candida albicans*.

2.3 Citologia Vaginal

A colpocitologia também conhecida como citologia vaginal ou citologia esfoliativa é o estudo das células do aparelho genital a partir da esfoliação do epitélio vaginal, sendo um método prático, seguro e barato para avaliação da saúde reprodutiva de cadelas e gatas, avaliando qualitativamente alterações infecciosas e endócrinas (MELLO, 1997). O estudo da citologia esfoliativa, introduzido por Papanicolaou (1942), possibilitou avaliações celulares, uma vez que o epitélio vaginal sofre modificações em função de variações hormonais cíclicas (SCHUTTE, 1967) durante o ciclo estral, sendo também muito utilizada no intuito de diagnosticar precocemente patologias do trato genital de fêmeas (RAPOSO & SILVA, 1999).

A análise citológica vaginal apresenta várias aplicações práticas no caso da espécie felina (HERRON, 1977). O exame auxilia no diagnóstico de doenças uterinas e vaginais (HERRON, 1977; BANKS, 1992), além de revelar a ocorrência de determinadas disfunções endócrinas (ARAGÃO, 2000), permitindo também a visualização de células esfoliadas, leucócitos, bactérias, fungos, espermatozóides (HERRON, 1977), eritrócitos, restos celulares, sujidades e estrias de muco (TONIOLLO et al., 1995).

2.4 Associação entre o Isolamento Microbiano e Citologia Vaginal

Vários autores estudaram a microbiota vaginal em cadelas, tanto a população normal, quanto à patogênica, sendo que, na literatura, poucos trabalhos referem-se à associação destas bactérias com a colpocitologia (CHAVES, 2003).

Freqüentemente, permanecem dúvidas aos clínicos da área de reprodução com relação aos resultados obtidos de exames microbiológicos, os quais devem ser interpretados em associação com a observação clínica e com exames citológicos (LANGONI et al., 1994). Em relação à citologia microbiológica, alguns agentes entre fungos e bactérias podem ser identificados direta ou indiretamente, baseados nas alterações causadas nas células epiteliais, pois o exame não permite a classificação da espécie presente (NETO, 2004).

O exame microbiológico representa um teste indireto para o diagnóstico de doenças infecciosas do aparelho reprodutor. O isolamento de determinado microrganismo não constitui, necessariamente, indicativo de infecção, e o não isolamento deste não elimina o indicativo de doença, desta forma o fato dele não ser isolado no material vaginal não elimina a possibilidade de doenças da reprodução, uma vez que uma série de microrganismos necessita de condições especiais para o seu isolamento (LANGONI et al., 1994).

As técnicas empregadas e a interpretação dos resultados são importantes para avaliar se os microrganismos isolados podem ser incriminados como agentes de doenças reprodutivas, causadores de vaginites, piometrites e endometrites ou contaminantes não patogênicos (BAKER & KENNEY, 1980).

Analisando casos de endometrite causadas por *Candida* spp em éguas, PUGH et al. (1986) demonstraram que a citologia vaginal é um exame tão preciso quanto à avaliação microbiológica. LANGONI et al. (1994), em fêmeas eqüinas, observaram uma boa concordância entre os achados bacteriológicos e citológicos, havendo desta forma uma associação significativamente forte entre os dois tipos de exames. Os autores também puderam concluir que o resultado dos exames citológicos é decisivo quanto ao diagnóstico das endometrites, devendo ser levado em consideração para se evitar resultados falso positivos que acabarão por induzir a tratamentos desnecessários, colocando em risco, inclusive, a integridade da mucosa do trato reprodutivo, e significando gastos com medicamentos.

2.5 Avaliação Microbiológica Vaginal

2.5.1 Material utilizado

Para a coleta de material vaginal para análise microbiológica normalmente utiliza-se swabs estéreis (hastes plásticas ou de madeira), com a ponta recoberta de algodão hidrófilo (MORENO et al., 1973; NASCIMENTO & LOPES, 1997; CLEFF et al., 2001; HOLST et al., 2003) e curetas estéreis (CLEFF et al., 2001). Antes da introdução do swab no ambiente vaginal é realizada uma limpeza da vulva do animal com uma gaze seca ou úmida para retirada de sujidades (MORENO et al., 1973; LANGONI et al., 1994).

O ambiente vaginal de gatas domésticas não contém muito material, desta forma HOLST et al. (2003), observaram que o umedecimento destes swabs com solução fisiológica auxilia na coleta do material.

2.5.2 Métodos de coleta

A coleta deve ser realizada em condições assépticas de modo a assegurar que a mesma não se contamine com outros microrganismos (KONEMAN et al., 2001).

Qualquer que seja a amostra a coletar, o material utilizado deverá estar esterilizado e o procedimento deverá ser realizado antes de qualquer tratamento com antibióticos e antifúngicos. Se a amostra não puder ser trabalhada de imediato, deve ser utilizada uma técnica de conservação, através de meios de transporte (KONEMAN et al., 2001).

2.5.3 Conservação das amostras

A conservação das amostras para diagnóstico microbiológico requer uma refrigeração adequada. De um modo geral, se a amostra não puder ser encaminhada de imediato ao laboratório, deve-se evitar variações importantes da temperatura, conservando-a em torno de 4-5° C, que pode ser obtido com o uso do gelo úmido e a utilização, se necessário, de meios de transporte como o Agar Nutriente, Água peptonada e caldo B.H.I. (caldo infusão cérebro e coração). O material acondicionado nos tubos de ensaio contendo meio de transporte deve ser remetido para análise em caixas de isopor refrigerada (KONEMAN et al., 2001).

2.5.4 Isolamento e identificação bacteriana

Após a chegada do material a ser analisado ao laboratório é realizada a semeadura direta estriando o material por toda placa. Os meios utilizados para o crescimento das colônias devem abranger as exigências das bactérias mais comumente isoladas no ambiente vaginal. As placas devem ser incubadas à 37° C em estufa bacteriológica por um período de 24, 48 e 72 horas, sendo observadas as morfologias das colônias isoladas. Depois da identificação presuntiva das colônias, estas devem ser submetidas ao método de Gram, teste da catalase e hidróxido de potássio a 30%, e depois aos testes bioquímicos pertinentes a espécie suspeita, segundo KONEMAN et al (2001).

2.5.5 Isolamento e identificação fúngica

Após a chegada da amostra ao laboratório, cada swab é semeado em placas contendo Agar Sabouraud a 2% para o crescimento de fungos filamentosos e leveduras. A identificação é feita com base nas características macroscópica das colônias e característica microscópica dos isolados, e quando necessária à utilização de testes bioquímicos. (ELLIS, 1971; ELLIS, 1976; DOMSCH et al., 1980; HOOG et al., 1995; DAVID, 1997; BARNETT et al., 1999; PITT, 2000; KLICH, 2002).

2.6 Avaliação Citológica

2.6.1 Métodos de coleta

Várias técnicas de coleta do material vaginal são descritas (MICHELUZZI & OSTROWSKI, 1976): na direta, a lâmina é pressionada sobre a mucosa vaginal, porém é deficiente, já que a maioria dos preparos realizados mostra distorções celulares, conforme descreveram EVANS & SAVAGE (1970) para cadelas. Na indireta, utilizam-se espátulas de madeira ou metálicas, aspiração do conteúdo vaginal por meio de pipetas de vidro de

extremidade curva contendo solução salina isotônica e swab estéril (CHRISTIE et al.,1970; LEIN, 1988).

Outros métodos também já foram descritos, entre eles: escova ginecológica (ALVARENGA, 1996; CHAVES, 2003) lavado uterino (ALVARENGA, 1996) e escova interdental (ARAGÃO, 2000).

O instrumento utilizado deve ser inserido no vestíbulo vaginal cerca de 1,0 cm a 1,5 cm de profundidade (TONIOLLO et al., 1995) havendo desta forma uma ligeira rotação na mucosa, o instrumento com o exsudato coletado é retirado e rolado sobre a lâmina estéril de microscopia (BANKS, 1992).

2.6.2 Fixação do esfregaço

A fixação do material deve ser feita imediatamente (LUCA, 1981). A lâmina deve ser rapidamente colocada em um frasco com etanol a 95 % (LUCA, 1981) ou em uma solução de partes iguais de éter e álcool a 90 °GL (MILLS et al., 1979; TONIOLLO et al., 1995), ou em álcool absoluto conforme recomendado por SOMRAK et al. (1990).

2.6.3 Coloração do esfregaço

Há vários métodos de coloração já descritos, como o método Shorr (LUCA, 1981; TONIOLLO et al., 1995); o corante de Papanicolaou (MILLS et al., 1979; LUCA, 1981), o corante de Wright (MILLS et al., 1979; OLSON et al., 1984) e coloração diferencial rápida ou coloração de panótico (Diff Quick®), este último de fácil execução, representando um caminho alternativo para a citologia vaginal (NEVES et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizadas 39 gatas divididas em dois grupos: Grupo 1: composto de 21 fêmeas inteiras e Grupo 2: composto de 18 fêmeas castradas. Os animais utilizados apresentavam diferentes raças, com idade variando de seis meses a 12 anos e eram provenientes de criações domiciliares (onde estes eram mantidos isolados, sem contato com outros animais) e particulares (onde viviam aglomerados, sendo denominado neste estudo de gatis) do Município do Rio de Janeiro. Após exame clínico geral, os animais foram considerados saudáveis (de acordo com a temperatura corporal e aspecto geral) e sem indícios de patologias reprodutivas (secreção vaginal, hiperemia e edema vulvar). Por ser tratar de um estudo inicial nesta linha de pesquisa, se faz necessário um acompanhamento do animal, por isto os procedimentos foram realizados juntamente ao exame clínico e anamnese, onde foram colhidos dados referentes à identificação, manejo e histórico clínico geral e reprodutivo dos animais (Anexo A). As variáveis analisadas foram idade, raça, histórico geral, tipo de criação, histórico do ciclo, cruzamentos, amamentação e status reprodutivo.

Quanto à idade, os animais foram separados em quatro intervalos segundo a faixa etária em meses (6 a 24 meses, 25 a 48 meses, 49 a 72 meses e > 73 meses), segundo a raça os animais selecionados foram separados em Persa, Siamês ou SRD (sem raça definida). Sobre o histórico geral foi verificado se os animais eram vacinados e/ou vermifugados. Quanto ao tipo de criação, as gatas foram divididas em criação com aglomerado de felinos (gatis) ou criação domiciliar. Com relação ao histórico reprodutivo, foram verificadas as variáveis cruzamento, amamentação e status reprodutivo. Na variável cruzamento, os proprietários das fêmeas inteiras foram questionados se os animais já haviam cruzado pelo menos uma vez, já o das fêmeas castradas foram questionados se estas gatas haviam cruzado pelo menos uma vez antes da castração. Quanto à amamentação, somente os proprietário das fêmeas inteiras foram questionados se estes animais estavam amamentando no momento do estudo. Sobre o status reprodutivo, as fêmeas foram classificadas em nulíparas (fêmeas que nunca haviam parido) ou paridas (se já haviam parido pelo menos uma vez).

As coletas para avaliação microbiológica e citológica foram realizadas entre os meses de março e maio de 2005.

3.2 Preparo dos Animais

Antes da realização dos procedimentos de coleta, os animais foram contidos de forma segura (contenção mecânica realizada por dois auxiliares) e mantidos em decúbito dorsal conforme descrito por ARAGÃO (2000). Logo depois, a vulva das gatas foi limpa com gaze umedecida com soro fisiológico estéril para retirada de sujidades, conforme procedimento utilizado por MORENO et al. (1973).

Os animais receberam um número seqüencial referente à ordem em que eles foram sendo pegos para a coleta. Esta numeração foi adicionada no formulário (Anexo A).

3.3 Avaliação Bacteriana Vaginal

3.3.1 Material para coleta

Foram utilizados swabs estéreis pediátricos¹ com haste flexível de polipropileno medindo 180 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro, com ponta de algodão hidrófilo (NASCIMENTO & LOPES, 1997; HOLST et al., 2003), tubos de ensaio contendo meio de transporte sólido Agar Nutriente para o acondicionamento dos swabs, soro fisiológico estéril e luvas descartáveis.

3.3.2 Procedimento de coleta

Para a coleta de material vaginal nas gatas, foi realizado o afastamento manual dos lábios vulvares evitando assim a contaminação externa (BJURSTRÖM & FORSBERG-LINDE, 1993), e com as mãos enluvadas foi introduzido o swab umedecido com soro fisiológico estéril por cerca de 1,0 cm de profundidade no vestibulo vaginal, havendo então rotações por toda mucosa vaginal interna (HOLST et al., 2003).

O swab foi colocado dentro de um tubo de ensaio estéril, contendo meio de transporte Agar Nutriente, identificado com o número do animal e imediatamente tamponado com algodão hidrófobo. O material foi mantido sob refrigeração com gelo úmido (5 °C) por um período máximo de 24 horas (BJURSTRÖM & FORSBERG-LINDE, 1993).

3.3.3 Isolamento e identificação bacteriana

No laboratório de Bacteriologia, localizado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, foi realizada a semeadura direta em placas de Petri descartáveis através da alça de platina por esgotamento. Os meios utilizados foram: Agar Sangue, Agar Azida, Agar Manitol Vermelho de Fenol, Agar Mac Conkey e Agar E.M.B. (Eosina de Azul de Metileno). As placas foram incubadas a 37 °C em condições de aerobiose na estufa bacteriológica por um período de 24, 48 e 72 horas, procedendo-se em seguida a observação morfológica e tintorial das colônias isoladas.

Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram (Anexo B), teste da catalase e hidróxido de potássio a 30 %. A partir daí, estabeleceu-se metodologia de identificação pertinente ao microrganismo suspeito. Para as amostras suspeitas de enterobactérias, as seguintes provas de identificação foram realizadas: comportamento em Ágar Tríplice Açúcar-ferro, motilidade em tubo, produção do Indol, produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares, redução do nitrato, produção de gelatinase, produção de urease, degradação do citrato e do malonato, prova de Voges-Proskauer e Vermelho de Metila, de acordo com o microrganismo envolvido. A identificação dos isolados de *Streptococcus* spp foi efetuada através da inoculação em leite adicionado de azul de metileno, e das provas de hidrólise de esculina e do hipurato. Para a identificação do gênero *Staphylococcus* spp, estes eram submetidos à prova da coagulase livre, resistência a bacitracina, redução de nitratos, Voges-Proskauer, fermentação de maltose (KONEMAN et al., 2001).

¹ Marca W-L Imunoquímica

3.4 Avaliação Fúngica Vaginal

3.4.1 Material para coleta

Foram utilizados swabs estéreis pediátricos com haste flexível de polipropileno medindo 180 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro, com ponta de algodão hidrófilo (MORENO et al., 1973; CLEFF et al., 2001), tubos de ensaio contendo meio de transporte líquido Água Peptonada a 1% para o acondicionamento dos swabs, soro fisiológico estéril e luvas descartáveis.

3.4.2 Procedimento de coleta

As gatas foram mantidas em decúbito dorsal para o procedimento. Procedeu-se o afastamento dos lábios vulvares manualmente evitando assim a contaminação externa (BJURSTRÖM & FORSBERG-LINDE, 1993), e com as mãos enluvadas foi introduzido o swab estéril umedecido com soro fisiológico estéril por cerca de 1,0 cm de profundidade no vestíbulo vaginal, havendo então rotações por toda mucosa vaginal interna. O swab foi colocado dentro de um tubo de ensaio estéril contendo meio de transporte Água peptonada a 1%, identificado com o número do animal e tamponado imediatamente com rosca. O material foi mantido sob refrigeração com gelo úmido (5°C) por um período máximo de 24 horas (BJURSTRÖM & FORSBERG-LINDE, 1993).

3.4.3 Isolamento e identificação fúngica

O material foi encaminhado ao laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado no Projeto de Sanidade Animal, para a semeadura em placas de Petri com a utilização do próprio swab. As placas continham os meios de cultura Agar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol levógeno (0,05 g/L), Agar Sangue com cloranfenicol levógeno (0,05 g/L) e Agar Sabouraud Dextrose, todas foram incubadas por 7 dias em incubadora B.O.D. Posteriormente foram feitas as provas iniciais de identificação com azul de algodão, para o reconhecimento de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. As amostras bacterianas foram imediatamente descartadas e o material fúngico foi armazenado em tubos de ensaio contendo o meio Agar Sabouraud Dextrose inclinado e incubados novamente à temperatura de 25 °C por cinco a sete dias. Depois da cultura dos fungos filamentosos, estes foram identificados com base na taxonomia clássica, através do estudo morfológico (macroscópico e microscópico) e quando necessário realizou-se testes bioquímicos.

Para o estudo macroscópico, foram observados a superfície e reverso da colônia, quanto ao diâmetro, cor dos esporos e micélio, textura, presença de exudatos e pigmentos solúveis. As estruturas microscópicas (conidióforos, células conidiogênicas e conídios) foram comparadas às apresentadas por critérios adotados por literaturas específicas (ELLIS, 1971; ELLIS, 1976; DOMSCH et al., 1980; HOOG et al., 1995; DAVID, 1997; BARNETT et al., 1999; PITT, 2000; KLICH, 2002).

Os isolados de leveduras foram caracterizados com a utilização de métodos tradicionais de assimilação e fermentação de açúcares e estudos fisiológicos complementares, de acordo com as chaves de identificação propostas por KURTZMAN e FELL (1998)

3.5 Avaliação Citológica Vaginal

3.5.1 Material para coleta

Foram utilizadas escovas interdentais finas² que possuem uma série de pequenas cerdas de nylon, e medem cerca de 6,0 cm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro. As escovas foram previamente desinfetadas com vapor de formol, sendo colocadas em uma caixa com pastilhas de formalina envoltas em gaze por no mínimo de 48 horas.

Foi utilizado também álcool absoluto, lâmina de vidro lisa³ com borda fosca, lamínula para microscopia⁴, corante Diff Quick® - Panótico Rápido (Anexo C) e microscópio óptico biocular⁵.

3.5.2 Procedimento de coleta

Logo depois das coletas para as análises microbiológicas, foi feita a introdução da escova interdental² no vestíbulo vaginal. A escova penetra cerca de 1,0 a 1,5 cm de profundidade, havendo uma leve rotação na mucosa vaginal. Depois da introdução, o instrumento é deslizado sobre duas lâminas de vidro estéreis devidamente identificadas com o nome e numeração do animal, procedendo-se então a confecção do esfregaço. Em seguida, as lâminas foram fixadas imediatamente no álcool absoluto em um recipiente próprio para acondicionamento das mesmas, por 20 a 30 minutos no mínimo, até ser efetuado a coloração, como recomendado por SOMRAK et al. (1990). As 78 lâminas obtidas foram encaminhadas ao Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e coradas através da técnica do Panótico, com o corante Diff Quick® (Anexo C). Depois da coloração, as lâminas foram devidamente montadas com lamínula para microscopia para preservação do material, sendo avaliadas em microscópio, através das objetivas de 10 e 40.

3.5.3 Análise do esfregaço

Foram realizadas buscas por toda a lâmina a procura de qualquer agente bacteriano ou fúngico, para que pudesse ser feita a associação entre citologia e microbiologia. Os microrganismos encontrados foram identificados como bactérias (cocos, bacilos), leveduras (esporos e hifas) e fungos filamentosos. O critério para a avaliação foi feito segundo ALLEN (1985), que quantificou as estruturas observadas em raras (+), freqüentes (++), abundantes (+++) e incontáveis (++++).

3.6 Associação entre o Isolamento Microbiano e Citologia Vaginal

Os achados do isolamento microbiano e da citologia vaginal foram analisados para que pudesse ser estabelecido ou não uma associação entre os dois exames quanto à presença de bactérias e fungos nas lâminas, e crescimento positivo na microbiologia para o mesmo animal.

² Marca Odontologic

³ Lâmina 24X76 mm - Perfecta

⁴ Lamínula 24X50 mm - Perfecta

⁵ Leintz

3.7 Análise Estatística

As variáveis de identificação, manejo geral e histórico reprodutivo foram associadas ao isolamento bacteriano, fúngico e a citologia vaginal, e cada uma das variáveis consideradas explicativas foi testada pelo Qui-quadrado, usando a correção de Yates, quando necessária o teste Fisher exato, utilizando-se o procedimento de tabelas do programa EpiInfo versão 3.2.2 (CDC, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos Animais

4.1.1 Caracterização dos grupos 1 e 2

Para o estudo foram utilizadas 39 gatas entre inteiras e castradas, nas quais foram realizadas três avaliações para cada animal. A primeira foi visando o isolamento bacteriano, seguido do isolamento fúngico e finalizando pela colpocitologia da mucosa vaginal. Todos os dados relacionados aos dois grupos estudados foram obtidos nas entrevistas com os proprietários dos animais e estão representados na Tabela 1.

Dentre os 21 animais inteiros pertencentes ao Grupo 1, observou-se que a maioria das gatas domésticas utilizadas tinha idade variando de seis a 48 meses (95,2%), sendo que os intervalos de seis a 24 meses e 25 a 48 meses apresentaram a mesma frequência (47,6 %). Em relação ao Grupo 2, a maior frequência foi no intervalo de 25 a 48 meses (39%), correspondendo ao período de maior atividade reprodutiva das fêmeas dessa espécie. Verificou-se também que os animais castrados apresentavam uma faixa de idade maior principalmente no intervalo superior ou igual a 73 meses, este fato pode ser explicado pois, o procedimento de castração normalmente ocorre quando as gatas são mais jovens.

Com relação às raças estudadas, foi verificado que a maior parte dos animais não apresentavam raça definida (SRD) para ambos os grupos com (81,0 %) para o primeiro e (94,5 %) para o segundo grupo.

Quanto ao controle profilático de viroses e verminoses nota-se que ambos os grupos apresentaram maior frequência para animais não vacinados e não vermifugados. Estes dados demonstram que os proprietários das fêmeas selecionadas na sua maior parte não adotavam as medidas profiláticas adequadas.

Foi observado durante as coletas, o local de permanência dos animais. Verificou-se que a grande maioria era proveniente de criações particulares (gatis), este dado se refere a ambos os grupos, sendo: Grupo 1 (80,9%) e Grupo 2 (83,3%).

Quanto ao histórico reprodutivo, nenhum proprietário foi capaz de informar a data do último cio do animal e se a fêmea no momento da seleção para o estudo estava ciclando ou não. Em relação ao estado reprodutivo dos animais, estes foram separados em dois grupos, sendo: Grupo 1 composto de 21 fêmeas equivalendo a 53,8 %, enquanto o Grupo 2 continha 18 gatas, correspondendo a 46,2 % do total de animais. Na literatura consultada não há menção sobre a caracterização das gatas, principalmente quanto ao estado reprodutivo. Este dado só foi descrito em cadelas por LING & RUBY, (1978) que dividiram as fêmeas em dois grupos entre castradas e inteiras.

Tabela 1. Caracterização das 39 gatas domésticas que foram submetidas à análise microbiológica e citológica vaginal.

Variáveis	Grupo 1	%	Grupo 2	%
	Gatas Inteiras		Gatas castradas	
Faixa etária (meses)				
06 a 24	10	47,6	02	11,1
25 a 48	10	47,6	07	39,0
49 a 72	01	4,8	04	22,2
> 73	00	00	05	27,7
Raças				
Persa	02	9,5	00	00
Siames	02	9,5	01	5,5
Sem Raça Definida (SRD)	17	81,0	17	94,5
Vacinação e Vermifugação				
Sim	05	23,8	09	50,0
Não	14	66,6	07	39,0
Somente Vacinadas	01	4,8	01	5,5
Somente Vermifugadas	01	4,8	01	5,5
Tipo de criação				
Gatis (aglomerado)	17	80,9	15	83,3
Casa	04	19,1	03	16,7
Cruzamento				
Sim	13	62,0	09	50,0
Não	08	38,0	09	50,0
Status reprodutivo				
Nulipara	11	52,3	10	55,5
Parida	10	47,7	08	44,5
Amamentação				
Sim	09	42,8	00	00
Não	12	57,2	18	100

As informações sobre o histórico de cruzamentos, prenhez e amamentação foram obtidas do formulário preenchido juntamente ao proprietário. A respeito do histórico de cruzamento, os dois grupos foram verificados.

Quanto a ocorrência de cruzamento no Grupo 1 observou-se que 62,0 % dos animais já haviam cruzado pelo menos uma vez, no Grupo 2 verificou-se proporção semelhante (50,0 %) para animais que tinham histórico de cruzamento e animais que nunca haviam cruzado antes da cirurgia de castração.

Nos animais inteiros e castrados observou-se que a maior parte era nulípara, sendo 52,3 % e 55,5 %, respectivamente. No que se refere a variável amamentação, somente as fêmeas inteiras tiveram este dado analisado. Verificou-se que entre as 21 gatas inteiras do primeiro grupo, 12 animais não estavam no período de amamentação no momento da coleta. Estes dados podem ser confirmados pela Tabela 1.

4.2 Avaliação Microbiológica Vaginal

4.2.1 Isolamento e identificação bacteriana

A microbiota vaginal de fêmeas híginas da espécie felina é um assunto ainda pouco estudado. Raros são os dados a respeito da população bacteriana encontrada neste ambiente, principalmente em animais com e sem atividade reprodutiva. Neste trabalho foram realizadas avaliações qualitativas das bactérias isoladas. Dos exames microbiológicos realizados nas 39 fêmeas obteve-se o crescimento bacteriano em todas as placas semeadas. Na análise dos microrganismos das amostras vaginais observou-se o isolamento de 12 espécies bacterianas, com um total de 182 isolados. As fêmeas do Grupo 1 apresentaram 105 isolados enquanto as fêmeas do Grupo 2 obtiveram 77 isolados. As fêmeas estudadas apresentaram freqüentes isolados de bactérias da família Enterobacteriaceae no ambiente vaginal. Com relação ao Grupo 1, verificou-se uma maior freqüência de *Edwardsiella tarda* (19,04 %), com 20 isolados, seguido de *Enterobacter* spp e *Streptococcus* spp na mesma proporção (16,19 %), com 17 isolados. Quanto ao Grupo 2, foi possível verificar uma maior freqüência de *Enterobacter* spp (16,88 %), depois de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em igual proporção com 11 isolados correspondendo a 15,88 %, conforme a Tabela 2.

Com base nos dados obtidos, foi observado que o estado reprodutivo dos animais influenciou o crescimento de algumas bactérias. No Grupo 1, além das enterobactérias houve o isolamento de *Lactobacillus* spp em 16 animais (15,23 %), não havendo, no entanto, o seu isolamento no grupo das fêmeas castradas. Outras bactérias também tiveram seu crescimento influenciado pelo estado reprodutivo, *Streptococcus* spp foi encontrada em 17 isolados de animais inteiros (16,19 %) e em somente três animais castrados (3,89 %), *Citrobacter diversus* obteve 7,61 % de freqüência no Grupo 1, não apresentando crescimento no Grupo 2. *Edwardsiella tarda* obteve 19,04% no Grupo 1 e 3,89 % no Grupo 2.

Seguindo esta mesma relação verificou-se que no grupo sem atividade reprodutiva (Grupo 2), houve maior freqüência para algumas espécies bacterianas como *Pseudomonas aeruginosa* que obteve o seu isolamento somente nos animais castrados (14,28 %). *Escherichia coli*, que foi isolada com uma freqüência de 14,28 % nos animais castrados correspondendo a 11 isolados, enquanto apenas 1,90 % da freqüência foi observada nos animais do Grupo 1. *Corynebacterium* spp também teve seu crescimento diferenciado entre os grupos, onde obteve 12,91 % de freqüência para animais do Grupo 2, sem, no entanto, não apresentar isolamento no Grupo 1. *Serratia* spp e *Enterococcus* spp apresentaram respectivamente cinco (6,49%) e quatro isolados (5,19%) em gatas castradas, não apresentando crescimento em gatas inteiras.

Tabela 2. Frequência absoluta e relativa dos isolamentos bacterianos de acordo com estado reprodutivo das 39 gatas domésticas submetidas à avaliação microbiológica e citológica vaginal.

Espécies bacterianas isoladas	Fêmeas			
	Inteiras (Grupo 1)	%	Castradas (Grupo 2)	%
<i>Edwardsiella tarda</i>	20	19,04	03	3,89
<i>Streptococcus</i> spp	17	16,19	03	3,89
<i>Enterobacter</i> spp	17	16,19	13	16,88
<i>Lactobacillus</i> spp	16	15,23	00	0,00
<i>Micrococcus</i> spp	15	14,28	10	12,91
<i>Hafnia alveo</i>	10	9,52	07	9,09
<i>Corynebacterium</i> spp	00	0,00	10	12,91
<i>Serratia</i> spp	00	0,00	05	6,49
<i>Enterococcus</i> spp	00	0,00	04	5,19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	0,00	11	14,28
<i>Escherichia coli</i>	02	1,90	11	14,28
<i>Citrobacter diversus</i>	08	7,61	00	0,00
Total	105	100,00	77	100,00

Com base nesses resultados foi possível verificar que os dois grupos apresentaram diferenças significativas quanto ao isolamento e as espécies de bactérias isoladas. O Grupo 1 continha animais mais jovens e em atividade reprodutiva o qual segundo HOLST et al. (2003) explica o fato do maior número de isolamentos quando comparado ao Grupo 2.

Com referência às bactérias encontradas neste estudo, verificou-se maior frequência de isolados da família Enterobacteriaceae em ambos os grupos, resultado semelhante foi encontrado por JARDIM et al. (1992), que descreveram esta família de bactérias como frequentemente encontrada na microbiota vaginal de gatas híginas, divergindo parcialmente dos outros autores citados na literatura que encontraram predominantemente três espécies de bactérias: *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp e *Staphylococcus* spp (CLEMENSTON & WARD, 1990; SCHOCKER-ITURRINO et al., 1992b; NASCIMENTO & LOPES, 1997; HOLST et al., 2003).

As bactérias *Escherichia coli* e *Streptococcus* spp foram isolados e tiveram grande frequência dependendo do grupo analisado, sendo que no Grupo 1 houve maior frequência para *Streptococcus* spp (16,19 %) e no grupo 2 para *Escherichia coli* (14,28 %). A maior divergência está relacionada ao isolamento de *Staphylococcus* spp, uma vez que no trabalho em questão não houve o crescimento da bactéria citada, o que confronta com dados da literatura que a descrevem como predominante na microbiota de gatas domésticas (CLEMENSTON e WARD, 1990; SCHOCKER-ITURRINO et al., 1992b; NASCIMENTO & LOPES, 1997; HOLST et al., 2003).

Quanto à diferença estatística observada no crescimento de algumas espécies bacterianas com relação ao estado reprodutivo, nenhum trabalho relacionado a gatas domésticas foi relatado na literatura e, portanto nenhuma comparação pode ser realizada. Relacionou-se esta diferença a um trabalho semelhante desenvolvido em cadelas (LING & RUBY, 1978), onde os autores observaram diferença somente na frequência quantitativa das bactérias quanto aos grupos, mas não nas espécies isoladas.

Analisando as bactérias isoladas quanto ao estado reprodutivo, verificou-se que algumas bactérias encontradas com mais frequência nas gatas castradas são descritas na literatura como microrganismos potencialmente patogênicos e que podem causar alterações nas vias urogenitais conforme relatado por SCHOCKER-ITURRINO et al. (1992 a). No presente estudo houve o isolamento e identificação bacteriana, porém os microrganismos não foram analisados quanto a sua patogenicidade, uma vez que eles podem representar a microbiota naturalmente encontrada na mucosa vaginal desses animais sem, no entanto, causar patologias ligadas ao trato reprodutivo, necessitando de fatores predisponentes ligados ao hospedeiro (VERMA et al., 1994; LIANJUAN et al., 1995).

4.2.2 Associação das variáveis de caracterização dos animais com a microbiota bacteriana

Após a caracterização das variáveis houve a associação destas com a microbiota vaginal desses animais, observando as diferenças de significância pelo testes do Qui-quadrado, ou de Fisher exato quando recomendado.

Em relação à faixa etária de seis a 24 meses e o isolamento bacteriano observou-se significância ao nível de 95 % com a espécie *Corynebacterium* spp (p=0,04), *Serratia* spp (p=0,02) e *Edwardsiella tarda* (p=0,03).

Ao analisar os dados com referência ao estado reprodutivo (inteiras e castradas) e o isolamento bacteriano, constatou-se significância com a espécie *Enterobacter* spp (p=0,03) nas gatas castradas. Resultado semelhante (p=0,03) foi também observado em relação ao tipo de criação (gatos aglomerados - Gatis) com a mesma bactéria.

Observou-se uma alta significância (p<0,001) entre a variável castração e as bactérias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Corynebacterium* spp. Nas gatas inteiras, a associação altamente significativa (p<0,001) foi observada para *Lactobacillus* spp, *Streptococcus* spp e *Edwardsiella tarda*. Verificou-se também uma significância (p<0,05) com as bactérias *Serratia* spp e *Enterococcus* spp e o Grupo 2 e para *Citrobacter diversus* no Grupo 1.

4.2.3 Isolamento e identificação fúngica

Com relação ao isolamento e identificação fúngica no presente estudo, foi observado um crescimento tanto de fungos filamentosos como de leveduras. Leveduras têm sido descritas no ambiente vaginal de diversas espécies principalmente em mulheres e cadelas (CLEFF et al., 2001). Os fungos filamentosos são achados mais raros e na sua maior parte não estão associados a problemas reprodutivos (MORAES, 2004). No presente trabalho verificou-se um total de 107 isolados entre leveduras e fungos filamentosos. Os fungos filamentosos apresentaram o maior número de isolados com 68 (63,55 %) e leveduras com 39 (36,44 %).

Poucos são os achados na literatura sobre a colonização fúngica no ambiente vaginal em gatas domésticas. Nenhum autor realizou o isolamento e identificação somente da microbiota fúngica nesses animais, os dados descritos em alguns trabalhos demonstram achados que foram observados na realização do isolamento bacteriano. Portanto, há a necessidade de mais trabalhos que descrevam e avaliem a população fúngica encontrada na vagina de gatas saudáveis como também com distúrbios reprodutivos, correlacionando e diferenciando quando possível esta microbiota presente, aliando estes resultados ao estado reprodutivo.

Com relação aos fungos isolados nos dois grupos distintos, houve diferença na frequência entre os gêneros. No Grupo 1, verificou-se alta frequência de *Candida* spp (30,5 %), *Aspergillus* spp (18,64 %) e *Curvularia* spp (11,86 %). No Grupo 2, observou-se maior incidência de *Penicillium* spp (25,0 %), *Cladosporium* spp (18,75 %) e *Candida* spp (16,66 %), dados estes demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência absoluta e relativa dos isolamentos fúngicos de acordo com estado reprodutivo das 39 gatas domésticas submetidas à avaliação microbiológica e citológica vaginal.

Espécies fúngicas isoladas	Fêmeas			
	Inteiras (Grupo 1)	%	Castradas (Grupo 2)	%
<i>Candida</i> spp	18	30,50	08	16,66
<i>Aspergillus</i> spp	11	18,64	06	12,50
<i>Curvularia</i> spp	07	11,86	05	10,41
<i>Rhodotorula</i> spp	06	10,16	07	14,58
<i>Cladosporium</i> spp	05	8,47	09	18,75
<i>Penicillium</i> spp	05	8,47	12	25,00
<i>Monocyllium</i> spp	03	5,08	00	0,00
<i>Torula</i> spp	03	5,08	00	0,00
Dematiaceo	01	1,69	00	0,00
<i>Fusarium</i> spp	00	0,00	01	2,08
Total	59	100	48	100

Pela dificuldade de comparação desses resultados com outros estudos em gatas, principalmente quanto ao estado reprodutivo, realizou-se a associação com outras espécies animais. Sobre a frequência fúngica encontrada na literatura consultada, os valores variam de 4,4 % em cadelas (OLIVEIRA., 1990) a 29,4 % em fêmeas primatas (MORAES, 2004). Os fungos filamentosos também foram descritos por MORAES (2004) em Mico-Leão, que observou o isolamento de 29,4% desses microrganismos no ambiente vaginal, sendo principalmente *Trichosporon* spp, *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Em outro estudo realizado por OLIVEIRA (1990) em cadelas foi descrito o isolamento de *Penicillium* spp, com pequena frequência entre os microrganismos encontrados (4,4 %).

Somente dois trabalhos foram citados em gatas domésticas adultas e hígdas, SCHOCKER-ITURRINO et al. (1992b) observaram 18 isolados fúngicos, não especificando se estes eram filamentosos ou possuíam características leveduriformes. Este achado se difere do presente estudo, onde encontrou-se 107 isolados fúngicos, sendo 39 de leveduras e 68 fungos filamentosos. JARDIM et al. (1992) descreveram que dentre a microbiota vaginal encontrada em animais saudáveis houve o isolamento de leveduras, porém os autores não citaram as porcentagens e nem as espécies encontradas.

A respeito das leveduras encontradas na vagina das gatas aparentemente saudáveis, selecionadas para o estudo observou-se que somente duas espécies foram isoladas *Candida* spp e *Rhodothorula* spp. Estas leveduras já foram descritas por CLEFF et al. (2001) em fêmeas caninas, onde os autores acharam 65,4 % de crescimento para as leveduras *Rhodothorula* spp, *Candida* spp e *Malassezia pachydermatis*. MORENO et al. (1973) isolaram 5,0 % de *Candida* spp em cadelas. MORAES (2004), relatou o isolamento de *Candida* spp (70,6 %) em Micos-leões.

Vários são os autores que encontraram leveduras na mucosa vaginal, porém as frequências encontradas por eles se diferem dos achados do estudo em questão.

4.2.4 Associação entre as variáveis de caracterização dos animais com a microbiota fúngica

Verificou-se a associação entre as diversas variáveis de caracterização dos animais selecionados e o isolamento fúngico. Foram utilizadas as variáveis faixas etárias, status reprodutivo, tipo de criação, histórico de cruzamento e amamentação, porém estas não tiveram significância quando foram confrontadas aos fungos encontrados. Nos dados relacionados ao estado reprodutivo constatou-se significância ($p > 0,05$) para *Candida* spp no Grupo 1 e *Penicillium* spp no Grupo 2.

4.2.5 Associação das variáveis de caracterização dos animais com o estado reprodutivo e a microbiota vaginal

Com relação às gatas inteiras, constatou-se que as bactérias *Citrobacter diversus* e *Corynebacterium* sp apresentaram alta significância ($p < 0,001$) no intervalo de idade de 6 a 24 meses e no intervalo de 25 a 48 meses respectivamente. *Edwardsiella tarda* e *Hafnia alveo* apresentaram significância ($p = 0,04$) na faixa de 25 a 48 meses nas fêmeas no mesmo grupo. Já em relação às gatas castradas, *Escherichia coli* apresentou significância ($p = 0,04$) no intervalo de idade de 25 a 48 meses.

Verificou-se significância ($p = 0,02$) para *Candida* spp em animais inteiros com idade variando entre seis a 24 meses, correspondendo aos achados de CLEFF et al. (2001) em fêmeas em atividade hormonal cíclica.

A variável amamentação apresentou significância com a bactéria *Enterobacter* spp ($p = 0,02$), e os fungos *Candida* spp ($p = 0,04$), *Cladosporium* ($p = 0,04$), *Penicillium* spp ($p = 0,01$) e *Rhodothorula* spp ($p = 0,02$) nos animais inteiros.

4.2.6 Associação entre a microbiota bacteriana e fúngica vaginal

Isolamentos bacterianos e fúngicos também foram analisados quanto a sua significância pelo teste do Qui-quadrado, sendo verificado que a bactéria *Lactobacillus* spp

apresentou uma associação altamente significativa ($p < 0,0001$) com as bactérias *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp* e com a levedura *Candida spp*. A bactéria *Edwardsiella tarda* também apresentou alta significância ($p < 0,0001$) em associação a *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp*, *Streptococcus spp* e *Penicillium spp*. Somente um trabalho citado por MORENO et al., (1973) descreveram sobre a associação dos microrganismos encontrados, porém os resultados obtidos pelo autor citado não se assemelham com os obtidos no presente estudo.

4.3 Avaliação Citológica

A citologia vaginal é descrita em pequenos animais principalmente no acompanhamento de gestação, reprodução assistida e também nos diagnósticos precoces de distúrbios reprodutivos. No presente estudo, utilizou-se a citologia com o intuito de verificar a presença de bactérias e fungos nas lâminas analisadas associando estes achados com os resultados da microbiologia. Alguns trabalhos já foram descritos com esta finalidade e constataram que a citologia é considerada um exame confiável (PUGH et al., 1986; LANGONI et al., 1994; NETO, 2004).

Em relação à presença de leveduras, verificou-se que 79,0 % das lâminas analisadas não apresentaram estes microrganismos no esfregaço. Estes resultados foram associados ao isolamento fúngico, desta forma, a lâmina devidamente identificada com o nome e numeração do animal é associada com os resultados do isolamento fúngico da amostra vaginal do mesmo animal. Como foram isolados 36,44 % de leveduras e apenas 21,0% das lâminas apresentaram estruturas leveduriformes, nota-se que não houve associação significativa entre os dois exames (Figura 1).

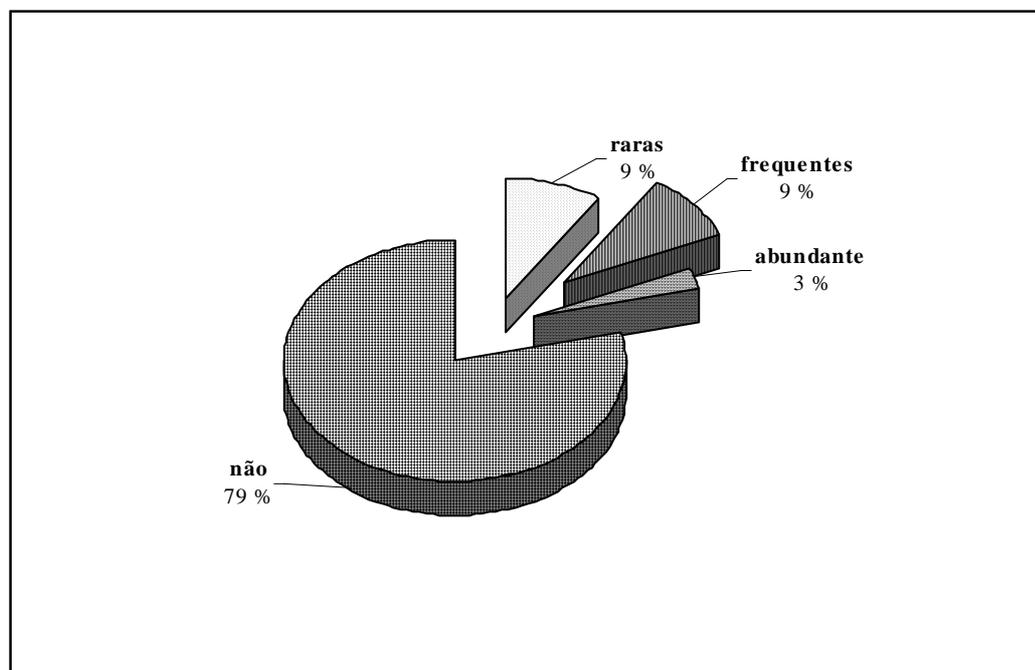


Fig 1. Quantidade de leveduras presentes nas lâminas avaliadas na citologia vaginal

Quanto à associação da citologia vaginal com o isolamento de fungos filamentosos, verificou-se que 88,0 % das lâminas não apresentaram indícios fúngicos, enquanto que na análise microbiológica 63,55 % dos isolados fúngicos eram positivos. Com base nestes dados verificou-se que a citologia não é um exame preciso no diagnóstico preventivo de enfermidades fúngicas do aparelho reprodutivo, discordando dos achados de PUGH et al. (1986). Os resultados estão demonstrados na Figura 3.

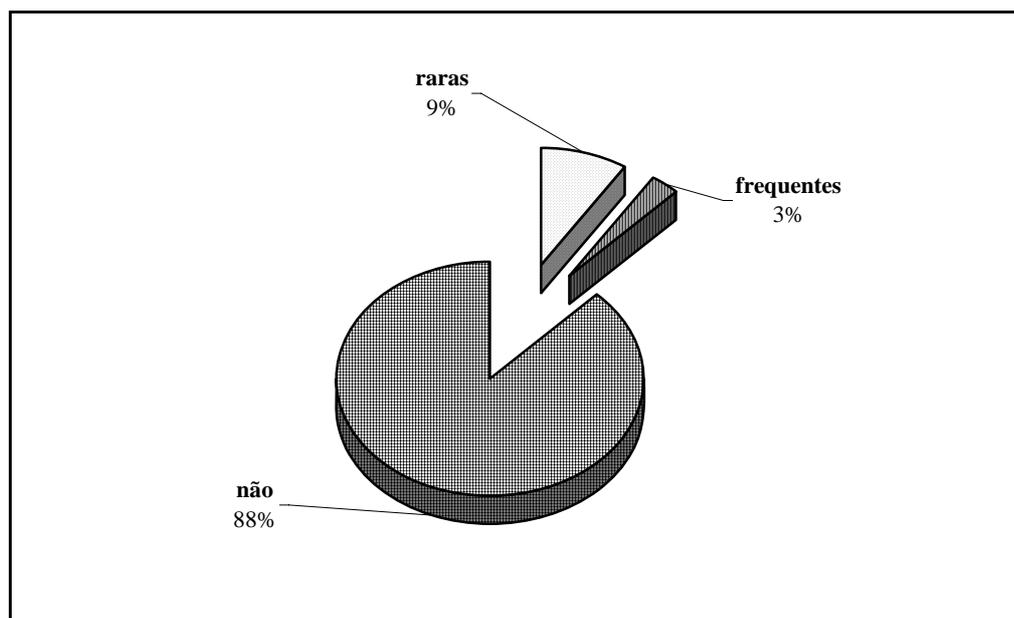


Fig 2. Quantidade de fungos filamentosos presentes nas lâminas avaliadas na citologia vaginal.

Analisando o isolamento bacteriano das amostras vaginais com as lâminas do esfregaço foi verificada a presença de bactérias em todas as lâminas da citologia (100 %), este resultado tem grande associação ao isolamento bacteriano que também obteve crescimento positivo em todas as amostras analisadas. Desta forma é possível constatar que a citologia vaginal é um exame tão preciso quanto a microbiologia em relação à constatação de bactérias, resultado semelhante foi observado por LANGONI et al (1994).

5 CONCLUSÕES

- ❖ A citologia vaginal teve associação significativa com o isolamento bacteriano, observado pela presença de cocos e bacilos nas lâminas com crescimento bacteriano positivo, porém a mesma associação não foi obtida no isolamento fúngico.
- ❖ Quanto ao isolamento bacteriano observou-se que a família Enterobacteriaceae foi comum aos dois grupos de animais, diferindo apenas na presença de *Lactobacillus* spp nas gatas inteiras e *Pseudomonas aeruginosa* nas gatas castradas.
- ❖ Com referência ao isolamento fúngico, as gatas inteiras apresentaram maior frequência para o isolamento de *Candida* spp do que as castradas que obtiveram maior frequência para *Penicillium* spp.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, G.C. & AUSTI WICK, P.K.C. *Fungal diseases of animals*. Surrey: Commonwealth Agricultural Bureaux., 216 p., 1973.

ALLEN, W. E. Abnormal vaginal cytology in a fertile bitch. *Journal of Small Animal Practice*, v. 26, p. 333-335, 1985.

ALVAREGA, M.E. *Avaliação de diferentes métodos de colheita e da eficiência do exame citológico em detectar alterações sazonais e patológicas do endométrio equino*. Botucatu: Universidade do Estado de São Paulo, 1996, 91 p. Tese de Doutorado.

ARAGÃO, C.N. *A utilização de um novo método de coleta do material para análise colpocitológica em gatas, a escova interdental, e sua comparação com o swab*. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2000, 80 p. Tese de Mestrado.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.E. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4 th ed., Saint Paul, MN p. 218 Ilust., 1999.

BAKER, C.B.; KENNEY, R.M. *Systematic approach in the diagnosis of the infertile or sub-infertile mare*. In: MORROW, D.A. *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders. p.721-736, 1980.

BALASSU, M.T.; TORRES, E.B.; VIZMANOS, M.F.C. Bacteriologic profile of the uterus and vagina of non-pregnant buffalo-cows. *Philadelphia Journal of Medicine*, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 35-41, 1992.

BANKS, W.J. *Histologia Veterinária aplicada*. 2 ed. São Paulo: Manole, 1992. 692p. Cap. 29: *Introdução à citologia exfoliativa*, p. 620-629.

BJURSTÖM, L.; FORSBERG-LINDE, C. Long term study of aerobic bacteria of genital tract in breeding bitches. *American Journal of Veterinary Research*. , v. 53, n. 5, p. 665-669, 1993.

BLUE, M.G. Mycotic invasion of mare's uterus. *Veterinary Record*, v.113, p.113-131, 1983.

CAMPERO, C.M.; CONOSCIUTO, G., ODRIOZOLA, E. Hallazgos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos em vaca lecheras, associados com problemas reprodutivos. *Revista Medicina Veterinária Buenos Aires*, v. 72, n. 6, p. 264-272, 1992.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/publications.htm>>. Acesso em 10/01/2004.

CHAVES, A. R. *Colpocitologia em ginecologia preventiva de cadelas*. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2003, 97 p. Tese de Mestrado.

CHRISTIE, D.W.; BAILEY, J.B.; BELL, E.T. The collection of vaginal smears from the Beagle bitch. *Veterinary Record*, v. 87, p. 265, 1970.

CLEFF, M. B.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A.R.M.; ANTUNES, T.A.; NASCENTE, O.S.; GOMES, F.R.; SOUZA, L.L.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. *Isolamento de leveduras da microbiota vaginal de cadelas relacionado com a fase do ciclo estral*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 3, 2001, Águas de Lindóia. Anais. p.130

CLEMETSON, L.L ; WARD, A.C.S. Bacterial flora of the vagina and uterus of healthy cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 196, n. 6, p. 902-906, 1990.

COLLINS, S.M. Study of incidence of cervical and uterine infection in Thoroughbred mares in Ireland. *Veterinary Record*, v. 66, p. 673-676, 1964.

DAVID, J.C. A contribution to the systematics of Cladosporium. *Myc. Papers*, n. 172, p. 157 ilust., 1997.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. Compendium of soil fungi. v. I and II. London: Academic Press., 1980.

DOYLE, L.; YOUNG, C.L.; JANG, S.S.; HILLIER, S.L. Normal vagina aerobic and anaerobic bacterial flora of the rhesus macaque (*Macaca mullata*). *Journal of Medical Primatology*, v. 20, p. 409-413, 1991.

ELLIS, M.B. *Dematiaceus Hyphomycetes*. Wallingford, UK: CAB International. p. 608, 1971.

ELLIS, M.B. *More Dermatiaceus Hyphomycetes*. Wallingford, UK: CAB International. 507 p., 1976.

EVANS, J.M. ; SAVAGE, T.J. The collection of vaginal smears from bitches. *Veterinary Record*, v. 87, n. 19, p. 598-599, 1970.

GARCIA, M.E. ; BLANCO, J.L. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Revista Iberoamericana de micología*, v. 17, p. S2-S7, 2000.

GUIDO, M.C.; PAZ, R.C.R.; COSTA, E.O.; ZUGE, R.M.; BENITES, N.R.; BARNABÉ, V.H.; BARNABÉ, R.C. *Microbiota prepucial e vaginal de felinos neotropicais mantidos em cativeiro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 27, Águas de Lindóia – SP, Anais, 2000.

HERRON, M.A. Feline vaginal cytologic examination. *Feline Practice*, v. 7, p. 36-39, 1977.

HOOG, G.S.; GARRO, J.; TAN, C.S.; WINTERMANS, R.G.F.; GENE, J. Atlas of clinical fungi. Netherlands:Baarn, p. 720 , 1995.

HOLST, B.C.; BERESTROM, A.; LAGERSTEDT, A.S.; KARLSTAM, E.; ENGLUND, L.; BAVERUD, V. Characterization of the bacterial population of the genital tract of adult cats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 64, n. 8, p. 963-968, 2003.

JARDIM, W.R.R.; VICENTE, W.R.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Avaliação da microbiota vaginal, em fêmeas felinas adultas, durante as fases do ciclo estral. In: ANAIS DO IV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA; Araçatuba: UNESP, v. único, p. 103-104, 1992.

KLICH, M. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Netherlands: CBS. p. 116 ilust., 2002.

KONEMAN, G.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WIN, W.C. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido*. 5 ed. Editora Medsi, 2001

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

KURTZMAN, C.; FELL, J. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 4th ed. Elsevier: Amsterdam, 1998.

LANGONI, H.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; SAKAMOTO, C.; SIMON, J.J.; LISTONI, F.J.P.; CARREIRA, E.L.C. Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 46, n. 6, p. 623-636, 1994.

LEIN, D.H. *Diagnóstico diferencial do corrimento vulvar na cadela*. In: KIRK, R.W. *Atualização Terapêutica Veterinária*. São Paulo: Manole, 1988. 1688 p. Seção 14, p. 1549-1551.

LIANJUAN, M.; YUEMIN, L.; XUN-M. Microbial flora of the vagina of cows after parturition. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, v. 25, n. 5, p. 26-27, 1995.

LING, G.V ; RUBY, A.L. Aerobic flora of the prepuce, urethra, and vagina of normal adult dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 39, n. 4, p. 695-698, 1978.

LUCA, L.A. de. *Ginecologia: Semiologia Clínica e Laboratorial*. São Paulo: Sarvier, 1981. 283 p. Cap. 4: *Citologia em Ginecologia*, p. 15-32.

MELLO, M.L.V. *Avaliação clínica e colpocitológica de cadelas com problemas reprodutivas em clínicas do estado do Rio de Janeiro*. 1997. 114 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

MERZ, W.D.; ROBERTS, G.D. IN: MURRAY, P.R. *Manual of Clinical microbiology*. 6 ed. Ed. Am. Soc. Microbiol.; Washington, 1995.

MICHELUZZI, A.A.; OSTROWSKI, J.E.B. Vaginal cytology in canine gynecological practice. *Revista Militar de Veterinária*, v. 22, n. 104, p. 155-158, 1976.

MILLS, J.N.; VALLI, V.E.; LUMSDEN, J.H. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Canadian Veterinary*, v. 20, n. 4, p. 95-101, 1979.

MORAES, I.A. *investigações sobre a fisiopatologia da reprodução em micos leões (Leontopithecus sp., LESSON, 1840) mantidos em cativeiro (Callitrichidae - Primates)*. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2004, 156 p. Tese de Doutorado.

MORENO, G.; BICUDO, P.L.; LOPES, C.A.M. Aspectos bacteriológicos da flora vaginal de cadelas. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo*, v. 40, n. 1, p. 59-62, 1973.

NASCIMENTO, M.C.M.O.; LOPES, M.D. Estudo comparativo da flora bacteriana normal da vagina e útero de gatas clinicamente sadias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, n. 2, p. 175-177, 1997.

NEVES, C.P.; ROSSI, C.R.S.; ALMEIDA, L.E.F.; MORAES, I.A. Estudo comparativo entre os métodos de Papanicolaou e Coloração Diferencial Rápida (CDR) em citologia vaginal de cadelas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n. 3, p. 476- 477, 2001.

NETO, J.B.L. Exames colpocitológicos. Disponível em: <<http://www.procelula.com.br/jornal/edicao6.html>>. Acesso em: 25 mar. 2004.

OLIVEIRA, C.M. *Estudo da microbiota aeróbia e pH vaginal, em fêmeas púberes e híginas da espécie canina (Canis familiaris), durante as fases do ciclo estral*. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1990. 72 p. Tese de Mestrado.

OLSON, P.N; THRALL, M.A.; WYKES, P.M. Vaginal cytology. Part 1. A useful tool for staging the canine estrous cycle. *Comparative Continuation Edition Practice Veterinary*, v. 6, n. 4, p. 288-297, 1984.

PAPANICOLAOU, G.N.; A new procedure for staining vagina smears. *Science*, v. 95, p. 438-439, 1942.

PITT, J. A laboratory guide to common Penicillium species. North Ryde, Australia: CSIRO. p. 187 ilustr., 2000.

PUGH, D.G.; MARTIN, M.T.; SHULL, J.W.; BOWEN, J.M. Endometrial candidiasis in five mares. *Journal of equine Veterinary Science*, v. 6, p. 40-43, 1986

RAMASWAMY, V.; ANDREW, M.; ROY, P. Aerobic microbes of cervico-vaginal mucus from repeat breeders bovines and their antibiogram. *Singapore Veterinary Journal*, v. 14-15, p. 60-65, 1991.

RAPOSO, R.S.; SILVA, L.D.M. Comparação qualitativa de diferentes técnicas de coloração para citologia vaginal em cabras da raça Saanen. *Ciência Animal*, v. 9, n. 2, p. 81-85, 1999.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; VICENTE, W.R.R.; TONIOLLO, G.H.; JARDIM, J.P.C.; PUGLIESES, A .C. *Bactérias patogênicas isoladas na microbiota vaginal de gatas (Felis catus) consideradas clinicamente sadias*. In: ANAIS DO XIV ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS; Jaboticabal: UNESP, v. único, p. 97-97, 1992.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; VICENTE, W.R.R.; TONIOLLO, G.H.; JARDIM, J.P.C.; BERCHIELLI, S.C.P. *Estudo microbiológico da vagina de felinas adultas*. IN: ANAIS DO XIV ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS; Jaboticabal: UNESP, v. único, p. 97-97, 1992.

SCHUTTE, A.P. Canine vaginal cytology thechnique and cytological morphology. *Journal of Small Animal Praticce*. v. 8, p. 301-306, 1967.

SHARDA, R.; MOGHE, M.N.; TANWANI, S.K. Antibiotic sensitivy pattern of bacteria isolated from repeat breeding animals. *Indian Veterinary Journal*, v. 68, p. 197-200, 1991.

SMITH, T. Mycosis of the bovine fetal membranes due to a mould of the genus Mucor. *Journal of Experimental Medicine*, v. 31, p. 115-22, 1920.

SOMRAK, T.M.; SORENSEN, K.; ABDUL-KARIM, F. *Pap smears: collection, handling and quality assurance*. In: Cervical Cytology Practice Guiddines. Chicago: American Society of Cytopathology Press, 1990. p. 201-226.

TONIOLLO, G.H.; CURY, S.R.; VICENTE, W.R.R.; CAMACHO, A.A; GARCIA, J.M.; VANTINI, R. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v. 32, n. 2, p. 125-129, 1995.

VERMA, H.K.; SHARMA, D.K.; KAUR, H.; DHABLAMA, D.C. A bacteriological study of repeat breeders cows and their treatment. *Indian veterinary Journal*, v. 47, n. 6, p. 467-470, 1994.

ANEXO B – COLORAÇÃO DE GRAM

Solução A

- Cristal violeta - 1 g
- álcool etílico 95% - 10 ml

Solução B

- Oxalato de amônio - 0,8 g
- água destilada - 80 ml

Misturar as duas soluções.

Nota:

- iodo - 1 g
- iodeto de potássio - 2 g
- água destilada - 300 ml

Nota:

- Safranina - 0,25 g (dissolvido em 10 ml de álcool etílico a 95%)
- Água destilada - 100 ml

Nota:

- Verde Malaquite - 5 g
- Água destilada - 100 ml

Procedimento:

1. Cobrir a lâmina com uma solução de cristal violeta. Deixar agir durante 1 minuto.
2. Escorrer o corante e lavar com jatos fracos de água corrente. Cobrir a preparação com reagente de Lugol e deixar agir durante 1 minuto.
3. Escorrer a solução de Lugol, lavar com água.
4. Diferenciar pelo álcool a 90°, deixando cair a solução de álcool gota a gota sobre a lâmina por aproximadamente 20 segundos.
5. Tornar a corar a preparação, durante 5 minutos, com uma solução de safranina (fucsina), deixando agir por 30 segundos.
6. Escorrer o corante, lavar com água e secar a lâmina na chama do bico de Bunsen.

ANEXO C - COLORAÇÃO DE PANÓTICO

SOLUÇÃO-PANÓTICO RÁPIDO

Fixador (Solução 1)

Revelador (Solução 2)

Corante (Solução 3)

TÉCNICA DE COLORAÇÃO

- Imergir a lâmina já com o esfregão seco por um (1) minuto no Fixador ou Solução 1.
- Retirar a lâmina do Fixador, apoiar a mesma em papel toalha, retirando assim o excesso do produto e em seguida, imergí-la no Revelador ou Solução 2 por mais um (1) minuto.
- Após retirar do Revelador, tornar a apoiar a lâmina no papel toalha retirando o excesso e agora, colocar no Corante ou Solução 3 por mais um (1) minuto.
- Após esse tempo, lavar as lâminas em água corrente, fluxo suave, evitando jatos fortes e em seguida secá-las à temperatura ambiente.
- Levar ao microscópio, focalizar e examinar em imersão.