

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL:  
EQUINOS

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ÉGUAS APÓS INOCULAÇÃO  
INTRAUTERINA DE TRÊS DIFERENTES CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI***

Autor: Giovani Casanova Camozzato

Porto Alegre  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL:  
EQUINOS

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ÉGUAS APÓS INOCULAÇÃO  
INTRAUTERINA DE TRÊS DIFERENTES CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos na área de Reprodução Equina, sob a orientação da Dr<sup>a</sup>. Caroline Wolf e co-orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos.

PORTO ALEGRE  
2014

## CIP - Catalogação na Publicação

Casanova Camozzato, Giovani

RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ÉGUAS APÓS INOCULAÇÃO  
INTRAUTERINA DE TRÊS DIFERENTES CEPAS DE ESCHERICHIA  
COLI / Giovani Casanova Camozzato. -- 2014.

60 f.

Orientadora: Caroline Wolf.

Coorientador: Rodrigo Costa Mattos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,  
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Endometrite. I. Wolf, Caroline, orient. II.  
Costa Mattos, Rodrigo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da  
UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**GIOVANI CASANOVA CAMOZZATO**

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ÉGUAS APÓS INOCULAÇÃO  
INTRAUTERINA DE TRÊS DIFERENTES CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos na área de Reprodução Equina, sob a orientação do Dr<sup>a</sup>. Caroline Wolf e co-orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos.

**APROVADO POR:**

---

Dr<sup>a</sup>. Caroline Wolf

Orientadora

---

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Co-orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Mara da Encarnação Fiala

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Carlos Antônio Mondino Silva

Membro da Comissão

---

Dr<sup>a</sup>. Anita Mylius Pimentel

Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me proporcionar todo este aprendizado em minha vida inteira, por simplesmente eu me considerar um cara de sorte. Sei que deve existir uma força muito grande por trás disso. Pela saúde e paz que tenho.

Aos meus pais Luiz Carlos e Ana, pelo exemplo extraordinário de vida. Exemplos de honestidade e trabalho.

A minha irmã Andreza e ao sobrinho Bernardo.

Ao restante dos familiares, todos importantes pra mim.

Aos meus amigos, colegas de mestrado e ao pessoal do REPROLAB, pela ajuda e por compartilharem comigo os momentos de alegrias, que são muitos.

Aos meus professores e orientadores, principalmente o mentor deste trabalho Rodrigo Costa Mattos.

Ao chimarrão topetudo com cheiro de seiva nativa que me faz pensar e humildemente agradecer todas estas coisas boas que tenho na vida.

*"O sucesso não é a chave para a felicidade.  
A felicidade é a chave para o sucesso."*

*Albert Schweitzer*

## RESUMO

### **Resposta inflamatória em éguas após inoculação intrauterina de três diferentes cepas de *Escherichia coli***

Autor: Giovani Casanova Camozzato

Orientador: Caroline Wolf

A endometrite é a causa mais importante de infertilidade em éguas falhadas e inflige grandes perdas na indústria de criação de equinos. Infecções uterinas bacterianas podem ocorrer em 25 % a 60 % das éguas estéreis e os agentes patogênicos mais frequentemente isolados são *Streptococcus zooepidemicus* e *Escherichia coli*. A endometrite causada por *Streptococcus sp* tem sido amplamente estudada, no entanto, pouco se sabe sobre a resposta endometrial da égua à *E. Coli*. Infecção focal induzida por *E. coli* foi associada com resposta inflamatória uterina menos exsudativa do que infecção por *Streptococcus zooepidemicus*. Em contrapartida, alguns estudos têm mostrado que as infecções uterinas por *E. coli* foram menos propensas a ter evidência citológica de inflamação. O objetivo deste estudo foi descrever a resposta inflamatória após a inoculação intra-uterina com três diferentes cepas de *E. coli* na égua. Nove éguas cíclicas, com idades entre 7 e 20 anos, foram selecionadas e seu estro detectado por palpação transretal e ultrassom. Somente éguas clinicamente normais com citologia negativa e bacteriologia foram utilizadas no experimento. Três diferentes cepas de *E. coli* obtidas a partir de: (UT) *swab* uterino de uma égua com endometrite, (VE) *swab* do vestíbulo de uma égua saudável e (FE) a partir de fezes de égua, foram utilizadas. Subsequentemente, as éguas foram submetidas a inoculação intrauterina com  $3 \times 10^9$  de bactérias de uma das três diferentes cepas *E. coli*. Todas as éguas foram desafiadas com as três cepas de *E. coli* de forma aleatória nos ciclos subsequentes. Um dia após a infecção, foram realizados exame clínico do trato genital por espéculo, ultrassonografia, citologia endometrial e cultura bacteriológica. Estes procedimentos foram repetidos diariamente até ser diagnosticado cultura bacteriana e citologia negativa. Todas as éguas tiveram leve ( $< 10/\text{campo}$ ) a grave ( $> 20/\text{campo}$ ) neutrofilia endometrial 24h após a inoculação de *E. coli*. Em 25 das 27 infecções (92,6%), sinais clínicos vaginais e líquido intra-uterino (LIU) foram detectados. Sinais clínicos vaginais graves como aspecto purulento e mucosa hiperêmica foram observadas em 17 infecções e 8 apresentaram sinais leves. Apenas 59,2% das infecções experimentais (16/27) foram positivas à cultura para *E. coli* 24h após a infecção. O tempo necessário para a eliminação das bactérias foi, em média de 2,8 dias ( $\pm 1,0$ ). O tempo para o

desaparecimento da inflamação (presença de leucócitos polimorfonucleares) foi em média 3,4 dias ( $\pm 0.8$ ). Em conclusão, a endometrite causada por *E. coli* provocou citologia positiva e a maioria das éguas desenvolveram sinais clínicos vaginais de endometrite e acúmulo de líquido intrauterino, não havendo diferença entre as cepas de *E. coli*.



## **ABSTRACT**

Endometritis in mares experimentally infected with three different strains of *E. coli*

*Author: Giovani Casanova Camozzato*

*Adviser: Caroline Wolf*

Endometritis is the most important cause of infertility in barren mares and inflicts major losses on the equine breeding industry. Bacterial uterine infections occur in 25% to 60% of barren mares and the most frequently isolated pathogens are *Streptococcus zooepidemicus* and *Escherichia coli*. Endometritis caused by *Streptococcus sp* has been widely studied. However, little is known about the mare's endometrial response to *E. coli*. Focal infection induced by *E. coli* was associated with less exudative uterine inflammatory response than by *Streptococcus zooepidemicus*. In contrast some studies have shown that uterine infections by *E. coli* were less likely to have cytological evidence of inflammation. Treatment of mares with persistent uterine infections needs to be directed towards the underlying breakdown of the uterine defense and against the microbial agent. The aim of this study was to describe the inflammatory response after intrauterine inoculation with three different strains of *E. coli* in the mare. Nine cyclic mares aged between 7 and 20 years old were selected and their estrous detected by transrectal palpation and ultrasound. Only clinically normal mares with negative cytology and bacteriology were used. Three different strains of *E. coli* obtained from: (UT) uterine *swab* of a mare with endometritis, (VE) vestibular *swab* from a healthy mare and (MA) from mare manure, were used. Subsequently, the mares were submitted to intrauterine inoculation with  $3 \times 10^9$  *E. coli* of one of the three different strains. All mares were challenged with each strain of *E. coli* in a randomized order in the subsequent different cycles. One day after infection, clinical examination of the genital tract by speculum, ultrasound, endometrial cytology and bacteriological cultures were performed. These procedures were repeated daily until negative culture and negative cytology were diagnosed. All mares had slight (<10/field) to severe (> 20/field) endometrial neutrophilia 24h after *E. coli* inoculation. In 25 of 27 infections (92.6%), vaginal clinical signs and intrauterine fluid (IUF) were detected. Severe vaginal signs with purulent aspect and hyperemic mucosa were observed in 17 infections and 8 presented mild signs. Only 59.2% of the examinations (16/27) were *E. coli* positive 24h after the infection. The time needed for elimination of bacteria in mares treated with leukocytes and mares of control group was in average 2.8 days and the cytology remained positive 3.4 days in average. In conclusion, *E. coli* endometritis provoke a positive cytology and most of the mares developed vaginal clinical signs of endometritis and IUF, with no difference among *E. coli* strains.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Ocorrência de citologia e bacteriologia positiva, sinais clínicos de endometrite e LIU 24h, 48h e 72h após a infecção com *E. coli*... **36**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Percentual de éguas com citologia e bacteriologia positivas e sinais clínicos vaginais 24 horas após a infecção experimental com as três diferentes cepas de <i>E. coli</i> .....	<b>35</b>
<b>TABELA 2</b>	Período de tempo (dias) e desvio padrão entre a infecção experimental e a primeira citologia e bacteriologia negativa em éguas infectadas experimentalmente com três diferentes cepas de <i>E. coli</i> .....	<b>36</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
<b>2.1 Endometrite</b> .....	13
<b>2.2 <i>Escherichia coli</i></b> .....	15
<b>2.3 Mecanismos de Defesa Uterinos</b> .....	18
2.3.1 Barreiras Físicas.....	18
2.3.2 Limpeza Física do Útero .....	19
2.3.3 Mecanismos Celulares e Imunológicos de Defesa.....	20
<b>2.4 Diagnóstico de Endometrite</b> .....	21
2.4.1 Exame Clínico .....	21
2.4.2 Exames Complementares.....	23
2.4.2.1 Exame bacteriológico.....	23
2.4.2.2 Citologia endometrial .....	24
<b>2.5 Tratamentos</b> .....	25
<b>3 ARTIGO</b> .....	30
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	39
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	40
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	41
<b>ANEXO A: Artigo publicado em Pferdeheilkunde 30 (Jan/Fev) 2014</b> .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

O agronegócio do cavalo ganha a cada ano maior espaço no mercado brasileiro, sendo uma importante atividade econômica e social. Este segmento movimentava 7,5 bilhões de reais/ano e gera aproximadamente 650 mil empregos diretos e cerca de 2,6 milhões de empregos indiretos (CNA, 2006) no campo e na cidade (LIMA *et al.*, 2006), superior aos gerados pela indústria automobilística. O Brasil possui 6 milhões de animais e é o terceiro maior rebanho do mundo (NASCIMENTO, 2009).

A espécie equina foi, por muito tempo, considerada a de menor fertilidade entre as espécies domésticas (VOSS, 1984). Isto foi atribuído a características de seleção e também a problemas relacionados ao manejo reprodutivo. A endometrite, com sintomatologia restrita ao útero, é uma das principais causas para a redução da fertilidade em éguas ocasionando perdas consideráveis no setor de criação de equinos (CAUSEY, 2006), sendo que as infecções uterinas bacterianas ocorrem em 25% a 60% das éguas falhadas (DIMOCK, 1928; COLLINS, 1964).

A *Escherichia coli* é um dos agentes mais isolados em culturas endometriais em éguas (RICKETTS, 1977; FERREIRO *et al.*, 1986; MATTOS *et al.*, 1984). A infecção por *E. Coli* normalmente é persistente (DIMOCK; EDWARDS, 1928), porém pouco se conhece sobre a resposta inflamatória na égua (LeBLANC *et al.*, 2007). Em infecções crônicas, sabe-se que a bactéria secreta um biofilme, uma matriz hidratada de polissacarídeos e proteínas, que proporcionam uma matriz adesiva para as microcolônias (FREEMAN *et al.*, 1990; COSTERTON *et al.*, 1995; SHAPIRO, 1998; EMODY *et al.*, 2003; SOTO *et al.*, 2005). Aparentemente a *E. Coli* causa uma resposta inflamatória uterina pouco exsudativa (EATON *et al.*, 2010).

Tendo em vista o impacto econômico que a subfertilidade/infertilidade tem sobre a indústria equina, é necessário compreender melhor as reações que a égua apresenta frente a agressões por microorganismos envolvidos na infecção/inflamação uterina, assim como buscar e provar melhores métodos de tratamento.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as reações clínicas e a resposta inflamatória uterina da égua frente a infecções experimentais com diversos sorotipos de *Escherichia coli*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Endometrite

O termo endometrite refere-se a um processo inflamatório agudo ou crônico envolvendo o endométrio (PYCOCK, 2007) podendo estar associada a uma infecção bacteriana ou não (KENNEY, 1992). Na espécie equina, as endometrites são consideradas como uma das causas mais frequentes de infertilidade (VOSS, 1984; BRINSKO *et al.*, 2011), sendo responsáveis por grandes prejuízos em sua reprodução e conseqüentemente, sua produção. Estas inflamações são responsáveis por grandes perdas econômicas, pois, são as principais causas de morte embrionária na égua (DARENIUS, 1992).

Fontes de contaminação do útero que levam ao desenvolvimento de endometrite incluem o parto, exames reprodutivos, inseminação artificial, monta natural e auto contaminação por características conformacionais (BRINSKO *et al.*, 2011). Geralmente o lúmen uterino da égua fértil é estéril, apesar do fato de ser contaminado na cobertura, consegue eliminar os elementos indesejáveis em algumas horas. Endometrite induzida pela cobertura é uma reação fisiológica nos eqüinos, acredita-se que esta resposta inflamatória seja necessária para remover bactérias contaminantes e excesso de espermatozoides introduzidas no útero (TROEDSSON, 2006). Após o coito é necessário que o ambiente uterino esteja apto para receber o embrião em torno dos 5,5 dias de prenhez (PYCOCK, 2000).

A endometrite se associa frequentemente com infecções por microorganismos, porém existe uma variedade de desafios endometriais que incluem agressões físicas, químicas e biológicas, as quais podem desencadear uma resposta inflamatória. Infecções bacterianas no trato reprodutivo estão entre as principais causas de infertilidade na égua (HUGHES; LOY, 1975). Os agentes microbianos mais encontrados nas endometrites na espécie equina são bactérias e fungos. As bactérias mais isoladas são: *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* ( $\beta$ -hemolítico), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (MATTOS *et al.*, 1984; RIDDLE; LeBLANC; STROMBERG, 2007; TROEDSSON, 2011). Em um estudo feito por Mattos *et al.*, (1984) de 25 éguas com crescimento bacteriano, 68% foram positivas à *Streptococcus zooepidemicus*, 16% para *Escherichia coli*, 8% para *Klebsiellae* 4% a

fungos. Por outro lado, em um estudo realizado com 282 éguas inférteis que avaliava o lavado uterino de baixo volume como diagnóstico para endometrite, LeBlanc *et al.*, (2007), isolou mais frequentemente a bactéria *E. coli* (27,6%) seguindo de *S. equi zooepidemicus* (20,9%), resultado que concorda com outro estudo (BUCCA *et al.*, 2013), no qual se administrava dexametasona em éguas com alto risco de desenvolver endometrite persistente induzida pela cobertura. Neste experimento isolou-se com maior frequência a bactéria *E. coli* (42,5%), seguido por *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Proteus sp.* e *Klebsiella sp.*

A frequência de éguas com bacteriologia positiva varia entre 10% a 37% (WINGFIELD-DIGBY, 1982). Essa elevada frequência pode ser atribuída a certos fatores predisponentes da espécie ou de certas raças. O índice de prenhez de éguas com endometrite é muito inferior ao de éguas híginas (MATTOS *et al.*, 1984), o que comprova que a inflamação uterina está altamente relacionada com a fertilidade da égua. Em adição, éguas com cultura bacteriana positiva antes da cobertura tiveram menores taxas de prenhez do que éguas com culturas negativas (RIDDLE; LeBLANC; STROMBERG, 2007).

As fêmeas da espécie equina podem ser divididas em dois grandes grupos: éguas susceptíveis e éguas resistentes à endometrite, conforme a capacidade de seus neutrófilos fagocitarem os agentes bacterianos e a capacidade de sua musculatura uterina eliminar mecanicamente o conteúdo em até 96 horas (WATSON, 1988). Uma variedade de fatores contribui com a susceptibilidade à endometrite persistente induzida pela cobertura, incluindo idade, qualidade endometrial e histórico reprodutivo (WOODWARD; TROEDSSON, 2013). Além disso, a conformação externa e interna do trato reprodutivo está associada com susceptibilidade à endometrite persistente. Éguas com má conformação perineal têm uma maior incidência de endometrite pós-cobertura do que as éguas normais (HEMBERG *et al.*, 2005). As éguas resistentes respondem à invasão bacteriana com um mecanismo de defesa altamente eficiente, e as bactérias introduzidas no útero, durante a cobertura ou parto, são geralmente eliminadas após poucas horas (ASBURY *et al.*, 1982). Éguas que eliminam a contaminação bacteriana em 36-48 horas têm a defesa uterina funcional e são classificadas como resistentes. Já as éguas classificadas como susceptíveis, falham ao limpar o útero da contaminação, pois tem a defesa uterina comprometida (TROEDSSON, 1997).

A habilidade física do útero em eliminar bactérias, debris inflamatórios e fluido é conhecido como um fator crítico de defesa uterina, e logicamente, qualquer prejuízo nessa função (defeito de contratilidade miometrial), torna a égua susceptível á endometrite persistente (TROEDSSON; LIU, 1991; LeBLANC *et al.*, 1994b), ou seja quando este sistema de defesa uterina falha (éguas susceptíveis), o organismo contaminante se estabelece produzindo inflamação e ambiente uterino desfavorável à gestação (HUGHES; LOY, 1969). Esta presença de fluido, bactérias e produtos inflamatórios podem prejudicar o transporte espermático e a fertilização e pode ser incompatível com a sobrevivência do embrião (WAITES; BELL, 1982).

Em éguas clinicamente sadias, a infiltração de neutrófilos para o endométrio e lúmen uterino parece ser responsável pela remoção inicial de bactérias invasoras (LIU; CHEUNG, 1986). O influxo de PMNs é uma reação fisiológica designada a eliminar o excesso de espermatozoides e bactérias contaminantes do útero, realizando um papel essencial à fertilidade normal (FREEMAN *et al.*, 2013). A migração de neutrófilos da corrente sanguínea para os tecidos é um processo importante na inflamação, as células fagocíticas migram para o interior do útero cerca de 30 minutos após a contaminação (PYCOCK; ALLEN, 1989). O influxo de PMNs é acompanhado por uma regulação de citocinas pró e antiinflamatórias, resultando na ativação de múltiplas vias (WOODWARD; TROEDSSON, 2013). Deficiências na produção, migração, ingestão e lise intracelular dos neutrófilos podem ser a causa de infecções bacterianas resistentes a tratamentos (BRENNEIS; HÄNSCH, 1993). A atividade fagocítica de neutrófilos em éguas susceptíveis é menor, provavelmente como resultado de efeitos negativos das secreções uterinas devido à fagocitose. No entanto, estes neutrófilos são altamente eficientes se estiverem em ambiente ideal (TROEDSSON, 1993).

## **2.2 *Escherichia coli***

A espécie bacteriana denominada *Escherichia coli* é um bastonete gram negativo, não esporulado, oxidase negativa, móvel por flagelos peritríquios ou não, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, pertencente à família Enterobacteriaceae (BRENNER, 1984).

Esta espécie pertence ao grupo de coliformes fecais, sendo descrita pela primeira vez por Dr. Theodor Escherich em 1885 ao tentar isolar o agente causador da cólera



(ESCHERICH, 1989). Os coliformes fecais são caracterizados por produzir ácido e gás em caldo EC (*Escherichia coli*) em temperaturas compreendidas entre 44°C e 46°C. A *E. coli* é a espécie comensal predominante na microbiota anaeróbica facultativa do trato intestinal dos humanos e animais de sangue quente (DRASAR; HILL, 1974).

Estes agentes podem ser classificados baseando-se no perfil de três antígenos bacterianos através de provas sucessivas de soroadglutinação. O antígeno flagelar “H” pode ser identificado pela sequência de aminoácidos que compõe a unidade fundamental do flagelo, a flagelina. Já o antígeno somático “O” compõe o corpo da bactéria e o antígeno “K” faz parte da cápsula bacteriana e quando presente em quantidade suficiente possui função antifagocitária. Atualmente, são conhecidos 173 antígenos “O”, 103 antígenos “K” e 56 antígenos “H” (THOMAS; BETTELHEIM, 1998) e frequentemente se desenvolvem pesquisas em que se associa uma doença a um certo sorogrupo de *E. coli*.

Em seres humanos, apesar de sua enorme importância, somente nesta década intensificou-se o estudo de marcadores genéticos de virulência, com o objetivo de caracterizar melhor seus mecanismos de virulência. Atualmente, há uma lista de cerca de 40 fatores de virulência relacionados, na sua maioria, à colonização do hospedeiro (adesinas/invasinas), à sobrevivência no ambiente extraintestinal (sistemas de captação de ferro), ao escape das defesas do hospedeiro (fatores que dificultam a fagocitose, ou que promovem resistência ao complemento presente no soro) (JOHNSON, *et al.*, 2005; EWERS *et al.*, 2007).

Esta bactéria produz diversas infecções extraintestinais. É a causa mais comum de infecções do trato geniturinário, bacteremia, meningite, infecções neonatais, intra-abdominais, pneumonia e ocasionalmente implicada em osteomielite, celulite e infecções de feridas (JOHNSON, 2002). Entre as doenças do trato causadas por *E. coli* uropatogênicas mais frequentes são cistite e piometra em cadelas e prostatite em cães.

A bactéria *E. coli* é o segundo agente mais isolados em culturas endometriais em éguas (MATTOSet *al.*, 1984), assim como em vacas, sendo que nesta espécie o agente mais comum é a bactéria *Staphylococcus aureus* (XU *et al.*, 2008). Tem-se relatado que uma vasta gama de bactérias, principalmente a *E. coli* são isoladas do útero de porcas com e sem endometrite (DE WINTER *et al.*, 1995).

Bicalho *et al.*, (2010), reportou seis genes da *E. coli*: fimH, astA, cdt, kpsMII, ibeA e hlva geralmente associados com invasão ou adesão bacteriana, tanto em metrite

como endometrite clínica em vacas. O gene fimH de aderência esteve presente em 87% das infecções uterinas e em 29% foi fortemente associado com aumento do risco da doença.

Em éguas, pouco se sabe sobre a resposta inflamatória frente a uma infecção com *E. coli* (LeBLANC, 2007; EATON, 2010). O exsudato uterino em infecções por *E. coli*, pode ser viscoso, semelhante ao relatado para infecções com *Klebsiella*, tornando-o difícil de isolar em uma cultura com *swab*. No trato geniturinário de seres humanos se adere tenazmente ao epitélio, impedindo sua remoção física (BEACHEY, 1981). A *E. coli* induziria uma resposta inflamatória uterina menos exsudativa e provocaria mais reação no tecido endometrial do que o *S. equizooepidemicus* (EATON *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por Riddle; LeBlanc; Stromberg, (2007), o tipo de microrganismo recuperado por *swab* influenciou no resultado da citologia uterina. Neste estudo, citologias positivas foram menos comuns quando foram isoladas bactérias gram-negativas (52 a 55%) do que quando isoladas gram-positivas (67 a 82%).

Em outro estudo (NIELSEN *et al.*, 2010), amostras de culturas bacterianas positivas para *E. coli* não foram associadas com a presença de PMNs. O número de amostras de citologia negativa para *E. coli*, foi significativamente maior em comparação a citologia negativa para outras espécies bacterianas. Este, concordou com o estudo realizado por Bindslev (2008), onde a presença de PMNs em amostras positivas para *E. coli* foi muito menos provável que amostras positivas para *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*.

De acordo com Walter *et al.* (2012), o número de colônias de *E. coli* não é correlacionado com o número de PMN em esfregaços. A percentagem de culturas positivas acompanhadas por PMNs em esfregaços foi geralmente baixa, porém mais culturas puras do que as culturas mistas de *E. coli* com as bactérias não patogênicas tiveram resultados citológicos positivos (37% versus 13%). A proporção de culturas puras de *E. coli*, acompanhados por PMNs em esfregaços era ainda mais baixa (ligeiramente > 10%) em estudos anteriores (WINGFIELD DIGBY; RICKETTS, 1982; WAELCHLI *et al.*, 1993), tornando difíceis as interpretações de culturas positivas de *E. coli* do útero da égua.

## 2.3 Mecanismos de Defesa Uterinos

A cobertura ou inseminação de éguas são seguidas de uma infecção e inflamação transitórias. Éguas normais eliminam bactérias e limpam-se de produtos inflamatórios rapidamente (KATILA, 1995). Mecanismos de defesas naturais existentes no útero visam promover a rápida eliminação da contaminação bacteriana que ocorre durante o parto ou cobertura.

O útero dispõe de mecanismos de defesa físicos, que são as barreiras físicas e contratilidade endometrial e os mecanismos imunológicos, compostos pelo sistema imune humoral e celular para promover uma rápida eliminação dos agentes causais da inflamação (HUGHES; LOY, 1969).

### 2.3.1 Barreiras Físicas

As barreiras físicas são constituídas pela vulva, vestíbulo e cérvix, que impedem a entrada de ar, material fecal e urina no útero. Na espécie equina, independentemente do método de cobertura, o sêmen é depositado na luz uterina, portanto, neste momento, as barreiras físicas são ultrapassadas, sendo o espermatozoide, proteínas do plasma seminal e bactérias do sêmen e do pênis do garanhão, responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória aguda (TROEDSSON, 1997). Os defeitos na conformação do períneo interferem nas barreiras que separam o ambiente uterino do meio exterior (CASLICK, 1937), ocasionando pneumovagina e expondo o útero a agentes irritantes e contaminantes, favorecendo o estabelecimento de infecção.

A conformação perineal sofre grande influência da idade, tendo sido demonstrado por Pascoe (1979) que éguas com boa conformação podem necessitar reparação vulvar com o avançar da idade e após certo número de partos. O autor demonstrou, também, a influência da condição corporal sobre o fechamento vulvar. Éguas em má condição corporal têm maior probabilidade de apresentar pneumovagina devido à redução do tecido adiposo na região vulvar.

Além disso, aderências e lacerações de cérvix dificultam a limpeza mecânica do útero durante o estro, podendo causar acúmulo excessivo de líquido durante o diestro e

impedindo o fechamento adequado da cérvix, o que impede a manutenção da prenhez (CASLICK, 1937).

### 2.3.2 Limpeza Física do Útero

Um importante mecanismo para a eliminação rápida do agente agressor e dos componentes e subprodutos inflamatórios é a contratilidade miometrial, que é imprescindível para a limpeza física da luz uterina (EVANS *et al.*, 1987; LeBLANC *et al.*, 1994; TROEDSSON *et al.*, 1993).

Durante o estro, ocorrem períodos de atividade contrátil de aproximadamente 5 minutos, alternados com períodos equivalentes de repouso. As contrações do miométrio facilitam esta drenagem, ao comprimir os vasos linfáticos, que movem o fluido em direção aos linfonodos (GUYTON, 1991). A expulsão eficiente de fluidos uterinos e debris envolve contrações sincronizadas dos tecidos miometriais circulares e longitudinais (HIRSBRUNNER *et al.*, 2006; HIRSBRUNNER *et al.*, 2010).

A limpeza deficiente do útero durante o estro é a maior causa de endometrite recorrente na égua (TROEDSSON; LIU, 1991). Éguas velhas e susceptíveis têm uma disfunção mecânica na limpeza de produtos do útero e acumulam fluidos após inoculação de bactérias durante o estro (LeBLANC *et al.*, 1989). Troedsson *et al.* (1993) observaram uma atividade miometrial semelhante em éguas susceptíveis e resistentes nas primeiras 6 a 8 horas após inoculação de *Streptococcus zooepidemicus*, que diminuiu após este período nas éguas susceptíveis. Em um experimento, os autores infundiram nanquim no útero de éguas resistentes e susceptíveis durante o diestro e verificaram uma drenagem linfática mais lenta nas éguas susceptíveis (LeBLANC *et al.*, 1995).

A demora na limpeza de subprodutos da inflamação permite a aderência das bactérias no endométrio (LeBLANC *et al.*, 1994a). Durante o diestro, quando a cérvix está fechada, é provável que os vasos linfáticos façam a reabsorção de algum fluido ou partícula remanescente no útero (LeBLANC *et al.*, 1995). Após a ovulação e o fechamento da cérvix o sistema linfático torna-se responsável pela drenagem de subprodutos do processo inflamatório. Entretanto, para que a drenagem linfática exerça sua função é fundamental uma boa contratilidade miometrial (LeBLANC *et al.*, 1995).

### 2.3.3 Mecanismos Celulares e Imunológicos de Defesa

A imunidade celular no útero da égua é composta basicamente por células fagocíticas, dentre as quais, os neutrófilos polimorfonucleares são as principais células de defesa do útero e já estão presentes na luz uterina 30 minutos após a cobertura atingindo o pico inflamatório em 12 horas (KATILA, 1995; TROEDSSON, 1997).

Em éguas clinicamente sadias, a infiltração de neutrófilos para o endométrio e lúmen uterino parece ser responsável pela remoção inicial de bactérias invasoras (LIU e CHEUNG, 1986). Além da infiltração de neutrófilos, ocorre um influxo de proteínas séricas e o endométrio tem a capacidade de desenvolver uma resposta imune típica, com produção e secreção seletiva de imunoglobulinas A e G (WIDDERS *et al.*, 1985).

Os leucócitos, em especial os neutrófilos polimorfonucleares, migram do vaso sanguíneo para o tecido adjacente e, dele, para o local da inflamação. Estudos feitos em câmaras quimiotáticas constataram que neutrófilos polimorfonucleares nas secreções uterinas de éguas susceptíveis têm menor capacidade de migrar e fagocitar bactérias, quando comparados com éguas resistentes (LIU *et al.*, 1985; WATSON *et al.*, 1987). Mais tarde, Troedsson *et al.* (1993) sugeriram que a fagocitose deficiente pelos neutrófilos seria resultado da influencia negativa das secreções uterinas de éguas susceptíveis, que seriam mais pobres em opsoninas que as secreções uterinas de éguas resistente à endometrite. No entanto, estes neutrófilos são altamente eficientes se estiverem em ambiente ideal (TROEDSSON *et al.*, 1993).

A migração de neutrófilos da corrente sanguínea para os tecidos é um processo importante na inflamação. As células fagocíticas migram para o interior do útero cerca de 30 minutos após a contaminação (PYCOCK; ALLEN, 1988). Deficiências na produção, migração, ingestão e lise intracelular dos neutrófilos podem ser a causa de infecções bacterianas resistentes a tratamentos (BRENNEIS; HÄNSCH, 1993). Em alguns estudos foi observado que o pico de neutrófilos no útero ocorre 6 horas após infusão de interleucina recombinante humana (ZERBE *et al.*, 2003).

O sistema imune humoral, como mecanismo de defesa uterino na égua, atua basicamente através das imunoglobulinas e do sistema complemento (TROEDSSON *et al.*, 1993). Na resposta à contaminação bacteriana, as imunoglobulinas têm como função principal sua capacidade de ligar-se ao microorganismo, fazendo a opsonização e, desta forma, facilitando a fagocitose pelos neutrófilos. Além disso, o anticorpo pode ativar a

casca da do sistema do complemento, o que aumenta ainda a eficiência da fagocitose (ROOK, 1992). Imunoglobulinas, IgG, IgT, IgA e IgM, foram encontradas nas secreções uterinas de éguas (KENNEY *et al.*, 1975), sendo observadas concentrações mais altas de imunoglobulinas nas secreções uterinas do que no soro, o que demonstra a produção de imunoglobulinas no endométrio (LIU *et al.*, 1981; WIDDERS *et al.*, 1985).

O sistema complemento é uma das principais vias efetoras da inflamação, tendo como consequência de sua ativação a opsonização, a ativação e a lise celular. O componente C3 do sistema complemento é o mais importante na opsonização de bactérias, sendo que as células fagocíticas apresentam receptores para ele e foi considerado como fator principal de quimiotaxia das secreções uterinas da égua (TROEDSSON *et al.*, 1993). Ativada a cascata do complemento, o componente C3 deposita-se na superfície do agente, promovendo a opsonização. Produtos da ativação do complemento estimulam a quimiotaxia e a ativação de leucócitos.

## **2.4 Diagnóstico de Endometrite**

O diagnóstico da endometrite é baseado no histórico da égua, exame externo, exame vaginal, palpação e ultra-sonografia do trato genital, bem como diagnóstico laboratorial, incluindo cultura uterina, citologia, biópsia endometrial e ocasionalmente, exame endoscópico do trato reprodutivo da égua (LeBLANC *et al.*, 2009).

### **2.4.1 Exame Clínico**

Através da inspeção da genitália externa, pode-se analisar a conformação vulvar e a coaptação dos lábios vulvares. A conformação defeituosa em éguas facilita a entrada de contaminantes no trato genital externo (CASLICK, 1937; SILVA, 1983)

Também no exame clínico, a endometrite pode ser diagnosticada visualmente pela presença de secreção mucopurulenta na comissura ventral da vulva e nos pelos da cauda, podendo haver também anormalidades na região perineal. Na palpação retal, o útero se caracteriza por ter pouco tônus e aumento de volume, o que se deve ao edema inflamatório (HUGHES; LOY, 1975).

Antes do uso da ultrassonografia, era difícil determinar a presença, e muito menos da natureza e quantidade de fluido presente no útero de éguas. Desde seu advento, a utilização da ultra-sonografia na reprodução teve um impacto profundo sobre a nossa capacidade de detectar a presença de líquido intrauterino na égua, bem como a sua gravidade (LIU; TROEDSSON, 2008).

O exame ultrassonográfico do útero revela um aumento das dobras endometriais, com qualidade variada de fluido livre na luz do órgão, podendo ter diferentes graus de volume e ecogenicidade (CURNOW, 1991). O autor atribui escores para estes quesitos, com o volume variando de 1 a 3, de mínimo à grande acúmulo e a qualidade variando de 1 a 4, indo de não ecogênico a fortemente ecogênico. Um excessivo acúmulo de fluido durante o estro, detectado ao ultrassom, pode ser associado à inflamação uterina (ALLEN; PYCOCK, 1989). Borba *et al.*, (2012) relataram que 75% das éguas com acúmulo de líquido intrauterino apresentam citologia positiva, os mesmos também relataram que 36,5% das éguas que não apresentaram líquido intrauterino são positivas à endometrite diagnosticadas pela presença de PMNs no exame citológico, o que sugere uma melhor acurácia desta técnica em comparação ao diagnóstico feito através da ultrassonografia.

A retenção de fluido no útero por si só não se torna uma contribuição para a capacidade de diagnóstico de endometrite, no entanto, avaliar o caráter do fluido, o volume acumulado de líquido e ecogenicidade, proporciona informações importantes sobre a presença e a gravidade da inflamação uterina (LIU; TROEDSSON, 2008).

Através da vaginoscopia, pode-se observar um colo uterino relaxado, aberto e fortemente hiperêmico, podendo haver acúmulo de fluidos no fundo de saco vaginal e no orifício cervical (NEELY, 1983). A confirmação do diagnóstico pode ser feita através da citologia e bacteriologia endometrial, sendo a presença de neutrófilos na luz uterina um indicador absoluto de inflamação (KNUDSEN, 1964; MATTOS *et al.*, 1984).

## 2.4.2 Exames Complementares

### 2.4.2.1 Exame Bacteriológico

O exame bacteriológico foi considerado como um meio auxiliar de diagnóstico, pois o fato de se obter bactérias na cultura não indica necessariamente endometrite (HUGHES, 1978). Ele deve sempre ser associado ao exame citológico e ao quadro clínico (PIMENTEL *et al.*, 1989).

Os autores Merket e Von Leppel (1970), propuseram uma técnica simples que consiste do uso da pinça de Albrechtsen para fixação da cérvix e da pinça de Merkt para a coleta propriamente dita, a qual protege o *swab* estéril da contaminação. O conjunto é introduzido na cavidade vaginal através do espelho de Polansky modificado.

O *swab* uterino para exame bacteriológico deve ser realizado previamente ao exame citológico ou biópsia, para se tentar obter uma amostra livre de contaminação iatrogênica. Serve para identificar o agente e realizar um antibiograma para futuro tratamento. O exame bacteriológico, quando isolado pode dar um resultado irreal devido à existência de flora saprófita vaginal que pode contaminar as amostras (SILVA *et al.*, 1987). Este tem significado quando associado à sintomatologia clínica ou à presença de células inflamatórias na citologia ou na biópsia. Além disso, deve indicar um agente potencialmente patogênico (*Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*), preferencialmente em cultura pura.

O emprego da cultura de um *swab* uterino para exame bacteriológico apenas tem sido insatisfatório para o diagnóstico de infecções uterinas uma vez que potenciais patógenos podem ser isolados de úteros sadios (BENNET, 1987). Apenas 40% dos casos de inflamação uterina mostram crescimento bacteriológico significativo e 13% de éguas sem endometrite mostram crescimento positivo (ROSSDALE; RICKETTS, 1980). Há, também, casos de inflamação uterina que não estão associados a crescimento bacteriano, pois, podem ser causados por agentes irritantes como ar (pneumovagina) e urina (urovagina).

Ball *et al.* (1988) desenvolveram uma técnica de coleta por lavagem com baixo volume de solução salina através de um cateter. No entanto, comparando a técnica de



lavagem com a de coleta através do espéculo, em éguas cuja região vulvar era marcada por uma solução de *Escherichia coli* Waelchli *et al.* (1992), concluíram que a contaminação das amostras era muito maior com a técnica da lavagem do que com auxílio do espéculo.

#### 2.4.2.2 Citologia endometrial

O exame citológico de uma amostra uterina é uma ferramenta de diagnóstico extremamente útil, e vários autores têm colocado a sua sensibilidade acima do teste bacteriológico (WINGFIELD DIGBY, 1978; MATTOS *et al.*, 1984; RIDDLE *et al.*, 2007).

Um recente estudo relacionou os achados citológicos e bacteriológicos com as taxas de prenhez, onde éguas que demonstraram citologia positiva obtiveram menores taxas do que éguas com citologia normal, independente dos resultados da cultura bacteriana (RIDDLE *et al.*, 2007).

Desde que a citologia endometrial foi descrita como um método auxiliar de diagnóstico para avaliar a inflamação endometrial, no início da década de 1960, tornou-se uma ferramenta de rotina na reprodução equina. Nos anos seguintes o método tem sido descrito e desenvolvido por inúmeros autores como uma ferramenta útil para o diagnóstico de inflamação endometrial e um indicador de endometrite bacteriana (ASBURY, 1984; RIDDLE *et al.*, 2007).

Rotineiramente a técnica do *swab* é mais utilizada, porém, há outras técnicas de citologia endometrial como a substituição do *swab* por uma escova ginecológica (ALVARENGA; PASTORELLO, 1994), e também a técnica do lavado endometrial que consta de infusão de pequeno volume de solução fisiológica no interior do útero, realizando uma lavagem e, posteriormente, a recuperação do volume infundido, o qual é centrifugado formando um precipitado que é esfregado em uma lâmina para posterior coloração e análise microscópica (BALL *et al.*, 1988).

A escova citológica foi superior que outras técnicas de diagnóstico no que diz respeito à proporção de amostras diagnosticadas, preservação da morfologia celular e detecção de leucócitos PMNs (WALTER *et al.*, 2012). Por outro lado, para Borba *et*

*al.*, (2012) os diagnósticos realizados com *swab*, escova ginecológica ou lavado endometrial apresentaram resultados similares.

O exame citológico do endométrio é o mais importante método auxiliar no controle da saúde genital da égua devido ao seu baixo custo, fácil emprego e a possibilidade de rápido diagnóstico de processos inflamatórios (MATTOS *et al.*, 1984) mesmo que subclínicos. O exame de um esfregaço corado a partir de um “*swab*” introduzido na cavidade uterina permite a identificação de leucócitos polimorfonucleares, sempre que houver inflamação do endométrio (COUTO; HUGHES, 1984). Trata-se de uma técnica de exame rápido que permite o diagnóstico objetivo de endometrite, a avaliação terapêutica e decisão sobre cobertura ou não de uma determinada égua durante o cio.

De acordo com Wingfield; Ricketts (1982), em esfregaços de éguas sadias não são encontrados leucócitos polimorfonucleares em nenhuma fase do ciclo, a não ser nos seguintes casos: após o parto, após cobertura e nos primeiros cios após o anestro (fase de transição vernal). A presença de PMNs em todos os casos indica um processo inflamatório do útero. Porém, essa técnica não permite prognóstico nem identificação do agente. O diagnóstico é confirmado por uma cultura endometrial bacteriana ou fúngica positiva associado à presença de PMNs.

## **2.5 Tratamento**

O objetivo do tratamento da endometrite consiste em ajudar o útero a limpar-se fisicamente dos detritos, contaminantes, o excesso de espermatozoides, bem como os subprodutos da resposta inflamatória normal à reprodução (PYCOCK, 2009). O tratamento das inflamações uterinas é dependente da idade da égua, natureza e extensão do processo, agente etiológico e comprometimento degenerativo do endométrio.

A terapia da endometrite deve iniciar com a eliminação dos fatores predisponentes, como a correção de pneumovagina através de vulvoplastia e a prevenção da contaminação bacteriana durante a cobertura ou inseminação. Quando o problema for de conformação perineal, a simples correção cirúrgica pode resolver o problema de infertilidade sem outro tipo de tratamento (CASLICK, 1937; SILVA, 1983).

Deve-se buscar a realização de uma única cobertura, preferencialmente antes da ovulação, o que pode ser obtido com um bom controle reprodutivo, e com a utilização de agentes indutores de ovulação (MALSHITZKY; MATTOS, 2007). Embora o espermatozoide seja o principal causador da inflamação pós-cobertura, é fundamental um controle da higiene da região perineal da égua, seja antes da monta natural ou da inseminação artificial. O embrião só chega ao lúmen uterino no 5º ou 6º dia após a fertilização, e durante este período, o corpo lúteo é refratário à prostaglandina liberada pelo endométrio. Estas características permitem a realização de tratamentos intrauterinos desde uma hora após a cobertura até o terceiro ou quarto dia após a ovulação (ASBURY, 1987). Tratamentos pós-cobertura devem ser realizados em relação ao momento da cobertura, mais do que em função do momento da ovulação (MATTOS *et al.*, 1999b).

A lavagem uterina é empregada como forma de promover uma limpeza física do endométrio, facilitando a ação de drogas a serem infundidas posteriormente, como antibióticos, que não agem satisfatoriamente em presença de pus ou tecidos necróticos (SILVA, 1987). A lavagem é suspensa quando o líquido retornar limpo e translúcido. Geralmente, utilizam-se de 3 a 5 litros por dia (1 litro por vez), pois foi verificado através de um densímetro óptico que a segunda e terceira lavagem era sempre mais densa que a primeira de modo que a lavagem com apenas 1 litro não é muito eficaz. Com a lavagem uterina ocorre também uma estimulação do endométrio, com um aumento subsequente da migração de neutrófilos para o lúmen uterino. Alguns estudos demonstram os benefícios da lavagem uterina com solução salina, associada a outros tratamentos ou não (TROEDSSON *et al.*, 1995; MATTOS *et al.*, 1997).

Um tratamento antimicrobiano poderá ser realizado em éguas com endometrite, para isso, é essencial que os defeitos anatômicos como conformação perineal, fístulas retovaginais, lacerações ou refluxo vesículo vaginal estejam cirurgicamente corrigidos (LYLE, 2003). Apesar de existirem numerosos agentes antimicrobianos disponíveis para o tratamento da infecção uterina em éguas, a seleção deve ser baseada não só na sensibilidade bacteriana, mas importante também saber a segurança do produto dentro do ambiente intra-uterino (BLANCHARD *et al.*, 2003). Estes fármacos têm sido amplamente utilizados para eliminar a infecção bacteriana do endométrio (LeBLANC *et al.*, 1989). Porém, o surgimento das penicilinas e sulfonamidas e o uso disseminado dos antibióticos não melhorou os índices de fertilidade da égua ao longo dos anos. Além disso, o uso excessivo e repetido de antibióticos no útero tem sido associado ao

desenvolvimento de endometrites fúngicas (FREEMAN *et al.*, 1986). O tratamento pode ser baseado na sensibilidade do agente (TROEDSSON *et al.*, 2011). A infecção com *Streptococcus zooepidemicus* poderá ser resolvido com  $5 \times 10^6$  Unidades Internacionais (UI) de Penicilina por 5 dias, para o tratamento de infecção com bactérias gram negativas, poderá ser utilizado 2g de sulfato de amicacina ou 3g de gentamicina. Antibióticos podem ser administrados por via sistêmica ou local, porém, maiores concentrações de antibiótico no tecido endometrial são encontrados após tratamento intrauterino comparado ao tratamento sistêmico (TROEDSSON *et al.*, 2011). Quando o processo inflamatório atingir somente as camadas mais superficiais do endométrio (estrato compacto), somente a infusão intrauterina é suficiente, utilizando-se antibiótico dissolvido em 60 a 100 ml de solução fisiológica (KENNEY, 1978; PIMENTEL *et al.*, 1996).

A aplicação de ocitocina melhora a limpeza de útero de éguas susceptíveis (LeBLANC *et al.*, 1994b). A aplicação de ocitocina visa promover a limpeza física do endométrio pela contração miometrial. Em experimentos usando cintilografia, observou-se que éguas susceptíveis eliminaram o radiocolóide com eficiência semelhante às éguas resistentes, após a administração de 20 UI de ocitocina entre o 3º dia de cio e 48 horas pós-ovulação (LEBLANC *et al.*, 1994b). Mattos *et al.*, (1999b) observaram melhora na taxa de prenhez de éguas com potro ao pé tratadas apenas com ocitocina ou com ocitocina mais infusão de plasma com leucócitos. Porém, em estudo realizado com éguas susceptíveis, infectadas experimentalmente, foi observado que o uso isolado de ocitocina não promoveu limpeza uterina em menos de 96 horas. O uso de ocitocina associada a lavagens uterinas promoveu o mesmo tempo de eliminação bacteriana (2,7 dias) que a lavagem combinada com plasma autólogo com leucócitos. Éguas que acumulam líquido no útero tratadas com ocitocina 7 a 8 horas após a ovulação apresentaram melhores taxas de prenhez que aquelas sem tratamento, e Mattos *et al.* (1999b) sugerem o uso de ocitocina entre 4 a 6 horas após inseminação, principalmente em éguas susceptíveis.

Em um estudo realizado por Evans *et al.* (1987), foi demonstrado que independente das condições endometriais, quando o clínico opta por tratar um processo inflamatório endometrial, o uso de ciclos curtos pode ser utilizado, associado ou não a qualquer outro tipo de tratamento já citado, sempre com benefícios evidentes. Esse processo consiste em reduzir a fase progesterônica e antecipar a estrogênica mediante a indução de cio pela PGF2 $\alpha$ . Durante a fase estrogênica há maior resistência dos

epitélios, maior afluxo sanguíneos, maior secreção de IgA e maior capacidade fagocítica dos leucócitos. Sob o domínio estrogênico característico do estro, o útero apresenta-se edemaciado, com aumento da produção de muco. A hiperemia favorece o aporte de neutrófilos e as contrações miométriais ocorrem de forma rítmica, favorecendo a evacuação do conteúdo uterino através da cérvix, que nesta fase encontra-se aberta (GANJAM, 1980). Por outro lado, com altas concentrações de progesterona, a cérvix encontra-se fechada e a contratilidade miométrial passa a apresentar longos períodos de contração, com baixa amplitude, o que caracteriza o tônus uterino típico da égua nesta fase. Todos estes fatores fazem com que a égua em diestro apresente uma menor capacidade de eliminação de uma possível contaminação e inflamação uterina. Além disso, há um efeito físico que facilita a drenagem do útero das secreções anormais, pela maior sensibilidade do miométrio à ação da ocitocina, pelo aumento das secreções das glândulas endometriais. Por outro lado, durante a fase progesterônica há uma maior facilidade de proliferação de agentes infecciosos patogênicos e redução das defesas naturais do endométrio (GANJAM *et al.*, 1980).

O tratamento com corticóides no período peri-ovulatório foi indicado por Dell'Aqua Jr (2006). Com base no histórico de acúmulo de fluido uterino, 30 éguas resistentes e 15 susceptíveis foram submetidas ao tratamento com acetato de prednisolona a cada 12 horas, iniciando 2 dias antes e continuando 1 dia após a ovulação. Todas as éguas foram inseminadas com sêmen congelado em dois ciclos reprodutivos, sendo o primeiro sem tratamento e o segundo com a utilização de corticóide. Enquanto em éguas sadias não se observou diferença nas taxas de prenhez de éguas tratadas e não tratadas (40% e 48%), em éguas com histórico de endometrite persistente pós-cobertura, uma taxa de prenhez superior foi obtida nas éguas tratadas (67%) em relação ao controle (5%). Embora tenha sido observada uma redução na função dos neutrófilos coletados 2 horas após a inseminação artificial no grupo tratado, uma redução no volume de fluido uterino com um aspecto mais límpido coletado foi descrito. Recentes estudos também apontam efeitos positivos do uso de dexametasona no tratamento de fertilidade de éguas com histórico de endometrite persistente induzida pela cobertura (BUCCA *et al.*, 2008). Para Wolf *et al.* (2012), glicocorticóides estão envolvidos na modulação do processo inflamatório, possuindo efeitos antiinflamatórios (que se manifestam como a diminuição de IgG) e também efeitos estimuladores (indução de um aumento de proteínas importantes, tais como AAT, TT e Actina) melhorando a defesa e mecanismos de proteção dos tecidos inflamados.

Tem sido relatado que o tratamento com agentes imunoestimulantes (*Propionibacterium acnes* ou extrato de parede celular de *Micobacterium*) melhoraram taxas de prenhez em éguas com endometrite persistente (ROHRBACH *et al.*, 2006). Foi sugerido que o extrato de parede de *Micobacterium* modula citocinas endometriais em éguas susceptíveis, porém o mecanismo não é completamente entendido (FUMOSO *et al.*, 2007). Outros tratamentos que tem por objetivo o estímulo de imunidade local são o tratamento com plasma sanguíneo (ASBURY, 1984) e a infusão intrauterina de leucócitos (NEVES *et al.*, 2007).

### 3 ARTIGO

#### ENDOMETRITE EM ÉGUAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS COM TRÊS DIFERENTES CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

GIOVANI CASANOVA CAMOZZATO<sup>1</sup>, NICOLÁS CAZALES<sup>2</sup>, EDUARDO MACHADO  
PINHEIRO<sup>1</sup>, PETRA GARBADE<sup>1</sup>, MARIA INÊS MASCARENHAS JOBIM<sup>1</sup>,  
RICARDO MACEDO GREGORY<sup>1</sup>, RODRIGO COSTA MATTOS<sup>1</sup>, CAROLINE WOLF<sup>1</sup>

<sup>1</sup>REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, UDELAR/CAPES, Montevideu, Uruguai

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi descrever a resposta inflamatória após a inoculação intrauterina de três diferentes cepas de *E. coli* em éguas. Nove éguas cíclicas, com idades entre 7 e 20 anos, foram selecionadas e seu estro detectados por palpação transretal e ultrassonografia. Foram utilizadas somente éguas clinicamente normais com exame citológico e bacteriológico negativos. As três diferentes cepas de *E. coli* utilizadas foram obtidas a partir de: (UT) *swab* uterino de uma égua com endometrite, (VE) *swab* do vestíbulo de uma égua saudável e (FE) a partir de fezes de égua. Subsequentemente, as éguas foram submetidas à inoculação intrauterina de  $3 \times 10^9$  de bactérias *E. coli* de uma das três cepas diferentes. Todas as éguas foram desafiadas com cada cepa de *E. coli* de forma aleatória nos diferentes ciclos subsequentes. Um dia após a infecção, foi realizado exame clínico do trato genital através de espéculo, ultrassonografia, citologia endometrial e culturas bacteriológicas. Estes procedimentos foram repetidos diariamente até que fossem diagnosticadas cultura e citologia negativa. Todas as éguas apresentaram leve (<10 neutrófilos/campo) a grave (>20 neutrófilos/campo) neutrofilia endometrial 24h após a inoculação de *E. coli*. Em 25 das 27 infecções (92,6%) as éguas apresentaram sinais clínicos vaginais e líquido intrauterino (LIU). Sinais clínicos vaginais graves como aspecto purulento e mucosa hiperêmica foram observadas em 17 infecções e 8 delas apresentaram sinais leves. Apenas 59,2% das inoculações (16/27) foram positivas para *E. coli* 24 horas após a infecção. O tempo necessário para a eliminação de bactérias foi, em média de 2,8 ( $\pm$  1,0) dias. O tempo para o desaparecimento da inflamação (presença de leucócitos polimorfonucleares) foi em média 3,4 ( $\pm$ 0,8) dias. Em conclusão, a endometrite causada

pela *E. coli* provocou citologia positiva e a maioria das éguas desenvolveram sinais clínicos vaginais de endometrite e LIU, não havendo diferença entre as cepas de *E. coli*.

---

**Palavras-chave:** éguas / infecção / *E. coli* / endometrite / citologia / bacteriologia

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to describe the inflammatory response after intrauterine inoculation with three different strains of *E. coli* in the mare. Nine cyclic mares aged between 7 and 20 years old were selected and their estrous detected by transrectal palpation and ultrasound. Only clinically normal mares with negative cytology and bacteriology were used. Three different strains of *E. coli* obtained from: (UT) uterine *swab* of a mare with endometritis, (VE) vestibular *swab* from a healthy mare and (MA) from mare manure, were used. Subsequently, the mares were submitted to intrauterine inoculation with  $3 \times 10^9$  *E. coli* of one of the three different strains. All mares were challenged with each strain of *E. coli* in a randomized order in the subsequent different cycles. One day after infection, clinical examination of the genital tract by speculum, ultrasound, endometrial cytology and bacteriological cultures were performed. These procedures were repeated daily until negative culture and negative cytology were diagnosed. All mares had slight ( $< 10/\text{field}$ ) to severe ( $>20/\text{field}$ ) endometrial neutrophilia 24h after *E. coli* inoculation. In 25 of 27 inoculations (92.6%), vaginal clinical signs and intrauterine fluid (IUF) were detected. Severe vaginal signs with purulent aspect and hyperemic mucosa were observed in 17 inoculations and 8 presented mild signs. Only 59.2% of the inoculations (16/27) were *E. coli* positive 24h after the infection. The time needed for elimination of bacteria was in average 2.8 ( $\pm 1.0$ ) days and the cytology remained positive 3.4 ( $\pm 0.8$ ) days in average. In conclusion, *E. coli* endometritis provoke a positive cytology and most of the mares developed vaginal clinical signs of endometritis and IUF, with no difference between *E. coli* strains.

---

**Keywords:** mares / infection / *E. coli* / endometritis / cytology / bacteriology



## INTRODUÇÃO

A endometrite é a causa mais importante de infertilidade em éguas estéreis (HUGHES; LOY, 1975; LeBLANC *et al.*, 2010) e causa grandes perdas na indústria de criação de eqüinos. Infecções bacterianas uterinas ocorrem em 25% a 60% das éguas falhadas e os agentes patogênicos mais frequentemente isolados são *Streptococcus zooepidemicus* e *Escherichia coli* (DIMOCK, 1928; COLLINS, 1964; MATTOS *et al.*, 1984; ALBIHN, 2003; LeBLANC *et al.*, 2007; LeBLANC, 2011).

A endometrite causada por *Streptococcus sp* tem sido amplamente estudada (HUGHES; LOY, 1975; NEVES *et al.*, 2007). No entanto, pouco se sabe sobre a resposta endometrial da égua para *E. coli* (LeBLANC *et al.*, 2007; EATON *et al.*, 2010). Infecção focal (LeBLANC *et al.*, 2007) induzida por *E. coli* (EATON *et al.*, 2010) foi associada com resposta inflamatória uterina menos exsudativa do que por *Streptococcus zooepidemicus*. Em contrapartida alguns estudos têm mostrado que as infecções uterinas por *E. coli* foram menos propensas a ter evidência citológica de inflamação (RIDDLE *et al.*, 2007; BURLESON, 2010).

O objetivo deste estudo foi descrever a resposta inflamatória uterina em éguas após a inoculação local de três diferentes cepas de *E. coli*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. Foram utilizadas nove éguas cíclicas de 7 a 20 anos de idade. Estas foram mantidas em condições semelhantes de manejo durante todo o experimento, suplementadas com aveia e feno, duas vezes por dia, com acesso *ad libitum* à água e suplemento mineral.

### Exames citológicos e bacteriológicos

Para obter as amostras de endométrio, o períneo da égua foi lavado e a cauda enfaixada. Um *swab* guardado (MinitubeGmbH, Tiefenbach, Alemanha) foi passado através do colo do útero para o lúmen uterino, por meio de um espécúlo estéril (MERKT; VON LEPPPEL, 1970). O *swab* foi exposto no lúmen uterino para obter uma

amostra endometrial, sem contaminação. O *swab* foi retraído para dentro da bainha, removido do útero e imediatamente colocadas em meio de cultivo Chromagar™ (McKINNON, 2011). A cultura bacteriológica foi considerada negativa quando nenhum crescimento foi observado na placa de Chromogenic Agar.

Outro *swab* foi feito, de maneira semelhante, para fazer uma amostra endometrial para exame citológico (MATTOS *et al.*, 1984). O *swab* foi rolado em uma lâmina de microscópio limpa, fixadas e coradas com solução Romanowsky (Panótico®, Laborclin, Brasil), as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico (400 x). A citologia foi considerada negativa quando PMNs não foram detectados na lâmina. Citologias positivas foram classificadas de acordo com o número de PMNs nos campos observados como: grave (> 20), intenso (15 a 19), moderado (10 a 14) e leve (<10).

### **Exame clínico do trato genital**

As éguas foram examinadas por palpação transretal e ultrassonografia para detectar líquido intrauterino (LIU). O LIU foi caracterizado por áreas hipocóicas maiores do que 10 mm de diâmetro no lúmen uterino.

O exame vaginal foi realizado para observar o aspecto da mucosa e a presença de secreção. Os sinais clínicos vaginais foram classificados como: grave (acúmulo abundante de líquido), leve (acúmulo de pouco líquido) ou ausente (sem acúmulo de líquido).

### **Preparação das bactérias**

Três diferentes cepas de *E. coli* foram obtidas a partir de: (UT) *swab* uterino de uma égua com endometrite, (VE) *swab* do vestíbulo de uma égua saudável e (FE) de fezes de uma égua. Após o isolamento, as bactérias foram cultivadas durante 24 horas no meio de enriquecimento de infusão de cérebro e coração (BHI). Glicerol foi adicionado ao meio de BHI, armazenado em criotubos esterilizados de 2mL à temperatura de -20 °C. Um teste de resistência a antimicrobianos foi realizado e este demonstrou diferenças na sensibilidade das três cepas de *E. coli* para diferentes fármacos.

Antes da infusão, as bactérias foram descongeladas e incubadas a 37 °C durante 24h em placas de Agar BHI, a fim de promover o crescimento bacteriano. Para a

inoculação uterina, as colônias foram suspensas em 2mL de solução salina a uma concentração final de  $1,5 \times 10^9$  bactérias/mL, utilizando a escala de MacFarland (Neflobac ®, Probac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil).

### **Delineamento Experimental**

Antes de cada infecção experimental, as éguas foram examinadas quanto à higidez reprodutiva, incluindo a avaliação da conformação vulvar, palpação retal e ultrassonografia do trato genital, exame vaginal com espécuro, culturas bacteriológicas e citologia do endométrio.

No momento em que foi detectada a presença de um folículo dominante (> 35 mm) e edema uterino (2-3), as éguas foram infectadas experimentalmente com qualquer uma das três cepas de *E. coli* ( $3 \times 10^9$  bactérias) diluídas em 20 mL de solução salina. Somente éguas clinicamente saudáveis com citologia e bacteriologia negativas foram utilizadas para este experimento. Todas as éguas estavam livres de líquido intrauterino no momento da inoculação da *E. coli*.

Exames clínicos do trato genital, citologia endometrial e culturas endometriais foram realizadas diariamente em todas as éguas, a partir de 1 dia após a infusão bacteriana. Os exames clínicos, bacteriológicos (MERKT; VON LEPPPEL, 1970) e citológicos (MATTOS *et al.*, 1984) continuaram até que fossem detectados ausência de neutrófilos na citologia e cultura negativa para *E. coli* a partir de *swabs* endometriais.

Um delineamento em quadrado latino foi utilizado. Todas as éguas foram desafiadas com as três cepas de *E. Coli* em uma ordem aleatória nos diferentes ciclos estrais. Como nove éguas foram usadas e cada uma foi inoculada com as três cepas de *E. coli*, um total de 27 infecções foram feitas. Novas infecções foram realizadas no mínimo 14 dias após a completa eliminação de bactérias inoculadas previamente. Nenhuma égua foi perdida durante o processo.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados usando-se um modelo geral de procedimento linear SAS (Statistical Analysis System). O modelo incluiu os principais efeitos na égua, cepas de *E. coli*, seqüências de grupos experimentais, variáveis dependentes de tempo necessário para eliminar as bactérias após a infecção experimental e o tempo entre a

infecção experimental e a primeira citologia negativa assim como suas interações. As médias foram comparadas utilizando médias dos quadrados mínimos.

## RESULTADOS

O percentual de éguas com sinais clínicos vaginais, LIU, citologia e bacteriologia positivas 24h após a infecção experimental com as três diferentes cepas de *E. coli* está representado na Tabela 1. Em 25 das 27 infecções (92,6%), sinais clínicos vaginais e acúmulo de LIU foram observados em éguas inoculadas. Sinais clínicos vaginais graves, como aspecto purulento e mucosa hiperêmica, foram observados em 17 infecções e as 8 restantes apresentaram sinais leves. No entanto, uma das éguas sem sinais clínicos de endometrite apresentou acúmulo de LIU. Ao terceiro dia, o número de éguas apresentando sinais clínicos leves ou severos foi reduzido para 11 (40,7%) (Figura 1).

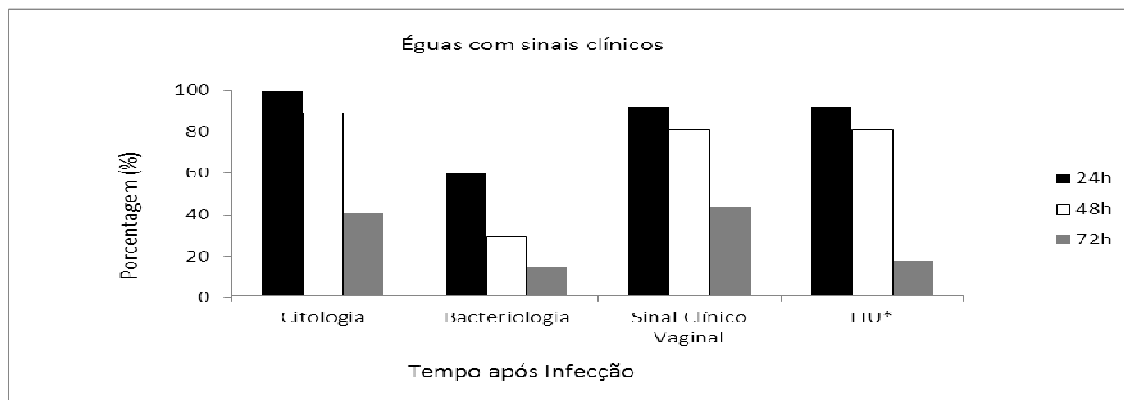
Tabela 1- Percentual de éguas com citologia e bacteriologia positivas, sinais clínicos vaginais 24 horas após a infecção experimental com as três diferentes cepas de *E. coli*.

Cepa	Citologia	Bacteriologia	Sinal clínico	LIU *
<i>E. coli</i>	positiva	positiva	vaginal	
UT	100%	67% <sup>a</sup>	78% <sup>a</sup>	89% <sup>a</sup>
VE	100%	67% <sup>a</sup>	100% <sup>a</sup>	89% <sup>a</sup>
FE	100%	44% <sup>a</sup>	100% <sup>a</sup>	100% <sup>a</sup>
Média	100%	59,3%	92,6%	92,6%

Caracteres diferentes indicam diferença significativa na coluna (P < 005)

\* Líquido intrauterino

Figura 1-Ocorrência de citologia e bacteriologia positiva, sinais clínicos de endometrite e LIU 24h, 48h e 72h após a infecção com *E. coli*.



Todas as éguas tiveram leve (<10 neutrófilos/campo) a grave (>20 neutrófilos/campo) neutrofilia endometrial 24 horas após a inoculação de *E. coli*. A citologia permaneceu positiva 3,4 dias em média (tabela 2). *E. coli* (UT) teve uma tendência ( $P < 0,09$ ) em produzir uma neutrofilia mais elevada do que a (VE) e (FE). Apenas 16 das 27 infecções (59,3%) foram positivas na cultura bacteriana 24 horas após a inoculação de *E. coli*. O tempo necessário para a eliminação da *E. coli* foi em média de 2,81 dias (tabela 2).

Tabela 2- Período de tempo (dias) e desvio padrão entre a infecção experimental e a primeira citologia e bacteriologia negativa em éguas infectadas experimentalmente com três diferentes cepas de *E. coli*.

Cepa <i>E. coli</i>	Citologia (dias)	Bacteriologia (dias)
UT	3,1 <sup>a</sup> ±0.9	3,2 <sup>a</sup> ±0.8
VE	3,6 <sup>a</sup> ±0.7	2,8 <sup>a</sup> ±1.3
FE	3,6 <sup>a</sup> ±0.9	2,2 <sup>a</sup> ±0.5
Média	3,4±0.8	2,8±1.0

Caracteres diferentes indicam diferença significativa na coluna ( $P < 005$ )

## DISCUSSÃO

Após 24 horas de infecção intrauterina com três diferentes cepas de *E. coli*, todas as infecções (100%) apresentaram leve a grave citologia endometrial. Vinte e cinco

(92,6%) das 27 infecções apresentaram sinais clínicos vaginais e acúmulo de líquido intrauterino. Isto está de acordo com estudos recentes, onde a presença de PMNs foi observada em todas as éguas e os sinais clínicos de endometrite e LIU estavam presentes em 83% (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2010) e em 100% (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2012) dos casos em 3h, 24h e 72h após a infecção por *E. coli*. No entanto, a maioria dos autores relata que nem todas as culturas positivas para *E. coli* foram associados com citologia positiva (RIDDLE *et al.*, 2007; BINDSLEV *et al.*, 2008; NIELSEN *et al.*, 2010; OVERBACK *et al.*, 2011).

No presente estudo, a cultura bacteriana positiva foi detectada em 59,2% dos casos 24h após a infecção por *E. coli*. As taxas de isolamento de *E. coli* foram menores do que os obtidos com a infecção experimental com *Streptococcus sp* (NEVES *et al.*, 2007), usando a mesma técnica. O exsudado uterino em infecções por *E. coli* pode ser tenaz, semelhante à descrita para as infecções por *Klebsiella* (DIMOCK; EDWARDS, 1928; BEACHEY, 1981), tornando-o difícil de isolar numa amostra com *swab*. Nas infecções crônicas a *E. coli* secreta um biofilme, uma matriz de polissacarídeo hidratado e proteína, oferecendo uma matriz adesiva para micro-colônias (COSTERTON, 1995; FREEMAN, 1990). A *Escherichia coli* também pode estar associada a uma infecção focal. A avaliação endoscópica do lúmen uterino de duas éguas afetadas revelou placas granulomatosas focais (LEBLANC *et al.*, 2007). Uma técnica de lavagem de baixo volume pode identificar mais organismos patogênicos do que a técnica de *swab*, pois a solução salina entra em contato com uma maior superfície (LeBLANC *et al.*, 2007). A técnica de lavagem uterina parece ter uma maior sensibilidade para a detecção de microrganismos gram-negativos, enquanto que para *Streptococcus  $\beta$ -hemolíticos*, não houve diferença quando comparados com *swabs* (WINGFIELD, 1982; RIDDLE *et al.*, 2007).

Em um estudo não publicado, Camozzato (2013) isolou *E. coli* a partir da vulva e do vestíbulo em 50 % e 80% respectivamente nas éguas após a limpeza do períneo com água e sabão. O autor demonstrou que é muito fácil provocar uma contaminação da amostra com um simples toque do *swab* na área vulvo-vestibular. Culturas falsas positivas têm sido associadas com a contaminação de instrumentos com bactérias a partir do ambiente, dos órgãos genitais externos e da vagina (RICKETTS, 1981). A contaminação do catéter uterino com flora vaginal deve ser considerada como uma fonte de resultados falsos positivos, pois a contaminação ocorre mais freqüentemente em um

sistema semi-guardado (ou seja, a técnica do lavado endometrial) do que em completamente guardado (ou seja, a técnica *swab*) (LeBLANC *et al.*, 2007).

Não foi observada diferença na citologia, sinais clínicos vaginais e uterinos entre as três diferentes cepas de *E. Coli*. Em vacas com metrite, *E. coli* foi mais aderente e invasivo no epitélio endometrial e células do estroma. Bicalho *et al.*, (2010) relataram seis genes de *E. coli*: fimH, Asta, CDT, kpsMII, IBEA e HlyA sendo geralmente associados com a adesão ou invasão bacteriana, tanto em metrite quanto endometrite clínica. O gene adesão fimH estava presente em 87% das infecções uterinas de *E. coli* em vacas. No presente estudo, apesar das diferenças entre as três cepas, as bactérias utilizadas provavelmente apresentavam genes associados com a adesão ou invasão causando os sinais clínicos de endometrite e citologia positiva.

Em conclusão, a endometrite causada por *Escherichia coli* provocou uma citologia positiva e a maioria das éguas desenvolveu sinais clínicos vaginais de endometrite e acúmulo de LIU, não havendo diferença entre as cepas de *E. coli*.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Microbiologia - Faculdade de Veterinária - UFRGS.

Este estudo foi financiado pela CAPES, CNPq e FAPERGS

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não têm interesses conflitantes.

#### **4 CONCLUSÕES**

A endometrite causada por *E. coli* provocou citologia positiva por 3,4 dias em média e a infecção persistiu em média 2,8 dias.

A maioria das éguas desenvolveu sinais clínicos vaginais de endometrite e acúmulo de líquido intrauterino.

Não houve diferença entre as três diferentes cepas de *E. coli*.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O propósito deste trabalho foi esclarecer as reações uterinas de éguas desafiadas à contaminação pela bactéria *Escherichia coli*.

A hipótese de que esta infecção geraria uma resposta inflamatória com presença de polimorfonucleares no exame citológico foi confirmada. Além disso, também ocorreram quadros clínicos típicos de endometrite como mucosa vaginal e cervical hiperêmica e também acúmulo de líquido intrauterino na maioria das éguas.

O isolamento da *E. coli* através de culturas bacterianas foi baixo, porém, condizente com resultados encontrados em outras pesquisas. Estes achados ainda não estão claros, portanto, passíveis de serem estudados mais profundamente.

A determinação de fatores de virulência das *E. coli* pode ser um ponto fundamental para caracterizar cepas que induzam uma maior resposta inflamatória e que de acordo com sua composição antigênica capsular, flagelar ou somática tenham um comportamento de autodefesa, tornando-as difíceis de serem isoladas e até mesmo eliminadas do ambiente uterino por mecanismos de defesas celulares.

A partir desta caracterização, poderiam-se determinar, inclusive, tratamentos mais eficazes para a endometrite causada por *Escherichia coli*.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALBIHN, A., BAVERUD, U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. **Acta Vet. Scand.** p. 121–129, 2003.
- ALLEN, W. E., PYCOCK, J. F. Current views on the pathogenesis of bacterial endometritis in mares. **Veterinary Record.** v. 122, p. 298-301, 1989.
- ALVARENGA, M. A.; PASTORELLO, M. . Comparação entre a eficiência da escova ginecológica e *swab* de algodão na coleta de material endometrial de éguas. In: 1 Congresso Brasileiro de Medicina Equina, São Paulo-SP. **Ars Veterinária**, 1994.
- ASBURY, A.C.; SCHULTZ, K.T.; KLEISIUS, P.H.; FOSTER, G.W.; WASHBURN, S.M. Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v. 32, p. 151-159, 1982.
- ASBURY A.C. Endometritis diagnosis in the mare. **Equine Vet.** v. 5., p. 166, 1984.
- ASBURY, A.C. Failure of uterine defense mechanisms. In: ROBINSON, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine 2.** Filadélfia, W. B. Saunders, 1987.
- BALL, B.A.; SHIN, S.J.; PATTON, V.H.; LEIN, D.H.; WOODS, G.L. Use of a low volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. **Theriogenology.**v. 29(6), p. 1269-1283, 1988
- BAIN, A. M. The role of infection in infertility in the Thoroughbred mare. **The Veterinary Record**, 78, p. 168-175, 1966.
- BENNETT, D.G. Diagnosis and treatment of equine bacterial endometritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 345-352, 1987.
- BEACHEY, E. H. Bacterial-adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **J. Infect Dis.** v. 143, p. 45, 1981.
- BINDSLEV, M.M, VILLUMSEN, M.H., PETERSEN, M. M., NIELSEN, J. M., BOGH, I. B., BOJESSEN, A. M. Genetic diversity of *S. equi* ssp. *zooeidemicus* and *E. coli* isolated from the reproductive tract of the mare. In: **Proceedings ICAR**; Budapest, Hungary, 2008.
- BLANCHARD, T. L., VARNER, D. D., SCHUMACHER, J., LOVE, C. C. , BRINSKO, S. P., RIGBY, S. L. Endometritis. In: **Manual of equine reproduction.** 2nd ed., p. 59-68, 2003.
- BORBA, E. V. C., CAMOZZATO, G. C., MALSCHITZKY, E., BUSTAMANTE, I. C., MARTINS, A. A., MATTOS, R. C., NEVES, A. P. Is the presence of uterine fluid a reliable indicator of endometrial inflammation? **Pferdeheilkunde**, v. 28, p. 27-29, 2012.
- THOMAS, G. H., BETTELHEIM, K. A., *Escherichia coli* on the www. **Letters in Applied Microbiology.** v. 27, p. 122–123, 1998.

BRENNEIS, H.; HANSCH, G. Granulozyten funktionss störungem: Formenund **Diagnostik. Dtsch. Med. Wschr.**, v. 118, p. 1117-1129, 1993.

BRENNER, D. J.; Family I. Enterobacteriaceae. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. vol 1, p. 408-516, 1984.

BRINSKO S. P., BLANCHARD, L. T., VARNER, D. D., SCHUMACHER, J., LOVE, C. C., HINRICHS, K. HARTMAN, D. Endometritis. In: **Manual of Equine Reproduction**. 3 ed., cap. 6. p. 73-84, 2011.

BUCCA, S. CARLI, A., BUCKLEY, T., DOLCI, G., FOGARTY. U.of persistent mating induced endometritis in susceptible mares, by corticosteroid administration at breeding time. **Reproducción equina III**. Resúmenes de conferencias del III congreso argentino de reproducción equina. Ed. Unirío, p. 89-96, 2013.

BURLESON, M. D., LeBLANC, M. M, RIDDLE, W. T, HENDRIKIS, K. E. M. Endometrial microbialisolates are associatedwithdifferentultrasonographic and endometrial cytologyfindings in Thoroughbred mares. **AnimReprodSci**. p. 121:103, 2010.

CASLICK, E.A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the thoroughbred mare. **Cornell Vet.**, v. 27, p. 178-187, 1937.

CASTILHO, L.F.F. Endometrites na égua: plasma autólogo acrescido de leucócitos como forma de tratamento. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, 1994. 92p.

CASTILHO, L.F.F.; MATTOS, R.; MALSCHITZKY, E.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Lavagem uterina com solução salina como forma de tratamento da endometrite. **Arquivos da Faculdade de Veterinária – UFRGS**v.23, p.43-52, 1995.

CAUSEY, R. C. Making sense of equine uterine infections: The many faces of phisycal clearance. **Veterinary Journal**, ed. 172, p. 405-421, 2006.

COLLINS, S.M. A study of the incidence of cervical and uterine infections in thoroughbred mares in Ireland.**Vet. Rec.**, v. 76, p. 673-675, 1964.

Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CAN, 2006. Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil. Brasília: CNA.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Ann Rev Microbiol**. p. 711-745, 1995.

COUTO, M. S., HUGHES, J. P., Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. **Equine Vet. Sci**. v. 4, p. 265-73, 1984.

DARENIUS, K. Early foetal death in the maré.Histological, bacteriological and cytological findings in the endometrium. **ActaVet.Scand.**, v. 33, p.147-160, 1992.

CHRISTOFFERSEN, M., *et al.*, Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 138 .p. 95–105, 2010.

CHRISTOFFERSEN, M., WOODWARD, E.M., BOJESEN, A.M., PETERSEN, M.R., SQUIRES, E.L., LEHN-JENSEN, H., TROEDSSON, M.H.T. Effect of immune modulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**. v. 78 p. 991–1004, 2012.

CURNOW, E. M., Ultrasonography of the mares uterus. **Eq. Vet. Educ.**, v. 3, n. 4, p. 190-193, 1991.

DARENIUS, K. Early foetal death in the mare. Histological, bacteriological and cytological findings in the endometrium. **Acta Vet. Scand.**, v. 33, p.147-160, 1992.

DE WINTER, P. J. J.; VERDONK, M.; KRUIF, A.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Bacterial endometritis and vaginal discharge in the sow: prevalence of different bacterial species and experimental reproduction of the syndrome. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 325-335, 1995.

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D.; ALVARENGA, M.A.; MACEDO, L.P.; MELO, C.M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 270-273, 2006.

DIMOCK, W. W.; EDWARDS, P. R. **The pathology and bacteriology of the Reproductive organs of mares in relation to sterility**. n. 286, p. 157-237, 1928.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. The distribution of bacterial flora in the intestine. In: DRASAR, B. S.; HILL, M. J. **Human intestinal flora**. Academic Press, p. 36-43, 1974.

EATON, S.; RAZ, T.; CHIRINO-TREJO, M.; BERGERMANN, J.; CARD, C. Comparison of endometrial inflammation following intrauterine inoculation with genital strains of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* or *Escherichia coli* in the mare. **Animal Reproduction Science**, s101-s102, 2010.

EMODY, L.; KERENYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 22, p. 29-33, 2003.

ENGELKE, F., ZERBE, H., KLUG, E., LEIBOLD, W. A new model system for endometritis in mares—preliminary results. **Pferdeheilkunde**, v. 15, p. 579–583, 1999.

EVANS, M.J., HAMER, J.M., GASON, L.M., IRVINE, A.C. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl**, v.35, p.327- 342, 1987.

EWERS, C., LI, G., WILKING, H., KIEBLING, S., ALT, K., ANTÁO, E. M., LATURNUS, C., DIEHL, I., GLODDE, S., HOMEIER, T., BÖHNKE, U., STEINRÜCK, H., PHILIPP, H. C., WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic,

and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **Inter. J. Med. Microbiol.**, v. 297(3), p. 163-76, 2007.

ESCHERICH, T. The intestinal bacteria of the neonate and breastfed infant. **Reviews Infective Disease**, v. 13, p. 352-356, 1989.

FAURSCHOU, M., BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microb. Infect.** v. 5, p. 1317–1327, 2003.

FREEMAN, k.P.; ROSZEL, J.F.; SLUSHER, S.H.; PAYNE, M. Mycotic Infections of the Equine Uterus. **Equine Practice**, v. 8, n.1, p. 34-42, 1986.

FREEMAN, K. P.; ROSZEL, J. F.; SLUSHER, S. H.; CASTRO, M. Variation in glycogen and mucins in the equine uterus related to physiologic and pathologic conditions. **Theriogenology**. v. 33, p. 799-808, 1990.

FREEMAN, S.L., GREEN, M.J., ENGLAND, G.C.W. Uterine fluid from bitches with mating-induced endometritis reduces the attachment of spermatozoa to the uterine epithelium. **The Veterinary Journal**, 2013.

FUMOSO, E. A., AGUILAR, J., GIGUERE, S., RIVULGO, M., WADE, J., ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effects of immunomodulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v. 118, p. 30-39, 2007.

GANJAM, V. K., McLEOD, C. KLESIUS, P. H., WASHBURN, S. M., KWAPIEN, R., BROWN, B. G., ATTLEBERGER, M. H. Effect of ovarian hormones on the pathophysiological mechanisms involved in resistance vs. susceptibility to uterine infections in the mare. *Proc. Am. Ass. Equine Pract.*, p. 141-153, 1980.

GINTHER, O. J., **Reproductive Biology of the Mare: Basics and Applied Aspects**. 2nd ed. Cross Plains. Equiservices, p. 642, 1992.

GUYTON, A.C. The lymphatic system. In: **Text-book of Medical Physiology**, Philadelphia, W.B. Saunders, p.180-184, 1991.

HEMBERG, E., LUNDEHEIM, N, EINARSSON, S. Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares. **J. Vet. Med.** A Physiol. Pathol. Clin. Med. v. 52, p. 474-77, 2005.

HIRSBRUNNER, G., REIST, M., COUTO, S. S., STEINER, A., SNYDER, J., VANLEEUEWEN, E. An in vitro study on spontaneous myometrial contractility in the mare during estrus and diestrus. **Theriogenology**. v. 65, p. 517-27, 2006.

HIRSBRUNNER, G., KAUFMANN, C., KELLER, C., HUSLER, J., STEINER, A. Spontaneous myometrial contractility in cows suffering from endometritis-Influence of localisation, smooth muscle layer and cycle phase. An in vitro study. **AnimReprod Sci.** v. 118, p. 124-30, 2010.

HUGHES, J.P. & LOY, R.G. Investigations on the effect of intrauterine inoculations of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. **American Association of Equine Practitioners** p. 289-292, 1969.

HUGHES, J.P Reproductive panel discussion. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practicioners.** Ts. Louis. p. 188-201, 1978.

HUGHES, J.P., LOY, R.G. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. **Equine Vet. J.** 7, 155–159, 1975.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A.; Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: The other bad *Escherichia coli*. **J Lab ClinMed.** p. 155-62, 2002.

JOHNSON, J. R., RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Inter. J. Med Microb.** v. 295, p. 383-404, 2005.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammation response of mares with fresh sēmen. **Biol. Reprod.** v. 1, p. 515-517, 1995.

KENNEY, R.M., BERGMAN, R.V., COOPER, W.L., MORSE, G.M. Minimal contamination technique for breeding mares. Technics and preliminary findings. In: Annual Convention of American Association on Equine Practice. **America Association of Equine Practicioners**, v. 21, p. 237-336, 1975.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology.** W. B. Saunders Comp., p. 723-729, 1986.

KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v. 172, p. 241-261, 1978.

KENNEY, R.M. The etiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 3, p. 185-186, 1992.

KNUDSEN, O. Endometrial Citology as a Diagnostic aid in Mares. **Cornell Veterinary.** v. 54, p. 415-422, 1964.

LeBLANC, M.M.; ASBURY, A.C.; LYLE, S.K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **American Journal Veterinary**, v. 50, p. 864-867, 1989.

LeBLANC, M.M. Oxytocin – the new Wonder drud for treatment of endometritis? **Equine Veterinary Education.**, v. 6, p. 39-43, 1994a.

LeBLANC, M. M., NEUWIRTH, L., MAURAGIS, D. *et al.* Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometrites. **Equine Vet. Journal.** v. 26, p. 279, 1994b.

LeBLANC, M.M.; JOHNSON, R.D.; CALDERWOOD, M.B.; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearence of India Ink in reproductively normal mares and mares susceptibiles to endometritis. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 501-506, 1995.

LeBLANC, M. M. *et al*; Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology.** v. 68. p. 403–412, 2007.

LeBLANC, M. M., CAUSEY, R. C. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 44 p. 10-22, 2009.

LeBLANC, M. M., Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reprod. Dom. Anim.** 45 (Suppl. 2), p. 21-27, 2010.

LIU, I.K.M.; MITCHELL, G.; PERRYMAN, L.E.; STEWART, E.W. immunological defence mechanisms of the uterus in the mare. **Teriogenology**, p. 265-267, 1981.

LIU, I.K.M.; CHEUNG, A.T.W. Immunoglobulin and neutrophil defense against uterine infection in mares resistant and susceptible to chronic endometritis: a review. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 189, n. 6, p. 700-702, 1986.

LIU, I. K. M., TROEDSSON, M. H. T., The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. **Theriogenology**, v.70, p. 415-420, 2008.

LYLE, K. S. Endometrial Culture and Antimicrobial Therapy. In: **Current Therapy in Equine Medicine** 5. Cap. 5.2, p. 230, 2003.

MALE, D., ROITT, I. Imunidade Inata e Adaptativa. In: ROIT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 2. Ed, p. 1.1-1.10. São Paulo, Editora ManoeleLtda, 1992.

MALSCHITZKY, E., MATTOS, R. C. Endometrite na égua, novos conceitos. **Revista brasileira de reprodução animal**. Belo Horizonte. v.31, n.1, p.17-26, 2007

MALSCHITZKY, E., FIALA, S. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. **Pferdeheilkunde**. 24:74-8., 2008.

MATTOS, R.C.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS, R.; GREGORY, R.M. Effects of different postbreeding treatments on fertility of Thoroughbred mares. I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde**. v.13(5), p.512-515, 1997.

MATTOS, R. C.; CASTILHO, L. F. F.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS, R.; GREGORY, R. M. Treatment of endometritis of experimentally infected mares: I - Effect of lavage, plasma and leukocytes on uterine bacterial clearance. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**. v.27, n.1, p.49-60, 1999 a

MATTOS, R.C.; MEIRELLES, L.S.; MALSCHITZKY, E.; CASTILHO, L.F.F.; NEVES, A.P.; MATTOS, A.L.G.; VIEIRA, M.J.; KELLER, A.; HÖTT, A.K.; GREGORY, R.M. Oxytocin, plasma containing leukocytes or combination of both as treatment of post breeding endometritis in the horse. **Pferdeheilkunde** 15(6), p.584-587, 1999b.

MATTOS, R. C.; NEVES, A. P.; GREGORY, R. M.; GOMES, M. J. S.; MATTOS, R.; MEIRELLES, L. S.; LAGARES, M. A.; KELLER, A.; WALD, V. B.; VIEIRA, M. J.; HÖTT, A. K. Treatment of endometritis of experimentally infected mares: II- Effect of

ecbolic drugs and plasma enriched with leukocytes on uterine bacterial clearance. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**.v. 27, n. 1, p. 61-72, 1999c.

MATTOS, R.C., MATTOS, A.L.G., KLUG, E. A.R. Citologia endometrial na égua auxiliar e complementar. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 8, p. 83-90, 1984.

McKINNON, A. O.; BEHANN, D.P. Use of Chromogenic Agar to Diagnose Reproductive Pathogens. In: McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (Eds.). Wiley-Blackwell: West Sussex. **Equine Reproduction**. 2 ed., v. 2, p. 1979-1987, 2011.

MERKT, H., VON LEPPPEL, J.F. Die Entnahme von Proben für die bakteriologische Untersuchung des Genitalsekretes der Stute, ihre Beurteilung sowie Behandlungshinweise. **DeutschTierärztliche Wochenschrift** 77, 489–528, 1970.

NASCIMENTO, S. Mercado a galope. **Revista Globo Rural**, n. 287, p. 36-43, 2009.

NEVES, A. P., KELLER, A.; TREIN, C. R.; MÖLLER, G.; JOBIM, M. I. M.; CASTILHO, L. F. F.; CARDOZO, M. I.; LEIBOLD, W.; KLUG, E.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Use of leukocytes as treatment for endometritis in mares experimentally infected with streptococcus equi subsp. zooepidemicus. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.314 - 322, 2007.

NEELY, D. P., LIU, I. K. M., HILLMAN, R. B. **Equine reproduction**. Basle: Hoffmann La Roche Inc. p. 179, 1983.

NIELSEN, J. M., TROEDSON, M. H., PEDERSEN, M. R., LEHN-JENSEN, H. Diagnosis of Endometritis in the Mare Based on Bacteriological and Cytological Examinations of the Endometrium: Comparison of Results Obtained by Swabs and Biopsies. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 30, n.1, 2010.

OVERBECK, W., WITTE, T. S., HEUWIESER, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. **Theriogenology**. v. 75 p. 1311–1318, 2011.

PASCOE, R.R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare., **Journal of Reproduction and Fertility. Suppl.** v. 27, p.299-305, 1979.

PIMENTEL, C. A., SANTOS, P. F. M., Biópsia endometrial em equinos. In: Laboratório Regional de Diagnósticos. **Doenças diagnosticadas no ano de 1989**. Pelotas, UFPEL, p. 47-49, 1989.

PYCOCK, J.F. ALLEN, E.A. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 6, p. 422-425, 1989.

PYCOCK, J.F. Inflammatory components in the uterine fluid of mares with acute endometritis. Proc. Of the John Hughes intern Workshop on Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 189, 1993.



PYCOCK, J. F. .Breeding management of the problem mare.*In*: Samper JC (Ed.). **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: WB Saunders. p.195-228, 2000.

PYCOCK, J. F., Therapy for mares with uterine fluid. In: SAMPER, J. C., PYCOCK, J. F., McKINNON, A. O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. cap. 14, p. 93-104, 2007.

PYCOCK, J. F., Breeding Management of the Problem Mare. In: SAMPER, J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2nd ed., cap.13, p. 139-164, 2009.

RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M.; M.; PIERCE, S. W.; STROMBERG, A. J. Relationships between pregnancy rates, uterine cytology and culture results in a Thoroughbred practice in central Kentucky. In: **Proceedings of the 50<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**. p. 51-54, 2005.

RIDDLE W. T., LeBLANC, M. M, STROMBERG A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice. **Theriogenology**.68, p. 395–402, 2007.

ROHRBACH, B., SHEERIN, P., STEINER, J., MATTHEWS, P. CANTRELL, C, DODDS, L. Use of Propionibacterium acnes as adjunct therapy in treatment of persistent endometritis in the broodmare. **Anim. Reprod.Sci.**, v. 94, p. 259-60, 2006.

ROSSDALE, D.P. & RICKETTS, S.W. **Equine Stud Farm Medicine**.2nd Ed., p. 52-53, 1980.

SILVA, C.A.M.; BARROS, S.S.; ESQUERE, R.S. & SILVA, J.H.S. A biopsia endometrial na avaliação da fertilidade da égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 7, p. 131-133, 1987.

SILVA, C.A.M. Uma nova técnica para a correção cirúrgica da pneumovagina na égua. **Turf e Fomento**. p. 247-248, 1983.

SHAPIRO, J. A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Ann Rev Microbiol**. v. 52, p. 81-104, 1998.

SOTO, S. M.; SMITHSON, A.; HORCAJADA, J. P.; MARTINEZ, J. A.; MENSA, J. P.; VILA, J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract Infection caused by uropathogenic Escherichia coli. **ClinMicrobiol Infect**. v. 12, p. 1034-1036, 2006.

THOMAS, G., H., BETTELHEIM, K. A., *Escherichia coli* on the www. **Letters in Applied Microbiology**. v. 7, p. 121–123, 1998.

TROEDSSON, M. H. T., LIU, I. K. M. Uterine clearance of non-antigenic markers (51-Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **J. Reprod. Fertil.Suppl**. v. 44, p. 283, 1991.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; THURMOND, M. Function of uterine and blood derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: Phagocytosis and Chemotaxis. **Biology of Reproduction**, n. 49, p. 507-514, 1993.

TROEDSSON, M.H.T., Diseases of the uterus. In: Robinson, N.E. (Ed.), **Current Therapy in Equine Medicine**, 4. WB Saunders Co., pp. 517–524, 1997.

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-induced endometritis in mares. *Vet Clin North Am Equine Pract.* v. 22, p. 705-12, 2006.

TROEDSSON, M. H. T. Endometritis. In:McKINNON, A. O., SQUIRES, E. L., VAALA, W. E., VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2nd. ed. cap.271, p. 2608-19, 2011.

VOSS, J. L. Introduction: Intrauterine infection in mares. Magazine Highlights from the horse interactive, in: **Proceedings Symposium on Mare Infertility**. Western States Veterinary Conference, Las Vegas, Nevada.p. 5-7, 1984.

ZERBE, H., CASTILHO, L. F. F. ENGELKE, F. MATTOS, R. C. SCHUBERTH, H. J., KLUG, E., LEIBOLD, W. Isolation and cryopreservation of functionally competent equine leukocytes. **J. Vet. Med.** v. 50, p. 179–184, 2003.

WAELECHILI, R. O., CORBOZ, L., DOEBELI, M. Streptomycin-resistant *Scherichia coli* as a marker of vulvovestibular contamination of endometrial culture swabs in the mare. **Can. J. Vet. Res.** v. 56(4), p. 308–312, 1992.

WALTER, J., NEUBERG, K. P., FAILING, K., WEHREND. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. **Animal Reproduction Science**. v. 132, p. 178– 186, 2012.

WAITES, G.T.; BELL, S.C. Glycogen-induced intrauterine leucocytosis and its effect on mouse blastocyst implantation in vivo and in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 66, p. 563-569, 1982.

WATSON, E.D. Uterine defence mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: A review. **Equine Veterinarian Journal**, v. 20, p. 397-400, 1988.

WIDDERS, P. R., STOKES, C. R., DAVID, J. S. E., BOUME, F. J. Immunohistological studies of the local immune system in the reproductive tract of the mare. **Res. Vet. Sci.**, v. 38 p. 88-95, 1985.

WINGFIELD DIGBY, N.J.; RICKETTS, S.W. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978- 1981. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v. 32, p. 181-185, 1982.

WOODWARD, E. M., TROEDSSON, M. H., Equine Breeding-Induced Endometritis: A Review. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 33, p. 673-682, 2013.

WOLF, C. A., MALSCHITZKY, E. GREGORY, R. M., JOBIM, M. I. M., MATTOS, R. C. Effect of corticotherapy on proteomics of endometrial fluid from mares susceptible to persistent postbreeding endometritis. **Theriogenology**, v. 77, p.1351–1359, 2012.

XU, L.M.; FENG, W. Y.; WANG, Z. M. Research progress of cow endometritis. **Progress in Veterinary Medicine**, v. 29, p. 71-74, 2008.

**ANEXO A**

**Artigo publicado em Pferdeheilkunde 30 (Jan/Fev) 2014**

# Endometritis in mares experimentally infected with three different strains of *E. coli*

Giovani C. Camozzato<sup>1</sup>, Nicolás Cazales<sup>1,2</sup>, Eduardo M. Pinheiro<sup>1</sup>, Caroline A. Wolf<sup>1</sup>, Petra Garbade<sup>1</sup>, Maria I. M. Jobim<sup>1</sup>, Ricardo M. Gregory<sup>1</sup> and Rodrigo C. Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Faculdade de Veterinária, UDELAR/CAPES, Montevideo, Uruguay

**Summary:** The aim of this study was to describe the inflammatory response after intrauterine inoculation with three different strains of *E. coli* in the mare. Nine cyclic mares aged between 7 and 20 years old were selected and their estrous detected by transrectal palpation and ultrasound. Only clinically normal mares with negative cytology and bacteriology were used. Three different strains of *E. coli* obtained from: (UT) uterine swab of a mare with endometritis, (VE) vestibular swab from a healthy mare and (MA) from mare manure, were used. Subsequently, the mares were submitted to intrauterine inoculation with  $3 \times 10^9$  *E. coli* of one of the three different strains. All mares were challenged with each strain of *E. coli* in a randomized order in the subsequent different cycles. One day after infection, clinical examination of the genital tract by speculum, ultrasound, endometrial cytology and bacteriological cultures were performed. These procedures were repeated daily until negative culture and negative cytology were diagnosed. All mares had slight ( $< 10$ /field) to severe ( $> 20$ /field) endometrial neutrophils 24h after *E. coli* inoculation. In 25 of 27 mares (92.6%), vaginal clinical signs and intrauterine fluid (IUF) were detected. Severe vaginal signs with purulent aspect and hyperemic mucosa were observed in 17 mares and 8 presented mild signs. Only 59.2% of the mares (16/27) were *E. coli* positive 24h after the infection. The time needed for elimination of bacteria was in average 2.8 ( $\pm 1.0$ ) days. In conclusion, *E. coli* spp. provokes a positive cytology and most of the mares developed vaginal clinical signs of endometritis and IUF, with no difference among *E. coli* strains.

**Keywords:** mares / infection / *E. coli* / endometritis / cytology / bacteriology / reproduction

**Correspondence:** Prof. R. C. Mattos, REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 91570-000 Porto Alegre, RS, Brazil, E-mail: rcmattos@ufrgs.br

**Citation:** Camozzato G. C., Cazales N., Pinheiro E. M., Wolf C. A., Garbade P., Jobim M. I. M., Gregory R. C. M., Mattos R. C. (2014) Endometritis in mares experimentally infected with three different strains of *E. coli*. *Pferdeheilkunde* 30, 57-60

## Introduction

Endometritis is the most important cause of infertility in barren mares (Hughes and Loy 1975, LeBlanc et al. 2010) and inflicts major losses on the equine breeding industry. Bacterial uterine infections occur in 25% to 60% of barren mares and the most frequently isolated pathogens are *Streptococcus zooepidemicus* and *Escherichia coli* (Dimock 1928, Collins 1964, Mattos et al. 1984, Albiñ 2003, LeBlanc et al. 2007 and LeBlanc 2011). Endometritis caused by *Streptococcus* sp has been widely studied (Hughes and Loy 1975, Neves et al. 2010). However, little is known about the mare's endometrial response to *E. coli* (LeBlanc et al. 2007 and Eaton 2010). Focal infection (LeBlanc et al. 2007) induced by *E. coli* (Eaton 2010) was associated with less exudative uterine inflammatory response than by *Streptococcus zooepidemicus*. In contrast some studies have shown that uterine infections by *E. coli* were less likely to have cytological evidence of inflammation (Riddle et al. 2007, Burlison 2010). The objective of this study was to describe the uterine inflammatory response after intrauterine inoculation with three different strains of *E. coli* in the mare.

## Materials and methods

### Animals

The experiment was conducted at the Laboratory of Animal Reproduction, UFRGS, Porto Alegre, Brazil. Nine cyclic mares between aged 7 and 20 years old were used. Mares were

kept under similar conditions of management during all the experiment, supplemented with oats and hay twice a day with ad libitum access to water and mineral supplement.

### Bacteriological and cytological examinations

To obtain the endometrial samples, the mare's perineum was washed and the tail bandaged. A guarded swab (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) was passed through the cervix into the uterine lumen, via a sterile speculum (Merkt and von Lepel 1970). The swab was exposed into the uterine lumen to obtain an endometrial sample without contamination. The swab was retracted into the sheath, removed from the uterus and immediately plated on Chromagar™ (McKinnon 2011). A bacteriological culture was considered negative when no growth was observed on the Chromogenic Agar dish or insignificant contaminants were isolated.

Another swab was taken, in a similar manner, to make an endometrial smear for cytological examination (Mattos et al. 1984). The swab was rolled back on a clean microscope slide, fixed and stained with a Romanowsky stain (Panótico®, Laborclin, Brazil) and evaluated under light microscopy (400×). Cytology was considered negative when no PMNs were detected in the slide. Positive cytology was classified according to the number of PMNs in the observed fields as: severe ( $> 20$ ), intense (15–19), moderate (10–14) and slight ( $< 10$ ).

### Clinical examination of the genital tract

Mares were examined by transrectal palpation and ultrasonography to detect intrauterine fluid (IUF). The IUF was characterized by hypoechoic areas larger than 10 mm in diameter in the uterine lumen. Vaginal examination was performed to observe mucosa aspect and the presence of secretion. Vaginal clinical signs were classified as: severe (abundant fluid accumulation), mild (little fluid accumulation) or absent (without fluid accumulation).

### Preparation of bacteria

Three different *E. coli* strains were obtained from: uterine swab of a mare with endometritis (UT), vestibular swab from a healthy mare (VE) and from mare's manure (MA). After isolation, bacteria were cultured for 24 h in the brain heart infusion (BHI) enrichment medium. Glycerol was added to the BHI medium, stored in 20 mL sterile cryovials at -20 °C. A resistance test for the three strains of *E. coli* was performed and demonstrated differences in the antimicrobial susceptibility.

Before infusion, bacteria were thawed and incubated at 37 °C for 24 h in BHI agar dishes in order to allow bacterial growth. For uterine inoculation, colonies were suspended in 2 mL saline solution to a final concentration of  $1.5 \times 10^9$  bacteria/mL, using the MacFarland scale (Neflobac®, Probac do Brazil Ltda, São Paulo, Brazil).

### Experimental Design

Before each experimental infection, mares were examined for reproductive soundness, including evaluation of perineal conformation, palpation per rectum and ultrasound of the genital tract, vaginal examination with speculum, bacteriological cultures and cytology of the endometrium. Only clinically normal mares with negative cytology and negative cultures were used.

When the presence of a dominant follicle (> 35 mm) and uterine edema (2–3) were detected, mares were experimentally infected with either one of the three strains of *E. coli* ( $3 \times 10^9$  CFU) diluted in a 20 mL saline solution. Only clinically healthy mares with negative cytology and bacteriology were used for this experiment. All mares were free from intrauterine fluid at the time of inoculation with *E. coli*.

Clinical examinations of the genital tract, endometrial cytology and endometrial cultures were conducted daily on all mares, beginning 1 day after bacterial infusion. Clinical, bacteriological (Merkel and von Lepel 1970) and cytological (Mattos et al. 1984) examination continued until negative culture for *E. coli* from endometrial swabs and absence of neutrophils in cytology were detected.

A Latin square design was used. All mares were challenged with the three strains of *E. coli* in a randomized order in the subsequent cycles. As nine mares were used and each one was submitted to the three *E. coli* strains, a total of 27 infections were done. New infections were performed no sooner than 14 days following complete elimination of bacteria previously inoculated. No mare was lost during the process.

### Statistical analysis

Data were analyzed using general linear model procedure of SAS (Statistical Analysis System). The model included the main effects of mare, *E. coli* strain and sequences of experimental groups and the dependent variables of time required to eliminate bacteria after experimental infection, time between experimental infection and the first negative cytology and their interactions. Means were compared using least square means.

### Results

The percentage of mares with vaginal clinical signs, IUF values, positive cytology and bacteriology 24 h after experi-

**Table 1** – Percentage of mares with positive cytology and bacteriology, with vaginal clinical signs and IUF 24 h after experimental infection with three different strains of *E. coli*. / *Prozentualer Anteil der Stuten mit positiver Zytologie, vaginal klinischen Symptomen und intrauteriner Flüssigkeitsansammlung 24 Stunden nach experimenteller Infektion mit drei verschiedenen E. coli Stämmen*

E coli strain	Vaginal	IUF *	Positive Cytology	Positive Bacteriology
UT	78 % <sup>a</sup>	89 % <sup>a</sup>	100 %	67 % <sup>a</sup>
VE	100 % <sup>a</sup>	89 % <sup>a</sup>	100 %	67 % <sup>a</sup>
MA	100 % <sup>a</sup>	100 % <sup>a</sup>	100 %	44 % <sup>a</sup>
Mean	92.6 %	92.6 %	100 %	59.3 %

Different characters indicate significant difference in the column (P < 0.05) \* Intrauterine Fluid

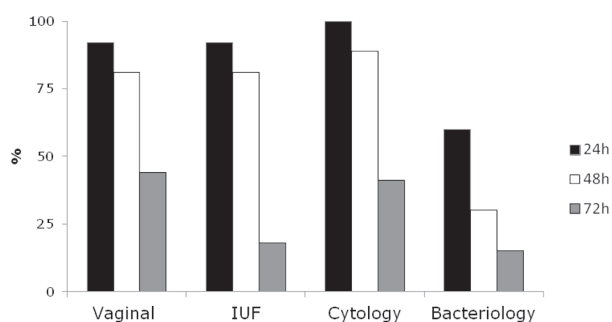
**Table 2** – Length of time (days) and standard deviation between experimental infection and the first negative cytology and bacteriology in mares experimentally infected with three different strains of *E. coli*. / *Zeitintervall (Tage mit Standardabweichung) zwischen experimenteller Infektion und der ersten negativen Zytologie und Bakteriologie bei Stuten nach experimenteller Infektion mit drei verschiedenen E. coli Stämmen*

E coli strain	Cytology (days)	Bacteriology (days)
UT	3.1 <sup>a</sup> ± 0.9	3.2 <sup>a</sup> ± 0.8
VE	3.6 <sup>a</sup> ± 0.7	2.8 <sup>a</sup> ± 1.3
MA	3.6 <sup>a</sup> ± 0.9	2.2 <sup>a</sup> ± 0.5
Mean	3.4 ± 0.8	2.8 ± 1.0

Different characters indicate significant difference in the column (P < 0.05)

mentally infection with three different strains of E coli are depicted in Table 1. In 25 of 27 mares (92.6%), vaginal clinical signs and IUF were observed in the inoculated mares. Severe vaginal signs with purulent aspect and hyperemic mucosa were observed in 17, and the remaining 8 presented mild signs. However, one of the mares without clinical signs of endometritis presented IUF. At the third day, the number of mares presenting mild or severe clinical signs was reduced to 11 (40.7%) (Figure 1).

All mares had slight (< 10/field) to severe (> 20/field) endometrial neutrophilia 24h after E coli inoculation and the cytology remained positive 3.4 days in average (table 2). UT E. coli had a tendency ( $P < 0.09$ ) to produce a higher neutrophilia than the VE and MA E. coli. Only 16 out of 27 mares (59.3%) were positive for E coli culture 24h after E coli inoculation. The time needed for E. coli elimination was in average 2.81 days (table 2).



**Fig 1** Occurrence of positive cytology, positive bacteriology, clinical signs of endometritis, and IUF 24h, 48h and 72h after infection with E. coli. / Auftreten einer positiven Zytologie, einer positiven Bakteriologie, klinischen Symptomen und einer intrauterinen Flüssigkeitsansammlung 24h, 48h und 72 h nach Infektion mit E. coli

## Discussion

After 24 hours of intrauterine infection with three different strains of E. coli, all mares (100%) presented slight to severe positive endometrial cytology. Twenty-five (92.6%) out of 27 mares presented vaginal clinical signs and intrauterine fluid accumulation. This is in agreement with recent studies, where the presence of PMNs was observed in all mares and clinical signs of endometritis and IUF were present in 83% (Christoffersen et al. 2010) and in 100% (Christoffersen et al. 2012) of the cases at 3 h, 24 h and 72 h after E. coli infection. However, most of the authors have reported that not all positive cultures of E. coli were associated with positive cytology (Riddle et al. 2007, Bindeslev et al. 2008, Nielsen et al. 2010, Overback et al. 2011).

In the present study, positive bacterial culture was detected in 59.2% of the infected mares after 24 h of E. coli inoculation. In this study the E. coli isolation rates were lower than the obtained with experimental infection with Streptococcus sp (Neves et al. 2007), using the same technique. Uterine exudate in E. coli infections may be tenacious, similar to that reported for Klebsiella infections (Dimock and Edwards 1928, Beachey 1981), making it difficult to isolate on a culture swab. In chronic infections E. coli secrete a biofilm, a hydrated matrix

of polysaccharide and protein, providing an adhesive matrix for micro-colonies (Costerton 1995, Freeman 1990). E. coli may also be associated with focal infection as endoscopic evaluation of the uterine lumen of two affected mares revealed focal, granulomatous plaques (LeBlanc et al. 2007). A low volume flush technique may identify more pathogenic organisms than the swab technique, as the saline solution comes in contact with a larger surface area (LeBlanc et al. 2007). The uterine flushing technique seems to have a higher sensitivity for the detection of gram-negative microorganisms, whereas for  $\beta$ -haemolytic Streptococcus, it did not differ when compared to swabs (Wingfield 1982 and Riddle 2007).

In an unpublished study (Camozzato 2013) isolated E. coli from the vulva and vestibule in 80% of the mares after cleaning the perineum with water and soap. The author demonstrated that is very easy to provoke a sample contamination with a simple touch of the swab in the vulvar-vestibular area. False positive cultures have been associated with contamination of culture instruments from the environment, external genitalia and vagina (Ricketts 1981). Contamination of a uterine catheter with vaginal flora must be considered as a source of false positive culture results, because contamination occurs more frequently in a semi-guarded (i.e. the flush technique) than in a completely guarded (i.e. swab technique) endometrial culture technique (LeBlanc et al. 2007).

In this study, no difference in cytology, vaginal and uterine clinical signs among the three different strains of E. Coli were observed. In cows with metritis, E. coli was more adherent and invasive to endometrial epithelial and stromal cells. Bicalho et al. (2010) reported six genes: fimH, astA, cdt, kpsMII, ibeA and hlyA to be mostly associated with bacterial adhesion or invasion, in both metritis and clinical endometritis. The fimH adherence gene was present in 87% of the uterine E. coli infections in cows and in 29% was strongly associated with increased risk of disease. In the present study, despite the differences among the three different strains, the bacteria used probably presented genes associated with adhesion or invasion and caused the clinical signs of endometritis and the positive cytology.

In conclusion, E. coli endometritis provoked a positive cytology and most of the mares developed vaginal clinical signs of endometritis and IUF, with no difference among E. coli strains.

## Acknowledgement

The authors would like to thank the Microbiology Laboratory – Faculty of Veterinary – UFRGS. This study was financially supported by CAPES, CNPq and FAPERGS

## Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

## References

- Albihn A., Baveurd U. (2003) Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. Acta Vet. Scand. 121-129

- Beachey E. H. (1981) Bacterial-adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* 143, 45
- Bicalho R. C., Machado, V. S., Bicalho, M. L., Gilbert, R. O., Teixeira, A. G., Caixeta, L. S., Pereira, R. V. (2010) Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 93, 5818-5830
- Bucca S., Carli A., Buckley T., Dolci G., Fagarty U. (2013) Modulation of persistent mating induced endometritis in susceptible mares, by corticosteroid administration at breeding time. *Reproducción equina III. Resúmenes de conferencias del III congreso argentino de reproducción equina*. Ed Unirio, 89-96
- Burleson M. D., LeBlanc M. M., Riddle W. T., Hendrikis K. E. M. (2010) Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares. *Anim. Reprod. Sci.* 121-103
- Collins S. M. (1964) A study of the incidence of cervical and uterine infections in thoroughbred mares in Ireland. *Vet. Rec.* 76, 673-675
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lapin-Scott H. M. (1992) Microbial biofilms *Ann Rev Microbiol* p 711-745, (1995) In: Darenius K. Early foetal death in the mare. Histological, bacteriological and cytological findings in the endometrium. *Acta Vet. Scand.* 33, 147-160
- Christoffersen M., Baagoe C. D., Jacobsen S., Bojesen A. M., Petersen M. R., Lehn-Jensen H. (2010) Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138, 95-105
- Christoffersen M., Woodward E. M., Bojesen A. M., Petersen M. R., Squires E. L., Lehn-Jensen H., Troedsson M. H. T. (2012) Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology* 78, 991-1004
- Dimock W. W., Edwards P. R. (1928) The pathology and bacteriology of the Reproductive organs of mares in relation to sterility. 286, 157-237
- Eaton S., Raz T., Chirino-Trejo M., Bergemann J., Card C. (2010) Comparison of endometrial inflammation following intrauterine inoculation with genital strains of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* or *Escherichia coli* in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 101-102
- Freeman K. P., Roszel J. F., Slusher S. H., Castro M. (1990) Variation in glycogen and mucins in the equine uterus related to physiologic and pathologic conditions. *Theriogenology* 33, 799-808
- Kenney R. M., Doig P. A. (1986) Equine endometrial biopsy In: *Morrow DA Current Therapy*. In: *Theriogenology*. W. B. Saunders Comp. 723-729
- Hughes J., Pand Loy R. G. (1969) Investigations on the effect of intrauterine inoculations of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. *American Association of Equine Practitioners*. 289-292
- Le Blanc M. M., Magsig J., Stromberg A. J. (2007) Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*. 68, 403-412
- LeBlanc M. M. (2010) Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post Mating-Induced Endometritis in the Mare. *Reprod. Dom. Anim.* 45, 21-27
- Mattos R. C., Mattos A. L. G., Gunzel A. R., Klug E. (1984) Bakteriologische und zytologische Untersuchungen von Uterusabstrichen beim Pferd. *Prak. Tierarzt* 65, 809-814
- McKinnon A. O., Beehan D. P. (2011) Use of Chromogenic Agar to Diagnose Reproductive Pathogens. In: McKinnon A. O., *Equine reproduction*. 2, 1979-1987
- Merkt H., von Lepel J. F. (1970) Die Entnahme von probenfür die bakteriologische Untersuchung des Genitalsekretes der Stute, ihre Beurteilung sowie Behandlungshinweise *Dtsch. Tierärztl. Wsch.* 77, 489-528
- Overbeck W., Witte T. S., Heuwieser W. (2011) Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology* 75, 1311-1318
- Riddle W. T., LeBlanc M. M., Stromberg A. J. (2007) Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice. *Theriogenology* 68, 395-402
- Ricketts S. W. (1981) Bacteriological examinations of the mare's cervix: techniques and interpretation of results. *Vet. Rec.* 108, 46-51
- Wingfield-Digby N. J., Ricketts S. W. (1982) Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice. *J. Reprod. Ferti.* 132, 181-185

### Endometritis bei mit drei unterschiedlichen Stämmen von E.coli experimentell infizierten Stuten

Das Ziel dieser Studie war es, Entzündungsreaktion bei der Stute zu beschreiben, die nach intrauteriner Inokulation mit drei verschiedenen Stämmen von *E. coli* auftreten. Neun zyklische Stuten im Alter zwischen 7 und 20 Jahren wurden ausgewählt und ihr Östrus durch transrektale Palpation und Ultraschall ermittelt. Nur klinisch unauffällige Stuten mit negativer Zytologie und Bakteriologie wurden verwendet. Drei verschiedene Stämme von *E. coli* kamen zum Einsatz: (UT) aus einer Tupferprobe einer Stute mit Endometritis, (VE) aus einem vestibulären Tupfer einer gesunden Stute und (MA) aus Pferdemit. Anschließend wurden die Stuten intrauterin mit  $3 \times 10^9$  *E. coli* einer der drei Stämme inokuliert. Alle Stuten wurden mit jedem Stamm von *E. coli* in randomisierter Reihenfolge in den folgenden Zyklen infiziert. Einen Tag nach der Infektion erfolgte eine klinische Untersuchung des Genitaltrakts mittels Spekulum, sowie Ultraschall, Endometriumzytologie und bakteriologische Kultur. Diese Verfahren wurden täglich so lange wiederholt bis eine negative Kultur und negative Zytologie diagnostiziert werden konnte. Alle Stuten hatten 24 h nach der *E. coli* Inokulation wenige (<10/Gesichtsfeld) bis zahlreiche (>20/Gesichtsfeld) neutrophile Granulozyten im Endometrium. 25 von 27 Stuten (92,6%) zeigten vaginal klinische Anzeichen und eine intrauterine Flüssigkeit (IUF). Schwere vaginale Symptome mit eitrigem Charakter und hyperämischer Schleimhaut lagen bei 17 Stuten und milde Erscheinungen bei 8 Stuten vor. Nur 59,2% der Stuten (16/27) erwiesen sich 24 h nach der Infektion als *E. coli* positiv. Die durchschnittliche Zeit für die Beseitigung der Bakterien lag bei 2,8 ( $\pm 1,0$ ) Tagen. Abschließend ist festzustellen, dass *E. coli* spp. eine positive Zytologie provozieren und die meisten Stuten vaginal klinische Anzeichen einer Endometritis und IUF entwickeln, wobei kein Unterschied zwischen den *E. coli*-Stämmen zu erkennen ist.

**Schlüsselwörter:** Stute / Infektion / *E.coli* / Endometritis / Zytologie / Bakteriologie / Reproduktion