



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020024112-5 A2



(22) Data do Depósito: 26/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 31/05/2022

(54) **Título:** MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA ENDOMETRITE EQUINA ASSOCIANDO CITOLOGIA, CULTURA BACTERIOLÓGICA E FÚNGICA AO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO E GRADUAÇÃO DE BIOFILME IN VITRO

(51) **Int. Cl.:** C12Q 1/04; C12Q 1/06; C12R 1/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DO AGRESTE DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** GUSTAVO FERRER CARNEIRO; JOSE ADELSON ALVES DO NASCIMENTO JUNIOR; ANTONIO BRITO DA SILVA FILHO; GILVANNYA GONCALVES DE SOBRAL; BRENO BARROS DE SANTANA; ALDO GIMENDIS PEREIRA DE MELO; MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA; ELIZABETE RODRIGUES DA SILVA; MARCELO MENDONCA; GIOVANNA ISABELLA DE SOUZA COUTO.

(57) **Resumo:** MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA ENDOMETRITE EQUINA ASSOCIANDO CITOLOGIA, CULTURA BACTERIOLÓGICA E FÚNGICA AO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO E GRADUAÇÃO DE BIOFILME IN VITRO. A presente invenção do campo da Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal e produtos de uso veterinário engloba um método inovador para diagnósticos de afecções uterinas em éguas, particularmente as endometrites, associando diferentes técnicas com maior precisão e conseqüente maiores possibilidades de tratamentos eficazes para essa patologia que acomete éguas de qualquer idade e em qualquer categoria reprodutiva, levando a maior perda econômica da Equideocultura. As infecções bacterianas que atuam no endométrio das éguas estão constantemente associadas à capacidade de produção de biofilme, sendo essa uma causa significativa de endometrite crônica, infertilidade momentânea e ainda refratariedade aos tratamentos prescritos. A intervenção terapêutica nesses casos representa um desafio para microbiologistas e clínicos, sobretudo devido ao método diagnóstico empregado, que apenas identifica os agentes microbianos, sem levar em consideração a produção de biofilmes e a resistência dos microrganismos, levando a tratamentos dispendiosos e ineficazes. O sistema diagnóstico desenvolvido consiste na identificação dos agentes, sua susceptibilidade farmacológica e capacidade de produção de biofilme, fornecendo subsídio para o sucesso da terapia, melhora da eficiência reprodutiva dos rebanhos equinos e evitando a problemática da resistência (...).

**“MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA ENDOMETRITE EQUINA ASSOCIANDO
CITOLOGIA, CULTURA BACTERIOLÓGICA E FÚNGICA AO PROTOCOLO DE
PRODUÇÃO E GRADUAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO*“**

Campo da invenção

[001] Método Diagnóstico associando diferentes técnicas com uma maior precisão e consequente possibilidades de tratamentos mais eficazes. A presente invenção se situa no campo da Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal e produtos de uso veterinário incluindo etapas de análise e interpretação dos dados obtidos.

Fundamentos da invenção

[002] A tecnologia atualmente utilizada para diagnóstico de endometrite não contempla a medição da produção de Biofilmes, fazendo com que o produtor tenha um custo elevado com tratamentos que muitas vezes são ineficazes. Sabe-se que a resistência microbiana é uma preocupação mundial, inclusive para a medicina veterinária (Nascimento Junior et al., 2018), o tratamento para uma égua que foi infectada por patógenos resistentes é complexo, o que consequentemente dificulta a intervenção adequada, e principalmente o diagnóstico correto, podendo ocasionar uma disseminação das bactérias resistentes em todo o rebanho (Vargas et al., 2019). (Artigo 9º, inciso IV, da Instrução Normativa nº 30/2013).

[003] As técnicas de identificação dos agentes microbianos já são estabelecidas, entretanto devido à falta de conhecimento, não se analisa a produção de Biofilmes por esses microrganismos, consequentemente os resultados de tratamento estabelecidos por meio das técnicas de diagnóstico utilizadas são muitas vezes ineficazes. A implementação da análise de produção de biofilmes possibilita um custo-benefício para os Veterinários e Produtores envolvidos na cadeia produtiva da Equinocultura, visto que comprovando a presença do biofilme não haverá o custo da utilização de antibioticoterapia de uma forma ineficaz. Evitando, portanto, o custo desnecessário de antibióticos que não surtirão efeito.

Descrição da invenção

[004] É objeto da presente invenção estabelecer um protocolo eficaz para diagnósticos de afecções uterinas em éguas, particularmente as endometrites, por se tratar da patologia que leva a maior perda econômica na Equideocultura. Essa afecção uterina pode acometer éguas de qualquer idade e em qualquer categoria reprodutiva.

[005] As infecções bacterianas que atuam no endométrio das éguas estão constantemente associadas à capacidade de produção de biofilme, o tratamento dessas infecções representa um desafio para microbiologistas e clínicos principalmente por não haver método diagnóstico disponível para identificação da produção dessa característica. Estudos comprovam que mais de 80% das bactérias isoladas de útero equino são capazes de formar biofilme in vitro.

[006] O biofilme trata-se de uma agregação complexa de microrganismos crescendo em um substrato sólido. São caracterizados por terem uma estrutura heterogênia, diversidade, interações complexas com a comunidade e matriz extracelular de substâncias poliméricas, que aumentam significativamente a resistência à terapia antibiótica (Troedsson, 2011). A formação de biofilme no trato reprodutivo equino é teorizada como uma causa significativa de endometrite crônica na égua (Vargas, et al. 2019). Biofilmes são nichos de proteção para microrganismos, fornecendo resistência e criando uma fonte de persistência para infecção. Biofilmes também fornecem aos microrganismos a capacidade de aderir fortemente qualquer superfície (Coutinho da Silva & Alvarenga, 2011). Tais biofilmes constituem potenciais reservatórios de patógenos, que servem como uma fonte contínua de infecções e contaminações cruzadas (Abdallah, 2014).

[007] A identificação do agente, assim como o conhecimento da sua suscetibilidade farmacológica são de fundamental importância, devido ao aumento da resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de drogas antibacterianas sem o devido diagnóstico. Assim como a formação prevalente de infecções fúngicas. A formação de biofilme possivelmente é responsável pela infertilidade momentânea e pela refratariedade aos tratamentos prescritos. O desenvolvimento de um Sistema diagnóstico que contemple a

identificação dos agentes, susceptibilidade farmacológica associadas a comprovação da produção de biofilme em que extensão, são necessários para o sucesso da terapia. A correlação desses testes pode fornecer subsídios ainda mais importantes para melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos equinos.

[008] De acordo com o artigo 24 da LPI (Lei da Propriedade Industrial – Lei nº 9.279/1996), seguem descritas abaixo todas as informações necessárias para a reprodução de nosso modelo:

[009] CITOLOGIA UTERINA: Os neutrófilos polimorfonucleares migram para o lúmen uterino em resposta à inflamação. Dessa forma a endometrite é diagnosticada de forma rápida e precisa através da identificação dessas células endometriais esfoliadas. Esse exame é realizado a partir da coleta de raspado uterino por uso de escova ginecológica e esfregaço em lâmina estéril para posteriormente realizar a coloração através do mergulho da lâmina em panótico rápido ou em qualquer outro corante. A amostra também pode ser coletada utilizando-se um swab ou através de células recuperadas do líquido do útero. Em seguida, a amostra seja em swab ou escova ginecológica é mergulhada em meio Phosphate-Buffered Saline (PBS) e armazenado em meio Brain Heart Infusion (BHI). No esfregaço corado, pode-se observar células epiteliais do endométrio e em alguns casos células de defesa, principalmente neutrófilos polimorfonucleares. Sendo assim, a endometrite é estabelecida baseada na presença de neutrófilos encontrados nas lâminas.

[0010] CULTURA BACTERIANA UTERINA: No laboratório, utilizando-se uma capela de fluxo laminar, as amostras coletadas são semeadas pela técnica de esgotamento em placas com ágar sangue de carneiro a 5%, e em seguida incubadas em estufa à temperatura de 37 °C por 24 a 48h. Após identificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), as placas são classificadas em: (1) sem crescimento, (2) crescimento isolado (apenas uma espécie de microrganismo) ou de (3) crescimento misto (duas ou mais espécies diferentes de microrganismos). Placas com crescimento misto são repicadas, isolando cada microrganismo em um cultivo, com intuito do crescimento e isolamento para cultura pura. Com 48 horas de incubação, as placas sem crescimento são descartadas e as com crescimento das culturas isoladas são, com auxílio de uma

alça de platina estéril em capela de fluxo laminar, transportadas para dois tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável, estéreis contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion - Becton Dickinson - BD®, Heidelberg, Alemanha), e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após a verificação do crescimento, as bactérias são armazenadas a temperatura de -70°C em caldo BHI contendo 20% de glicerol (v/v). Os microrganismos são identificados e o teste de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método Método Kirby Bauer realizado utilizando as concentrações padrões de cada antimicrobiano. A leitura e interpretação dos resultados são feitas de acordo com as recomendações do CLSI (2009).

[0011] CULTURA FÚNGICA UTERINA: Após a colheita, o swab para a cultura é transportado sob refrigeração até o laboratório e o material semeado em duas placas de ágar Sabouraud com cloranfenicol a 10%, duas com ágar seletivo para fungos patogênicos (cicloheximida). Incubam-se as placas à temperatura ambiente (25°C), por até 15 dias, inspecionando-se diariamente o crescimento fúngico. Para identificação de fungos filamentosos artrosporados e leveduras, realiza-se a semeadura em profundidade e provas de fermentação (glicose, galactose, sacarose, maltose e lactose) e assimilação de carboidratos (glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, rafinose, trealose, melibiose, celobiose, xilose, ramanose e sorbose), e assimilação de fontes nitrogenadas (peptona e KNO₃), sendo a identificação da espécie realizada como descrito por McGinnis (1980). A prova de formação do tubo germinativo em meio de leite é utilizada para a identificação da *Candida albicans* (Jitsurong et al., 1993). Já para fungos filamentosos e esporulados, utiliza-se o preconizado por Looder e Van Rij (1970) microcultivo, confecção de lâminas com lactofenol-azul de algodão para identificação do gênero do fungo através de suas características morfológicas e da espécie por provas específicas, dependendo do gênero.

[0012] PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME: A caracterização da produção de biofilme é avaliada quantitativamente pelo teste de aderência em microplaca, com modificações na metodologia proposta por Christensen et al. (1985) e Cucarella et al. (2001). As bactérias são inoculadas na concentração de 1UFC/mL, em

caldo Triptona de Soja (TSB) (Kasvi), e incubadas a 37°C por 24h. Posteriormente, a suspensão de bactérias diluídas em 1:40 em TSB, são inoculadas em triplicata em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, incubadas por 24 horas a 37^o C. Após incubação, os poços são lavados duas vezes com 200 µL de solução salina estéril, secos em estufa a 60°C e deixados até a secagem da placa, durante 30 minutos. Adiciona-se, então, 200 µL de cristal violeta a 1% por 15 minutos. Em seguida, os poços são lavados três vezes com água destilada e secos em temperatura ambiente. A absorbância é determinada a 490nm em leitor de ELISA (Analítica, Asys UVM 340). Poços contendo apenas meio TSB servem como controle negativo. A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a média aritmética da absorbância das densidades óticas (ODs) das amostras testes (ODt) e do controle negativo (ODc), onde foram utilizadas para classificar cada amostra de acordo com as categorias a seguir: Não produtora de biofilme = $ODt \leq ODc$; Fraca produtora de biofilme = $ODc < ODt \leq (2 \times ODc)$; Moderadamente produtora de biofilme = $(2 \times ODc) < ODt \leq (4 \times ODc)$; Forte produtora de biofilme = $(4 \times ODc) < ODt$.

Exemplos de concretizações da invenção

[0013] Trata-se de um método diagnóstico inovador contemplando diferentes técnicas tais como a identificação do agente, o conhecimento da suscetibilidade farmacológica e a formação e caracterização da produção de biofilme. O desenvolvimento de um Sistema diagnóstico completo é necessário para o sucesso da terapia.

[0014] O diagnóstico laboratorial de endometrite envolve na grande maioria dos casos apenas citologia e cultura bacteriana, não levando em consideração uma informação crucial para o tratamento adequado da afecção. Portanto, acrescentando a análise de produção e quantificação de biofilme é possível visualizar o quadro clínico do animal de forma completa.

[0015] Seguindo o método diagnóstico proposto foram coletadas amostras de 41 éguas de raças e idades diversas, oriundas da região Agreste do estado de Pernambuco, durante a estação de monta de 2019. Os animais possuíam histórico de prenhez ou

coleta de embrião negativa por três vezes consecutivas. Das 41 éguas 75,6% apresentaram culturas microbiológicas positivas, a frequência dos microrganismos isolados podem ser observados na TABELA 1, a resistência a antibióticos testados na TABELA 2 e a capacidade de produção de biofilme na TABELA 3.

[0016] TABELA 1 - Frequências absoluta e relativa de microrganismos isolados por cultura microbiológica do útero de éguas da região do Agreste Pernambucano na estação de monta de 2019.

Microrganismos isolados	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Staphilococcus spp.	8	25,80%
Bacilos Gram negativos NFL	4	12,90%
Streptococcus β -hemolítico	1	3,22%
Escherichia colli	1	3,22%
Klebsiella spp.	1	3,22%
Proteus spp.	1	3,22%
Cladosporium spp.	2	6,45%
Klebsiella spp. e Escherichia colli	1	3,22%
Staphilococcus spp. e Penicilium spp	1	3,22%
Staphylococcus spp. e Cladosporium spp.	1	3,22%
Klebsiella spp. e Trichosporon spp.	1	3,22%
Bacillus spp.	7	22,60%
Micrococcus spp.	2	6,49%
Total	31	100%

[0017] TABELA 2 – Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas do útero de éguas suscetíveis no Agreste de Pernambuco.

Antibiótico	Amostra com resistência
Amicacina	4,77%
Enrofloxacina	9,53%
Azitromicina	19,05%
Gentamicina	9,53%
Ceftriaxona	9,53%
Tetraciclina	9,53%
Penicilina	95,24% (100% das bactérias Gram-negativas)
Ampicilina	70%

[0018] TABELA 3 – Frequência da capacidade de formação de biofilme in vitro por bactérias isoladas de úteros de éguas suscetíveis, e sua caracterização quanto a produção.

Produção de biofilme	
Positiva	76,2%
Negativa	23,8%
Caracterização da produção de biofilme	
Fracas produtoras	43,75%
Moderadas produtoras	43,75%
Fortes produtoras	12,5%

[0019] A resistência a antimicrobianos é um obstáculo para o tratamento eficaz da endometrite em éguas, entretanto não é o único fator que deve ser levado em consideração. Por meio do exposto, entre as bactérias encontradas cerca de 76,2% são produtoras de biofilmes, que são comunidades sésseis de microrganismos fixadas a uma superfície ou em uma matriz extracelular, esse material que envolve as bactérias as torna resistente a antibióticos e a outras situações adversas.

[0020] Pelo exposto, o presente método diagnóstico permite uma visão abrangente a respeito do quadro de éguas com endometrite, possibilitando uma melhor abordagem terapêutica, solucionando a problemática de despesas desnecessárias com medicamentos que não surtirão efeito.

Referências bibliográficas

ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; NOUR-EDDINE, C. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, vol 196, p. 453–472; 2014.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSONV, W.A.; YONGER, J.J.; BADDOR, L.M., BARRETT, F.F.; MELTON, D.M.; BEACHEY, E.H. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22:996-1006. 1985.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183:2888-2896. 2001.

JITSURONG S; S KIAMSIRI, S.; PATTARARANGRONG, N. New milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida albicans*. *Mycopathologia*, Aug;123(2):95-8. 1993.

LOODER, J.; VAN RIJ, K.N.J. *The Yeasts: A taxonomic study*. Holland: Holland Nortt, 1970.1350 p.

NASCIMENTO JUNIOR, J.A.A.; OLIVEIRA, E.R.G.; LIMA, A.V.A.; SILVA, T.D.; CORREIA, M.T.S.; CARNEIRO, G.F. Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry

and Biofilm Formation of Bacteria Isolated From Mare Uterus. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol 66, p. 122, Jul 2018.

SILVA, M.A.C., ALVARENGA, M.A. Fungal endometritis in mares. *Equine Reproduction*. p.2532- 2538, 2011

TROEDSSON, M.H.T. Endometritis. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. *Equine Reproduction, Second Edition*. U.K: Wiley- Blackwell; 2011.

VARGAS H., NASCIMENTO JUNIOR, J.A.A.; SOBRAL, G.G., VIANA, A.R., VILAR, I.J., CARNEIRO, G.F. Intrauterine infusion of ozone in susceptible mare. *Animal Reproduction*, v.16, n.1, p.103, Jan/Mar. 2019.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA ENDOMETRITE EQUINA, **caracterizado por** compreender diferentes técnicas de identificação de agentes microbianos, sua susceptibilidade farmacológica e comprovação da produção de biofilmes *in vitro* determinando sua extensão.
2. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** executar citologia uterina, cultura bacteriana uterina, teste de susceptibilidade a antimicrobianos, cultura fúngica uterina e teste de produção e caracterização do biofilme.
3. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** realizar citologia uterina através de coleta de raspado uterino com uso de escova ginecológica, swab ou através de células recuperadas do líquido do útero, esfregaço em lâmina estéril e posterior coloração para determinação de endometrite de acordo com a presença de neutrófilos nas amostras.
4. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** efetuar cultura bacteriana uterina utilizando capela de fluxo laminar para semear as amostrar coletadas pela técnica de esgotamento em placas com ágar sangue de carneiro a 5%, incubação em estufa à temperatura de 37 °C por 24 a 48h para subsequente identificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).
5. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** classificar as Unidades Formadoras de Colônias da cultura bacteriana uterina (UFC) em: (1) sem crescimento, (2) crescimento isolado ou de (3) crescimento misto.
6. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** isolar os microrganismos encontradas em placas de crescimento misto, para uma cultura pura.

7. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** transportar os microrganismos de culturas isoladas com o uso de uma alça de platina estéril em capela de fluxo laminar para tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável estéreis contendo BHI (Brain Heart Infusion) e incubar em estufa a 37°C por 24 horas, após o crescimento armazenar as bactérias para identificação e teste de sensibilidade a antimicrobianos.
8. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** verificar a presença de fungos após a colheita semeando o material coletado em duas placas de ágar Sabouraud com cloranfenicol a 10%, duas com ágar seletivo para fungos patogênicos (cicloheximida), e posteriores análises específicas para determinação do gênero e espécie fúngica.
9. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** avaliar quantitativamente a produção de biofilme pelo teste de aderência em microplaca.
10. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** averiguar os resultados de produção e caracterização do biofilme de acordo com a média aritmética da absorbância das densidades óticas (ODs), das amostras testes (ODt) e do controle negativo (ODc).
11. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** classificar as amostras analisadas para produção de biofilme em: Não produtora de biofilme; Fraca produtora de biofilme; Moderadamente produtora de biofilme ou Forte produtora de biofilme de acordo com a médias aritmética da absorbância das densidades óticas.
12. MÉTODO DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** levar em consideração a quantificação de biofilme *in vitro* para o planejamento da intervenção terapêutica de endometrites em éguas.

RESUMO**“MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA ENDOMETRITE EQUINA ASSOCIANDO CITOLOGIA, CULTURA BACTERIOLÓGICA E FÚNGICA AO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO E GRADUAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* “**

A presente invenção do campo da Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal e produtos de uso veterinário engloba um método inovador para diagnósticos de afecções uterinas em éguas, particularmente as endometrites, associando diferentes técnicas com maior precisão e conseqüente maiores possibilidades de tratamentos eficazes para essa patologia que acomete éguas de qualquer idade e em qualquer categoria reprodutiva, levando a maior perda econômica da Equideocultura. As infecções bacterianas que atuam no endométrio das éguas estão constantemente associadas à capacidade de produção de biofilme, sendo essa uma causa significativa de endometrite crônica, infertilidade momentânea e ainda refratariedade aos tratamentos prescritos. A intervenção terapêutica nesses casos representa um desafio para microbiologistas e clínicos, sobretudo devido ao método diagnóstico empregado, que apenas identifica os agentes microbianos, sem levar em consideração a produção de biofilmes e a resistência dos microrganismos, levando a tratamentos dispendiosos e ineficazes. O sistema diagnóstico desenvolvido consiste na identificação dos agentes, sua susceptibilidade farmacológica e capacidade de produção de biofilme, fornecendo subsídio para o sucesso da terapia, melhora da eficiência reprodutiva dos rebanhos equinos e evitando a problemática da resistência microbiana, preocupação evidente e atual para a Medicina Veterinária no mundo.