

## CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL DE VACAS LEITEIRAS TRATADAS COM PROBIÓTICOS

**RAYSSA LOPES MACHADO<sup>1</sup>; ALINE POLICARPO BAIOCO<sup>2</sup>; LIGIA MARGARETH CANTARELLI PEGORARO<sup>3</sup>; NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO<sup>4</sup>; MONIQUE TOMAZELE ROVANI<sup>5</sup>; RAFAEL GIANELLA MONDADORI<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rayssa.machado015@gmail.com](mailto:rayssa.machado015@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul – [alinebaioco@hotmail.com](mailto:alinebaioco@hotmail.com)

<sup>3</sup>Embrapa Clima Temperado – [ligia.pegoraro@embrapa.com](mailto:ligia.pegoraro@embrapa.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nataliaaviladecastro@gmail.com](mailto:nataliaaviladecastro@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul – [monique.rovani@ufrgs.br](mailto:monique.rovani@ufrgs.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rgmondadori@gmail.com](mailto:rgmondadori@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

De acordo com dados da IFCN (*International Farm Comparision Network*) a média de consumo de leite mundial em 2024 foi de 188 litros *per capita*, demonstrando o aumento em 17% em comparação com 30 anos atrás, quando o consumo era de 155 litros *per capita* (EMBRAPA, 2025). Este aumento expõe a crescente importância do mercado de laticínios, indicando um maior consumo e procura por um alimento considerado como base da cadeia alimentar em diversas culturas ao redor do mundo, especialmente pelos seus fatores nutricionais.

Com a crescente demanda por este produto, tornou-se necessário aumentar o investimento no mercado leiteiro, visando uma maior eficiência das fazendas produtoras em conjunto com a saúde e o bem-estar animal. Por outro lado, sabe-se que a seleção genética voltada prioritariamente ao aumento da produção leiteira pode impactar negativamente os parâmetros reprodutivos das vacas (WEIGEL et al., 2006).

Casos clínicos de doenças pós-parto são uma das principais adversidades enfrentadas por produtores de leite, cada um expressando um grau de severidade diferente, bem como consequências diversas, podendo afetar a produtividade da propriedade leiteira (LIMA; F.S, 2019). Nesse contexto, em um estudo conduzido por VÁRHIDI et al. (2025), os autores identificaram mais de cinquenta espécies de bactérias existentes no trato vaginal de vacas leiteiras, sendo algumas portadoras de genes resistente à antimicrobianos. Esse achado expõe a necessidade de buscar por alternativas ao uso de antibióticos na produção leiteira, visando um uso mais responsável estes fármacos.

Pesquisas recentes apontam que a modulação do microbioma vaginal pode ser uma alternativa eficaz às terapias com antibióticos, e a utilização de probióticos intravaginais pode desempenhar um papel importante no manejo preventivo de doenças uterinas pós-parto (ADNANE; CHAPWANYA, 2022). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um tratamento probiótico aplicado por via intravaginal sobre a microbiota e o pH vaginal de vacas leiteiras.

### 2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Protocolo nº 44088). O estudo foi conduzido na unidade experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, localizada na cidade de Capão do Leão. Foram utilizadas 21 vacas da

raça Jersey, pluríparas, não-prenhas e não-lactantes, com escore corporal entre 3 e 4, em uma escala de 1 a 5 (1 = caquética e 5 = obesa).

Todos os animais receberam 150 mg de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino) intramuscular (I.M.) 10 dias antes do início do experimento (D-10). As aplicações de progesterona seguiram semanalmente até o D14, totalizando 4 administrações durante o período do experimento. No D0, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos para receberem duas cápsulas contendo as cepas probióticas via IV (grupo probiótico, n=11) ou duas cápsulas sem tratamento probiótico pela via intravaginal (IV; grupo controle, n=10).

O tratamento probiótico utilizado consistiu em uma mistura de *Lactobacillus rhamnosus* LR06, *Lactobacillus rhamnosus* LR04 e *Lactobacillus reuteri* LRE02, na proporção de 12:12:1, respectivamente, sendo a contagem final de células de  $4,5 \times 10^{10}$  UFC/cápsula.

Os animais foram submetidos à aferição de pH vaginal, através de fitas comerciais (Kasvi) na escala de 0 a 14, e coletas de *swab* vaginal nos D0, D2, D3, D4, D7 e D14. No D0, cada animal teve cinco *swabs* coletados, sendo duas amostras armazenadas com meio MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) e refrigeradas para posterior cultura microbiológica, enquanto as demais amostras foram congeladas a -20°C em 300 $\mu$ L de solução estabilizadora molecular (SEMol) para posterior análise de microbiota.

Os *swabs* armazenados em meio de cultura MRS foram semeados em placas de petri e incubados em meio anaeróbico a 37°C por 48 horas. As colônias formadas foram submetidas à coloração de Gram e analisadas quanto à morfologia e coloração por microscopia de imersão (200x). Todas as amostras positivas para bacilos coletadas no D2 e D4, foram submetidas à identificação de espécie pelo método MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization*).

Também foram realizadas coletas de sangue da veia coccígea nos D0, D4, D7 e D14 em tubos a vácuo de 4ml com ativador de coágulo. As amostras foram centrifugadas (3500 rpm por 10 minutos) e o soro foi armazenado à -20°C para posterior dosagem de progesterona, feita por eletroquimioluminescência, com uma sensibilidade de 0,21 ng/ml intraensaio CV de 5,6%.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software estatístico JMP (JMP Statistical Discovery LLC.), sendo as variáveis contínuas (níveis séricos de progesterona e pH vaginal) analisadas por ANOVA. O estudo do microbioma foi analisado por teste não paramétrico Mann-Whitney (Mann e Whitney, 1947). Para todas as análises, foi estabelecido nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento em cultura dos bacilos foi significativamente maior em animais do grupo probiótico em comparação aos animais do grupo controle ( $p < 0,0001$ ). O microrganismo administrado no trato reprodutivo dos animais do grupo probiótico se manteve viável até o D4, visto que a recuperação dos bacilos foi significativa nesse momento. No entanto, apenas a espécie *Lactobacillus rhamnosus* foi identificada pelo método, enquanto que a cepa de *Lactobacillus reuteri* usada na formulação das cápsulas não foi identificada. De acordo com AROUTCHEVA et al. (2001), há indícios de que cepas de *Lactobacillus* suprimem o crescimento endógeno de outras bactérias na vagina através da produção de ácidos orgânicos, como o ácido lático e peróxido de oxigênio, por exemplo.

O pH vaginal foi semelhante ( $P = 0,05$ ) entre os grupos durante todo o período de estudo, sendo a média entre os dias de 6,9 e 6,8 para o grupo controle e probiótico, respectivamente. Os valores encontrados foram consistentes com os achados em estudos que também avaliaram o pH vaginal como feito por WESTERMANN S. et al. (2010). A acidez da flora vaginal se deve à presença de *Lactobacillus* spp, sabe-se que essa cepa pode produzir ácido lático, contribuindo para a manutenção de um ambiente ácido (VÁRHIDI et al., 2025), no entanto, em baixas quantidades irá proporcionar uma tendência a um pH alcalino-neutro.

Em relação à composição da comunidade de bactérias presentes na microbiota do trato reprodutivo dos animais, percebeu-se maior domínio por membros do filo *Firmicutes* e *Proteobacterias*, seguido pelo filo *Bacteroidetes*. A população total correspondente ao filo *Firmicutes*, *Proteobacterias* e *Bacteroidetes* foi de 21,33%, 11,09% e 1,89%, respectivamente. Como ilustrado por GALVÃO et al. (2019), o microbioma do trato reprodutivo de vacas saudáveis ou diagnosticadas com endometrite clínica é semelhante, apresentando divergência apenas nas quantidades de cada filo, expondo uma maior abundância dos filos *Firmicutes* e *Proteobacterias*, e redução de *Bacteroidetes* no organismo de animais saudáveis.

As famílias com maior abundância nas amostras foram *Mycoplasmoidaceae*, *Methylophilaceae* e *Streptococcaceae*. Como relatado por JEON et al. (2015), bactérias das famílias citadas estão presentes em tratos reprodutivos de animais saudáveis, compondo um ambiente diverso, sendo esta uma característica positiva para o organismo, uma vez que essa heterogeneidade auxilia na manutenção da prevalência de bactérias saudáveis em relação às bactérias que possam causar um caso clínico indesejável, como metrite, por exemplo.

Os gêneros com maior presença nas amostras foram *Ureaplasma*, *Streptococcus* e *Methylophilus*, nos valores de 14,15%, 1,99% e 1,83%, respectivamente. As espécies mais abundantes encontradas, independentemente do grupo avaliado, foram *Ureaplasma diversum* e *Methylophilus sp000525025*. Não houve diferença estatística entre os grupos em qualquer nível de diferença taxonômica ( $p>0,05$ ). A maior presença de *Ureaplasma diversum* pode se justificar pelo fato dessa bactéria também poder atuar de forma comensal, além de agir como patógeno (MARQUES et al; 2011), portanto, nem sempre a presença dessa bactéria irá indicar um quadro clínico de doença no trato reprodutivo.

#### 4. CONCLUSÕES

O tratamento com cepas probióticas não foi capaz de modular a microbiota vaginal das amostras coletadas no D7, nem de alterar o pH vaginal avaliado até o D14. A cepa ***Lactobacillus rhamnosus***, administrada no grupo Probiótico, permaneceu viável até o D4, enquanto a ***Lactobacillus reuteri*** não foi isolada na mucosa vaginal das vacas após o tratamento. Até se tem conhecimento, este é o primeiro estudo a caracterizar a microbiota vaginal de animais tratados com cepas probióticas, fornecendo informações relevantes para futuras investigações sobre a influência de probióticos na saúde reprodutiva bovina.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNANE M, CHAPWANYA A. A Review of the Diversity of the Genital Tract Microbiome and Implications for Fertility of Cattle. *Animals*, v.13, n.12, p.460, 2022.

AROUTCHEVA A, GARITI D, SIMON M, SHOTT S, FARO J, SIMOES JA, GURGUIS A, Faro S. Defense factors of vaginal lactobacilli. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.185, n.2, p.375-379, 2001.

EMBRAPA. Anuário Leite: **Produção de Leite e as Mudanças Climáticas**. Zero Hora Digital, Pelotas, Acessado em 03 julho. 2025. Online. Disponível em: <http://www.embrapa.br/gado-de-leite>

GALVÃO, K.N.; BICALHO, R.C.; JEON, S.J. Symposium Review: The Uterine Microbiome Associated with the Development of Uterine Disease in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v.102, n.12, p.11786–11797, 2019.

JEON, S.J.; VIEIRA-NETO, A.; GOBIKRUSHANTH, M.; DAETZ, R.; MINGOTI, R.D.; PARIZE, A.C.; DE FREITAS, S.L.; DA COSTA, A.N.; BICALHO, R.C.; LIMA, S.; et al. Uterine Microbiota Progression from Calving until Establishment of Metritis in Dairy Cows. *Applied and Environmental Microbiology*. v.81, n.18, p. 6324–6332, 2015.

LIMA, F.S.; VIEIRA-NETO, A.; SNODGRASS, J.A.; DE VRIES, A.; SANTOS, J.E.P. Economic Comparison of Systemic Antimicrobial Therapies for Metritis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v.102, n.8, p.7345–7358, 2019.

MARQUES LM, BUZINHANI M, GUIMARÃES AM, MARQUES RC, FARIA ST, NETO RL, YAMAGUTI M, OLIVEIRA RC, TIMENESKY J. Intraspecific sequence variation in 16S rRNA gene of *Ureaplasma diversum* isolates. *Veterinary Microbiology*; v.152, n.1-2, p.205-211, 2011.

VÁRHIDI, Z. Identification of Naturally Occurring Inhabitants of Vaginal Microbiota in Cows and Determination of Their Antibiotic Sensitivity. *Veterinary sciences*, v.12, n.5, p.423, 2025.

WEIGHEL, A. K., Prospects for improving reproductive performance through genetic selection. *Animal Reproduction Science*. v.96, n.3-4, p.323-330, 2006.

WESTERMANN, S.; DRILLICH, M.; KAUFMANN, T.B.; MADOZ, L.V.; HEUWIESER, W. A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology*, v.74, n.7, p.1248–1255, 2010.