

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**FATORES DE VIRULÊNCIA E SIMILARIDADE  
GENÉTICA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE  
ÚTEROS E URINA EM CADELAS COM E SEM  
PIOMETRA**

**Raquel Peres de Oliveira**  
Médica Veterinária

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**FATORES DE VIRULÊNCIA E SIMILARIDADE  
GENÉTICA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE  
ÚTEROS E URINA EM CADELAS COM E SEM  
PIOMETRA**

**Raquel Peres de Oliveira**

Orientadora: Prof. Dra. Daise Aparecida Rossi

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS – BRASIL**

Agosto 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

O48f Oliveira, Raquel Peres de, 1987-  
2013 Fatores de virulência e similaridade genética de *Escherichia coli*  
isoladas de úteros e urina em cadelas com e sem piometra / Raquel Pe-  
res de Oliveira. -- 2013.  
89 f. : il.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-  
grama de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Cão - Doenças - Teses. 3. Patogênsese -  
Teses. 4. Útero - Histopatologia - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida.  
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias. III. Título.

---

CDU: 619

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço principalmente a Deus por mais essa conquista na minha vida, por ter me dado forças nos momentos mais difíceis, perseverança, paciência e serenidade para concluir o meu trabalho.

Aos meus pais, Abadia e Humberto, e minha irmã Camila por tudo que fizeram por mim, pelo apoio e incentivo aos estudos. Sem vocês não teria chegado até aqui. Ao meu namorado Renato, pelos conselhos, pela amizade, confiança e principalmente por me fazer tão feliz. Amo vocês e sou extremamente grata por tudo.

À minha orientadora, Professora Doutora Daise Aparecida Rossi que me deu a oportunidade de realizar meu mestrado. Obrigada pelos seus ensinamentos, pela confiança, pela serenidade em que sempre me tratou e por ser essa pessoa tão agradável de trabalhar.

Agradeço também a todos que me ajudaram no laboratório: Eliane, Priscila, Mariela, Driene, Guilherme, Marcelo, Eduardo e Francesca, que me ajudaram no preparo dos meios de cultura, na lavagem dos materiais e no processo das amostras. De forma especial agradeço à Roberta, que sempre esteve disposta a me ajudar e foi de grande importância a me orientar com os PCRs e com o RAPD. À Beatryz, por me acompanhar durante as coletas e me ajudar com a histopatologia. Muito obrigada a todos.

Obrigada Silvia, Mariana Assunção, Aline e Christiane por serem minhas amigas, que mesmo estando longe sei que sempre poderei contar com vocês.

À toda equipe do centro cirúrgico do Hospital Veterinário de Uberlândia, Professores, técnicos administrativos, residentes e estagiários, que me ajudaram com a coleta do material para o meu experimento. Mesmo atrasando um pouquinho o trabalho de vocês com a minha coleta, sempre me receberam muito bem.

E por fim agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e ao programa de Pós-Graduação em ciências Veterinárias que me possibilitou a realização do meu mestrado.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Objetivos.....	14
1.1.1. Geral.....	14
1.1.2. Específicos.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Caracterização de <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.2. Patogenia da <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.3. Fatores de virulência em <i>E. coli</i> .....	19
2.4. Piometra em cães .....	21
2.5. Infecções do trato urinário.....	25
2.6. Alterações histopatológicas na piometra.....	26
2.7. Resistência antimicrobiana.....	29
2.8. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR).....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Desenho do estudo.....	33
3.2. Coleta das amostras .....	34
3.3. Isolamento e Identificação.....	34
3.4. Suscetibilidade aos antimicrobianos.....	36
3.5. Genes de virulência.....	37

3.6. Similaridade entre os isolados pela técnica de amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD-PCR).....	39
3.7. Análise Histopatológica.....	41
3.8. Análise dos Resultados.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1. Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> em cadelas com piometra.....	42
4.2. Crescimento bacteriano em cadelas sadias.....	48
4.3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana.....	49
4.4. Genes de virulência.....	55
4.5. Alterações histopatológicas.....	61
4.6. Similaridade filogenética .....	64
5. CONCLUSÃO .....	69
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- AMP - ampicilina  
ATCC – American type culture collection  
BHI - Brain and Heart Infusion  
CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais  
CFA - colonization factor antigens II  
CFO – cefoxitina  
CIP – ciprofloxacina  
CLO – cloranfenicol  
CTF - ceftiofur  
DAEC - *E. coli* difusamente aderente  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
DNTP - deoxinucleotídeo trifosfatado  
EAEC - *E. coli* enteroagregativa  
EIEC - *E. coli* enteroinvasiva  
ENO – enrofloxacina  
EPEC - *E. coli* enteropatogênica  
ERI – eritromicina  
ESBL – beta-lactamase de espectro estendido  
ETEC - *E. coli* enterotoxigênica  
EUA – United States of American  
ExPEC - *E. coli* patogênica extra-intestinal  
FLF – florfenicol  
GEN – gentamicina  
H<sub>2</sub>S - sulfito de hidrogênio  
ITU - infecções do trato urinário  
LMI – Lisina, Motilidade e Indol  
MIO – Motilidade Indol e Ornitina  
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina  
NAL - ácido nalidíxico  
NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards  
NEO - neomicina  
NOR - norfloxacina

PCR – Reação da polimerase em cadeia  
RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA  
SUL – sulfonamida  
STEC - *E. coli* shigatoxigênica  
TBE – Tris/Borate/EDTA  
TET – tetraciclina  
TGI - trato gastro-intestinal  
TSA - ágar triptona de soja  
UFC – Unidades formadoras de colônias  
UPEC - *E. coli* uropatogênicas  
UPGMA - Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean  
UV- Ultra-violeta

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1:</b> Meios de cultura e provas bioquímicas usadas para identificação das espécies de enterobactérias lactose positivas.....	36
<b>Tabela 2:</b> Primers para identificação dos genes de virulência <i>pap</i> , <i>hly</i> , <i>cnf</i> , <i>sfa</i> e <i>afa</i> em <i>Escherichia coli</i> .....	39
<b>Tabela 3:</b> Primers utilizados no RAPD-PCR dos isolados de <i>Escherichia coli</i> .....	40
<b>Tabela 4:</b> Classificação das alterações histológicas de acordo com o grau de comprometimento celular, aspecto e tipos de células inflamatórias.....	41
<b>Tabela 5:</b> Cultivo bacteriano de amostras de conteúdo uterino e urina de cadelas com piometra, atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 14/08/2012 a 18/03/2013.....	43
<b>Tabela 6:</b> Caracterização dos animais com piometra que apresentaram positividade para <i>E. coli</i> , atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 14/08/2012 a 18/03/2013, Uberlândia, MG.....	46
<b>Tabela 7:</b> Caracterização de micro-organismos encontrados em úteros de cadelas sadias atendidas no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 14/08/2012 a 18/03/2013, Uberlândia, MG.....	48
<b>Tabela 8:</b> Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>E. coli</i> isolados de piometra e urina de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 14/08/2012 a 18/03/2013, Uberlândia, MG.....	50

<b>Tabela 9:</b> Distribuição das cepas de <i>E. coli</i> isoladas de cadelas com piometra de acordo com o número de classes de antibióticos a que é resistente. Animais atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 14/08/2012 a 18/03/2013, Uberlândia, MG.....	53
<b>Tabela 10:</b> Distribuição das estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de cadelas com piometra quanto a resistência aos grupos de antimicrobianos. Animais atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 14/08/2012 a 18/03/2013, Uberlândia, MG.....	54
<b>Tabela 11:</b> Frequênci a e porcentagem de genes de virulência em cepas de <i>E. coli</i> oriundas de urina e conteúdo uterino de cadelas com piometra em Uberlândia, MG.....	56
<b>Tabela 12:</b> Frequênci a e porcentagem de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de cadelas com piometra que possuem de um a cinco genes de virulência testados.....	61
<b>Tabela 13:</b> Relação entre a histopatologia e a presença de genes de virulência em <i>E. coli</i> isoladas do útero de cadelas com piometra atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 14/08/2012 a 18/03/2013.....	63

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Coleta de amostra através de aspiração do conteúdo purulento do útero das cadelas com piometra para análise microbiológica.....	24
<b>Figura 2:</b> Crescimento bacteriano de amostras de cadelas com piometra em Uberlândia. 2a - Formação de colônia em Agar MacConkey. 2b - Formação de colônia em Agar Sangue.....	47
<b>Figura 3:</b> Gel agarose demonstrando a presença dos genes <i>sfa</i> , <i>afa</i> , <i>pap</i> , <i>hly</i> e <i>cnf</i> em cepas de <i>E. coli</i> oriundas de cadelas com piometra em Uberlândia, MG. M (marcador de peso molecular de 100pb); C+ (controle positivo <i>E. coli</i> ATCC 25922); C- (controle negativo); a1-a7 (cepas de <i>E. coli</i> provenientes de cadelas com piometra; a presença de bandas no gel indica que a amostra é positiva para o respectivo gene). As setas indicam o tamanho das bandas para cada gene em pares de bases (pb).....	56
<b>Figura 4:</b> Dendrograma de 32 isolados de <i>E. coli</i> oriundos de cadelas com piometra de Uberlândia – MG, pela técnica de RAPD-PCR com os primers 1247 e 1290, utilizando a média de experimentos ( <i>average from experiments</i> ) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 85%, pelo programa GelCompar. Perfil 1 – grupo com 53,8% de homologia, composto por dois clusters (a e b) com 88,9% e 93,8% de similaridade, respectivamente. Perfil 2 – grupo com 55,9% de homologia, composto por dois clusters (c e d) com 90,0% e 88,9% de similaridade, respectivamente. Perfil 3 – grupo com 56,4% de homologia, composto por um cluster (e) com 87,3% de similaridade. Perfil 4 – grupo com 63,9% de homologia.....	66

## **FATORES DE VIRULÊNCIA E SIMILARIDADE GENÉTICA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE ÚTEROS E URINA EM CADELAS COM E SEM PIOMETRA**

**RESUMO:** Este estudo avaliou a ocorrência de *Escherichia coli* em conteúdo uterino e urina de cadelas sadias e com piometra. Nos isolados, foi determinada a presença de genes de virulência, resistência aos antimicrobianos e proximidade genética. Os resultados foram associados a alterações histopatológicas e também verificada a relação entre infecções uterinas e do trato urinário pelo agente. Das 87 amostras, obteve-se crescimento bacteriano em 46/87 (52,9%), sendo 36/52 (69,2%) provenientes do conteúdo uterino e 10/35 (28,6%) de urina. Observou-se positividade para *E. coli* em 25/36 (69,4%) amostras de útero com piometra e 7/10 (70,0%) amostras de urina. Para as cadelas sadias constatou-se crescimento de micro-organismos em 28/49 (57,1%) amostras, mas nenhuma foi identificada como *E. coli*, demonstrando que esse agente estava associado aos animais doentes. Houve sensibilidade de 100% ao ceftiofur, gentamicina, enrofloxacina, norfloxacina, cefoxitina e ciprofloxacina, e resistência à eritromicina (100%), ampicilina (34,4%) e sulfonamida (25,0%). Os isolados de *E. coli* apresentaram grande número dos genes de virulência estudados: 31/32 (96,9%) possuíam o gene sfa, 19/32 (59,4%) afa, 15/32 (46,9%) pap, 17/32 (53,1%) hly e 22/32 (68,75%) cnf. A análise histopatológica identificou que 6/22 (27,3%) animais apresentaram grau I na classificação, 9/22 (40,9%) grau II e 7/22 (31,8%) grau III, sendo que houve uma interligação entre a maior resposta inflamatória e o maior número de genes de virulência. A análise de similaridade genética demonstrou elevada diversidade filogenética em *E. coli*, mas constatou que as cepas oriundas do mesmo animal possuíam o mesmo genótipo, logo a cistite e a piometra apresentaram uma relação direta. O estudo denotou a importância de *E. coli* nas piometras de cadelas e a presença de caracteres fenotípicos e genotípicos atuantes na patogênese da doença.

**Palavras-chaves:** *E. coli*, genes de virulência, patogênese, RAPD, resistência

## **VIRULENCE FACTORS AND GENETIC SIMILARITY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM UTERUS AND URINE IN FEMALE DOGS WITH AND WITHOUT PYOMETRA**

**Abstract:** This research evaluates the occurrence of *Escherichia coli* in the uterine contents and urine of healthy and pyometra female dogs. At the isolate was determined the presence of virulence genes, antimicrobial resistance and genetic proximity. The results were associated with histopathological changes and observed the relationship between uterine infections and urinary tract by the agent. Of the 87 samples, the results show bacterial growth in 46/87 (52.9%), 36/52 (69.2%) from the uterine contents and 10/35 (28.6%) of urine. Positivity was observed for *E. coli* 25/36 (69.4%) uterus' samples with pyometra and 7/10 (70.0%) urine's samples. For the healthy female dogs was observed a growth of micro-organisms in 28/49 (57.1%) samples, but no one has been identified as *E. coli*, what means that agent was associated with sick animals. There was 100% sensitivity to ceftiofur, gentamicin, enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, and cefoxitin and erythromycin resistance (100%), ampicillin (34.4%) and sulfonamide (25.0%). The isolate of *E. coli* showed a large number of virulence genes studied: 31/32 (96.9%) had the gene *sfa*, 19/32 (59.4%) *afa*, 15/32 (46.9%) *pap*, 17/32 (53.1%) and *hly* 22/32 (68.75%) *cnf*. Histopathological analysis found that 6/22 (27.3%) animals showed grade I in the classification, 9/22 (40.9%) grade II, and 7/22 (31.8%) grade III, being that, there was an interconnection between greater inflammatory response and highest number of virulence genes. The genetic similarity analysis showed high phylogenetic diversity in *E. coli*, but found that the strains isolated from the same animal had the similar genotype, as soon as cystitis and pyometra showed a direct relationship. The study demonstrates the importance of *E. coli* in pyometras female dogs and the presence of phenotypic and genotypic active in disease pathogenesis.

**Keywords:** *E. coli*, virulence genes, pathogenesis, RAPD, resistance

## 1. INTRODUÇÃO

A piometra canina, também denominada como complexo hiperplasia-cística-endometrial, é uma enfermidade da cadela adulta caracterizada pela inflamação do útero com acumulação de exsudatos, que ocorre na fase lútea do ciclo estral e que pode acometer vários sistemas do organismo. Ocorre em decorrência de alterações hormonais e geralmente está associada a infecções bacterianas. Na histopatologia observa-se um quadro inflamatório típico, pois os cornos uterinos encontram-se distendidos preenchendo grande parte da cavidade peritoneal (COGGAN, 2005).

A incidência de piometra na cadela é alta, sendo a doença reconhecida como uma das causas mais comuns de enfermidade e morte desta espécie animal. Trata-se de uma das condições patológicas mais comuns que acomete o trato genital dos cães (TSUMAGARI et al., 2005).

A bactéria mais frequentemente isolada do conteúdo uterino de cadelas com piometra é *Escherichia coli* (COGGAN, 2005). Estes micro-organismos estabelecem uma proximidade genética com cepas isoladas de infecções do trato urinário (ITU) (KÜPLÜLÜ et al., 2009). Esta constatação permite formular a hipótese de que cadelas com infecção do trato urinário com determinados bióticos ou genótipos de *E. coli* possuem maior risco de causar piometra. E animais que apresentam infecção uterina, possuem maior possibilidade de ocasionar uma ITU.

Isolados de *E. coli* de piometra e cistites podem apresentar características de virulência que incluem a presença do gene *pap* (codificação de fímbria P), *afa* (adesina afimbrilar), *sfa* (fímbria S), *hly* ( $\alpha$ -hemolisina) e *cnf* (fator de necrose citotóxica). A expressão dessas características evidencia o potencial invasivo das cepas (STENSKE et al., 2009).

A resistência de *E. coli* aos antimicrobianos em piometra e ITU representa um sério problema na clínica em medicina veterinária, devido à baixa suscetibilidade aos antibióticos de escolha (fluorquinolonas) (COHN et al., 2003). Isso se deve ao uso indiscriminado e constante desses medicamentos que interferem no tratamento efetivo das infecções provocadas por estes agentes. Outra explicação está relacionada ao raro uso de antibiogramas nesses casos de infecções e o profissional optar por selecionar fármacos com base na experiência e no conhecimento da ocorrência de resistência (HAGMAN, 2012).

Diante disso, é importante a caracterização de amostras de *E. coli* isoladas concomitantemente do conteúdo purulento e urina de cadelas com piometra, com base nos níveis de resistência aos antibióticos e capacidade de produzir genes de virulência. É também importante conhecer a incidência de *E. coli* e estas mesmas variáveis em úteros aparentemente sãos (sem piometra), para estabelecer se a colonização prévia do útero por determinadas cepas pode ser um fator de risco para desenvolvimento da piometra em cadelas. A avaliação histopatológica também pode contribuir no estabelecimento dos graus de patogenicidade das diferentes estirpes de *E. coli* isoladas do trato genital de cadelas.

O conjunto desses resultados e a determinação dos padrões de proximidade genética são de grande valia no conhecimento da severidade da piometra e do potencial invasivo para as vias urinárias.

## 1.1.OBJETIVO

### 1.1.1. GERAL

Pesquisar *Escherichia coli* em urina e em conteúdo uterino de cadelas com piometra e sadios, determinando fatores de virulência como a presença de genes de adesão e produção de toxinas e a similaridade genética.

### 1.1.2. ESPECÍFICOS

- Conhecer a ocorrência de *Escherichia coli* em amostras de piometra, úteros sãos e de conteúdo urinário em cadelas da cidade de Uberlândia;
- Caracterizar outros micro-organismos presentes nos úteros onde *E. coli* não foi isolada;
- Determinar o perfil de resistência dos isolados frente aos antimicrobianos;
- Identificar fatores de virulência das cepas associadas aos genes de adesão e produção de toxinas utilizando a técnica de PCR;
- Analisar as alterações histopatológicas nos úteros em cadelas com piometra causadas pelas cepas de *E. coli*;

- Investigar a similaridade genética das estirpes isoladas por meio da técnica de RAPD-PCR e correlacionar caracteres fenotípicos e genotípicos com os *clusters* formados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Caracterização de *Escherichia coli*

A espécie bacteriana *Escherichia coli* é um bastonete Gram negativo, não esporulado, oxidase negativa, a maioria é móvel devido a existência de flagelos peritríqueos, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, e pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Fontes de carbono como acetato e glicose são usadas para seu crescimento, porém o citrato não pode ser utilizado. A glicose é fermentada a ácidos: lático, acético e fórmico, sendo o ácido fórmico hidrolisado a hidrogênio e dióxido de carbono. *E. coli* produz β-galactosidase e indol mas não forma sulfito de hidrogênio ( $H_2S$ ) ou hidrolisa a uréia (BETTELHEIM, 1978.). Lautrop et al. (1971) e Layne et al. (1971) relatam a ocorrência de cepas de  $H_2S$  *E. coli* positivas, cujo comportamento fenotípico é mediado por plasmídio.

*E. coli* pertence ao grupo de coliformes termotolerantes, sendo descrita pela primeira vez por Theodor Escherich em 1885 ao tentar isolar o agente etiológico da cólera (ESCHERICH, 1889; ADAM; MOSS, 1997). Os coliformes termotolerantes são caracterizados por produzirem ácido e gás em caldo EC em temperaturas compreendidas entre 44°C e 46°C, sendo a temperatura ótima para crescimento de *Escherichia coli* de 44,5°C variando até 45,5°C (PERRY; HAJNA, 1944).

Espécies de *E. coli* crescem rapidamente em meios bacteriológicos simples, incluindo o ágar MacConkey, no qual forma colônias fermentadoras de lactose. É o principal organismo anaeróbio facultativo presente no trato intestinal da maioria das espécies animais de sangue quente, na proporção de  $10^7$  a  $10^9$  micro-organismos por grama de fezes. O intestino estéril de animais recém-nascidos torna-se

rapidamente colonizado por estas bactérias, provenientes das mães e do próprio ambiente (GYLES; FAIRBROTHER, 2004).

A sorologia é baseada em diferentes抗ígenos encontrados na estrutura da superfície bacteriana. Os três抗ígenos fundamentais são O, K e H. Os抗ígenos somáticos "O" termoestáveis, relacionados com polissacarídeos da membrana externa;抗ígenos flagelares "H" termolábeis, relacionados com proteínas dos flagelos, e抗ígenos capsulares "K" termoestáveis, relacionados com polissacarídeos capsulares. Esse método de identificação permite a diferenciação entre amostras patogênicas das comensais (WILES et al., 2008).

Entre as bactérias Gram negativas, *Escherichia coli* é considerada a bactéria mais comumente isolada nas ITU tanto de animais como do homem, possivelmente por sua "habilidade" em ultrapassar algumas das barreiras do sistema urinário e genital (BOWER et al., 2005). Pode ser encontrada no trato gastro-intestinal (TGI) inferior de seres humanos e de outros mamíferos. Embora seja pertencente à microbiota comensal de mamíferos, pode causar um amplo espectro de doenças intestinais e extra-intestinais tanto em humanos quanto em animais (CROXEN; FINLAY, 2010).

*E. coli* pode ser caracterizada como importante patógeno emergente, pois pode exibir sofisticados mecanismos de virulência sendo responsável por significativas enfermidades clínicas em homens e animais. Dentre estas doenças podem se destacar: meningite neonatal, septicemia, infecções do trato urinário e diarréia que pode se manifestar tanto de forma branda, autolimitante ou caracterizar quadros muito graves como a colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (KAPER et al., 2004).

## 2.2. Patogenia da *Escherichia coli*

Com base na patogênese clínica e na constituição genética de *E. coli*, esta pode ser classificada em três grandes grupos: *E. coli* comensal, *E. coli* patogênica intestinal (entérica ou diarreicogênica) e *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) (CROXEN; FINLAY, 2010).

As espécies comensais fazem parte da microbiota do TGI. Essas estirpes vivem em simbiose com o hospedeiro por longos períodos de tempo com benefícios

mútuos. O nicho típico para essas cepas está associado a compartimentos intestinais específicos com expressiva presença de muco (VEJBORG et al., 2010).

A estrutura populacional dos espécimes comensais permite que esses micro-organismos possam interagir com outros agentes patogênicos executando função de potenciais probióticos. A identificação de novas cepas probióticas de *E. coli* para indústrias e para a clínica veterinária representa uma ferramenta importante na redução da quantidade de antibióticos que são usados como profiláticos, promotores de crescimento e para o tratamento de animais doentes; além da relevância referente à diminuição da aquisição de resistência aos antibióticos pelos patógenos (TENAILLON et al., 2010).

As cepas de *E. coli* patogênicas intestinais ou diarreogênicas são classificadas em seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); enterotoxigênica (ETEC); shigatoxigênica (STEC); enteroinvasiva (EIEC); enteroagregativa (EAEC) e difusamente aderente (DAEC). Esses subtipos se diferem de acordo com seus mecanismos de patogenicidade, fatores de virulência, modos de adesão em culturas de células epiteliais e sintomas clínicos em casos de doenças (KAPER et al., 2004).

*E.coli* enteropatogênica (EPEC) é constituída por cepas negativas para os genes de virulência da shiga toxina e enterotoxina ST (termoestável) e LT (termolábel), mas carregam o gene *eaeA* que codifica a proteína intimina, facilitando sua adesão à célula epitelial, que causa uma lesão característica de fixação epitelial (*attaching-effacing* II). Essa capacidade de adesão à membrana plasmática das células intestinais causa destruição das microvilosidades com consequente perda da capacidade de absorção. A lesão é caracterizada por degeneração dos enterócitos e inflamação da lâmina própria. Essas bactérias já foram encontradas em crianças, bezerros, cordeiros, suínos, cães e gatos (STELLA et al., 2008; FRANCO et al., 2008; MORATO et al., 2008).

*E. coli* enterotoxigênica (ETEC) caracteriza uma das mais importantes causas de diarréia infantil nos países em desenvolvimento. Essas cepas são não invasivas e causam uma diarréia de tipo secretora por produzir a enterotoxina LT e ST. A toxina ST é expressa pela maior parte das cepas caninas de ETEC. Os principais sintomas incluem fezes aquosas, vômitos, náuseas e cólicas intestinais. A secreção de enterotoxinas e adesinas (CFA - colonization factor antigens II) permite a colonização das células do epitélio intestinal. A colonização geralmente ocorre por meio de fímbrias de superfície e se ligam a receptores específicos da célula. Estas

infecções também acometem animais recém-nascidos, principalmente leitões, bezerros, cordeiros e está associada com até 31% dos casos de diarreia canina (KUHNERT et al., 2000; KAPER et al., 2004).

As cepas STEC são caracterizadas por causar diarreia sanguinolenta, acometendo prevalentemente crianças e idosos em países desenvolvidos. Também podem causar lesões tipo *attaching-effacing* II no intestino grosso, e nos casos mais severos, necrose. Tornou-se notória após dois grandes surtos em 1982 nos EUA, relacionados ao consumo de hambúrguer mal cozido. Estes surtos foram atribuídos à cepa O157: H7. Os sintomas clínicos incluem: cólica abdominal e diarreia inicialmente aquosa que progride para hemorrágica. Bovinos e pequenos ruminantes são considerados os principais reservatórios naturais dessas cepas (BETTELHEIM, 1978). Além da distinta classificação pelo sorotipo (O157: H7), também existe outra característica fundamental em sua classificação: a produção de uma toxina semelhante à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*, a shiga-like toxina, também denominada verotoxina. Existem dois principais grupos antigênicos destas toxinas: Stx1 (VT-I) e Stx2 (VT-II). Estas são capazes de atravessar o epitélio intestinal e alcançar células do endotélio de vasos que suprem o intestino, o rim, pâncreas e outras vísceras como cérebro e coração. As consequências são: coagulação intravascular, trombocitopenia, micro angiopatia, anemia hemolítica, falência renal e síndrome hemolítica urêmica (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002).

Infecções por EIEC ocorrem em humanos de todas as idades, sendo mais comum em países menos desenvolvidos (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Os principais sintomas são: dores abdominais, febre, diarreia aquosa seguida de disenteria com muco e sangue. A principal patologia consiste na inflamação e erosão da mucosa, principalmente no intestino grosso. Há uma íntima penetração da bactéria na mucosa que provoca grave ulceração. O processo invasivo ocorre nas células M do folículo linfóide. Essas cepas após penetrar no epitélio intestinal, induzem apoptose dos macrófagos evitando a fagocitose. Há envolvimento de enterotoxinas e citotoxinas (NAVANEETHAN; RALPH, 2008).

*E. coli* enteroaggregativa (EAEC) caracteriza-se por causar uma diarréia aquosa infantil persistente, com vômitos, desidratação e febre. Essas cepas apresentam fatores de virulência que permitem a ocorrência de uma aderência

agregativa que impede a absorção intestinal ocasionando diarreia (REGUA-MANGIA et al., 2009).

Estirpes de *E. coli* difusoaderente (DAEC) estão relacionadas com diarréia em crianças com mais de um ano de idade. Essas cepas apresentam um padrão característico de aderência difusa mediada por fímbrias e codificada por genes específicos. Apresentam adesinas do tipo Dr, que permite a transdução de sinais para a célula hospedeira de forma a promover um rearranjo do citoesqueleto levando aos danos celulares. São raras as associações desses agentes com diarreia em animais (KAPER et al., 2004).

As cepas de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) são caracterizadas por causar doenças em outros sítios corporais que não o intestinal. Estão reunidas as cepas uropatogênicas UPEC, que causam infecção no trato urinário; as cepas associadas à meningite neonatal e septisemia, portanto capazes de colonizar e produzir doença nos mais variados sítios anatômicos (KAPER et al, 2004). Apresentam vários fatores que possibilitam a colonização, invasão dos tecidos do hospedeiro e evasão do sistema imune, como: adesinas, invasinas, toxinas, sideróforos e evasinas. Em cães, esse grupo de patógenos têm sido principalmente relacionado às infecções do trato urinário (ITUs) e piometras (BOWER et al., 2005).

Tradicionalmente, as *E. coli* associadas às infecções extra-intestinais têm sido estudadas de acordo com seus fatores de virulência e os sítios anatômicos acometidos. Além disso, estudos de comparação genotípica e fenotípica de *E. coli* isoladas de diferentes síndromes demonstrou elevada similaridade entre elas (SMITH et al., 2007; FILHO, 2008).

### **2.3. Fatores de virulência em *E. coli***

Os isolados de *E. coli* provenientes de animais e de humanos apresentam uma grande diversidade de patótipos, com muitos genes comuns, o que sugere a possibilidade de trocas genéticas entre eles e consequentemente à probabilidade do surgimento de cepas emergentes. A evolução desses agentes por transferência horizontal de genes facilita a adaptação em novos ambientes, além da aquisição de fatores de virulência envolvidos diretamente em infecções (DAM; DAS, 2006).

As ilhas de patogenicidade são elementos genéticos com constituição de genes diferentes dos cromossomos das bactérias e codificam vários fatores de virulência e também características do seu aparelho secretor. A transferência de genes de virulência por plasmídeos ou fagos é considerada a origem das ilhas de patogenicidade (SCHMIDT; HENSEL, 2004).

Patogenicidade em *E. coli* é um mecanismo multifatorial e complexo que envolve vários fatores de virulência variando de acordo com o sorotipo. O termo fator de virulência é impreciso, pois um único componente poderia não ser suficiente para transformar uma cepa de *E. coli* na forma patogênica, mas a combinação com outros determinantes de virulência teria um papel decisivo em seu potencial invasivo (IKUNO et al., 2006).

Os fatores de virulência e os genes responsáveis identificados em amostras de *E. coli* comumente encontrados são: capacidade de adesão pela fímbria P, associada às infecções urinárias (*pap*) e ligada à determinação de enteropatogenicidade (*sfa*), adesinas afimbríais (*afa*), produção de hemolisinas (*hly*) e fator necrosante citotóxico (*cnf*) (STENSKE et al., 2009).

Os fatores de adesão em *E. coli* são representados pela presença de fímbrias, incluindo a Fímbria Tipo 1 e a Fímbria P que são responsáveis pela aderência na mucosa em diferentes estágios da doença. A classificação das fímbrias e adesinas são determinadas pela morfologia e habilidade de promover aglutinação de hemácias de diferentes espécies. Em função desta característica, são também denominadas hemaglutininas. Entre as hemaglutininas, existe uma divisão simples: fímbrias as quais se previne a aglutinação quando incubadas com D-manose são denominadas D-manose-sensíveis e as demais, D-manose-resistentes (KUHNERT et al., 2000).

As adesinas D-manose-resistentes são um grupo de estruturas bacterianas que se liga a carboidratos presentes nos receptores celulares, que não a D-manose. A fímbria P liga-se especificamente ao carboidrato α-D galactose e β-D galactose do antígeno do grupo sanguíneo P, presente nas hemácias. O gene *pap* é uma subunidade integrante do heteropolímero cromossomal que codifica a fímbria P e tem a função de polimerização. Está diretamente associado com pielonefrite aguda e ao estabelecimento da infecção urinária (KAPER et al., 2004).

A adesina afimbral Afa é expressa por algumas *E. coli* diarréogênicas e uropatogênicas. Embora sejam denominadas como afimbriais, parecem possuir uma fina estrutura fibrilar de difícil visualização (KELLER et al., 2002).

Outra fímbria frequentemente presente nas cepas extra-intestinais é a S-fímbria. A S-fímbria é uma adesina que tem afinidade por um terminal de galactose presente nas glicoproteínas. A sequência *sfa* está presente no cromossomo bacteriano e a proteína codificada por este gene é composta por quatro subunidades (HACKER et al., 1993). As *E. coli* que apresentam o gene *sfa* podem aderir às células endoteliais de origem sistêmica, incluindo as cerebrais, uma vez que esta adesina é observada em processos de septicemia com grande frequência (JOHNSON, 1991).

A α-hemolisina é uma exotoxina que é frequentemente associada à cepas de *E. coli* uropatogênicas. Ela atua criando poros na membrana celular eucariótica de eritrócitos. A lise dessas células é de fundamental importância para o desenvolvimento e a multiplicação bacteriana, já que promove a liberação de ferro e outros nutrientes essenciais do metabolismo desse agente. A secreção dessa toxina é dependente da expressão do gene *hly*. Cepas de *E. coli* capazes de codificar a proteína Hly apresentam maior potencial de formação de biofilme em condições *in vitro* (SOTO et al., 2007).

O fator de necrose citotóxica, codificado pelo gene *cnf*, é uma toxina que impede a divisão celular por meio da modificação da constituição de proteínas que regulam a fisiologia do citoesqueleto celular, não ocasionando alterações na replicação dos ácidos nucléicos. Essa toxina induz apoptose em células epiteliais da bexiga, diminuindo fagocitose por polimorfonucleares. Sua produção tem sido detectada em cepas de *E. coli* de infecções extra intestinais. Além disso, há uma correlação positiva entre atividade hemolítica e a produção de toxina (CNF) em amostras de *E. coli* (EMÖDY et al., 2003).

## **2.4. Piometra em cães**

A piometra é uma desordem uterina que acomete, principalmente, cadelas na fase adulta, devido à estimulação progesterônica crônica e repetitiva a cada ciclo estral. Em animais jovens, frequentemente está associada ao uso de contraceptivos

a base desse hormônio (VERSTEGEN et al., 2008). Essa patologia consiste numa patologia que acarreta risco de vida para os animais, sendo caracterizada por uma acumulação de líquido purulento intraluminal, acompanhado de uma quimiotaxia importante, associado a uma infiltração de células inflamatórias no endométrio e miométrio (CRANE, 2009).

A incidência de piometra na cadela é alta, sendo reconhecida como uma das principais causas de morte desta espécie animal. A doença é caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudatos. A patênciça da cérvix (aberta ou fechada) influencia na severidade da doença, pois quando fechada possibilita o desenvolvimento de bacteremia e toxemia, podendo levar o animal ao óbito em poucos dias (PRETZER, 2008).

Os sinais clínicos da piometra variam desde uma secreção vulvar sanguínea a purulenta em processo de piometra aberta, até inapetência, depressão, letargia, distensão abdominal, poliúria, polidipsia e vômito que ocorrem principalmente na piometra de cérvix fechada (DABROWSKI et al., 2009).

O diagnóstico baseia-se no histórico do animal. A maioria das cadelas desenvolve a doença entre quatro a dez semanas após o cio. Exames complementares podem revelar uma leucocitose e neutrofilia. A ultrassonografia é o método de diagnóstico de eleição para a piometra, pois determina o tamanho do útero, a espessura da parede uterina e a presença de fluido intraluminal (PRETZER, 2008).

O tratamento de escolha para a piometra é a ovário-salpingo-histerectomia, uma vez que a infecção circunscrita na cavidade abdominal leva rapidamente a uma septicemia, e apenas a retirada cirúrgica do útero pode reverter o quadro séptico. Os animais doentes devem receber fluidoterapia intravenosa e antibióticos de amplo espectro antes da cirurgia. A antibioticoterapia deve persistir por uma semana após a retirada do útero infectado (VERSTEGEN et al., 2008).

Também existem protocolos de tratamento medicamentosos a base de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) associado a antimicrobianos. Entretanto, não são considerados eficazes pelos riscos de ruptura uterina. A PGF2 $\alpha$  irá promover lise do corpo lúteo, aumentar a contratilidade do miométrio, contribuir para a liberação do conteúdo séptico uterino e pode aumentar o relaxamento cervical. Ou seja, o mecanismo de ação é muito simples, ao promover a lise do corpo lúteo (após quinto dia do diestro), diminui as concentrações séricas de progesterona, minimizando

gradativamente as alterações hipertróficas causadas por este hormônio no endométrio e nas glândulas endometriais (MARTINS, 2007). Com a ação da PGF2 $\alpha$  espera-se encontrar o esvaziamento do útero, aumento da secreção vulvar no inicio do tratamento e redução do volume uterino, a descarga vaginal se torna menos purulenta e mais mucóide ou sanguínea com a continuidade do tratamento (SORRIBAS, 2009).

Em alguns países da União Europeia e nos Estados Unidos da América têm sido realizados alguns estudos que analisam a eficácia da antibioticoterapia aplicada como tratamento desta patologia. Variados antibióticos têm sido utilizados na terapia da infecção na medicina veterinária, citando-se penicilinas, aminopenicilinas, cefalosporinas, macrólidos, lincosamidas, ácido-fusídico, tetraciclínas, cloranfenicol, sulfonamidas potenciadas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. O uso de antibióticos tem sido associado com um aumento de resistência aos antibióticos por parte de estirpes *E. coli* multiresistentes (COHN et al., 2003; GUARDABASSI et al., 2004; SHAHEEN et al., 2008).

É relativamente comum o diagnóstico de uma infecção urinária associada à piometra canina. No estudo de Küplülü et al. (2009), quatro de oito cadelas com piometra tinham simultaneamente infecção urinária, tendo sido observada uma similaridade de 57,14% entre as estirpes bacterianas isoladas a partir do útero e da bexiga. No estudo de Fransson (2003), de 79 cadelas das quais *E. coli* foi isolada a partir do conteúdo uterino, 16 apresentaram infecção urinária associada. Ambos os autores sugerem que é mais provável que o trato urinário seja infectado secundariamente à piometra, devido a localização anatômica do orifício uretral.

A incidência deste tipo de patologia nas comunidades caninas difere dependendo do país e da cultura do mesmo. Estudo realizado em uma população de Beagles, a incidência de piometra foi de 15,2% em fêmeas com idade superior a quatro anos de idade (FUKUDA, 2001). Já Tsumagari et al., (2005) encontrou incidência de 62,5% em fêmeas de um a cinco anos e 41,7% em fêmeas com mais de seis anos de idade. Niskanen e Thrusfield (1998) estudaram cães na Finlândia, a média de idades em que ocorreu piometra foi de nove anos de idade. Outros estudos demonstram essa variação na incidência de piometra com médias de idade de 8,5 anos (PELANDER et al., 2008), 7,9 anos de idade (HAGMAN et al., 2011), 7,1 anos de idade (HAGMAN et al., 2009) e 2,4 anos de idade (FELDMAN; NELSON, 2004).

Existem raças com uma predisposição mais elevada à ocorrência dessa patologia do que outras, sendo que Rottweiler, São Bernardo, Chow Chow, Golden Retriever, Schnauzer miniatura, Irish Terrier, Airedale Terrier, Cavalier King Charles Spaniel, Collie de pelo cerdoso e Pastor de Berna, representam as raças de maior risco (SMITH, 2006).

O agente bacteriano mais comum em situações de piometra é *E. coli*, isolado de 57-96% dos exsudados uterinos em cadelas com a doença (HAGMAN et al., 2006). Porém, outras bactérias apresentam importância neste tipo de patologia, como é o caso da *Klebsiella*, *Pasteurella* e *Staphylococcus* (JURKA et al., 2010).

A predominância de *E. coli* se deve à habilidade desse patógeno em aderir a sítios抗igenicos específicos no endométrio estimulado por progesterona. Esses agentes promovem a liberação de partículas das membranas celulares, que promovem disfunção nos neutrófilos e macrófagos, levando à inibição ou síntese excessiva e liberação de citocinas proinflamatórias como TNF, IL-1, IL-6, bem como de mediadores secundários - radicais livres, óxido nitroso e prostaglandinas. Este é um dos mecanismos para o aumento da inflamação e resposta imunológica (CRANE, 2009).

De acordo com Johnson (2009), as bactérias encontradas no útero de cadelas com piometra e nas cadelas saudáveis são bactérias que fazem parte da microflora normal do útero e vagina. Os micro-organismos predominantemente isolados da microflora vaginal são *Estafilococos*, *Estreptococos* (alfa e beta-hemolíticos e não-hemolíticos), *Escherichia coli*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Haemophilus*. O *Mycoplasma* e o *Ureaplasma* também estão presentes na vagina canina, estando o *Ureaplasma* geralmente associado à presença de *Mycoplasma* (ETTINGER, 1992).

Olson e Mather (1978) não detectaram crescimento bacteriano em úteros de cadelas sadias. Já Watts et al. (1996) observaram que bactérias foram isoladas em 100% dos casos estudados do útero de cadelas saudáveis (n=12). Os autores também constataram similaridade com a microflora da cérvix e da vagina e inferiram que esse crescimento é decorrente das condições propícias para o crescimento encontradas no útero e/ou uma diminuição da resposta imunológica. De maneira similar, Baba et al. (1983) observaram isolamento de micro-organismos em 62% das amostras uterinas (n=78) de cadelas saudáveis. Os autores concluíram que o

conteúdo vaginal bacteriano frequentemente se desloca para dentro do útero, mas somente algumas espécies sobrevivem.

As infecções são raras em cadelas sadias, porém, quando ocorre queda da imunidade pode estar associada a casos de endometrite (HIRSH; ZEE, 2003). O isolamento de micro-organismos da microbiota endógena, geralmente consideradas de pouca virulência, não podem ser desprezadas automaticamente como agentes etiológicos, ao contrário, é possível que tenham grande importância clínica. Falhas ao excluir a microbiota normal durante os procedimentos de análise da amostra clínica podem levar à necessidade de maior tempo para a análise, ou ao fornecimento de dados incorretos ao clínico (SOUZA; SCARCELLI, 2000).

## 2.5. Infecções do trato urinário

Semelhante à infecção uterina, as ITUs também são usualmente causadas por bactérias constituintes da microflora intestinal ou do trato urogenital baixo, sendo *E. coli* o agente etiológico mais frequentemente associado à essas infecções na clínica de pequenos animais (CORREIA et al., 2007).

Os processos infecciosos do sistema urinário geralmente se iniciam na uretra ou na bexiga e por via ascendente podem acometer ureteres e rins ou atingir a corrente sanguínea. A cistite se desenvolve quando os mecanismos de defesa falham em combater agentes como bactérias e vírus capazes de aderir, multiplicar e persistir em uma porção do trato urinário (BARTGES, 2004).

Dentre as infecções urinárias bacterianas, as causadas por *E. coli* desempenham um papel importante, sendo responsáveis por severas síndromes que podem culminar com a morte do animal. As cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas (UPEC) podem causar dois tipos de infecções do trato urinário, as sintomáticas e as assintomáticas (JOHNSON; RUSSO, 2005).

Os sinais clínicos das infecções do trato urinário inferior (uretra e bexiga) são polaciúria, estrangúria ou disúria, dor à palpação abdominal, turvação da urina e/ou hematúria. As infecções do trato urinário superior (ureteres e rins) causam geralmente manifestações mais severas, como anorexia, letargia, pirexia, hematúria, septicemia e falência renal (BARTGES, 2004). A prevalência de infecção do trato

urinário em cães é equivalente a 14% e podem ser manifestadas de forma severa (CORREIA et al., 2007).

As principais complicações causadas pela ITU são sintomáticas e incluem cistite (infecção da bexiga), pielonefrite (infecção renal) e bacteremia (infecção na corrente sanguínea). Para resistir à força hidrodinâmica do fluxo urinário e estabelecer a infecção no trato urinário, *E. coli* uropatogênicas expressam uma gama de fatores de virulência, citados anteriormente, que são codificados pelas ilhas de patogenicidade (LLOYD et al., 2007).

A patogênese da ITU inclui a contaminação da área periuretral por *E. coli* uropatogênica, seguida pela aderência das bactérias às células epiteliais do trato urinário. As bactérias podem se multiplicar intracelularmente, o que conduz à esfoliação e apoptose das células uroepiteliais pela influência de adesinas e toxinas. Esta etapa é seguida por invasão dos túbulos renais e fixação nas células do epitélio renal. Os patógenos invadem então o rim e provocam a destruição das células epiteliais através da liberação de toxinas (por exemplo: α-hemolisina). No rim *E. coli* uropatogênica pode entrar na corrente sanguínea e iniciar a bacteremia (SMITH et al., 2008; DHAKAL et al., 2008).

## **2.6. Alterações histopatológicas na piometra**

As alterações histológicas do útero devidas à infecção são geralmente, representadas pela presença de neutrófilos que se agrupam no lúmen uterino e nas glândulas. Além disso, têm-se os leucócitos que migram para o interior do epitélio. Em casos mais brandos de infecção, verificam-se poucos neutrófilos dentro do estroma endometrial (SMITH, 2006).

Trata-se de um quadro inflamatório típico, pois os cornos uterinos encontram-se distendidos preenchendo grande parte da cavidade peritoneal. Quando em formas mais graves, apresentam forte odor e aspecto mucopurulento. A classificação de Dow (1959) diz respeito aos estágios da infecção, sendo que o grau I é uma hiperplasia endometrial cística caracterizada por não apresentar nenhuma reação inflamatória, a hiperplasia endometrial cística do grau II está associada à infiltração de mononucleares. Já a hiperplasia de grau III possui uma intensidade variável, associada à infiltração de polimorfonucleares e com

comprometimentos mais severos. A hiperplasia de grau IV está associada a uma fibrose do miométrio.

Mais especificamente, o grau I da classificação de Dow (1959) refere-se ao endométrio espessado com alterações císticas, focais ou generalizadas, em número variável e de conteúdo límpido. Estas elevações císticas podem estar presentes em qualquer ponto do útero (CARREIRA; PIRES, 2003). É correspondente a um estágio de menor complicaçāo, já que trata-se de uma leve hiperplasia endometrial sem infiltração celular em nenhuma das camadas uterinas e sem evidências de inflamação endometrial (DOW, 1959).

O grau II engloba as alterações macroscópicas anteriores com uma alteração da aparência do endométrio e das estruturas císticas. O endométrio revela-se acinzentado e as alterações císticas, mais opacas. No aspecto histológico, observa-se infiltração linfocitária, plasmocitária e macrofágica, concentrada, sobretudo no estroma superficial, mas podendo estender-se até à zona das criptas, envolver os vasos sanguíneos e infiltrar a camada muscular interna (DOW, 1959). Alguns estudos sugerem que a infecção bacteriana crônica e subclínica é responsável pela infiltração intersticial desses três tipos celulares, sem simultânea inflamação neutrofílica (SCHLAFFER; GIFFORD, 2008). Neste estágio, a produção de muco é intensa formando, por vezes, uma fina película aderente ao endométrio (DOW, 1959).

No grau III, referente à endometrite aguda, o útero apresenta-se globulado, com aumento generalizado das suas dimensões e cistos disseminados de conteúdo purulento. O endométrio espessado pode conter zonas de atrofia papilomatosa exuberante e, à sua superfície, podem ser visualizadas áreas hemorrágicas ou de ulceração. Ao exame microscópico estão presentes congestão, edema e infiltração por células polimorfonucleares, sem fibrose (DOW, 1959). Em casos moderados, a inflamação encontra-se confinada à camada superficial do endométrio (CARREIRA; PIRES, 2003) e, nos casos mais graves, estende-se à camada basal do endométrio e, por vezes, ao miométrio (DOW, 1959). A maioria das cadelas com piometra diagnosticadas encontram-se neste estágio (KIDA et tal., 2009; BIGLIARDI et al., 2004).

O grau IV, que representa a endometrite crônica, pode evoluir de forma aberta, sem retenção do conteúdo intrauterino, ou fechada, com retenção. Na forma aberta, visualiza-se alteração da proporção endométrio/miométrio e adenomiose.

Microscopicamente, encontram-se cistos rompidos e o esvaziamento do seu conteúdo no lúmen uterino. O infiltrado celular estende-se ao miométrio, que se pode revelar hipertrófiado e fibrosado. Quando a evolução ocorre de forma fechada, o útero apresenta-se macroscopicamente muito distendido pela retenção do conteúdo e com paredes finas. A superfície do endométrio é acinzentada e apresenta-se frequentemente ulcerada. Ao exame microscópico notam-se a atrofia severa da parede, com diminuição da espessura do miométrio e do endométrio, por vezes reduzido a uma única camada de células cúbicas ou colunares. É frequente o aparecimento de zonas necrosadas ou ulceradas no endométrio (DOW, 1959). Não é incomum encontrar no mesmo órgão e, por vezes até no mesmo corno uterino, a coexistência de hiperplasia e de atrofia. Nestes casos, quase sempre as cadelas evidenciam sinais clínicos de uma piometra fechada (CARREIRA; PIRES, 2003). Perante esta situação, o grau de hiperplasia deverá ser classificado de acordo com o estágio mais grave (CARREIRA; PIRES, 2005).

Gilbert (1992) referiu-se à piometra como uma interação entre o potencial patogênico das bactérias e as alterações endometriais. Dessa forma, o grau de distensão das paredes uterinas varia de acordo com a quantidade de exudato, de aspecto serosanguinolento ou mucopurulento, presente no útero.

A piometra pode ser difusa ou focal, com possível comprometimento do epitélio endometrial. Os segmentos uterinos são severamente afetados nas formas não difusas, caracterizando áreas focais, que revelam uma distensão das glândulas endometriais, alcançando as paredes do miométrio que se encontram edematosas (PRETZER, 2008).

A hiperplasia endometrial resulta da deformação cística das glândulas endometriais, com proliferação de fibroblastos e reação inflamatória nos casos de endometrite e piometra (DE BOSSCHERE et al., 2001).

Para auxiliar no diagnóstico da piometra, podem-se avaliar as secreções uterinas, pois essas se encontram alteradas quando há um processo inflamatório no útero (LEITNER et al., 2003). As imagens ultrasonográficas também são úteis para distinguir as alterações morfológicas das paredes uterinas. A serosa e a muscular, quando estão edemaciadas, podem medir de 2-3mm de espessura. O endométrio hiperplásico pode alcançar 7-10mm de espessura. Assim, o ultrassom é uma importante ferramenta na análise da extensão e severidade da piometra (ENGLAND et al., 2003).

## 2.7. Resistência antimicrobiana

A resistência bacteriana aos antimicrobianos, particularmente a multirresistência, é um sério problema na clínica em medicina veterinária. Ao lado do aumento de sua frequência e severidade, o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos pelas principais companhias farmacêuticas tem diminuído. Isto agrava os efeitos da resistência, tornando-a um dos maiores desafios ao controle das infecções em serviços de saúde. Há uma urgência declarada em pesquisas por novas drogas e no topo de sua lista de prioridades está a descoberta de novos quimioterápicos contra *E. coli* e *Klebsiella* com resistência do tipo ESBL, *Enterococcus faecium* vancomicina resistentes, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de *Aspergilus* e *Acinetobacter baumannii*, por serem patógenos que representam atualmente alto risco em infecções (TALBOT et al., 2006).

Porém, de fundamental importância, ao lado dos esforços na busca de novas drogas, é o uso racional das já existentes. Essa realidade pressupõe a necessidade de estudos continuados sobre a sensibilidade bacteriana, especialmente para *E. coli*, visando aperfeiçoar os protocolos terapêuticos e investigar a ocorrência de linhagens multirresistentes em virtude da possibilidade de transmissão cruzada entre homens animais (SIQUEIRA et al., 2008).

Guardabassi et al. (2004) citaram vários estudos de resistência antimicrobiana em animais de companhia e associam o aumento do uso de antibióticos com o aumento da resistência. O registro sistemático do consumo de antibióticos não é prática rotineira em vários países, fato que dificulta essa correlação, porém resultados significativos foram encontrados em alguns países como Suíça e EUA abordando este aspecto.

A emergência da resistência antimicrobiana na bactéria é complexa, e geralmente envolve a combinação de eventos incluindo mutações nos genes de resistência, troca de material genético entre micro-organismos e aumento das pressões seletivas pelo uso abusivo de antimicrobianos. O principal mecanismo de transferência de resistência na família *Enterobacteriaceae* é através da transferência de plasmídios de resistência entre cepas por conjugação. Esses plasmídios são moléculas de DNA extragênicos contendo genes de resistência antimicrobiana que

são transferidos entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (NORMAND et al., 2000).

Por razão da difusão de resistência bacteriana, muitas cepas de *E. coli* têm se tornado multirresistentes, isto é, resistentes a mais de três classes de antimicrobianos, causando uma séria preocupação, principalmente em hospitais e outras áreas de saúde (TONOVER, 2006).

*E. coli* e outras bactérias Gram-negativas são naturalmente resistentes a antibióticos como: macrolídeos, novobiocinas, rifamicinas, actinomicina D e ácido fusídico (SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005). Em casos de infecções por estirpes patogênicas, os antimicrobianos de escolha são amoxicilina, amoxicilina - ácido clavulânico, cefalosporinas, aminoglicosídeos, cotrimoxazol e quinolonas. No entanto, a capacidade de *E. coli* para adquirir genes de resistência torna imprevisível a determinação da melhor forma de tratamento, de modo que esta deve ser sempre determinada por testes de susceptibilidade (WHITE et al., 2002).

Grande parte das *E. coli* (40 a 90%) são resistentes a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclinas. Cerca de 15 a 30% das cepas apresentam resistência às cefalosporinas de primeira geração, neomicina, canamicina, cloranfenicol e quinolonas. Os antibióticos com as menores taxas de resistência disponíveis são amoxicilina-clavulanato, cefalosporinas de segunda e terceira geração, gentamicina, sulfazotrim, ceftiofur, tobramicina, amicacina, colistina e polimixina B (HIRSCH; ZEE, 2003).

Os agentes antimicrobianos fluorquinolonas são muito utilizados na medicina humana e veterinária. A enrofloxacina tem um amplo espectro de ação contra muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas que estão associadas a infecções do trato urinário em cães (PLUMB, 1999). O mecanismo primário de resistência bacteriana a antibióticos fluorquinolonas foi descrito em *E. coli* como uma mutação cromossomal no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da enzima DNA girase (COHN et al., 2003).

Cooke et al. (2002) observaram em cepas de *E.coli* isoladas de cães com infecções do trato urinário, 53% de resistência à enrofloxacina e 47% de sensibilidade. Observaram também que houve um aumento significativo de resistência, de isolados de *E.coli* de urina de cães à enrofloxacina em um hospital veterinário na Califórnia, e que esse aumento seguiu um aumento no uso de enrofloxacina.

Cohn et al. (2003) observaram um aumento significativo na proporção de isolados bacterianos, de trato urinário de cães, resistentes à enrofloxacina de 1992 a 2001 na Universidade de Missouri nos EUA. Apesar da eficácia desse antimicrobiano permanecer alta com 80% dos isolados sendo suscetíveis, os dados mostram que houve um aumento na proporção de bactérias isoladas resistentes.

Oluoch et al. (2001) isolaram *E.coli* de 674 cães (urina, pele, trato respiratório, ouvido, trato reprodutivo feminino, trato reprodutivo masculino e outros órgãos sistêmicos), e observaram 90% de sensibilidade à norfloxacina, 87,5% à enrofloxacina, 90,7% à gentamicina e 85,9% à amicacina.

Estudos realizados com cadelas com piometra demonstram resultados variados quanto à resistência aos antimicrobianos. Hagman e Greko (2005) estudaram 80 amostras de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra e verificaram taxas reduzidas de resistência aos antimicrobianos testados: 10% à ampicilina, 8% à sulfametoxazol, 5% à estreptomicina, 4% à enrofloxacina e à tetraciclina, 2% ao trimetoprim e ausência de resistência à gentamicina. Siqueira et al. (2008) observaram taxas elevadas de sensibilidade em cepas de *E. coli* aos antimicrobianos ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacina. A maior sensibilidade foi encontrada à ciprofloxacina em estudo realizado por Pradhan et al. (2000), já Yates (1996) encontrou como antimicrobianos mais eficazes a gentamicina, a enrofloxacina, a amoxicilina com clavulanato e a cefalexina, já Franklin e Mörner (1996) verificaram 100% de sensibilidade à enrofloxacina.

Kalenski et al. (2012) observaram que os antibióticos que apresentaram maior eficácia contra as cepas de *Escherichia coli* estudadas em 33 cadelas em São Paulo foram a gentamicina, a enrofloxacina, a cefalexina e a associação de amoxicilina com ácido clavulânico, nesta ordem.

Diferindo dos estudos citados anteriormente, Lara et al. (2008) verificaram em testes *in vitro* que cepas de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra foram resistentes aos principais antibióticos prescritos pelos médicos veterinários, que incluem amoxicilina, ampicilina, cefalexina, cefalotina, ciprofloxacina, enrofloxacina, gentamicina e norfloxacina.

## 2.8. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)

Além da compreensão da interação intraespecífica, a caracterização das cepas é importante na determinação de padrões de similaridade. A avaliação da diversidade dentro de um grupo de estirpes de *E. coli* requer uma categorização sistemática que permite classificar cepas semelhantes em “clusters” (ABRAHAM, 2011).

*Random amplified polymorphic DNA* é um método simples de genotipagem por PCR usando oligonucleotídeos curtos de sequência aleatória. As sequências aleatórias se ligam a locais de iniciação aleatórios e amplificam segmentos de DNA de comprimentos variáveis. Isto resulta num padrão de pequenos e grandes fragmentos de DNA. Esses padrões são idênticos para as populações bacterianas clonais. O poder discriminatório dessa técnica se dá pela utilização de mais de uma sequência de iniciadores. Além disso, a utilização de medidas apropriadas, tais como uso do mesmo aparelho amplificador, concentração de MgCl<sub>2</sub> ótima, controles positivos e negativos adequados e quantificação de concentrações de DNA permitem a produção de perfis reproduutíveis em um laboratório (GORDON, 2010; HADRYS et al., 1992).

Vários trabalhos de pesquisa relacionam a participação de cepas de *E. coli* em processo de infecção do trato urinário em cães e humanos, além de infecções extra intestinais em humanos (JOHNSON; RUSSO, 2002; SMITH et al., 2007; ABRAHAM, 2011). Há, entretanto, poucos estudos epidemiológicos relacionando a presença deste patógeno em animais com piometra, e/ou sua associação com infecções urinárias (FILHO, 2008).

Chen et al. (2003) na Austrália, Coggan et al. (2004) e Filho (2008) no Brasil realizaram estudos parciais acerca da caracterização genotípica de amostras de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra que demonstraram a ampla variabilidade genética entre as estirpes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Desenho do estudo

Os animais utilizados no estudo eram provenientes de diversas localidades da cidade de Uberlândia e deram entrada no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia no período de agosto de 2012 a março de 2013. Foram aleatoriamente selecionadas cadelas que participavam do Programa de Castração (Convenio UFU-Prefeitura Municipal de Uberlândia) ou com suspeita de piometra.

Os materiais colhidos das cadelas foram urina e conteúdo uterino. No total, foram coletadas 52 amostras da musculatura e conteúdo purulento de úteros e 35 amostras de urina de cadelas com diagnóstico de piometra. De cadelas sadias foram coletadas 49 amostras por meio de *swabs* dos cornos uterinos. Todas as amostras foram identificadas quanto à origem em relação ao animal, como idade, raça e sinais clínicos.

O conteúdo uterino das cadelas com e sem piometra foi submetido ao cultivo bacteriano. Os fragmentos da musculatura uterina dos animais com piometra foi também submetido à análise histopatológica para avaliar o grau de lesão que o agente etiológico causou sobre o órgão. As amostras de urina foram utilizadas para avaliação da presença de *E. coli*.

A partir do isolamento de *E. coli*, foram realizados testes bioquímicos para a identificação da espécie. As cepas que confirmaram positividade para *E. coli* foram avaliadas quanto à sensibilidade aos antimicrobianos e a presença de genes de virulência por meio de PCR (*polimerase chain reaction*). A análise filogenética entre os isolados foi realizada pela técnica de RAPD-PCR.

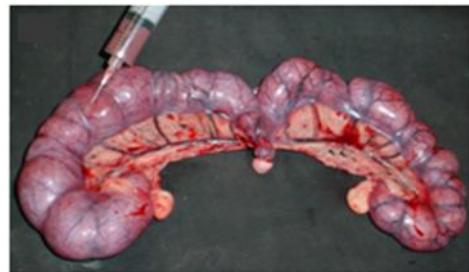
Os outros micro-organismos isolados foram caracterizados quanto ao gênero.

Este estudo foi aprovado pelo Comité de Ética na Utilização de Animais (CEUA), sob o número 046/13.

### 3.2. Coleta das amostras

Para os animais doentes (com piometra), no momento da cirurgia (ovário - salpingo - histerectomia), o útero foi retirado do animal e o conteúdo purulento foi aspirado com auxílio de seringa e agulha de grosso calibre (Figura 1), já a urina foi coletada por meio da técnica de cistocentese. Todas as amostras foram armazenadas em caixa isotérmica contendo gelo e transportadas ao laboratório para posterior processamento. O tempo máximo gasto da colheita de todas as amostras até o início das análises foram de quatro horas.

Os fragmentos histopatológicos de 2cm<sup>2</sup> foram coletados com auxílio de bisturi e acondicionados em frascos contendo Formol a 10% (Synth®), para posterior avaliação.



**Figura 1:** Coleta de amostra através de aspiração do conteúdo purulento do útero das cadelas com piometra para análise microbiológica.

Quanto aos animais sadios, os úteros retirados dos animais foram acondicionados em sacos plásticos estéreis e mantidos sob refrigeração em caixa de isopor com gelo até a sua análise. No laboratório, a coleta do material foi feita com auxílio de swab estéril passado ao longo de toda extensão da mucosa uterina de ambos os cornos.

### 3.3. Isolamento e Identificação

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os procedimentos microbiológicos e moleculares foram conduzidos em paralelo com a cepa controle de *Escherichia coli* (ATCC 25922)

(Microbiologics®).

As amostras dos animais com piometra coletadas na seringa foram transferidas para tubos de ensaio estéreis. As análises foram realizadas conforme Coggan (2005). As amostras colhidas foram cultivadas em três meios de cultura distintos: ágar sangue de carneiro (5%) (Oxoid ®), ágar MacConkey (Oxoid ®) e caldo BHI (*Brain and Heart Infusion*).

O cultivo direto foi realizado em ágar sangue de carneiro (5%) (Oxoid ®) e em ágar MacConkey (Oxoid ®), por meio de semeadura por esgotamento nas placas de Petri com auxílio de alça de platina.

Já o cultivo com pré-enriquecimento foi feito em caldo BHI (*Brain and Heart Infusion*) (Oxoid®). Para isso, swab estéril contendo as amostras de úteros sãos e com piometra foram inoculados em tubos contendo 5mL do caldo e incubadas a 36°C durante 24 a 48 horas. As amostras inoculadas no caldo BHI, também foram semeadas nos dois ágares descritos anteriormente.

A identificação dos micro-organismos isolados foi realizada por testes bioquímicos usando um Kit comercial para identificação de enterobactérias (Laborclin®) que utiliza cinco meios de cultura e fornece resultados para dez reações bioquímicas diferentes. As especificações de cada prova bioquímica realizada com o kit comercial estão descritas na Tabela 1. As análises foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante.

Das amostras com crescimento bacteriano, mas sem a identificação de *E. coli*, as colônias foram submetidas à coloração de Gram com o objetivo de caracterizar cada cepa morfológicamente. Para isso, foi utilizado um conjunto de reagentes para coloração de Gram (Laborclin®) contendo soluções de corante Violeta Genciana, Fucsina, fixador Lugol e descorante à base de álcool-acetona. O procedimento foi efetuado de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a conservação dos isolados, as amostras com crescimento bacteriano foram estriadas em Ágar nutriente (Oxoid ®) e mantidas a temperatura de 4°C.

**Tabela 1:** Meios de cultura<sup>1</sup> e provas bioquímicas usadas para identificação das espécies de enterobactérias lactose positivas.

<b>Meio de Cultura</b>	<b>Provas Bioquímicas</b>	<b>Resultado Positivo</b>	<b>Resultado negativo</b>
Rugai	Produção de triptofano	Cor verde garrafa no ápice do tubo	Mantém-se a cor original do meio (verde azulado) no ápice do tubo
	Fermentação da glicose	Cor amarela no fundo do tubo	O fundo do tubo mantém a cor original do meio (verde azulado)
	Produção de gás a partir da glicose	Bolhas com intensidade variável no interior do meio;	Mantém-se íntegro.
	Produção de gás sulfídrico	Cor negra de intensidade variável no fundo do tubo	Coloração diferente da anterior mencionada
LMI	Uso da lisina	Cor que passa do amarelo ao púrpura no meio	Coloração amarela no meio
	Uso da ornitina	Cor que passa do amarelo ao púrpura no meio	Coloração amarela no meio
MIO	Motilidade	Crescimento difuso com turvação total ou parcial do meio	Crescimento restrito à linha de picada.
	Produção Indol	Anel vermelho;	Não se desenvolve coloração no reagente.
Rhamnose	Uso da rhamnose	Cor amarela com turvação do meio	Mantém sua coloração original e com crescimento (turvação)
Citrato	Uso do citrato como única fonte de carbono	Crescimento no meio e/ou desenvolvimento de coloração azul	Coloração inalterada e sem sinais de crescimento

<sup>1</sup> Kit para identificação de enterobactérias (Laborclin®)

### 3.4. Suscetibilidade aos antimicrobianos

As cepas identificadas como *E. coli* foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão de disco, utilizando protocolo recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002).

Os isolados foram estriados em placas contendo ágar triptona de soja (TSA) (Oxoid®) e incubados a 37°C por 24 horas. Três a cinco colônias puras, bem

isoladas, de mesmo tipo morfológico foram selecionadas da placa e transferidas para um tubo contendo 5mL de NaCl 0,85% (Synth). A turbidez foi ajustada com salina estéril de modo a obter turbidez óptica comparável à solução padrão de MacFarland a 0,5, que corresponde aproximadamente de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC.mL. Em seguida, os inóculos foram semeados com auxílio de swabs estéreis em toda a superfície do ágar Mueller Hinton (MH) (Difco®). As placas permaneceram entreabertas por 5 a 15 minutos, à temperatura ambiente, para que o inóculo fosse completamente absorvido pelo ágar antes da aplicação dos discos.

Após absorção, foram adicionados os seguintes discos de antimicrobianos: ácido nalidíxico (NAL 30µg), cefoxitina (CFO 30 µg), norfloxacina (NOR 10 µg), ampicilina (AMP 10µg), gentamicina (GEN 10µg), tetraciclina (TET 30µg), sulfonamida (SUL 300µg), cloranfenicol (CLO 30µg), eritromicina (ERI 15µg), ciprofloxacina (CIP 5µg), neomicina (NEO 30µg), enrofloxacina (ENO 5µg) e ceftiofur (CTF 30µg) (Laborclin®).

As placas foram incubadas a 37°C em aerobiose por 18 a 20 horas, e após, os diâmetros dos halos de inibição (em milímetros) foram medidos. Seguindo os critérios de interpretação dos diâmetros dos halos os micro-organismos foram classificados como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano testado.

### **3.5. Genes de virulência**

Para a extração do DNA foi utilizado o kit DuPont™ PCR Reagent, que contém reagentes para extração do DNA (tampão fosfato e protease). Os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações do fabricante. Três colônias puras de *E. coli* foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de caldo BHI (Oxoid®) e incubadas por 24 horas à 36°C. Em seguida, 2mL das culturas foram transferidos para microtubos (Bioexpress, USA) e centrifugados (Cientec®) a 12000.g por 5 minutos para a formação de um *pellet*. Foi descartado o sobrenadante e ao *pellet* foi adicionado 200 µL de tampão fosfato e 2,5 µL da solução de protease (DuPont™ PCR Reagent). Essa mistura foi aquecida a 37°C por 20 minutos e a 95°C por 10 minutos em termociclador (Eppendorff®) e transferida para bloco de resfriamento (2°C a 8°C) durante 5 minutos para obtenção do DNA.

A quantificação do DNA foi feita através do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) em comprimento de onda de 260nm, observando sempre a relação 260/280 a fim de verificar a integridade do DNA (relação entre 1,8-2,0).

Os pares de iniciadores descritos na Tabela 2 foram utilizados na análise dos fatores de virulência relacionados à aderência e à produção de toxinas. O controle positivo de *E. coli* (ATCC 25922) foi usado em todas as reações de amplificação, bem como um controle negativo, composto por água ultrapura estéril, adicionada à mistura de reação, em substituição ao DNA.

Para a amplificação dos genes *sfa*, *pap*, *hly* e *cnf*, o volume final para a reação de amplificação (50µL) foi composto por 50ng da solução de DNA bacteriano e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP); 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 20 picomoles para os primers *sfa*, *pap* e *cnf* e 30 picomoles para os primer *hly*, 0,2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Cada gene foi estudado separadamente nas reações. A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorff®), obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos (VON SYDOW, 2005).

Para o gene *afa*, a solução de amplificação constituiu de 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl, 2,0mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP), 30 picomoles do primer, 1U de Taq, 70ng de DNA e um volume final de 30µL. A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorff®), obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial a 94°C por 10 minutos; 30 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 76°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos (SIQUEIRA, et al. 2008).

**Tabela 2:** Primers para identificação dos genes de virulência *pap*, *hly*, *cnf*, *sfa* e *afa* em *Escherichia coli*.

Genes	Sequência 5' - 3'	Peso Molecular	Referência
<i>pap-1</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336 pb	Yamamoto et al. (1995)
<i>pap-2</i>	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		
<i>hly-1</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177 pb	Yamamoto et al. (1995)
<i>hly-2</i>	ACCATATAAGCGGTCAATTCCCGTCA		
<i>cnf-1</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498 pb	Yamamoto et al. (1995)
<i>cnf-2</i>	CATTCAAGTCCTGCCCTCATTATT		
<i>sfa-1</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410 pb	Yamamoto et al. (1995)
<i>sfa-2</i>	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		
<i>afa-1</i>	GCTGGGCAGCAAATGATAACCTC	750 pb	Siqueira et al. (2008)
<i>afa-2</i>	CATCAAGCTGTTGTTCGTCCGCCG		

Os produtos amplificados ( $8\mu\text{L}$ ) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular o marcador de 100pb (Invitrogen®). Após 90 minutos de corrida à 100W de potência , 100V de voltagem e 100A de corrente elétrica, os géis de agarose (Affymetrix®) foram corados pela solução de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e visualizados sob luz UV, no transiluminador (Loccus Biotecnologia).

### 3.6. Similaridade entre os isolados pela técnica de amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD-PCR)

A avaliação da proximidade genética entre os isolados de *E. coli* foi realizada pela técnica de RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), conforme o protocolo descrito por Hopkins e Hilton (2001) com modificações.

Os iniciadores (*primers*) descritos na Tabela 3 foram usados na determinação do nível de similaridade entre os isolados de um mesmo animal e na comparação com os isolados de outros animais.

**Tabela 3:** Primers utilizados no RAPD-PCR dos isolados de *Escherichia coli*.

<b>Primers</b>	<b>Sequência 5' → 3'</b>	<b>Referência</b>
1247	AAGAGCCCCG	Hopkins e Hilton (2001)
1290	GTGGATGCGA	

O volume final para a reação de amplificação ( $25\mu\text{L}$ ) foi composto por 20ng da solução de DNA bacteriano e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 10mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP); 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 100 picomoles de cada *primer*, 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Cada sequência foi estudada separadamente nas reações. A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorff®), obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial a 94°C por 4,5 minutos; 5 ciclos de amplificação com 3 etapas: 94°C por 30 segundos, 22°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos; 35 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: 94°C por 30 segundos, 28°C por 30 segundos, 72°C por 3 minutos, e um ciclo de 72°C 5 minutos (HOPKINS; HILTON, 2001).

A separação dos produtos amplificados ( $8\mu\text{L}$ ) foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Affymetrix®), utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular o marcador de 100pb (Invitrogen®). Os géis de agarose foram corados e visualizados conforme descrição anterior.

Para verificar a similaridade entre as cepas, os géis com os produtos amplificados foram levados ao aparelho de captação de imagens (Loccus Biotecnologia) e a análise computacional foi realizada no Programa GelCompar II (*Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns*), versão 1.50, *Applied Maths Korthrijk, Belgium*. As bandas de fraca, média e forte intensidade captadas pelo programa foram consideradas na análise e a matriz de similaridade foi obtida por comparação entre pares de cepas usando o coeficiente de similaridade de Dice, adotando-se 1% de tolerância, para cada *primer* separadamente. A análise final foi baseada na média de experimentos (*average from experiments*). Foi utilizado o método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) para a construção do dendrograma, englobando todas as cepas estudadas.

### 3.7. Análise Histopatológica

Para a confecção de lâminas histológicas fragmentos com tamanho de 2cm<sup>2</sup> foram colhidos através da secção transversal do terço médio de ambos os cornos uterinos com piometra e conservados em formol 10%. Após o período de 48 horas as amostras foram processadas segundo Tolosa et al. (2003), seccionadas no tamanho de 5µm e coradas por hematoxilina e eosina (Limpex®).

A interpretação dos achados histológicos foi realizada conforme a metodologia adaptada de Dow (1959) que compreende a classificação das alterações histológicas de acordo com o grau de comprometimento celular, aspecto e tipos de células inflamatórias (Tabela 4).

**Tabela 4:** Classificação das alterações histológicas de acordo com o grau de comprometimento celular, aspecto e tipos de células inflamatórias.

Grau	Alteração	Aspecto	Células	Características
I	Sem caracterização inflamatória de hiperplasia	Leve Infiltrado inflamatório	Polimorfo Nucleares	Células inflamatórias na mucosa e muscular
II	Hiperplasia leve	Leve Infiltrado inflamatório	Linfócitos plasmócitos neutrófilos	Infiltrado inflamatório na mucosa
III	Dilatação cística das glândulas endometriais	Infiltrado inflamatório difuso e acentuado	Neutrófilos e macrófagos	Congestão e hemorragia difusa moderada
IV	Dilatação cística das glândulas endometriais	Eosinofílico amorfo	Neutrófilos Linfócitos Plasmócito	Infiltrado inflamatório Com focos hemorrágicos

Fonte: Dow (1959) adaptada.

Como controles foram utilizados fragmentos de cornos uterinos colhidos de cadelas que não apresentaram nenhum tipo de alteração macroscópica no útero (hiperemia, espessamento da parede uterina e presença de exsudato).

### 3.8. Análise dos Resultados

Todos os resultados foram tabulados e submetidos à estatística descritiva, com o cálculo dos percentuais de isolamento, resistência aos antimicrobianos, presença de genes de virulência e grau de alteração histológica provocada pelas estirpes de *E. coli*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Ocorrência de *Escherichia coli* em cadelas com piometra

Das 52 cadelas avaliadas foram colhidas 87 amostras, sendo 52 do conteúdo purulento no útero e 35 de urina. O menor número de amostras de urina está relacionado ao fato de que em 17 animais não foi detectada a presença de urina no interior da bexiga. A ausência de urina nesses animais pode ser justificada por dois motivos, relacionado ao jejum em que o animal é exposto antes do procedimento cirúrgico e pelo uso de anestésicos na cirurgia que promove o relaxamento do músculo esfínter com consequente liberação da urina.

Dentre as amostras analisadas, obteve-se crescimento bacteriano em 46/87 (52,9%), sendo 36/52 (69,2%) provenientes do conteúdo uterino e 10/35 (28,6%) de urina. Quanto à positividade para *E. coli*, observou-se que 25/36 (69,4%) amostras do conteúdo purulento e 7/10 (70,0%) amostras de urina apresentaram o agente (Tabela 5).

**Tabela 5:** Cultivo bacteriano de amostras de conteúdo uterino e urina de cadelas com piometra, atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre agosto de 2012 a março de 2013.

Amostra	Número amostras N (%)	Crescimento bacteriano N (%)	Positividade para <i>E. coli</i> N (%)
<b>Piometra</b>	52 (59,8)	36 (78,3)	25 (78,1)
<b>Urina</b>	35 (40,2)	10 (21,7)	7 (21,9)
<b>Total</b>	87 (100,0)	46 (100,0)	32 (100,0)

A elevada ocorrência de *E. coli* em piometra observada neste estudo, que identificou o micro-organismo em 25/36 (69,44%) das amostras com crescimento em meios de cultura, corrobora com a afirmativa que este é o micro-organismo mais prevalente em piometra canina (HAGMAN, KÜHN, 2002; DABROWSKI et al., 2009; PEREIRA, 2011; KALENSKI et al. 2012).

Estudo realizado por Pereira (2011) isolou em sete animais de um total de 12, *E. coli* no seu conteúdo uterino, correspondente a 58% do total. De forma semelhante, Wheaton et al., (1989), avaliaram 47 cadelas das quais 66% apresentaram positividade para *E.coli*. Kalenski et al. (2012) avaliaram 33 fêmeas caninas do Hospital Veterinário de São Paulo e o principal agente identificado na piometra foi a *E. coli*, encontrada em 57,57% dos casos.

Outros autores observaram índices ainda mais elevados de positividade para *E. coli*, aproximados a 80%, em amostras de cadelas com a patologia (DABROWSKI et al., 2009) e Coggan et al. (2004) encontraram positividade de 79%.

Filho (2008) avaliou 32 cadelas com piometra em São Paulo e observou crescimento bacteriano em 27 (84%) amostras de pus e sete (22%) amostras de urina. O autor detectou a presença de *E. coli* em 25 amostras do conteúdo purulento e apenas uma amostra positiva para este agente na urina.

Estudo realizado na Índia por Bassessar et al. (2013) com 20 cadelas com piometra obteve positividade para *E. coli* em nove (45,0%) amostras de conteúdo uterino, quatro (20,0%) para *Salmonella*, duas (10,0%) para *Pseudomonas*, três (15,0%) para *Staphylococcus*. Duas amostras (10,0%) mostraram infecção mista, com isolamento de *E. coli* e *Staphylococcus*.

É possível que a incidência de *E. coli* como agente etiológico de piometras possa ser ainda maior que os 69,44r% observados neste estudo. Isso pode ter ocorrido pela utilização de antimicrobianos antes da cirurgia como profilático de outras infecções que pode ter contribuído para a inviabilidade da bactéria no laboratório. Somado a isso, a ausência de crescimento bacteriano também pode estar relacionado à inviabilidade da bactéria para o crescimento *in vitro*, causada pela ação das células do sistema imune do hospedeiro (SMITH, 2006).

A presença de *E. coli* foi encontrada em 69,5% (32/46) das cadelas que apresentaram crescimento bacteriano, considerando-se amostras de pus ou urina. Animais que apresentaram positividade na urina mantiveram esse padrão nas amostras do conteúdo uterino, com exceção do animal número 20 cujo o agente foi

isolado somente na urina. Portanto, seis caninos possuíam cepas de *E. coli* em ambos os locais investigados, o que faz sugerir que possa haver uma interligação entre a cistite e a piometra, que pode ser atribuída a uma mesma origem.

Wadas et al. (1996) analisaram as características de *E.coli* isoladas de conteúdo uterino de cadelas com piometra e do trato urinário das mesmas e verificaram uma elevada similaridade entre elas, 88% dos casos. Os autores concluíram que a *E. coli* associada com piometra canina, seria oriunda da infecção do trato urinário, tendo em vista que as cepas isoladas possuíam uma alta proximidade genética.

A colonização da vagina, principalmente a área em volta da abertura uretral, aumenta a oportunidade da bactéria de entrar no sistema urinário. Normalmente a maior parte dos nichos disponíveis está ocupada por microflora residente, principalmente lactobacilos, e qualquer desequilíbrio dessa microbiota significa uma oportunidade para a colonização do trato vaginal por *E.coli* ou outros patógenos potenciais (SAYLERS; WHITT, 2002).

O potencial de sobrevivência de *E. coli* na mucosa intra-uterina e no trato urinário está associado à capacidade de adesão nas células de revestimento desses tratos, de forma a inibir sua eliminação pela motilidade natural ou pela ação mecânica da urina (MURRAY et al., 1998).

A ligação de *E. coli* está associada tanto à presença de características de virulência quanto ao ciclo estral. Alguns estudos apontam que a fase diestral favorece de forma significativa na fixação e na multiplicação desse agente no endométrio (ISHIGURO et al. 2007; ARORA et al. 2006).

Durante o diestro em fêmeas caninas, a progesterona produzida pelo corpo lúteo ovariano age sobre o útero e estimula o crescimento e a atividade secretória das glândulas uterinas, promovendo assim a hiperplasia endometrial cística. O endométrio torna-se cístico e espessado, proporcionando o acúmulo de fluidos e bactérias nas glândulas endometriais e luz uterina, favorecendo a colonização bacteriana por via ascendente e o aparecimento da piometra. Além disso, a progesterona promove redução da resposta leucocitária e das contrações uterinas, que são mecanismos de defesa do organismo (ENGLAND et al., 2007).

A variação na adaptação de *E. coli* ao período estral promove também alternância na expressão de genes que favorecem a adesão da bactéria na mucosa uterina. Assim, a presença do micro-organismo acaba não induzindo uma resposta

imunológica eficiente. Dessa forma, dependendo da fase do ciclo em que o animal se encontra, há uma maior predisposição ao desenvolvimento da infecção (KREKELER et al., 2012).

Além disso, a utilização de injeções abortivas ou a administração de estrogênio ou progesterona de forma exógena caracterizam pontos importantes na manifestação da doença (HEDLUND, 1999). Estes fatores favorecem na habilidade desse agente em aderir a sítios antigênicos específicos no endométrio estimulado por progesterona e no miométrio (GROOTERS, 1994).

Logo, a ocorrência da *E. coli* observada neste trabalho pode ser explicada pela afinidade que esta bactéria possui pelo epitélio do trato urinário e endométrio durante a fase de dominância da progesterona, somada à presença do precipitado bacteriano que favorece a colonização uterina, levando à piometra canina, conforme descrito por Concannon e Verstegen (2005).

A Tabela 6 demonstra características referentes à raça e a idade dos animais estudados. Foi possível constatar que 38,5% (10/26) dos animais eram sem raça definida, 19,2% (5/26) pertenciam à raça Poodle, 11,5% (3/26) eram Pitt Bull, 11,5% (3/26) Rottweiller, 7,7% (2/26) Basset Hound, 3,8% (1/26) da raça Shar pei, 3,8% (1/26) Pintcher e 3,8% (1/26) Akita. A idade dos animais variou de um a 14 anos, com média de 8,6 anos, e 80,8% (21/26) das cadelas com idade superior a seis anos.

A elevada porcentagem de cães sem raça definida pode ser justificada pelo fato de que parte dos usuários do Hospital Veterinário serem pessoas de baixa renda. Esse mesmo argumento também foi utilizado por Coggan (2005). Além disso, no Brasil há uma maior tendência na adoção de cães sem raça determinada (ALBUQUERQUE, 2010). Pereira (2011) não determinou valores, mas também observou uma elevada porcentagem de animais sem raça definida ao estudar 12 animais com piometra em Portugal.

O predomínio nas raças Poodle, Pitt Bull e Rottweiler faz sugerir que determinadas raças podem estar mais predispostas ao desenvolvimento da piometra. Essa predisposição em Rottweiler e Pitt Bull já foi relatada anteriormente (ALBUQUERQUE, 2010; SMITH, 2006; FELDMAN; NELSON, 2004).

Vários autores afirmaram que a piometra ocorre em todas as raças e, embora possa ocorrer em cadelas com um ano de idade, esse complexo é observado com maior frequência em animais acima dos seis anos (COGGAN, 2005, KÜPLÜLÜ et

al., 2009; WHITEHEAD, 2008; ALBUQUERQUE, 2010). Úteros de cadelas que tiveram vários ciclos estrais encontram-se predispostos ao estabelecimento de infecção uterina devido à maior probabilidade de apresentarem alterações predisponentes ao desenvolvimento da piometra (KUSTRITZ, 2005).

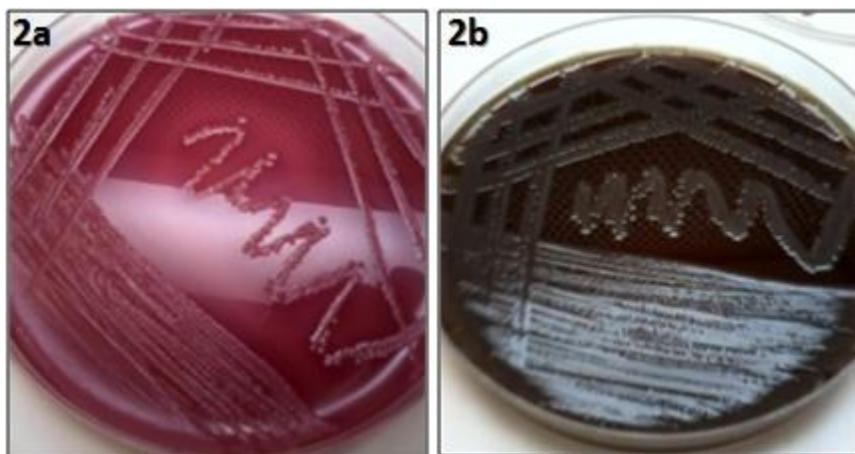
**Tabela 6:** Caracterização dos animais com piometra<sup>1</sup> que apresentaram positividade para *E. coli*, atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre agosto de 2012 a março de 2013, Uberlândia, MG.

Animal	Piometra	Urina	Idade (anos)	Raça
03	+	-	10	Poodle
04	+	-	1	Sem raça definida
06	+	+	14	Sem raça definida
07	+	-	10	Pitt Bull
09	+	-	4	Shar pei
10	+	-	11	Sem raça definida
11	+	-	10	Rottweiller
12	+	+	8	Pintcher
13	+	-	10	Poodle
18	+	-	6	Basset Hound
19	+	-	9	Poodle
20	-	+	7	Sem raça definida
21	+	-	8	Akita
22	+	-	1	Sem raça definida
24	+	+	12	Sem raça definida
27	+	-	4	Sem raça definida
29	+	-	8	Pitt Bull
31	+	-	9	Pitt Bull
32	+	-	11	Poodle
33	+	+	8	Sem raça definida
37	+	-	9	Rottweiller
39	+	-	11	Sem raça definida
43	+	+	10	Rottweiller
44	+	+	10	Basset Hound
49	+	-	11	Poodle
52	+	-	13	Sem raça definida

<sup>1</sup> resultados provenientes de amostras de 52 animais. +: amostras positivas para *E. coli*; -: amostras negativas para *E. coli*.

A utilização do Ágar MacConkey e do Ágar Sangue não apresentaram diferenças nas quantidades de isolados de *E. coli*, já que ambos favoreceram o crescimento da bactéria, foi o que ocorreu nas 32 (100%) amostras positivas (Figura 2). Porém, o Ágar Sangue ofereceu melhores condições para o crescimento de outras bactérias, uma vez que a formação de colônias foi detectada em 46 (100%) amostras, já no Ágar MacConkey houve positividade em somente 41 (89,1%).

Essa diferença está associada ao fato de o Ágar Sangue beneficiar o crescimento da grande maioria das bactérias Gram positivas e negativas bem como de algumas leveduras. Diferentemente, o Ágar MacConkey é um meio seletivo e diferencial empregado no isolamento de bactérias Gram negativas (COGGAN et al., 2004), favorecendo o crescimento de um menor número de micro-organismos.



**Figura 2:** Crescimento bacteriano de amostras de cadelas com piometra em Uberlândia. 2a - Formação de colônia em Agar MacConkey. 2b - Formação de colônia em Agar Sangue.

Considerando-se as amostras de urina e conteúdo uterino de cadelas com piometra em que houve crescimento bacteriano, somente 30,4% (14/46) não eram positivas para *E. coli*. Dentre essas cepas, foi possível identificar duas espécies: *Enterobacter aerogenes* em duas cadelas e *Morganella morganii* em um animal, todas em amostras de conteúdo uterino.

*Enterobacter aerogenes* também foi isolado na cultura de conteúdo uterino de um animal em estudo realizado por Pereira (2011). O autor ainda relata que esse agente não é comum em casos de piometra canina.

A identificação de *Morganella morganii* em um animal sugere que a infecção uterina nesse animal pode ser oriunda de uma contaminação fecal, já que essa espécie ocorre com alta frequência em fezes de cães e apresenta característica de

invasora oportunista (JAWETZ, et al., 1982). Coggan et al. (2008) registraram a presença desse micro-organismo em duas das 197 amostras do conteúdo uterino de cadelas em que houve crescimento bacteriano.

#### **4.2. Crescimento bacteriano em cadelas sadias**

Do total de 49 animais saudáveis avaliados, constatou-se crescimento de micro-organismos em 28/49 (57,1%) das amostras. A partir das análises realizadas pode-se observar a presença de micro-organismos de morfologias variadas, mas a identificação bioquímica demonstrou que não havia positividade para *E. coli* (Tabela 7).

**Tabela 7:** Caracterização de micro-organismos encontrados em úteros de cadelas sadias atendidas no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 14/08/2012 a 18/03/2013, Uberlândia, MG.

<b>Micro-organismos</b>	<b>Número de amostras</b>
	<b>N (%)</b>
Bacilos Gram-negativos	3 (10,7)
Cocos Gram-negativos	3 (10,7)
Bacilos Gram-positivos	7 (25,0)
Cocos Gram-positivos*	15 (53,6)
<b>Total</b>	<b>28 (100)</b>

N: número de animais positivos; %: porcentagem referente ao total de 28; \*: apresentaram positividade no teste de catalase.

Houve maior número de isolamentos de cocos gram-positivos, equivalente a 53,6% (15/28) dos quais todos foram catalase-positivos, seguido por bacilos gram-positivos (25,0%) e por cocos e bacilos gram-negativos, com 3/28 (10,7%), cada. Como os cocos gram-positivos apresentaram na coloração de gram na forma de cocos aos pares, em cachos de uva ou agrupados e foram todos catalase positivos, podemos classificá-los no gênero *Staphylococcus* (LEVY, 2004).

Resultados semelhantes foram encontrados por Baba et al. (1983) que detectaram o crescimento microbiano em 48/78 (61,5%) amostras de útero de cadelas sadias. Desse total, os autores não identificaram patógenos na maioria das amostras positivas. Diferentemente, Maksimovic et al. (2012) e Olson e Mather

(1978) detectaram a presença de agente microbiano em amostras de útero de cadelas sãs em apenas um animal de um total de cães equivalente a 40 (2,5%) e 22 (4,5%), respectivamente.

A ausência de isolamento de *E. coli* nos úteros sadios permite inferir que provavelmente esse agente está ligado com os casos de piometra canina.

#### **4.3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana**

Para animais já diagnosticados com piometra e em estágios mais avançados, que incluem sepse, sepse grave e choque séptico, quanto mais precoce for o início da terapia com antimicrobiano adequado, melhor será o prognóstico do paciente. Há evidências de que o ajuste da terapia de acordo com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos permite a utilização da droga ideal para o combate do agente. Também é conhecido que o uso de drogas antimicrobianas inadequadas coloca em risco a eficácia no tratamento e aumenta a letalidade dos pacientes. O benefício é ainda maior quando a administração de tratamentos adequados é precoce (KUMAR et al., 2006).

A emergência da resistência antimicrobiana bacteriana é complexa, e geralmente envolve a combinação de eventos incluindo mutações nos genes de resistência, troca de material genético entre micro-organismos e aumento das pressões seletivas pelo uso abusivo de antimicrobianos (NORMAND et al., 2000).

O uso indiscriminado de antibióticos, bem como o seu uso indevido, podem aumentar a seleção de estirpes multirresistentes, dificultando o tratamento da piometra canina. Os estudos de vigilância bacteriológica são de validade temporal devido a capacidade das bactérias desenvolverem mecanismos de resistência aos antibióticos. Portanto, a continuação de estudos de susceptibilidade de *E. coli* são necessários para otimizar o protocolo terapêutico da piometra e outras infecções causadas por esta bactéria (SIQUEIRA et al., 2008).

Este estudo demonstrou que os índices de resistência em *E. coli* isoladas de conteúdo purulento de piometra canina variou de acordo com o antimicrobiano. As drogas a que os isolados mostraram maior sensibilidade foram ceftiofur, gentamicina, enrofloxacina, norfloxacina, cefoxitina e ciprofloxacina, com 100% das cepas sensíveis, seguidas dos antimicrobianos neomicina (96,9%), cloranfenicol (93,7%), tetraciclina e ácido nalidíxico (84,4%). As maiores porcentagens de

resistência foram encontradas para os antibióticos eritromicina (100%), ampicilina (34,4%) e sulfonamida (25,0%) (Tabela 8).

**Tabela 8:** Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* isolados de piometra e urina de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre 14/08/2012 a 18/03/2013, Uberlândia, MG.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Sensível</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Resistente</b>
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
Sulfonamida (300µL)	24 (75,0)	-	8 (25,0)
Ceftiofur (30µL)	32 (100,0)	-	-
Tetraciclina (30µL)	27 (84,4)	1 (3,1)	4 (12,5)
Eritromicina (15µL)	-	-	32 (100,0)
Neomicina (30µL)	31 (96,9)	1 (3,1)	-
Gentamicina (10µL)	32 (100,0)	-	-
Ampicilina (10µL)	21 (65,6)	-	11 (34,4)
Ácido nalidíxico (30µL)	27 (84,4)	-	5 (15,6)
Enrofloxacina (5µL)	32 (100,0)	-	-
Norfloxacina (10µL)	32 (100,0)	-	-
Cefoxitina (30µL)	32 (100,0)	-	-
Cloranfenicol (30µL)	30 (93,75)	-	2 (6,2)
Ciprofloxacina (5µL)	32 (100,0)	-	-

N: número de isolados; %: porcentagem referente ao total em cada item.

Estudo realizado por Oluoch et al. (2001) com 674 cepas de *E. coli* isoladas de diversas infecções em cães, incluindo o trato genitourinário, os autores observaram que 90% dos isolados apresentaram sensibilidade a norfloxacina, 87,5% a enrofloxacina, 90,7% a gentamicina e 85,9% a amicacina. Coggan (2005) analisando 151 amostras de *E.coli* isoladas de úteros com piometra, detectaram altos percentuais de sensibilidade relativos à norfloxacina (94%), polimixina B (82,8%), sulfazotrin (76,8%), cloranfenicol (75,5%), enrofloxacina (75,5%), e gentamicina (70,2%).

Coggan et al. (2008) e Siqueira et al. (2008) observaram que as maiores frequências de susceptibilidade das estirpes de *E. coli* isoladas do útero de cadelas com piometra foram encontradas respectivamente para a norfloxacina (94% - 98,1% dos isolados), a enrofloxacina (75,5% - 90,4%), a ciprofloxacina (90,4%), a polimixina B (82,8%) e o cloranfenicol (75,5%). Quanto à resistência, os autores detectaram 86,1% para cefalotina, 73,1% para a associação sulfametoxazole-

trimetoprim, 28,8% - 68,9% para a ampicilina, 46,4% para a cefoxitina, 34,4% para a tobramicina, 32,5% para a tetraciclina e 29,8% para a amicacina.

Hagman e Greko (2005) estudaram 80 amostras de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra e verificaram taxas reduzidas de resistência aos antimicrobianos testados: 10% à ampicilina, 8% à sulfametoxazol, 5% à estreptomicina, 4% à enrofloxacina e à tetraciclina, 2% ao trimetoprim e ausência de resistência à gentamicina.

Diferentemente, Cooke et al. (2002) observaram em cepas de *E.coli* isoladas de cães com infecções do trato urinário, 53% de resistência à enrofloxacina e, além disso, detectaram um aumento significativo nesse perfil explicado pelo uso constante deste antimicrobiano nos períodos de 1994 a 1997 em um hospital veterinário na Califórnia. Cohn et al. (2003) também observaram um aumento significativo na proporção de isolados bacterianos, de trato urinário de cães, resistentes à enrofloxacina de 1992 a 2001 na Universidade de Missouri nos EUA.

Os agentes antimicrobianos fluorquinolonas são muito utilizados na medicina humana e veterinária e são caracterizados como a classe de escolha no tratamento pós-operatório das cirurgias de ovário-salpingo-histerectomia de cadelas com piometra, sendo a enrofloxacina o antibiótico mais utilizado. A enrofloxacina tem um amplo espectro de ação contra muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que estão associadas a infecções do trato urinário em cães. O mecanismo primário de resistência bacteriana a antibióticos fluorquinolonas foi descrito em *Escherichia coli* como uma mutação cromossomal no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da enzima DNA girase (COHN et al., 2003). Este grupo de antimicrobianos apresenta propriedades farmacocinéticas favoráveis como efeito bactericida rápido, que reduz a contagem de *E. coli* de três a cinco logaritmos dentro de uma a duas horas (MCKELLAR, 1996).

Apesar de alguns trabalhos evidenciarem o aumento da resistência à enrofloxacina pelo uso prolongado, o presente estudo mostra a eficácia do medicamento para os isolados, com 100% de susceptibilidade (COHN et al., 2003; COOKE et al., 2002; OLOUCH et al., 2001). Coggan (2005) também observaram a eficiência desse antimicrobiano, com 75,5% dos isolados sendo suscetíveis.

A literatura recomenda a utilização de uma fluoroquinolona (enrofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina) em combinação com uma penicilina de espectro estendido ou ampicilina contra infecções causadas por *E. coli*. Antibióticos

alternativos no tratamento de *E. coli* incluem: aminoglicosídeos (gentamicina), trimetoprim, sulfametoazol, amoxicilina, ácido clavulânico, cefalosporinas de terceira geração e cloranfenicol (ETTINGER; FELDMAN, 2005). Todavia, no presente estudo a utilização de ampicilina e sulfa não apresentou resultados satisfatórios, evidenciando a necessidade da execução do antibiograma para escolha do tratamento mais eficaz.

O perfil de resistência encontrado ao macrolídeo eritromicina, correspondente a 100% dos isolados, se deve pelo fato desta bactéria apresentar um reservatório de genes de resistência aos macrolídeos. Trata-se de características que foram adquiridas por meio de transferência plasmidial e podem representar uma forma de disseminação dessa característica por mecanismos de recombinação gênica para outros agentes como *Shigella* e *Salmonella*. Dentre os mecanismos encontrados em *E. coli* pode-se citar a modificação de metilases, a inativação de enzimas e a aquisição de bombas de efluxo, que envolvem vários genes, cuja presença de apenas um é suficiente para fornecer resistência à eritromicina (CHAU et al., 2009).

A detecção de níveis de resistência mais elevados para as penicilinas (ampicilina - 34,4%) pode ser devido à resistência das enterobactérias à esse princípio ativo e também pela ampla utilização dessas drogas na rotina clínica (HAGMAN; GREKO, 2005).

A mesma justificativa pode ser atribuída ao cloranfenicol e à sulfonamida, que apresentaram porcentagens de resistência equivalentes a 6,2% e 25,0% respectivamente. Trata-se de drogas frequentemente utilizadas na clínica veterinária, podendo pressionar a seleção de estirpes resistentes (FILHO, 2008).

Quanto aos demais antibióticos, os padrões de resistência pelas bactérias pode estar relacionado à possibilidade de aquisição de genes de resistência às drogas, notadamente aqueles presentes em plasmídios (JOHNSON; RUSSO, 2002).

Filho (2008) avaliou 33 culturas de *E. coli* oriundas de cadelas com piometra e também observaram que as amostras provenientes de urina apresentaram um perfil de resistência semelhante quando comparadas com as obtidas do pus. O autor constatou diferenças somente para os antibióticos trimetropim+sulfadiazina, estreptomicina e amoxacilina.

O aparecimento de estirpes multirresistentes, principalmente em bactérias Gram negativas, constitui atualmente um problema grave em medicina veterinária. A apresentação de multirresistência intrínseca e/ou adquirida nestes micro-organismos

pode ser considerada quando há resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos (POOLE, 2004). A Tabela 9 demonstra a frequência de resistência antimicrobiana levando-se em consideração o número de antibióticos. Pode-se observar que 9/32 (28,1%) das cepas isoladas apresentaram padrão de multirresistência (pelo menos três classes de antimicrobianos), sendo 7/9 (77,8%) oriundas do conteúdo uterino e 2/9 (22,2%) da urina.

**Tabela 9:** Distribuição das cepas de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra de acordo com o número de classes de antibióticos a que é resistente. Animais atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre agosto de 2012 a março de 2013, Uberlândia, MG.

<b>Número de antibióticos</b>	<b>Pus</b>	<b>Urina</b>	<b>Total</b>
	<b>N = 25</b>	<b>N = 7</b>	<b>N = 32</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>1</b>	12 (48,0)	4 (57,1)	16 (50,0)
<b>2</b>	6 (24,0)	1 (14,3)	7 (21,9)
<b>3</b>	4 (16,0)	1 (14,3)	5 (15,6)
<b>4</b>	2 (8,0)	1 (14,3)	3 (9,4)
<b>5</b>	1 (4,0)	-	1 (3,1)

N: número de isolados para cada tipo de amostra; n: número de isolados resistentes; %: porcentagem de isolados resistentes.

A Tabela 10 indica os padrões de resistência múltipla aos antibióticos de maneira mais específica. Constatou-se que 6/32 (18,7%) cepas de *E. coli* apresentaram resistência comum à eritromicina, ampicilina e sulfazotrim. Além disso, 3/32 (9,4%) estirpes demonstraram resistência comum à eritromicina, ampicilina, sulfazotrim ou ácido nalidíxico e tetraciclina.

A resistência simultânea a vários tipos de antibiótico é considerada relativamente rara. Quando ocorre, acredita-se que esteja relacionada com a presença de uma bomba não seletiva que permite o efluxo dos antibióticos para o exterior da bactéria e aumenta o padrão de resistência de duas a quatro vezes (FALLON et al., 2003).

Esse padrão de multirresistência está de acordo com estudo realizado por Filho (2008) com 36 cadelas, das quais 25% das cepas de *E. coli* apresentaram essa característica.

**Tabela 10:** Distribuição das estirpes de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra quanto a resistência aos grupos de antimicrobianos. Animais atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre agosto de 2012 a março de 2013, Uberlândia, MG.

Antibióticos – Resistência	N	%
ERI	32	100
ERI, AMP	11	34,4
ERI, AMP, SUF	6	18,7
ERI, AMP, SUF, TET	2	6,2
ERI, AMP, NAL, TET	1	3,1
ERI, AMP, SUF, NAL, CLO	1	3,1

N: número de cepas resistentes; %: porcentagem de cepas resistentes. ERI (eritromicina), AMP (ampicilina), SUF (sulfonamida), TET (tetraciclina), NAL (ácido nalidíxico), CLO (cloranfenicol).

Siqueira et al. (2008) observaram a ocorrência de variados perfis de multirresistência em 158 linhagens de *E. coli* provenientes de infecção trato urinário (ITU), piometra e fezes. Considerando-se a resistência a pelo menos três antimicrobianos os autores detectaram 47,1% em isolados de ITU, 13,5% de piometra e 7,3% de fezes. A resistência a cinco ou mais drogas foi constatada em 33,3% das cepas de ITU, 1,9% de piometra e 5,5% de fezes.

Os resultados do presente estudo foram superiores aos achados por Hagman e Greko (2005) que encontraram uma porcentagem equivalente a 10,6% (32/301) em amostras de conteúdo uterino e urina de cadelas na Suécia, porém, estes autores classificaram como multirrestistentes as cepas com resistência a mais de um antimicrobiano.

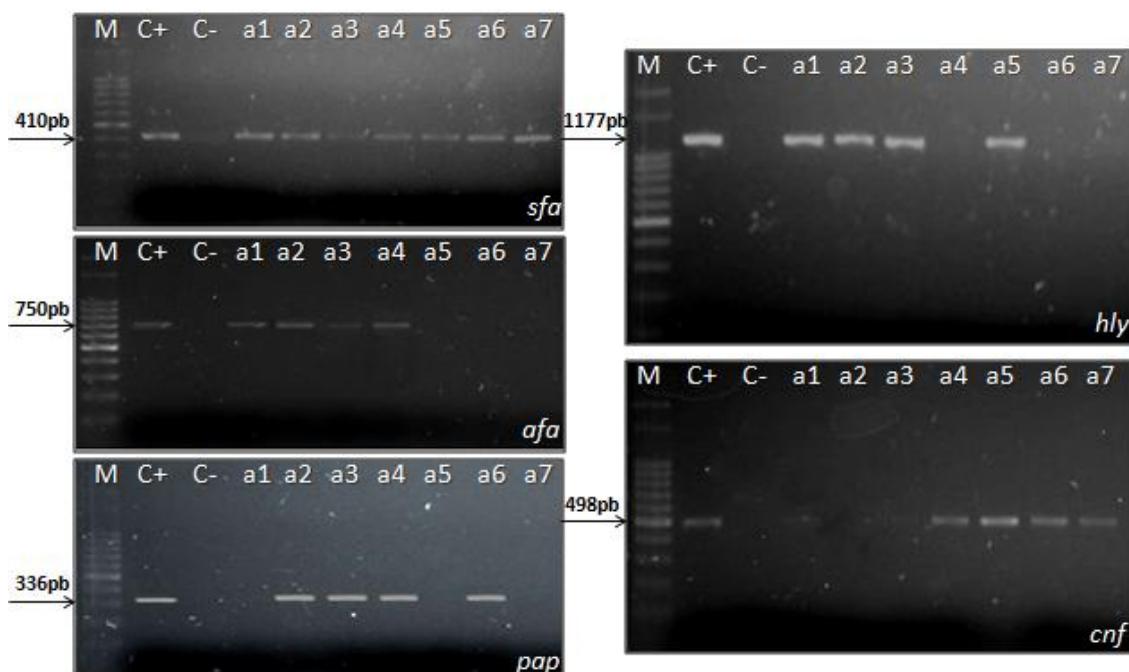
Valores superiores foram encontrados por Lara et al. (2008) ao estudarem 15 cepas de *E. coli* em São Paulo oriundas de conteúdo uterino em cadelas com piometra. Os autores detectaram 100% de resistência bacteriana frente aos oito fármacos testados.

Diante dos fatos, a terapia das diferentes afecções bacterianas deveria fundamentar-se em testes de sensibilidade microbiana. Entretanto, a escolha dos antimicrobianos recai comumente na experiência profissional, no apelo comercial ou no custo de determinados produtos, aliada à dificuldade de acesso a laboratórios de microbiologia veterinária (RIBEIRO et al., 2006).

#### 4.4. Genes de virulência

A patogenicidade das linhagens de *E. coli* está ligada a diferentes fatores de virulência, incluindo adesinas, toxinas, mecanismos de captação de ferro, multi-resistência aos antimicrobianos, entre outros (SOUSA, 2006). O reconhecimento dos fatores de virulência de *E. coli* relacionados à patogenicidade de infecções em cães contribui no entendimento da epidemiologia do agente, no tratamento, na adoção de medidas de controle, assim como dos reflexos em saúde pública em face do estreito contato do homem com animais de companhia (SIQUEIRA, 2006). Neste contexto o presente estudo propôs uma avaliação comparativa dos principais fatores de virulência de linhagens de *E. coli* isoladas de piometra e urina de cães.

O presente estudo detectou a presença de todos os genes estudados: *sfa*, *afa*, *pap*, *hly* e *cnf*, os produtos amplificados desses genes por alguns isolados estão exemplificados na Figura 3.



**Figura 3:** Gel agarose demonstrando a presença dos genes *sfa*, *afa*, *pap*, *hly* e *cnf* em cepas de *E. coli* oriundas de cadelas com piometra em Uberlândia, MG. M (marcador de peso molecular de 100pb); C+ (controle positivo *E. coli* ATCC 25922); C- (controle negativo); a1-a7 (cepas de *E. coli* provenientes de cadelas com piometra; a presença de bandas no gel indica que a amostra é positiva para o respectivo gene). As setas indicam o tamanho das bandas para cada gene em pares de bases (pb).

A Tabela 11 apresenta a frequência de detecção dos genes para adesinas (*sfa*, *afa* e *pap*) e toxinas (*hly* e *cnf*) em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de urina e piometra em cadelas.

**Tabela 11:** Frequência e porcentagem de genes de virulência em cepas de *E. coli* oriundas de urina e conteúdo uterino de cadelas com piometra em Uberlândia, MG

Fatores de Virulência	Piometra N = 25 n (%)	Urina N = 7 n (%)	Total N = 32 n (%)
<b><i>sfa</i></b>	24 (96,0)	7 (100,0)	31 (96,9)
<b><i>afa</i></b>	15 (60,0)	4 (57,1)	19 (59,4)
<b><i>pap</i></b>	11 (44,0)	4 (57,1)	15 (46,9)
<b><i>hly</i></b>	13 (52,0)	4 (57,1)	17 (53,1)
<b><i>cnf</i></b>	17 (68,0)	5 (71,4)	22 (68,75)

N: número de isolados; n: número de isolados que apresentaram gene de virulência; %: porcentagem de isolados que apresentaram gene de virulência.

A presença do gene *sfa* foi observada em 96,9% (31/32) das cepas de *E. coli* isoladas, sendo 24/25 oriundas de amostras do conteúdo uterino e 7/7 de urina.

A fímbria S codificada pelo gene *sfa* é composta por várias subunidades, que são extremamente importantes na interação da bactéria ao epitélio renal e da bexiga (MULVEY, 2002). A elevada porcentagem de isolados portadores do gene *sfa* encontrada no presente estudo sugere o potencial das estirpes isoladas de amostras de urina em colonizar o epitélio e favorecer a infecção da bexiga, que podem evoluir para uma infecção renal. Quanto aos isolados de piometra é possível inferir que esta adesina deve ter um papel importante também na colonização do útero.

Essa fímbria é frequentemente encontrada em isolados envolvidos em processos de septicemia. Dessa forma, considerando que a septicemia é uma das consequências da piometra, a presença desse fator de virulência pode contribuir para os quadros de generalização da infecção (FILHO, 2008).

Vários trabalhos demonstram porcentagens de ocorrência inferiores ao encontrado nesse estudo para esse gene, tanto em cães quanto em humanos. No homem, a expressão de *sfa* tem sido evidenciada em mais de 20% de isolados de *E. coli* em pacientes no Brasil (TIBA, 2004) e em outros países (RODRIGUEZ et al., 2005; FREITAG et al., 2005). Estudo realizado por Siqueira (2006) demonstrou uma positividade de 43,1% dos isolados de ITU em 51 cães e em 46,1% do conteúdo

uterino de 52 cadelas com piometra no Brasil. Coggan (2005) encontrou porcentagem de 79,5% para o gene *sfa* em *E.coli* oriundas de cadelas com piometra, destancando a importância desse gene na adesão ao endométrio. Filho (2008) obteve 56% de suas estirpes positivas para este gene.

A adesina afimbral (*afa*) foi detectada em 59,4% (19/32) das cepas no presente estudo, sendo 15/19 provenientes de amostras de piometra e 4/19 da urina. O número de isolados que apresentaram este gene também foi maior que o observado por Coggan (2005).

Coggan (2005) observou a presença desse gene em apenas 3,3% das amostras isoladas de *E.coli*. O autor considerou que provavelmente essa adesina teria um papel muito pequeno na colonização do útero. A adesina *afa* também foi encontrada em menor freqüência no trabalho de Siqueira (2006) com 1,9% de isolados de ITU e piometra. A sequência referente a esta adesina não foi detectada nos estudos realizados por Chen at al. (2003) e Filho (2008). Ghanbarpour e Akhtardanesh (2012) obtiveram uma porcentagem de 2,38% em 84 estirpes de *E. coli* isoladas em cadelas com piometra no Irã. Somente Léveillé et al. (2006) demonstraram porcentagens um pouco mais elevadas com 15% dos isolados de pus e urina de cadelas com piometra.

De acordo com Tramuta et al. (2011) o gene *afa* não é frequentemente encontrado em isolados de piometra em cães, indicando que esse fator de virulência é incomum nesses animais. Trata-se de um gene mais associado a isolados de *E. coli* uropatogênicas de humanos. Em humanos, essa adesina tem sido observadas em porcentagens iguais ou superiores a 64%. Estas adesinas possuem como receptor um antígeno do grupo sanguíneo Dr bem caracterizado no homem (MULVEY, 2002; TIBA, 2004). A ausência deste grupo sanguíneo em cães provavelmente justifique a baixa relação desta adesina com a ocorrência de infecções gênito-urinárias por *E. coli* em cães, ou mesmo em outras espécies domésticas (SIQUEIRA, 2006).

Porém, pode-se atribuir a elevada porcentagem de positividade para esse gene a uma possível aquisição do agente infeccioso de seu proprietário ou outros humanos, já que trata-se de uma característica de cepas oriundas de humanos. Estudo realizado por Harada et al. (2012) no Japão avaliou a similaridade filogenética em cepas de *E. coli* isoladas de amostras fecais de cães e seus donos. Os autores observaram que é possível a transferência desses agentes, já que

detectaram uma porcentagem de proximidade genética superior a 95% em três famílias avaliadas.

Outro relato importante que pode servir de subsídio refere-se ao trabalho realizado por Pomba et al. (2009) que detectaram a presença de um clone da estirpe de *E. coli* específica de humanos O25-ST131 e altamente virulenta em um cão. Os autores indicaram que provavelmente a transmissão tenha ocorrido de forma homem-animal.

O gene *pap* foi detectado em 46,9% (15/32) das amostras, das quais 11/15 eram oriundas de conteúdo uterino e 4/15 provenientes de cepas da urina. A adesina mais importante, principalmente nas cepas que causam infecções renais é o pili P. Os genes envolvidos na síntese do pili P são designados como *pap* (pili associado com pielonefrite). A regulação do gene *pap* é complexa, pois sua expressão muda em resposta à temperatura, nível de glicose no meio e concentrações de aminoácidos (SAYLERS; WHITT, 2002). Receptores da fímbria P estão presentes nos eritrócitos de humanos, suínos, pombos, frangos, caprinos e cães (TIBA, 2004).

Coogan (2005) encontraram o gene *pap* em 57,6% das estirpes de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra, enquanto Von Sydow (2005) detectou esse mesmo gene em 19,4% de estirpes de *E. coli* isoladas das fezes de cães. Siqueira (2006) obtiveram uma positividade de 23,5% das linhagens isoladas de ITU, 36,5% de piometra e 18,2% das fezes de um total de 158 cepas estudadas.

Outros estudos encontraram maior prevalência de *pap* em isolados de cães com ITU, 72% e 68,5%, respectivamente (FÉRIA et al., 2001; JOHNSON et al. 2003). A similaridade dos estudos com fímbria P em linhagens isoladas de afecções genito-urinárias no homem e animais reforçam mais uma vez o postulado que as bactérias causadoras de ITU e piometra descendem de um mesmo clone bacteriano, assim como a preocupação com o cão como reservatório de estirpes patogênicas para o homem e vice-versa (SIQUEIRA, 2006).

Wullt et al. (2001) observaram que a fímbria P pode ter um importante papel na adesão bacteriana, colonização do endométrio e na patogênese da piometra. A avaliação da presença do gene *pap* em estudo realizado com 23 cepas de *E. coli* provenientes de cadelas com piometra por Chen et al. (2003) na Austrália constatou uma porcentagem de 52% de positividade. Tramuta et al. (2011) detectaram a

presença do gene em 36,7% das 30 cepas de *E. coli* oriundas de amostras de urina de cães da Itália.

A presença do gene *hly* foi determinada em 53,1% dos isolados (17/32), dos quais 13/17 detectados nas cepas oriundas de pus uterino e 4/17 de amostras de urina.

A hemolisina é uma citolisina capaz de lesar eritrócitos, leucócitos, células endoteliais e renais, favorecendo a infecção pelo agente (TIBA, 2004; TRABULSI, 2005). Ao lisar eritrócitos, há captação do ferro exógeno, elemento necessário ao metabolismo bacteriano, por meio da síntese de exoproteínas reconhecidas como sideróforos. Isto ocorre em todos os mamíferos e até em peixes (SAYLERS; WHITT, 2002). Cepas de *E.coli* isoladas de cães e gatos com infecção do trato urinário têm uma alta prevalência de *hly* (Siqueira et al., 2008).

A capacidade de *E. coli* de captar o ferro no organismo animal, ou mesmo adaptar-se à multiplicação em baixas concentrações do íon, é considerado importante mecanismo de virulência, principalmente em infecções extra-intestinais (FILHO, 2008).

Resultados semelhantes ao deste estudo foram encontrados por Siqueira et al. (2008) no Brasil em 51 isolados de amostras de ITU, 52 de piometra e 55 de amostras de fezes de cães. As porcentagens corresponderam a 33,3%, 34,6% e 12,7%, respectivamente. Em isolados de *E. coli* provenientes de cães e gatos diferentes estudos têm apontado a expressão do gene *hly* em níveis iguais ou superiores a 41% (FÉRIA et al., 2001; JOHNSON et al., 2003; FREITAG et al., 2005). Chen et al. (2003) verificaram o gene *hly* em 52% de 23 isolados de *E. coli* oriundos de piometra em cadelas da Austrália e Tramuta et al. (2011) observaram sua presença em 23,3% de 30 isolados de urina de cães na Itália.

Para o gene *cnf* a positividade foi de 68,75% (22/32), sendo 17/22 provenientes de conteúdo uterino e 5/22 de urina.

O “fator citotóxico necrotizante” era associado à uropatogênese apenas devido aos achados epidemiológicos (CHEN et al., 2003). Estudos feitos em culturas de neutrófilos humanos, contudo, indicaram que esta toxina pode influenciar na resposta imune do hospedeiro, uma vez que parece possibilitar a resistência bacteriana à morte por neutrófilos polimorfonucleares (RIPPERE-LAMPE et al., 2001). Esse gene codifica uma importante citotoxina facilitadora da disseminação bacteriana do lúmen da bexiga e do trato intestinal para a circulação sanguínea

(TIBA, 2004). Considerando a importância desse gene no potencial invasivo de *E. coli*, sua presença pode facilitar infecções em diferentes locais, incluindo a infecção uterina.

Filho (2008) encontrou uma prevalência de 23% em 33 isolados de *E. coli* para o gene *cnf* e Coggan (2005) observou uma prevalência de *cnf* em 57,0% das amostras de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra. Esse gene foi detectado em 16 (53,3%) isolados de *E. coli* oriundos de amostras de urina de 30 cães na Itália por Tramuta et al. (2011), já Johnson et al. (2003) revelaram a presença de *cnf* em 41% das linhagens de *E. coli* isoladas de ITU em cães nos Estados Unidos. De forma semelhante, Siqueira (2006) detectou a presença do gene *cnf* em 11 (21,6%) isolados de ITU, 21 (40,4%) de piometra e em 9 (16,4%) das fezes.

Das 32 cepas de *E. coli* isoladas neste estudo, todas apresentaram pelo menos um dos genes estudados. Além disso, observou-se que o grupo que apresenta maior número de cepas é o que possui todos os genes estudados, com porcentagem de 34,4% (11/32), das quais 8/11 foram isoladas de amostras de piometra e 3/11 de urina (Tabela 12).

Outro dado interessante se deve ao fato de que todas as cepas oriundas do mesmo animal, considerando os isolados de urina e conteúdo uterino, apresentaram os mesmos padrões de virulência, com positividade para os mesmos genes, com exceção dos animais de número 24 e 33, nos quais as estirpes provenientes da urina apresentaram um gene a menos em relação ao isolado da piometra. Esses achados fazem sugerir que possivelmente no mesmo animal os isolados do útero e da urina eram pertencentes a uma mesma linhagem com alta proximidade genética.

**Tabela 12:** Frequência e porcentagem de cepas de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra que possuem de um a cinco genes de virulência testados

Quantidade de genes	Piometra N = 25 n (%)	Urina N = 7 n (%)	Total N = 32 n (%)
1	6 (24,0)	2 (28,6)	8 (25,0)
2	3 (12,0)	-	3 (9,4)
3	4 (16,0)	1 (14,3)	5 (15,6)
4	4 (16,0)	1 (14,3)	5 (15,6)
5	8 (32,0)	3 (42,8)	11 (34,4)

N: número de isolados para cada tipo de amostra; n: número de isolados que apresentaram gene de virulência; %: porcentagem de isolados que apresentaram gene de virulência.

#### 4.5. Alterações histopatológicas

O complexo de hiperplasia endometrial cística corresponde a uma alteração histológica do útero, caracterizado por hiperplasia endometrial e pela presença de um grande número de glândulas endometriais císticas distendidas com tamanhos e formações diferentes (CHEN et al., 2006). Os tipos de lesão observados são classificados de acordo com a quantidade de infiltrado inflamatório. No grau I verifica-se lesões com ausência de células inflamatórias; os outros grupos (II, III e IV) incluem casos de aumento na gravidade ou cronicidade, caracterizado por infiltração de células inflamatórias (GILBERT, 1992).

Foram colhidos 52 fragmentos de corno uterino para a avaliação histopatológica. Desse total, somente 25 (48,1%) apresentou crescimento bacteriano para *E. coli*. Durante a confecção das lâminas ocorreu acidente técnico que impediu a análise de quatro amostras, correspondente aos animais 22, 33, 37 e 39, o que totalizou 21 lâminas. Mas, foi incluída a análise de amostra do animal de número 20, o qual não apresentou crescimento de *E. coli* no conteúdo uterino, porém apresentava a presença do agente na urina. Portanto a quantidade de lâminas analisadas foram 22.

Desse total de amostras avaliadas, observou-se que material colhido do útero com piometra 6/22 (27,3%) dos animais apresentaram escore I na classificação, 9/22 (40,9%) escore II e 7/22 (31,8%) grau III. Não foi detectada nenhuma amostra com classificação IV.

Resultados semelhantes foram encontrados por Coggan et al. (2008) no Brasil ao avaliar a histologia de 146 amostras positivas para *E. coli* de cadelas com piometra. Os autores observaram que 21,2% apresentaram escore 1; 41,1% apresentaram escore 2; 24,7% apresentaram escore 3 e 6,8% apresentaram escore 4. De Bosschere et al. (2001) observaram no exame histológico que nenhum útero ( $n=26$ ) de cadelas saudáveis apresentou reação inflamatória. Dhaliwal et al., (1998) tentaram correlacionar as linhagens de *E.coli* isoladas e as alterações histopatológicas da parede uterina. Linhagens O4K- e O7K+ destruíram completamente a integridade do epitélio, enquanto que as linhagens O88K+ e K- produziram menor efeito em termos de infiltração de células inflamatórias e grau de integridade.

A elevada infiltração de células inflamatórias, observada em algumas amostras das quais foi detectado grau III, pode ser justificada pelo trabalho de GILBERT (1992). Este autor acredita que o aumento da taxa de infiltração de células inflamatórias está diretamente relacionado ao tempo de infecção. Quanto maior o tempo de infecção maior a cronicidade da patologia e, portanto, maior infiltração de células inflamatórias. Dessa forma, a determinação do grau III pode indicar um maior tempo de instalação da infecção.

A presença de toxinas bacterianas, particularmente as endotoxinas associadas a *E. coli*, podem ser absorvidos através do útero e causar sintomas sistêmicos de endotoxemia. A partir daí, parte do conteúdo uterino pode escoar através do colo do útero e apresentar uma descarga vulvar com um teor elevado de células inflamatórias, principalmente neutrófilos (PURSWELL, 1997).

A Tabela 13 indica uma relação entre os achados histopatológicos e a presença de genes de virulência. Nos animais 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 18, 21, 24, 31 e 32 foi possível visualizar que há possibilidade da presença dos genes de virulência ter contribuído para as alterações histopatológicas observadas na mucosa uterina. Isso porque nesses animais a quantidade de genes de virulência encontrados foi superior a dois e os escores histopatológicos ficaram entre II e III. Esta relação foi observada em 14/16 (87,5%) das amostras analisadas.

O fato de *E. coli* isolada do conteúdo uterino das cadelas 19, 43, 44 e 49 possuir somente um dos genes de virulência estudados pode ter influenciado no menor grau de lesão ao epitélio (grau I) detectado no exame histopatológico. A discrepância observada no animal 20, em a cepa de *E. coli* apresenta um elevado potencial de virulência por possuir os cinco genes estudados deve-se ao fato de que o micro-organismo só foi isolado na urina e o cultivo de material uterino não apresentou crescimento bacteriano, justificando o grau I na histopatologia.

Nas piometras, a atuação bacteriana por meio da produção de toxinas caracterizam potentes indutores da resposta inflamatória, que resultam na alteração do tecido uterino. A resposta inflamatória no tecido uterino infectado na piometra tem sido motivo de investigações. Em um estudo baseado na análise dos padrões moleculares envolvidos no útero em piometrite, numerosos genes ( $> 800$ ) foram encontrados (HAGMAN et al., 2009). Muitos destes genes estão associados com a ativação que quimiocinas, citocinas que promovem a infiltração de células inflamatórias (CHOTIMANUKUL; SIRIVAIIDYAPONG, 2011). Um conhecimento mais

amplo da resposta inflamatória local e sistêmica pode permitir a identificação de novos biomarcadores de piometra nos animais ou metas futuras para o tratamento (HAGMAN, 2012).

**Tabela 13:** Relação entre a histopatologia e a presença de genes de virulência em *E. coli* isoladas do útero de cadelas com piometra atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia entre agosto de 2012 a março de 2013.

Animal	Grau (Histopatológico)	Quantidade de genes
03	III	2
04	II	5
06	III	5
07	II	3
09	III	5
10	II	3
11	II	2
12	III	5
13	III	4
18	III	3
19	I	1
20*	I	5
21	II	5
22**	-	5
24	II	5
27	II	1
29	II	1
31	II	4
32	III	5
33**	-	4
37**	-	2
39**	-	4
43	I	1
44	I	1
49	I	1
52	I	3

\* *E. coli* somente na urina. \*\* Animais em que não foi possível a análise histopatológica.

#### 4.6. Similaridade filogenética

A técnica do RAPD-PCR têm sido considerada eficiente e adequada para a tipagem molecular de *E. coli* (SAHILAH et al., 2010). Ela é capaz de discriminar o perfil filogenético de estirpes de origem humana (VOGEL et al., 2000) e de animais (GOMES et al., 2005; SALEHI et al., 2008), também sendo de grande importância em estudos epidemiológicos e estudos de contaminação cruzada em alimentos (KANUNGO, 2009, MELO et al., 2011; MELO et al., 2013).

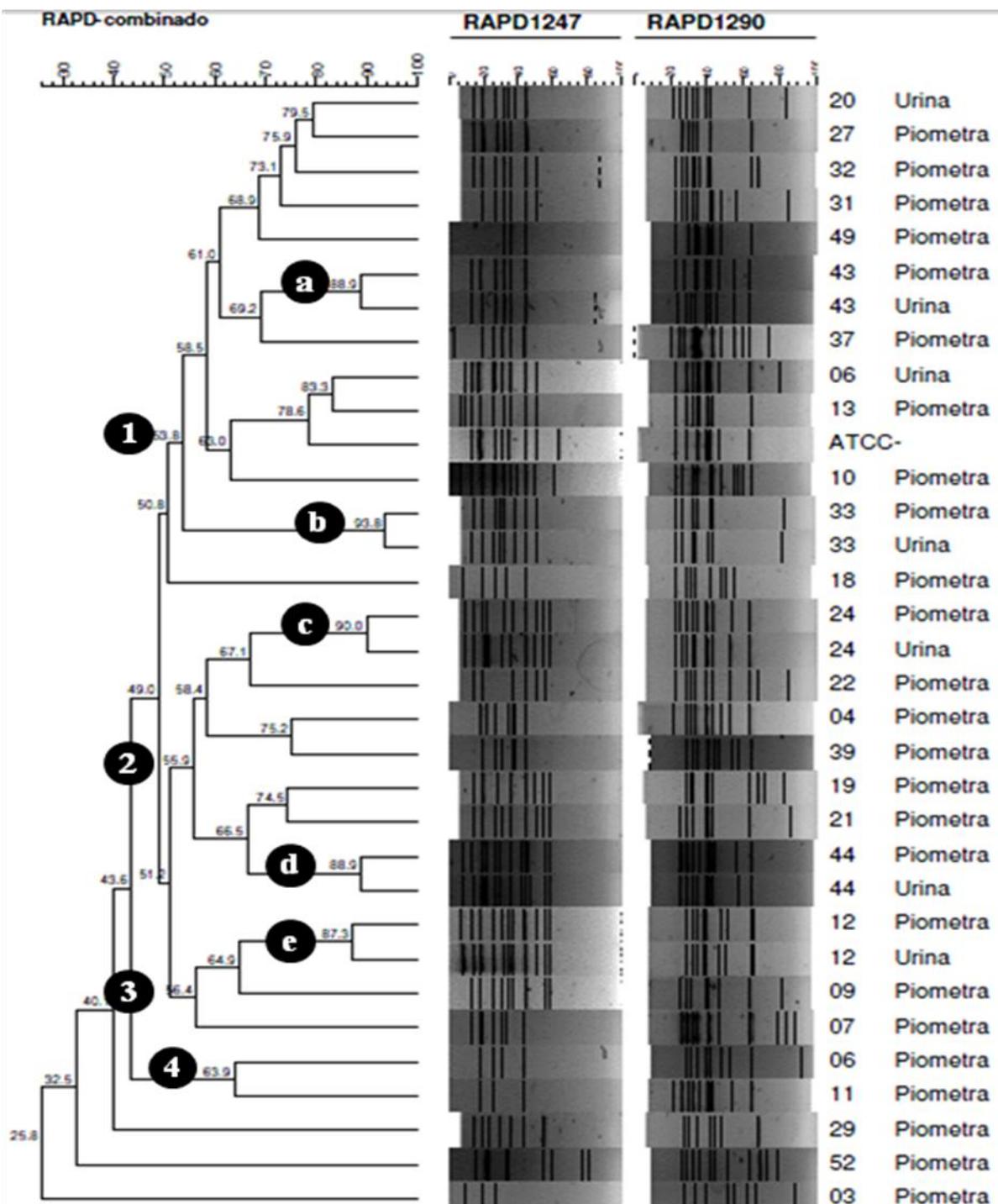
A análise de similaridade entre as cepas demonstrada no dendrograma construído utilizando o coeficiente de similaridade de Dice demonstrou grande diversidade entre os isolados de *E. coli*. Essa diversidade foi observada na análise das amplificações dos dois *primers* testados (1247 e 1290).

A Figura 4 demonstra a proximidade genética dos isolados para ambos os *primers*. A análise mostrada no dendrograma, discriminou os grupos semelhantes filogeneticamente para cada um dos *primers*. A avaliação final foi baseada na média de experimentos (*average from experiments*), utilizando os dois *primers* pelo programa GelCompar.

A análise do dendrograma não registrou clones com 100% de homologia. Porém, a identificação de *clusters* com similaridade superior a 85% foram considerados como pertencentes a um mesmo genótipo. A separação foi feita por grupos com homologia entre 51 e 64%.

A partir da identificação dos *clusters* foram realizadas comparações a nível fenotípico por meio do perfil de resistência antimicrobiana e genotípico pela avaliação comum da presença dos genes de virulência estudados: *sfa*, *afa*, *pap*, *hly* e *cnf*.

Foram identificados quatro grupos distintos (1-4) com proximidade genética entre 51 a 64%, indicando a elevada variabilidade genética dentro dos grupos (Figura 4). Além disso, foram detectados quatro genótipos que apresentaram similaridade filogenética inferior a 50%, correspondente aos isolados de conteúdo uterino dos animais 3, 18, 29 e 52.



**Figura 4:** Dendrograma de 32 isolados de *E. coli* oriundos de cadelas com piometra de Uberlândia – MG, pela técnica de RAPD-PCR com os primers 1247 e 1290, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 85%, pelo programa GelCompar. Perfil 1 – grupo com 53,8% de homologia, composto por dois *clusters* (a e b) com 88,9% e 93,8% de similaridade, respectivamente. Perfil 2 – grupo com 55,9% de homologia, composto por dois *clusters* (c e d) com 90,0% e 88,9% de similaridade, respectivamente. Perfil 3 – grupo com 56,4% de homologia, composto por um *cluster* (e) com 87,3% de similaridade. Perfil 4 – grupo com 63,9% de homologia.

Quanto ao grupo 1, com homologia de 53,8%, foi possível constatar a presença de dois *clusters* “a” e “b” com similaridade de 88,9% e 93,8%, respectivamente. Cada *cluster* composto por duas cepas, oriundas do mesmo animal, 43 e 33, respectivamente, e de amostras distintas conteúdo uterino e pus. Além disso, para ambos os *clusters* as características fenotípicas e genotípicas foram muito semelhantes.

No *cluster* “a”, observou-se que as cepas apresentaram resistência para quatro antimicrobianos e positividade comum para o gene *sfa*. Em “b”, as estirpes possuem resistência ao macrolídeo eritromicina e os genes *cnf*, *afa* e *sfa*.

Para o grupo 2, com homologia de 55,9%, detectou-se dois *clusters* “c” e “d”, com proximidade genética de 90,0% e 88,9%, respectivamente. Ambos os *clusters* também apresentaram duas linhagens isoladas de um mesmo animal, 24 e 44, respectivamente. Quanto ao perfil de resistência antimicrobiana, observou-se que todas as estirpes apresentaram resistência comum à eritromicina. Já a nível genotípico o *cluster* “c” apresentou os genes *sfa*, *pap*, *hly* e *cnf*, e o *cluster* “d” somente o gene *sfa*.

Em relação ao grupo 3, com homologia de 56,4%, identificou-se apenas um *cluster* “e” com similaridade filogenética de 87,3%, composto por duas cepas provenientes da cadelha de número 12. Ambas as linhagens apresentaram características fenotípicas e genotípicas idênticas, ou seja, resistência ao macrolídeo eritromicina e positividade para todos os genes de virulência estudados (*sfa*, *afa*, *pap*, *hly* e *cnf*).

O grupo 4, com homologia de 63,9% é composto por duas cepas com padrão distinto, não podendo ser designadas como *cluster*.

Diante dos dados, foi possível constatar que a maioria das cepas oriundas do mesmo animal possuíam o mesmo genótipo. Dessa forma, pode-se inferir que a cistite e a piometra para os animais 12, 24, 33, 43 e 44 tiveram uma relação direta em que a origem de uma infecção foi dependente da outra, não sendo possível determinar qual foi a primária. Sabe-se então, que provavelmente o micro-organismo apresentou tropismo de forma a manifestar doença em ambos os locais (bexiga e útero).

Vale ressaltar a exceção para o animal número 6, em que a origem de ambas as infecções foram distintas, já que as cepas oriundas do conteúdo uterino e da urina apresentaram baixa similaridade genética, equivalente a 43,6% (Figura 4).

A elevada diversidade genética entre os isolados de *E. coli* de diferentes animais pode ser explicada pelo fato de que os animais em estudo eram provenientes de diferentes ambientes, raças e idades diferentes. Esta diversidade de genótipos sugere a possibilidade de trocas genéticas entre as estirpes e entre espécies diferentes e a probabilidade do surgimento de genótipos emergentes (KUHNERT, et al., 2000). Além disso, muitas bactérias evoluem por transferência horizontal o que facilita sua adaptação em novos ambientes, contribuindo para a aquisição de fatores de virulência envolvidos diretamente em infecções e no desenvolvimento de diferentes *clusters* (DAM; DAS, 2006).

David et al. (2010) observaram uma ampla heterogeneidade genética ao avaliar 281 estirpes de *E. coli* isoladas a partir de bovinos, suínos, frango, equinos, caninos e felinos nos Estados Unidos. Guo et al. (2013) observaram uma elevada homologia entre isolados de *E. coli* oriundos de fezes e de urina de 123 cães hospitalizados na Austrália. Johnson et al. (2008) nos Estados Unidos também demonstrou alto grau de proximidade genética ao comparar 228 cepas de *E. coli* provenientes de humanos e de cães em amostras de urina.

O perfil de similaridade filogenético detectado neste estudo em isolados de urina e conteúdo uterino já foi encontrado por outros autores. Segundo Sandholm et al. (1975), em 100 cadelas investigadas, foram isoladas cepas de *Escherichia coli* a partir do trato urinário e do conteúdo uterino em 85 destas. Estes micro-organismos tinham afinidade pelo epitélio do trato urinário bem como pelo endométrio estimulado por progesterona. Verificou-se que as cepas de *E. coli* isoladas de trato urinário e útero apresentavam características similares.

Wadas et al. (1996) analisaram as características de *E.coli* isoladas de conteúdo uterino de cadelas com piometra e das fezes das mesmas e verificaram que eram muito similares. Além disso, em 88% dos casos, *E. coli* isolada a partir do trato urinário eram idênticas ou similares àquelas isoladas a partir dos úteros infectados. Concluiu-se que *E. coli* associada com piometra canina, seria oriunda da microbiota fecal e que a infecção do trato urinário ocorreu pelo mesmo clone de *E. coli* que o observado no útero da cadela com piometra, tendo em vista que as cepas isoladas eram similares embora não idênticas. Aventaram a possibilidade de que *E. coli* associada com quadros de piometra seriam descendentes de certos clones de *E. coli* presentes nas fezes, e que poderiam conter determinados fatores de virulência.

A associação de parâmetros genotípicos e fenotípicos na confirmação da homologia entre isolados de *E. coli* de piometra e urina também foi realizado por Filho (2008). O autor observou a presença de resistência antimicrobiana e de características de virulência em cepas oriundas do mesmo animal. E concluiu que há proximidade em isolados de *E. coli* entre as bactérias recuperados de pus uterino e urina de animais com piometra.

## 5. CONCLUSÕES

O presente estudo corroborou na importância de *Escherichia coli* como principal agente etiológico da piometra canina. A ausência desse patógeno nas amostras provenientes de cadelas sadias confirma sua importância na patologia.

Os níveis de resistência observados para os antibióticos eritromicina, ampicilina e sulfonamida aliados ao perfil de multirresistência observado em 9/32 (28,1%) isolados atentam para a necessidade de utilização de testes de sensibilidade microbiana de modo a fundamentar a terapia desse tipo de infecção.

A presença de diversos genes associados à virulência, como os associados a adesão e a produção de toxinas demonstrou o alto potencial patogênico das cepas, já que 34,4% (11/32) das *E. coli* isoladas apresentaram todos os genes estudados.

A análise histopatológica confirmou o grau de patogenicidade das cepas de *E. coli* que possuíam maior número de genes de virulência, pois foi constatado relação entre a maior resposta inflamatória e o potencial virulento.

A diversidade genotípica observada nas espécies isoladas revelou que provavelmente os isolados têm diferentes origens. Porém, a proximidade genética entre as cepas provenientes do mesmo animal, de amostras de urina e de conteúdo uterino, indica a relação de dependência entre os dois tipos de infecções.

Portanto, é importante monitorar *E. coli* isolados de cadelas quanto a sua resistência aos antibióticos e genes de virulência, pois as mesmas cepas que causam infecção nas cadelas podem também infectar os humanos, caracterizando uma possível importância em saúde pública. Assim, o comportamento humano no convívio com os pets pode representar risco adicional de infecção por este micro-organismo.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Baseado nos dados obtidos com o presente estudo pretende-se dar continuidade ao trabalho por meio da identificação das outras espécies isoladas tanto das cadelas com piometra quanto nos animais sadios.

Outra perspectiva está relacionada à verificação de mais genes de virulência nas cepas de *E. coli* que permitam classificar esses isolados dentro dos diferentes grupos dessa espécie.

A avaliação das amostras perdidas para análise histopatológica representa outro aspecto a ser abordado posteriormente. Pretende-se confeccionar novas lâminas que permitam realizar a análise completa desse tópico do estudo.

Por fim, espera-se fazer uso de novas metodologias de tipagem molecular, como o Pulsied Field que permitam avaliar os perfis similaridade entre as cepas isoladas e comparar os resultados com os encontrados na técnica de RAPD-PCR.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. Molecular characterization of commensal and pathogenic *Escherichia coli* that colonise human urinary tract and the porcine gastrointestinal tract and the development of whole cell biosensors to evaluate bacteriocin mediated bacterial interactions. 2011. 170f. Doctor of Philosophy thesis, School of Biological Sciences, University of Wollongong, 2011.

ADAM, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiología de los Alimentos**. Traduzido por Manuel Ramis Verges. 1º ed. Zaragoza (Espanha): Editorial Acribia. 1997. 463p.

ALBUQUERQUE, M. C. S. C. **Relação entre os sinais clínicos e os achados laboratoriais de hematologia e provas bioquímicas em cadelas com piometra**. 2010. 101f. Dissertação de mestrado - Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

ARORA, N.; SANDFORD, J.; BROWNING, G.F.; SANDY, J.R.; WRIGHT, P.J. A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, Victoria, Austrália, v. 66, n.4, p.1530-1536, abril, 2006.

BABA, E. H.; FURKATA T.; ARAKAWA A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.44, n.4, p.606, abril, 1983.

BARTGES, J.W. Diagnosis of urinary tract Infeccions. **The Veterinary clinics of North America: Small animals practice**, Philadelphia, v. 34, n. 4, p. 923-933, Julho, 2004.

BASSESSAR, V.; VERMA, Y.; SWAMY, M. Antibiogram of bacterial species isolated from canine pyometra. **Veterinary World**, v.6, n.8, p. 546-549, 2013.

BETTELHEIM, K. A. The sources of "OH" serotypes of *Escherichia coli*. **Journal of hygiene**, Londres, v.80, n. 1, p.83, fevereiro 1978.

BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; LUPPI, A.; BONATI, L.; CORRADI, A. Ultrasonography and cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, San Diego, v.39, n.3, p.136-140. 2004.

BOWER, J. M.; ETO, D. S.; MULVEY, A. Covert operation of uropathogenic *Escherichia coli* wihin the urinary tract. **Traffic**, v. 6, n.1, p. 18-31, janeiro, 2005.

CARREIRA, R. P.; PIRES, M. A. Hiperplasia Quística do endométrio em cadelas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.100, p. 5-16, 2005.

CHAU, P.N.M.; WOERTHER, P. L.; BOUVET, M. A.; LECLERCQ, R.; CANU, A. *Escherichia coli* as Reservoir for Macrolide Resistance Genes. **Emerging Infectious Diseases journal**, Atlanta, v.15, n. 10, p.1648-1650, outubro, 2009.

CHEN, Y. M. M.; WRIGHT, P. J.; LEE, C. S. BROWNING, G.F. Uropathogenic virulence factor in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases od canine pyometra and feces of healthy bitches. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.57-69, 2003.

CHEN, Y.M.M.; LEE, C.S.; WRIGHT, P.J. The roles of progestagen and uterine irritant in the maintenance of cystic endometrial hyperplasia in the canine uterus. **Theriogenology**, Stoneham, v.66, n.6, p.1537–1544, fevereiro, 2006.

CHOTIMANUKUL, S.; SIRIVAIKYAPONG, S. Differential expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in healthy and infected canine endometrium. **Theriogenology**, Stoneham, v.76, n.6, p.1152-1161, outubro, 2011.

COGGAN, J.A.; OLIVEIRA, C.M.; FAUSTINO, M.; MORENO, A.M.; VON SYDOW, A.C.; MELVILLE, P.A.; BENITE, N.R. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino e histopatológico de útero de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas de *E. coli*. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.71, p.715-749, 2004.

COGGAN, J.A. **Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino e histopatológico de útero de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas de E.coli e o potencial risco à saúde humana**. 2005. 157f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP/ São Paulo, 2005.

COGGAN, J. A.; MELVILLE, P. A.; OLIVEIRA, C. M.; MORENO, A. M.; BENITES, N. R. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n.3, p.477-483, 2008.

COHN, L. A.; GARY, A. T.; FALES, W. H.; MADSEN, R. W. Trends in fluorquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 15, n. 4, p. 338-343, 2003.

CONCANNON, P. W.; VERSTEGEN, J. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 30., 2005, Mexico City, Mexico. **Proceedings...** Mexico City: World Small Animal Veterinary Association, 2005.

COOKE, C. L.; SINGER, R. S.; JANG, S. S.; HIRSH, D. C. Enrofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs with urinary tract infections. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, 220, n. 2, p. 190-192, 2002.

CORREIA, C.; COSTA, E.; PERES, A.; ALVES, M.; POMBO, G.; ESTEVINHO, L. Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 20, p. 543-549, 2007.

CRANE, M. B. **Pyometra**. In: Silverstein DC, Hopper K, eds. Small Animal Critical Care Medicine. St. Louis, Missouri. Elsevier Saunders. 2009; p.607.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature reviews Microbiology**, London, v.8, p. 26-38, 2010.

DABROWSKI, R.; KOSTRO, K.; LISIECKA, U.; SZCZUBIAŁ, M.; KRAKOWSKI, L. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. **Theriogenology**, Stoneham, v.72, n.4, p.471-476, 2009.

DAVID, D. E.; LYNNE, A. M.; FOLEY S. L. Evaluation of Virulence Factor Profiling in the Characterization of Veterinary *Escherichia coli* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, V. 76, N. 22, p. 7509-7513, novembro, 2010.

DAM, T.; DAS, P. P. Potencial tool for the investigation of the gene transfer in Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.55, n.4, p. 479-480, 2006.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W.; CORYN, M. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: Should the two entities be disconnected. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 1509-1519, 2001.

DHAKAL, B. K.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 38, p.2-11. 2008.

DHALIWAL, G. K.; WRAY, C.; NOAKES, D. E. Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). **Veterinary Record**, London, v. 143, n. 22, p. 659-661, 1998.

DOW, C., Experimental reproduction of the cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal Pathology Bacteriology**, London, n. 78, p. 267-278, 1959.

EMŐDY, L.; KERÉNYI M, N. G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 29-33, outubro de 2003.

ENGLAND, G.; EGER, A.; CONCANNON, W. Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. **Recent Advances in Small Animal Reproduction International Reproductive Information**, Ithaca. 2003.

ENGLAND, G. C. W.; FREEMAN, S. L.; RUSSO, M. Treatment of spontaneous pyometra in 22 bitches with a combination of cabergoline and cloprostenol. **Veterinary Record**, London, v. 160, n. 9, p. 293-296, 2007.

ESCHERICH, T. The intestinal bacteria of the neonate and breastfed infant. **Reviews Infective Disease**, Chicago, v.13, p.352-356, 1889.

ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, 3.ed., Los Angeles: Editora Manole, 1992, 1678 p.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. "Urinary tract infections" **Textbook of Veterinary Internal Medicine**, 6<sup>a</sup> Ed., 1800-1808, 2005.

FALLON, R.; O'SULLIVAN, N.; MAHER, M.; CARROLL, C. Antimicrobial resistance of *coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 277-281, 2003.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex. In: Kersey, R. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3<sup>a</sup> ed. St. Louis: W. B. Saunders. 2004, p.852-867.

FÉRIA, C.; MACHADO, J.; CORREIA, J.D.; GONÇALVES, J.; GAASTRA, W. Distribution of papG alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v.202, p.205-208, 2001.

FILHO, J.C.B.S. **Pesquisa de bactérias e sua sensibilidade aos antimicrobianos em cães com piometra, com especial interesse na caracterização de *Escherichia coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC).** 69f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. UNIP/ São Paulo, 2008.

FRANCO, R. M. ***Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana.** 144f. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense/ Niterói, 2002.

FRANCO, R.M.; MANTILLA, S.P.S.; GOUVEIA, R.; OLIVEIRA, L.A.T. Ocorrência de *Escherichia coli* em suínos abatidos nos Estados de Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina utilizando diferentes metodologias de isolamento. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 103, p. 209-218, 2008.

FRANKLIN, A.; MÖRNER, A. P. Antibiotic sensitivity of bacterial isolates from urinary tract infections and metritis in dogs. **Compendium of Continuing Education Practice in Veterinary**, v. 18, n. 2, p. 96, 1996.

FRANSSON, B. **Systemic Inflammatory Response in Canine Pyometra - the response to bacterial uterine infection.** Doctoral thesis. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Small Animal Clinical Sciences, 2003.

FREITAG, T.; SQUIRES, R.A.; SCHMID, J.; ELLIOT, J. Feline uropathogenic *Escherichia coli* from Great Britain and New Zeland have dissimilar virulence factor genotypes. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v.106, p.79-86, 2005.

FUKUDA, S. Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. **Experimental animals**, Tokyo, v.50, n.4, p.325-329, 2001.

GHANBARPOUR, R.; Akhtardanesh B. Genotype and antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* strains involved in canine pyometra. **Comparative Clinical Pathology**, London , v. 21, n. 5, p. 737-744, outubro, 2012.

GILBERT, R. Diagnosis and treatment of pyometra in bitches and queens. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v.14, n.6, p.777-784, 1992.

GOMES, A. R.; MUNIYAPPA, L.; KRISHNAPPA, G.; SURYANARAYANA, V. V. S.; ISLOOR, S.; HUGAR, P. G.. Genotypic characterization of Avian *Escherichia coli* by random Amplification of Polymorphic DNA. International **Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 4, n.6, p. 378-381, 2005.

GORDON, D. M. Strain Typing and the Ecological Structure of *Escherichia coli*. **Journal of Aoac International**, Arlington, v.93, p. 974-984, 2010.

GROOTERS, A. M. Diseases of the ovaries and uterus. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Saunders manual of small animal practice**. 3° ed. [S.I.]: W.B. Saunders Company, 1994.1467 p.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London , v. 54, p. 321-332, 2004.

GUO, S.; BROUWERS, H J. M.; COBBOLD, R. N.; PLATELL, J. L.; CHAPMAN, T. A.; BARRS, V. R.; JOHNSON, J. R.; TROTT, D.J. Fluoroquinolone-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, including O25b-ST131, isolated from faeces of hospitalized dogs in an Australian veterinary referral centre. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 68, p. 1025-1031, 2013.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2004. p. 193-194.

HACKER, J.; KESTLER, H.; HOSCHUTZKY, H.; JANN, K.; LOTTSPEICH, F.; KORHONEN, T. K. Cloning and characterization of S fimbrial adhesion II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. **Infection and immunity**, Washington, v.61, p.544-550, 1993.

HADRYS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 1, p. 55-63. 1992.

HAGMAN, R.; KÜHN, I. *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1,2, p. 143-153, 2002.

HAGMAN, R.; GREKO, C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. **Veterinary Record**, London, v.157, n.7, p. 193-196, 2005.

HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; FRANSSON, B. A.; BERGSTRÖM, A.; HOLST, B. S.; LAGERSTEDT, A. S. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F<sub>2alpha</sub> metabolite analysis. **Theriogenology**, Stoneham, v.66, n.2, p. 198-206, 2006.

HAGMAN, R.; RONNBERG, E.; PEJLER, G. Canine uterine bacterial infection induces upregulation of proteolysis-related genes and downregulation of homeobox and zinc finger factors. **PLoS ONE**, San Francisco, v.4, n.11, 2009.

HAGMAN, R.; LAGERSTEDT, A.; HEDHAMMAR, A.; EGENVALL, A. A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. **Theriogenology**, Stoneham, V. 75, n. 7, p. 1251-1257, abril de 2011.

HAGMAN, R. Clinical and Molecular Characteristics of Pyometra in Female Dogs. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v.47, n. 6, p. 323-325, 2012.

HARADA, K.; OKADA, E.; SHIMIZU, T.; KATAOKA, Y.; SAWADA, T.; TAKAHASHI, T. Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* isolates: A comparative analysis between dogs and their owners in Japan. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, V. 35, n. 2, P. 139-144, março 2012.

HEDLUND, C. Piómetra. In: Fossum, T. **Cirugía em pequeños animales**. Buenos Aires: Inter-médica, 1999, p.588-593.

HIRSCH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. [S.I.]: Editora Guanabara Koogan S.A., 2003. 446 p.

HOPKINS, K. L.; HILTON, A. C. Optimization of random amplification of polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, V. 32, n. 3, p. 126-130, março 2001.

IKUNO, A. A. et al. Genes de virulência associados em *Escherichia coli* (APEC) isoladas de poedeiras comerciais, do meio ambiente e de água de dessentação de granjas de postura de ovos. **O Biológico**, São Paulo, v.68, 2006. Suplemento 2. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 9., 2006,

São Paulo. Resumo 132/026. Disponível em:  
[http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68\\_supl\\_raib/132.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/132.PDF)

ISHIGURO, K.; BABA E.; TORII, R.; TAMADA, H.; KAWATE, N.; HATOYA, S.; WIJEWARDANA, V.; KUMAGAI, D.; SUGIURA, K.; SAWADA, T.; INABA, T. Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased *Escherichia coli* adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus. **Veterinary Journal**, Londres, v.173, n.2, p.325-32, março 2007.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. 15. ed. [S.I.]: Editora Guanabara Koogan S.A., 1982. 568 p.

JOHNSON; J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 4, n.1, p 80-128, 1991.

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A. "Uropathogenic" *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary-tractextraintestinal infections. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 186, p. 859-864, 2002.

JOHNSON, J.R.; KASTER, N.; KUSKOWSKI, M.A.; LING, G.V. Identification of virulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.41, n.1, p.337-345, 2003.

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International journal of medical microbiology**, Stuttgart, v. 295, p. 383-404, 2005.

JOHNSON, J.R.; OWENS, K.; GAJEWSKI, A.; CLABOTS, C. *Escherichia coli* Colonization Patterns among Human Household Members and Pets, with Attention to Acute Urinary Tract Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.197, n. 2, p. 218 –24, janeiro 2008.

JOHNSON, C. A. Disorders of the vagina and uterus. In: NELSON, R.W.; COUTO, C. G. **Small Animal Internal Medicine**. 4<sup>a</sup> ed. St. Louis: Mosby Elsevier, p.911 –925, 2009.

JURKA, P.; MAX, A.; HAWRYŃSKA, K.; SNOCHOWSKI, M. Age-related pregnancy results and further examination of bitches after aglepristone treatment of pyometra. **Reproduction in domestic animals Zuchthygiene**, Berlin, v.45, n.3, p.525-529, 2010.

KALENSKI, A.; REINOLDES, A.; KITSIS, M.; FAUSTINO, M.; TALIB, S. M. F.; CORTOPASSI, S. R. G. Identificação das bactérias envolvidas na sepse grave de fêmeas caninas com piometra submetidas a ováriohisterectomia terapêutica. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 130-138, 2012.

KANUNGO, S. A simplified analysis different *Escherichia coli* strains by using RAPD technique. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Roménia, v.37, n.2, p. 257-60, 2009.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, London, v.2, p.123–140, 2004.

KELLER, R.; ORDOÑES, J. G.; DE OLIVEIRA, R.R.; TRABULSI, L.R.; BALDWIN, T. J.; KNUTTON, S. Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, Washington, v. 70, n.5, p. 2681-2689, 2002.

KIDA, K.; MAEZONO, Y.; KAWATE, N.; INABA, T.; HATOYA, S.; TAMADA, H. Epidermal growth factor, transforming growth factor-a, and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycle and in bitches with pyometra. **Theriogenology**, Stoneham, v.73, n.1, p. 1-12. Outubro 2009.

KREKELER, N.; MARENDA, M.S.; BROWNING, G.F.; HOLDEN, K.M.; CHARLES, J.A.; WRIGHT, P.J. Uropathogenic virulence factor FimH facilitates binding of uteropathogenic *Escherichia coli* to canine endometrium. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 35, n.5, p. 461-467, setembro 2012.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, n.1, p.107-117, 2000.

KUMAR, A.; ROBERTS, D.; WOOD, K. E.; LIGHT, B.; PARRILLO, J. E.; SHARMA, S.; SUPPES, R.; FEINSTEIN, D.; ZANOTTI, S.; TAIBERG, L.; GURKA, D.; KUMAR, A.; CHEANG, M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Critical Care Medicine**, New York, v. 34, n. 6, p. 1589-1596, 2006.

KÜPLÜLÜ, S.; VURAL, M. R.; DEMIREL, A.; POLAT, M.; AKÇAY, A. The comparative evaluation of serum biochemical, haematological, bacteriological and clinical findings of dead and recovered bitches with pyometra in the postoperative process. **Acta Veterinaria**, Beograd, v.59, n.2, p.193-204, 2009.

KUSTRITZ, M. V. Cystic endometrial hyperplasia and pyometra. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman, **Texbook of Veterinary Internal Medicine - Diseases of the Dog and Cat**, 6<sup>a</sup> ed., Elsevier Saunders, 2005, p.1676-1680.

LARA, V. M.; DONADELI, M. P.; CRUZ, F. S. F.; CARREGARO, A. B. Multirresistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cadelas com piometra. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.4, p.1032-1034, 2008.

LAUTROP, H.; ORSKOV, I.; GAARSLEV, K. Hydrogen sulphide producing variants of *Escherichia coli*. **Acta Pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v.79, p.641-650, 1971.

LAYNE, P.; HU, A.S; BALOWS, A.; DAVIS, B.R. Extrachromosomal nature of hydrogen sulfide production in *Escherichia coli*. **Journal Bacteriology**, Washington, v.106, n.3, p.1029-1030, 1971.

LEITNER, M.; AURICH, J. E.; GALABOVA, J. E.; AURICH, C.; WALTER, I. Lectin binding patterns in normal canine endometrium and in bitch with pyometra and cystic endometrial hyperplasia. **Histological Histopathology**, Murcia, v.18, n.3, p.787-795, 2003.

LÉVEILLÉ, S.; CAZA, M.; JOHNSON, J.R.; CLABOTS, C.; SABRI, M.; DOZOIS, C.M. Ilha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed *in vivo* in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. **Infection and immunity**, Washington, v.74, p. 3427-3436, 2006.

LEVY, C. E. Detecção e identificação bactérias de importância médica. In: LEVY, C. E. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, Módulo V. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, 2004. 93 p.

LLOYD, A. L.; RASKO, D. A.; MOBLEY, H. L. T. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.189, n.9, p. 3532-3546. 2007.

MAKSIMOVIC, A.; MAKSIMOVIC, Z.; FILIPOVIC, S.; BESIROVIC, H.; RIFATBEGOVIC, M. Vaginal and uterine bacteria of healthy bitches during different stages of their reproductive cycle. **Veterinary Record**, London, v. 171, n.15, 2012.

MARTINS, D. G. Complexo hiperplasia endometrial cística/piometra: fisiopatogenia, características clínicas, laboratoriais e abordagem terapêutica. Jaboticabal. Unesp-Jaboticabal, 2007.

MCKELLAR, Q. A. Clinical relevance of the pharmacologic properties of fluorquinolones. **Compendium of Continuing Education Practice in Veterinary**, v. 18, n. 2, p. 14-20, 1996.

MELO, R. T.; GUIMARÃES, A. R., MENDONÇA, E. P.; COELHO, L. R.; MONTEIRO, G.P.; FONSECA, B. B.; ROSSI, D. A. Identificação sorológica e relação filogenética de *Salmonella* spp. de origem suína. **Pesquisa veterinária brasileira**, Rio de Janeiro, v.31, n.12, p.1039-1044, dezembro 2011.

MELO, R. T.; NALEVAIKO, P. C.; MENDONÇA, E. P.; BORGES, L. W.; FONSECA, B. B.; BELETTI, M. E.; ROSSI, D. A. Campylobacter jejuni strains isolated from chicken meat harbor several virulence factors and represent a potential risk to humans. **Food Control**, Vurrey, v.33, p. 227-231, 2013.

MORATO, E.P.; LEOMIL, L.; BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; MOURA, R.A.; CASTRO, A.F.P. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* Types. **Zoonoses Public Health**, Berlin, v. 56, p. 229-237, 2008.

MULVEY, M.A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cellular microbiology**, Oxford, v.4, n.5, p.257-271, 2002.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Medical microbiology**. 3.ed. [S.I.]: Mosby, 1998. 719 p.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth informational supplement**. NCCLS M100-S12, v. 22, n. 1, Wayne, 2002.

NAVANEETHAN, U.; RALPH, A.G.; Mechanisms of infectious diarrhea. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, London, v.5, p.637-647. Novembro, 2008.

NISKANEN, M.; THRUSFIELD, M. V. Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. **Veterinary Record**, London, v.143, n.18, p.493-498, 1998.

NORMAND, E. H.; GIBSON, N. R.; TAYLOR, D. J.; CARMICHAEL, S.; REID, S. W. J. Trends of antimicrobial resistance in bacterial isolates from a small animal referral hospital. **Veterinary Record**, London, v. 146, n. 6, p. 151-155, 2000.

OLSON, P. N.; MAT HER, E. C. Canine vaginal and uterine bacterial flora. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.172, p.708–711, 1978.

OLUOCH, A. O.; KIM, C. H.; WIESIGER, R. M.; KOO, H. Y.; SIEGEL, A. M.; CAMPBELL, K. L.; BURKE, T. J.; MCKIERNAN, B. C.; KAKOMA, I. Nonenteric *Escherichia coli* isolates from dogs: 674 cases (1990-1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 218, n. 3, p. 381-384, 2001.

PELANDER, L.; HAGMAN, R.; HÄGGSTRÖM, J. Concentrations of cardiac Troponin I before and after ovariohysterectomy in 46 female dogs with pyometra. **Acta Pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v.50, n.1, p.35, 2008.

PEREIRA, A. D. R. V. C. **Antibioresistência em piômetra canina**. 67f. Mestrado integrado em Medicina Veterinária - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 2011.

PERRY, C. A.; HAJNA, A. A. Further evaluation of EC medium for the isolation of coliform bacteria and *Escherichia coli*. American. **Journal of public health**, Oxford, v.34, p.735-738, 1944.

PLUMB, D. C. **Veterinary drug handbook**. Iowa State University Press,. V.44, n.4, p. 238-241, 1999

POMBA, C.; FONSECA, J. D.; BAPTISTA, B. C.; CORREIA, J.D. Detection of the Pandemic O25-ST131 Human Virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-Producing Clone Harboring the qnrB2 and aac(6)-lb-cr Genes in a Dog. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Washington, v.53, n.1, p. 327-328, janeiro 2009.

POOLE, K. Efflux-mediated multirresistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v.10, n.1, p. 12-26, 2004.

PRADHAN, R. C.; BARIK, A. K.; RAY, S. D.; MISHRA, P. R. Antibiogram of uterine microflora in bitches with endometritis – Pyometra complex. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 76, n. 11, p. 982-985, 2000.

PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n.3, p. 359-363, 2008.

PURSWELL, B. Pyometra and Cystic Endometrial Hyperplasia. In: LEIB, M.S.; MONROE, W.E. **Practical Small Animal Internal Medicine**. Philadelphia, USA: W.B. Saunders, 1997. p.422-426.

REGUA-MANGIA, A. H.; BEZERRA, R.M.P.; ESPARIS, C.M.; TEIXEIRA, L.M. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 38, n. 1, p. 27-34, janeiro 2009.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S. et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, p.724-731, 2006.

RIPPERE-LAMPE, K.E.; O'BRIEN, D.; CONRAN, R.; LOCKMAN, H.A. Mutation of gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, Washington, v.69, n.6, p.3954-3964, junho 2001.

ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E.L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **Journal of gastroenterology and hepatology**, Melbourne, v. 17, p. 467-475, 2002.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; FAKHR, M.K.; NOLAN, L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, Inglaterra, v.151, p.2097-2110, 2005.

SAHILA, A. M.; AUDREY, L. Y. Y.; ONG, S. L.; WAN SAKEENAH, W. N.; SAFIYYAH, S.; NORRAKIAH, A. S.; AMINAH, A.; AHMAD AZUHAIRI, A. DNA profiling among egg and beef meat isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR) and random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR). **International Food Research Journal**, v. 17, p. 853-866, 2010.

SALEHI, T. Z.; MADANI, S.A.; KARIMI, V.; KHAZAEI, F. A.. Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 494-497, 2008.

SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTÖ, A-K. Pathogenesis of canine pyometra. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 167, n. 11, p. 1006-1010, 1975.

SAYLERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: A Molecular Approach.** 2<sup>a</sup>ed. Washington: ASM Press, 2002. p. 205-212.

SCHEUTZ, F.; STOCKBINE, N.; GENUS, I. **Escherichia Castellani and Chalmers 1919, 941TAL** In: Bergey's Manual of systematic bacteriology. Second edition, volume two. Garrity GM, Ed., Bergey's Manual Trust USA 2005, p. 607-624.

SCHLAFFER, D. H.; GIFFORD, A. T. Cystic endometrial hyperplasia, pseudoplatental endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, n.3, p.349-358, 2008.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 14, 2004.

SHAHEEN, B. W.; OYARZABAL, O. A.; BOOTHE, D. M. The role of class 1 and 2 integrons in mediating antimicrobial resistance among canine and feline clinical *E. coli* isolates from the US. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.144, n.3, p.363-370, 2008.

SIQUEIRA, A. K. **Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção de trato urinário, piometra e fezes de cães.** 111f. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO, M. G.; SALERMO, T.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, M. D.; PRESTES, N. C.; SILVA, A. V. Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piômetra e de fezes de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.5, p.1263-1266. 2008.

SMITH, F.O. Canine pyometra. **J. Theorig.**, v.66, p.610-612, 2006.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, p. 134-163, 2007.

SMITH, Y. C.; RASMUSSEN, S. B.; GRANDE, K. K.; CONRAN, R. M.; O'BRIEN, A. D. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.76, p. 2978-2990. 2008.

SORRIBAS, C. E. **Manual de emergências e afecções freqüentes do aparelho reprodutor em cães**. São Paulo: Medvet, 2009. p. 16- 24.

SOTO, S. M.; SMITHSON, A.; MARTINEZ, J. A.; HORCAJADA, J. P.; MENSA, J.; VILA, J. Biofilm formation in Uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. **Journal of urology**, Baltimore, v.177, n.1, p.365-368. 2007.

SOUSA, C.P. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.12, n.3, p.363-373, 2006.

SOUZA, C.A.I.; SCARCELLI, E. Agressão por microorganismos da microbiota endógena. **Arquivos do Instituto o Biológico**, São Paulo, v.67, n.2, p. 275-281, 2000.

STELLA, A.E.; RIGOBELO, E.C.; OLIVEIRA, A.C.; MALUTA, R.P.; MARIN, J.M.; ÁVILA, F.A. Ocorrência e Sensibilidade Microbiana em Cepas de *Escherichia coli* Enteropatogênicas isoladas de Propriedades Leiteiras na Região de Ribeirão Preto-SP, **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v.15, n.1, p.66-74, abril 2008.

STENSKE, K. A.; JOE BARTGES, F. A.; DRAUGHON, D. A. Prevalence of urovirulence genes cnf, hlyD, sfa/foc, and papGIII in fecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.70, n.11 p.1401-1406, 2009.

TALBOT, G.H.; BRADLEY, J.; EDWARDS JR., J.E.; GILBERT, D.; SCHELD, M.; BARTLET, J.G. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v.42, p.657-668, 2006.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature reviews Microbiology**, London, v. 8, p.207-217, 2010.

TIBA, M.R. **Determinação genotípica dos fatores de virulência em amostras de Escherichia coli isoladas de cistites**. 72f. Dissertação Mestrado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004.

TOLOSA E.M.C.; RODRIGUES C.J.; BEHMER O.A.; FREITAS-NETO A.G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 2003, p.331.

TONOVER, F. C. Mechanism of antimicrobial resistance in bactéria. **American journal of medicine**, New York, v. 119, p 3-19, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TRAMUTA, C.; NUCERA, D.; ROBINO, P.; SALVARANI, S.; NEBBIA, P. Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. **Journal of veterinary science**, Suwon, v.12, n.1, p.49-55, 2011.

TSUMAGARI, S.; ISHINAZAKA, T.; KAMATA, H.; OHBA, S.; TANAKA, S.; ISHII, M. Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.87, n.3, p.301-308, 2005.

VEJBORG, R. M.; FRIIS, C.; HANCOCK, V.; SCHEMBRI, M. A.; KLEMM, P. A virulent parent with probiotic progeny: comparative genomics of *Escherichia coli* strains CFT073, Nissle 1917 and ABU 83972. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.283, p.469-484, 2010.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, n.3, p.364-374, 2008.

VOGEL, L.; OORSCHOT, E. VAN; MAAS, H. M. E.; MINDERHOUD, B.; DIJKSHOORN, L.. Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, robototyping and serotyping. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v.6, p. 82-87. 2000.

VON SYDOW, DEL, G. A. C. M. **Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes.** 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

WADAS, B.; KÜHN, I.; LAGERSTEDT, A-S.; JONSSON, P. Biochemical phenotypes of *Escherichia coli* in dogs: Comparison of isolates from bitches suffering from pyometra and urinary tract infection with isolates from faeces of healthy dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 52, n. 3-4, p. 293-300, 1996.

WATTS, J. R.; WRIGHT, P. J.; WHITHEAR, K. C. Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 37, p. 54-60, 1996.

WHEATON, L. G.; JOHNSON, A. L.; PARKER, A. J.; KNELLER, S. K. Results and complications of surgical treatment of pyometra: a review of 80 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v.25, p.563-568, 1989.

WHITE, D. G.; ZHAO. S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D. D.; McDERMOTT, P. F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infection**, Paris, v.4, p.405-412, 2002.

WHITEHEAD, M. L. Risk of pyometra in bitches treated for mismating with low doses of oestradiol benzoate. **Veterinary Record**, London, v.162, n. 23, p.746-749, 2008.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and molecular pathology**, New York, v. 85, p. 11-19, 2008.

WULLT, B.; BERGSTEN, G.; SAMUELSSON, M.; GEBRETSADIK, N.; HULL, R.; SVANBORG, C. The role of P fimbriae for colonization and host response induction in the human urinary tract. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 183, n. 1, p. 43-46, 2001.

YAMAMOTO, K.; HIRAO, K.; OSHIMA, T.; AIBA, H.; UTSUMI, R. Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 280, p.1448-1456, 2005.

YATES, D. G. The antimicrobial sensitivity of bacteria isolated from 30 cases of pyometra in the bitch. **Veterinary Journal**, v. 49, n. 12 p. 709-710, 1996.