JENNIFER ANNE COGGAN

**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**

São Paulo

2005

JENNIFER ANNE COGGAN

**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**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1544
FMVZ

Coggan, Jennifer Anne

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 / Jennifer Anne Coggan. – São Paulo : J. A. Coggan, 2005.
156 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Piometra animal. 2. *Escherichia coli*. 3. Fatores de virulência.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino e histopatológico de útero de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas das *E. coli* isoladas e o potencial risco à saúde humana", Protocolo nº 174/2002, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sendo aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Microbiological study of uterine contents and histopathological of the uterus of bitches with pyometra and study of virulence factors of the *E. coli* isolated and the potencial risk to human health" protocol number 174/2002, under the responsibility of Prof.Dr. Nilso Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "*ad referendum*" meeting.)

São Paulo, 01 de julho de 2002

Prof^a Dr^a
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: COGGAN, Jennifer Anne

Título: 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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, John e Vicki, pelo imenso amor que sempre me deram e por acreditarem em mim e em meus ideais sempre me apoiando. Amo vocês!

Ao meu namorado e eterno companheiro, Douglas, por sempre me entender, me dar forças para atingir meus objetivos, e acima de tudo por me amar e estar ao meu lado nas horas boas e ruins. Você pra mim é um exemplo de bondade, espero te fazer muito feliz. Te amo!

A minha avó, Granny Pam, que sempre acreditou em mim mas que infelizmente hoje não está aqui para ver meu progresso.

Aos meus irmãos, Hayley e Jamie, que sempre acreditam em mim, me apóiam e me respeitam.

A todos os amigos e companheiros que dividem comigo minhas vitórias e minhas derrotas.

A todas as pessoas que de alguma forma tentam fazer desse mundo um lugar melhor para se viver.

Aos animais, que sem eles a vida teria menos graciosidade e pureza, e que são um eterno estímulo para mim.

AGRADECIMENTOS

Chega ao fim uma etapa muito importante da minha vida, e para chegar até aqui contei com o apoio de muitas pessoas que acreditaram em mim, me deram forças para concluir esse projeto e me ensinaram não só informações importantes para realizar esse trabalho, mas também formas novas de encarar o mundo e superar obstáculos que irei enfrentar no futuro. Para todas essas pessoas, muito obrigado!

A conclusão dessa dissertação de mestrado me trouxe muito mais que conhecimento. Aprendi muito durante esse período, e convivi com pessoas incríveis, de muita generosidade e apesar das dificuldades que enfrentei só tenho um saldo positivo.

Agradeço imensamente meu orientador Prof. Dr. Nilson Roberti Benites e a Dra. Priscilla Anne Melville que me apoiaram e me deram forças e a oportunidade de realizar esse trabalho. A generosidade dessas duas pessoas é um exemplo a ser seguido, e me sinto privilegiada por ter conhecido e convivido com elas.

Agradeço a Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira e ao Marcelo Faustino do Departamento de Obstetrícia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, que me deram a oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Andréa Moreno que me possibilitou realizar uma boa parte de meu trabalho com seu auxílio e orientação. Aproveito para agradecer minha grande amiga Renata Paixão, que me ajudou muito e que sem seus conhecimentos não seria possível realizar meu trabalho.

Agradeço à FAPESP por financiar meu projeto e à CAPES por ter me apoiado financeiramente durante um ano e meio, possibilitando a conclusão desse trabalho.

Agradeço muito aos meus colegas de pós-graduação que sempre me apoiaram e me incentivaram durante essa etapa, citando principalmente a Anna Catharina, Felício, Josana, Leslie, Luis Ivan, Miriam, Mônica, Roberto e Simone. Aos colegas estagiários do laboratório, Clarice e Sonia.

A todos os funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pois sem sua ajuda não seria possível realizar esse estudo.

Aos animais, pelo seu amor incondicional que só embeleza minha vida.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram e não estou citando individualmente.

*"Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,
portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e
principalmente viver"*

Dalai Lama

RESUMO

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.** [Microbiological study of intrauterine contents and histopathology of uterus of bitches with pyometra and research of virulence factors in *E.coli* isolates and the potential risk to human health]. 2005. 156 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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. 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. A piometra é uma das condições patológicas mais comuns que acomete o trato genital dos cães. A bactéria mais freqüentemente isolada do conteúdo uterino de cadelas com piometra é *Escherichia coli*. Algumas cepas de *E.coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e/ou animais. No homem, o microrganismo tem sido associado a severos distúrbios gastrintestinais, além de infecções extra-intestinais, com referência especial às infecções urinárias, meningites do recém-nascido e septicemias. Para a realização deste trabalho foi realizado o isolamento microbiológico das bactérias presentes no conteúdo intra-uterino de 100 cadelas com piometra, a contagem de unidades formadoras de colônias por ml, antibiograma das bactérias isoladas, exame histopatológico do útero, e pesquisa de fatores de virulência nos isolados de *E.coli*. O trabalho foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e as amostras coletadas de animais submetidos à cirurgia de ovário-salpingo-histerectomia no Setor de Obstetrícia do Hospital Veterinário. O presente estudo confirmou a ocorrência da *Escherichia coli* como sendo o

principal agente envolvido na piometra em cadelas, bem como permitiu verificar a presença de fatores de virulência nas cepas isoladas. Estatisticamente quanto maior o número de unidades formadoras de colônias/ml, maior a intensidade do processo inflamatório. Observou-se uma maior sensibilidade de *E.coli* aos antimicrobianos norfloxacin, polimixina B, sulfazotrin, cloranfenicol, enrofloxacin, e gentamicina e uma maior resistência aos antimicrobianos cefalotina e ampicilina. Nas cepas isoladas de bactérias Gram negativas houve maior sensibilidade aos antimicrobianos norfloxacin e polimixina B e maior resistência aos antimicrobianos ampicilina, cefalotina, cefoxitina, cefalexina, e tetraciclina. Nas cepas isoladas de bactérias Gram positivas houve maior sensibilidade aos antimicrobianos vancomicina, cefalexina, norfloxacin, sulfazotrin, gentamicina, e polimixina B e maior resistência aos antimicrobianos penicilina, oxacilina e ampicilina. Foram identificados fatores de virulência em 98,0% das cepas de *Escherichia coli* avaliadas, demonstrando uma alta frequência de *E.coli* potencialmente patogênica.

Palavras-chaves: Piometra animal. *Escherichia coli*. Fatores de virulência.

ABSTRACT

COGGAN, J. A. **Microbiological study of intrauterine contents and histopathology of uterus of bitches with pyometra and research of virulence factors in *E.coli* isolates and the potential risk to human health.** [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. 156 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Canine pyometra, also known as cystic endometrial hyperplasia complex, is a disease of the adult dog characterized by the inflammation of the uterus with accumulation of purulent discharge, that occurs in the luteus phase of the estrus cycle and that can affect various systems of the organism. It occurs in result of hormone alterations and generally is associated with bacterial infections. The incidence of pyometra in the bitch is high, being the disease recognized as one of the most common illness occurring in this animal species and one of the most common cause of death. Pyometra is one of the main pathological condition that affects the genital tract in dogs. The bacterial species most frequently isolated from the uterine contents of dogs with pyometra is *Escherichia coli*. Some strains of *E.coli* are proven to be pathogenic for the man and/or animals. In man, the microorganism has been associated with severe gastrointestinal diseases, as well as extra-intestinal diseases, with special reference to the bladder infections, septicemias and neonatal meningitis. This study consisted of microbiological isolation of the bacteria from the intrauterine contents of 100 dogs with pyometra, the counting of number of units forming colonies in 1ml, antibiogram of the isolated bacteria, histologic examination of the uterus, and research of virulence factors in the *E.coli* strains. The study was carried out in the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia of the Universidade de São Paulo, and the samples obtained from the animals submitted to surgery of ovariohysterectomy in the Sector of Obstetrics of the Veterinarian Hospital. The present study confirmed the occurrence of *Escherichia coli* as being the main

agent involved in pyometra in bitches, as well as verified the presence of virulence factors in the strains isolated. Statistically the bigger the number of unit forming colonies/ml the greater the intensity of the inflammatory process. One observed more sensitivity of *E.coli* to the antimicrobial substances norfloxacin, polymixin B, sulfazotrin, chloranfenicol, enrofloxacin, and gentamicin and more resistance to the antimicrobial substances cefalotin and ampicilin. In the strains of Gram negative bacteria there was more sensitivity to the antimicrobial substances norfloxacin and polymixin B and a greater resistance to the antimicrobial substances ampicilin, cefalotin, cefoxitin, cefalexin, and tetracilin. In the strains isolated of Gram positive bacteria there was a greater sensitivity to the antimicrobial substances vancomycin, cefalexin, norfloxacin, sulfazotrin, gentamicin, and polymixin B and a greater resistance to the antimicrobial substances penicillin, oxacilin and ampicilin. Virulence factors were identified in 98,0% of the strains of *Escherichia coli* evaluated, demonstrating a high frequency of potentially pathogenic *E.coli*.

Key words: Animal pyometra. *Escherichia coli*. Virulence factors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interpretação dos escores correspondentes às áreas ocupadas pelos processos inflamatórios. São Paulo, 2004.....	88
Tabela 2 - “Primers” utilizados na PCR para amplificar fragmentos de diferentes genes para enterotoxinas (LT, STa e STb) e vero citotoxinas (VT1, VT2 e VT2e), e de diferentes genes para <i>pap</i> , <i>sfa</i> , <i>afa</i> , <i>hly</i> , <i>iuc</i> e <i>cnf1</i> . São Paulo, 2004.....	92
Tabela 3 – Frequências de resistência e sensibilidade de cepas de <i>E.coli</i> isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra frente a diversos antimicrobianos. São Paulo, 2004.....	102
Tabela 4 - Frequências de resistência e sensibilidade de cepas de bactérias Gram negativas (exceto <i>E.coli</i>) isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra frente a diversos antimicrobianos. São Paulo, 2004.....	105
Tabela 5 - Frequências de resistência e sensibilidade de cepas de bactérias Gram positivas isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra frente a diversos antimicrobianos. São Paulo, 2004.....	108

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1	ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO ÚTERO.....	35
3.2	BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA PIOMETRA.....	36
3.2.1	<i>Enterobacteriaceae</i>	39
3.2.1.1	<i>Escherichia coli</i>	40
3.2.1.1.1	<i>ETEC</i>	44
3.2.1.1.2	<i>EPEC</i>	47
3.2.1.1.3	<i>EIEC</i>	49
3.2.1.1.4	<i>EHEC</i>	50
3.2.1.1.5	<i>UPEC</i>	54
3.2.1.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64
3.2.1.3	<i>Salmonella</i>	65
3.2.1.4	<i>Proteus</i>	67
3.2.1.5	<i>Morganella morganii</i>	68
3.2.1.6	<i>Citrobacter</i>	68
3.2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
3.2.3	<i>Staphylococcus</i>	70
3.2.3.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	72
3.2.3.2	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	72
3.2.3.3	<i>Staphylococcus intermedius</i>	73

3.2.3.4	<i>Staphylococcus caprae</i>	73
3.2.4	<i>Streptococcus</i>	74
3.2.4.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	75
3.2.4.2	<i>Streptococcus canis</i>	75
3.2.5	<i>Enterococcus faecium</i>	76
3.2.6	<i>Corynebacterium</i>	76
3.3	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	77
3.3.1	Bactérias Gram negativas	79
3.3.2	Bactérias Gram positivas	81
4	MATERIAIS E MÉTODOS	84
4.1	COLHEITA DO MATERIAL.....	84
4.2.	AVALIAÇÃO DO <i>STATUS</i> MICROBIOLÓGICO DE AMOSTRAS DE CONTEÚDO UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA.....	85
4.3	CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICRORGANISMOS EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA.....	86
4.4	TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE “IN VITRO” DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.....	86
4.5	EXAMES HISTOPATOLÓGICOS DE FRAGMENTOS DE ÚTERO DE CADELAS COM PIOMETRA.....	87
4.6	ESTUDO DA PRESENÇA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLADAS DO CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	88
4.6.1	Extração do DNA bacteriano	89

4.6.2	Reação em cadeia da polimerase.....	90
4.6.3	Deteção do produto amplificado.....	91
4.7	ESTATÍSTICA.....	93
5	RESULTADOS.....	95
5.1	AVALIAÇÃO DO <i>STATUS</i> MICROBIOLÓGICO DE AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA.....	95
5.2	CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICROORGANISMOS EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA.....	97
5.3	TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE “IN VITRO” DOS MICROORGANISMOS ISOLADOS FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.....	99
5.4	EXAMES HISTOPATOLÓGICOS DE FRAGMENTOS DE ÚTERO DE CADELAS COM PIOMETRA.....	109
5.5	ESTUDO DA PRESENÇA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLADAS DO CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	110
5.6	CORRELAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NOS FRAGMENTOS DE ÚTERO COM OS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	111
6	DISCUSSÃO.....	114
7	CONCLUSÕES.....	137
	REFERÊNCIAS.....	140

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. 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. A piometra é uma das condições patológicas mais comuns que acomete o trato genital dos cães. Durante um período de aproximadamente dois meses após a ovulação, a concentração plasmática de progesterona aumenta. Durante este período a progesterona promove o crescimento endometrial e a secreção glandular enquanto impede a atividade do miométrio, assim permitindo o acúmulo de secreção das glândulas uterinas. Essa secreção constitui um excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano. O crescimento bacteriano também é facilitado pela inibição da resposta leucocitária em infecções devido à ação de progesterona.

A bactéria mais frequentemente isolada do conteúdo uterino de cadelas com piometra é *Escherichia coli*. Algumas cepas de *E.coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e/ou animais. No homem, o microrganismo tem sido associado a severos distúrbios gastrintestinais, além de infecções extra-intestinais, com referência especial às infecções urinárias, meningites do recém-nascido e septicemias. A maior parte das infecções (com exceção da meningite neonatal e da gastroenterite) é endógena. Ou seja, a flora microbiana normal da pessoa é capaz de causar infecção quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas. Cães e gatos podem ter um papel importante na transmissão como vetores de *E.coli* para outros animais e para o humano. Diversos estudos indicaram que a transmissão, de

clones de *E.coli* uropatogênicas similares aos clones fecais, entre humanos, cães e gatos já ocorreu e pode ocorrer novamente.

A infecção bacteriana na piometra é um problema secundário, mas presente na maior parte dos casos de piometra. A cérvix pode estar aberta ou fechada, sendo que a primeira situação ocorre na maior parte dos casos em alguma fase da doença, tornando a secreção proveniente do útero pela cérvix, uma grande fonte de infecção ao homem. A piometra pode persistir por um mês ou mais e, se o útero não for retirado, podem ocorrer recidivas de patologia nos cios subseqüentes, o que acaba tornando o animal doente uma fonte constante de infecção particularmente ao homem que convive tão proximamente ao cão.

Tendo em vista a importância da piometra em cadelas, por ser a doença uma das causas mais importantes de óbito na espécie, bem como por esta patologia representar potencial risco à saúde pública pelo fato da secreção vaginal de cadelas doentes constituir fonte de infecção para o homem, foi delineado o presente trabalho no qual proceder-se-á ao estudo mais detalhado da patologia através do estudo microbiológico de conteúdo uterino de cadelas com piometra, bem como à avaliação das lesões presentes no útero devidas a cada microrganismo isolado realizando-se ainda a quantificação de microrganismos presentes em cada quadro e pesquisa de fatores de virulência de cepas de *E.coli* isoladas, (microrganismo que, segundo a literatura é o que apresenta maior prevalência nesta patologia) que possam representar potencial risco à saúde humana.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar o *status* microbiológico de amostras de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra;
- Proceder à contagem de unidades formadoras de colônias em conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra;
- Avaliar a susceptibilidade “in vitro” frente aos antimicrobianos das bactérias isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra;
- Realizar exames histopatológicos de fragmentos de útero de cadelas com piometra para verificar a intensidade do processo inflamatório;
- Estudar a presença de fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas do conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra utilizando a reação em cadeia da polimerase;
- Correlacionar as alterações histopatológicas nos fragmentos de útero com os resultados microbiológicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

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 (HIDLAGO; COHEN; MÉNDEZ, 1986; ROBERTS, 1956). Ocorre em decorrência de alterações hormonais e geralmente está associada a infecções bacterianas (GROOTERS, 1994; HIDALGO; COHEN; MÉNDEZ, 1986; THRELFALL, 1995).

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 (ARTHUR, 1964; ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982; HAGMAN; KÜHN, 2002). A piometra é uma das condições patológicas mais comuns que acomete o trato genital dos cães (ROBERTS, 1956).

Esse distúrbio caracterizado por uma hiperplasia glandular cística do endométrio, com acúmulo de pus na cavidade uterina, ocorre com muita frequência em cadelas de meia-idade e idosas. A causa ainda é obscura, mas sugeriu-se que se deva à excessiva estimulação hormonal do útero, seja por compostos progestacionais ou estrogênicos (CHRISTIANSEN, 1988; ROBERTS, 1956).

A patência da cérvix (piometra aberta ou fechada) tem importante influência na severidade da doença, no seu prognóstico, e nas opções de tratamento que podem ser empregadas (GROOTERS, 1994).

A inflamação é de natureza supurativa e, se a cérvix fecha, o pus fica acumulado dentro da cavidade uterina (CRAIG, 1937).

O distúrbio 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 6 anos, e mais comumente em cadelas nulíparas (ARTHUR, 1964; CHRISTIANSEN, 1988; CRAIG, 1937; DERIVAUX; BARNABE, 1976, ROBERTS, 1956; SANDHOLM; VASENIUS; KIVISTÖ, 1975). Allen (1995) observou a mesma frequência de piometra em cadelas nulíparas e pluríparas. Niskanen e Thrusfield (1998) relataram o resultado de uma pesquisa com cadelas entre nove meses e dezoito anos de idade. Concluíram que cadelas nulíparas tinham um risco moderadamente maior em desenvolver piometra do que primíparas e pluríparas.

Segundo Nelson e Feldman (1986), a piometra na cadela é mediada por uma desordem hormonal diestral. A doença resultaria de uma interação bacteriana com um endométrio que passou por mudanças patológicas de uma estimulação prolongada ou repetida por progesterona (DERIVAUX; BARNABE, 1976; GANDOTRA et al., 1994; GROOTERS, 1994; HIDALGO; COHEN; MÉNDEZ, 1986; THRELFALL, 1995). A concentração plasmática de progesterona na cadela em anestro é da ordem de 0,5 ng/ml. Durante um período de aproximadamente dois meses após a ovulação, a concentração plasmática de progesterona aumenta (GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986), e muitas vezes excede 40 ng/ml. Durante este período a progesterona promove o crescimento endometrial e a secreção glandular enquanto impede a atividade do miométrio, assim permitindo o acúmulo de secreção das glândulas uterinas. Essa secreção constitui um excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano. O crescimento bacteriano também é facilitado pela inibição da resposta leucocitária em infecções devido à ação de progesterona (GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986; THRELFALL, 1995).

A hiperplasia endometrial induzida por progesterona geralmente precede o desenvolvimento da piometra (GROOTERS, 1994; HIDALGO; COHEN; MÉNDEZ, 1986; NELSON; FELDMAN, 1986). O aumento da parede do endométrio é causado por um aumento no tamanho e quantidade de glândulas endometriais, que podem mostrar atividade secretória. O estroma torna-se edemaciado, e uma infiltração celular inflamatória se torna presente. Ocasionalmente, a secreção endometrial glandular resulta em um acúmulo de fluido fino ou viscoso no lúmen do útero. Esse útero repleto de fluido é conhecido como hidrometra ou mucometra. Essas condições são tipicamente estéreis (NELSON; FELDMAN, 1986).

A infecção bacteriana é uma condição secundária (ARTHUR, 1964; DERIVAUX; BARNABE, 1976; HIDALGO; COHEN; MÉNDEZ, 1986; NELSON; FELDMAN, 1986). Bactérias da vagina são a mais provável fonte para a infecção uterina (NELSON; FELDMAN, 1986). Essas bactérias ascendem pela cérvix e para dentro do útero durante o estro. A predominância de *Escherichia coli* nas infecções uterinas pode ser devida à habilidade deste microrganismo em aderir a sítios antigênicos específicos no endométrio estimulado por progesterona e no miométrio (GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986).

A vagina apresenta uma flora bacteriana normal residente. Durante o estro, a cérvix relaxa e estas bactérias são capazes de entrar no útero. Geralmente o mecanismo de defesa do útero é capaz de eliminar estas bactérias. Entretanto, se bactérias penetrarem no útero, as concentrações elevadas de progesterona neste período podem reduzir a velocidade da resposta inflamatória (ALLEN, 1995).

As fêmeas com hiperplasia cística endometrial, parecem incapazes de eliminar bactérias que podem sobreviver no fluido cístico. O microrganismo geralmente isolado nestes casos é a *Escherichia coli* (ALLEN, 1995).

De Bosschere, Ducatelle e Tshkala (2003) observaram através da indução de piometra em cadelas normais, que a hiperplasia endometrial cística não é um pré-requisito para o desenvolvimento da piometra, pois conseguiram induzir a infecção uterina durante o metaestro normal inoculando *E.coli* no útero.

A administração de progestágenos sintéticos bem como a progesterona endógena, podem predispor à piometra, causando hiperplasia endometrial cística e diminuindo a resistência do endométrio à invasão bacteriana (ALLEN, 1995; GROOTERS, 1994). A administração de estrógenos para prevenir a concepção pode predispor a piometra por manter a cérvix relaxada por mais tempo na fase lútea do que o normal (ALLEN, 1995; CRISTIENSEN, 1988). O estrógeno, isoladamente, não está normalmente associado com o desenvolvimento da hiperplasia endometrial cística. Entretanto, os estrógenos intensificam os efeitos estimuladores da progesterona no útero. Concentrações farmacológicas de estrógeno durante a fase diestral do ciclo estral podem aumentar o risco de desenvolver a piometra (GROOTERS, 1994; HIDALGO; COHEN; MÉNDEZ, 1986; NELSON; FELDMAN, 1986). O uso de estrógeno para prevenir a prenhez aumenta muito o risco de desenvolver piometra, sendo esta uma causa comum da ocorrência de piometra em cadelas jovens (GROOTERS, 1994).

Segundo Hidalgo, Cohen e Méndez (1986) e Christiansen (1988), a administração experimental de progesterona ou de compostos progestacionais em animais sãos, provoca os sinais clínicos e as lesões patológicas da piometra.

Apesar da estimulação por progesterona ser considerada um passo inicial para o desenvolvimento do complexo hiperplasia-endometrial-cística-piometra, as concentrações séricas de progesterona não são significativamente diferentes entre animais normais e animais com a desordem (HARDY; OSBORNE, 1974).

De Cock, Ducatelle e Logghe (1997) e Vermeirsch et al. (2000) especulam que as manifestações da hiperplasia endometrial cística sejam mediadas por anormalidades nos receptores endometriais para estrógeno e/ou progesterona.

Niskanen e Thrusfield (1998) relataram o resultado de uma pesquisa com cadelas entre nove meses e dezoito anos de idade. Concluíram que a administração de estrógeno aumentou o risco de piometra em cadelas de até 4 anos. Dezesete raças apresentaram maior predisposição à doença, dentre elas; Golden Retriever, Schnauzer miniatura, São Bernardo pelo curto, Airedale Terrier, Cavalier King Charles Spaniel, Collie pelo curto e Rottweiler. O Daschund pelo duro e os cães sem raça definida apresentaram um risco menor de desenvolver a enfermidade.

Egenvall et al. (2001) analisaram o banco de dados de uma empresa de seguros na Suécia com dados de mais de 20.000 cães. A ocorrência de piometra se diferenciava de acordo com idade, raça, e localização geográfica. O risco de desenvolver piometra era maior em cães das raças Collie Pelo Longo, Rottweiler, Cavalier King Charles Spaniel, Bernese Mountain Dog e Cocker Spaniel Inglês. Raças com menor risco de desenvolver piometra foram Pastor Alemão, Dachshund miniatura e Dachshund standard.

Segundo Borrensen (1979), durante três anos 40% dos pacientes atendidos no Departamento de Obstetrícia do Veterinary College of Norway em Oslo, apresentaram piometra. Oitenta e três por cento destes 40% tinham entre 6 e 11 anos de idade (média 7,8), e 93% dos casos foram diagnosticados 12 semanas após o cio. Não observaram predisposição racial para o desenvolvimento da piometra.

Historicamente, a piometra é uma desordem de cadelas de meia-idade (8 a 10 anos de idade), ocorrendo após anos de estimulação repetida de progesterona no útero. Mas, com o uso de anticoncepcionais a base de estrógeno em cadelas jovens, observou-se um aumento dos

casos de piometras abertas e fechadas em fêmeas jovens (GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986). A piometra deve ser considerada em qualquer cadela com sinais clínicos consistentes aparecendo durante ou logo após o diestro, não importando a idade (NELSON; FELDMAN, 1986; THRELFALL, 1995). Sinais de piometra geralmente ocorrem 1 a 2 meses após o estro ou após a administração de progesterona exógena (ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982; DERIVAUX; BARNABE, 1976; GROOTERS, 1994; ROBERTS, 1956).

Normalmente existem antecedentes de estros irregulares e de gestações fictícias (ARTHUR, 1964).

Os sinais clínicos relatados pelo proprietário dependem da patência da cérvix. A cadela com piometra de cérvix aberta apresenta uma secreção de cor sanguínea a purulenta pela vulva. A secreção geralmente é percebida 4 a 8 semanas após o cio, mas pode ser observada logo após o cio ou até 12 a 14 semanas após o fim do mesmo. Outros sinais incluem: letargia, depressão, inapetência, poliúria, polidipsia e vômitos (ALLEN, 1995; CHRISTIANSEN, 1988; CRAIG, 1937; DERIVAUX; BARNABE, 1976; GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986; ROBERTS, 1956; SANDHOLM; VASENIUS; KIVISTÖ, 1975). Também são comuns cadelas com piometra de cérvix aberta estarem relativamente saudáveis exceto pela presença anormal de secreção vaginal (NELSON; FELDMAN, 1986).

Os sinais clínicos em cadelas com piometra de cérvix fechada incluem: depressão, letargia, fraqueza, inapetência, poliúria, polidipsia e vômitos (ALLEN, 1995; GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986; ROBERTS, 1979). Ocasionalmente, o proprietário pode perceber uma secreção vulvar anterior aos outros sinais, com duração de poucos dias. Vômitos e anorexia, em conjunto com poliúria, causam progressivamente desidratação, choque, coma, e eventualmente óbito. A severidade da doença depende da habilidade do proprietário em

reconhecer o problema. Sinais de doença geralmente têm início 4 a 10 semanas após o cio (NELSON; FELDMAN, 1986).

A piometra fechada caracteriza-se por pequena quantidade de muco vaginal com apenas um número limitado de tipos celulares (leucócitos e células intermediárias, parabasais e basais coradas basofilamente) (CHRISTIANSEN, 1988).

Menos comumente, os sintomas podem incluir dor óssea em uma ou mais patas (CHRISTIANSEN, 1988).

Anormalidades encontradas no exame físico incluem depressão, desidratação, aumento uterino, e uma secreção sanguínea a muco-purulenta pela vulva se a cérvix estiver aberta (NELSON; FELDMAN, 1986). Febre é um sinal variável (ALLEN, 1995; DERIVAUX; BARNABE, 1976; GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986) e, quando presente, é associada à inflamação uterina e infecção bacteriana secundária, assim como septicemia ou bacteremia (NELSON; FELDMAN, 1986). Com septicemia ou bacteremia, o choque pode ocorrer (GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986). A temperatura corpórea mostra considerável variação. Em caso de piometra aberta, a temperatura pode ser normal ou elevar-se 1 – 2°C. Em casos fechados o aumento de temperatura é geral, principalmente no início do quadro (39,4 – 40,5°C) (ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982; ROBERTS, 1979).

A poliúria e polidipsia compensatória podem ocorrer devido à redução na habilidade do túbulo renal em concentrar urina (GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986). Azotemia pré-renal pode estar presente se o consumo de água não compensar adequadamente a poliúria (NELSON; FELDMAN, 1986; ROBERTS, 1979). Dow (1957), Hardy e Osborne (1974) e Watts, Wright e Whithear (1996) observaram azotemia em 18 a 26% dos cães com piometra.

A cérvix uterina pode abrir-se intermitentemente, possibilitando então a saída, mais ou menos abundante, de líquido fétido, de cor cinza-amarelada ou vermelho-pardacenta (ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982; CHRISTIANSEN, 1988; CRAIG, 1937; DERIVAUX; BARNABE, 1976; ROBERTS, 1956; ROBERTS, 1979). A secreção vaginal pode ser constante ou intermitente, causando a presença de sujidade na cauda e membros do animal (CRAIG, 1937). No caso da cérvix permanecer fechada, ocorre distensão uterina progressiva e o abdômen tende a ceder e aumentar de volume, nas porções em declive (ALLEN, 1995; DERIVAUX; BARNABE, 1976; ROBERTS, 1956; ROBERTS, 1979).

Muitas vezes, quando há secreção vaginal, o proprietário considera prolongamento do cio. Pode haver vômitos. O abdômen pode estar distendido, e gestação deve ser considerada. Óbito pode ocorrer devido a uma toxemia ou associado a uma peritonite devida à perfuração do corno (ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982).

Segundo Borrensen (1979), dos casos de piometra atendidos no Veterinary College of Norway, 90% dos pacientes apresentaram desvios de apetite e ingestão de água. A polidipsia foi o sinal clínico mais frequente. Cinquenta e três por cento dos animais apresentavam secreção vulvar.

A supressão da eritropoiese também pode ocorrer devido à toxemia (ALLEN, 1995). A distensão do abdômen torna-se marcante, assemelhando-se à ascite (CRAIG, 1937).

Nos casos de piometra aberta, observa-se grande quantidade de bactérias e neutrófilos no esfregaço vaginal; a quantidade de neutrófilos indica o grau de toxidez (CHRISTIANSEN, 1988).

O aumento uterino pode ser difícil de ser detectado pela palpação, principalmente se o útero está drenando muito de seu conteúdo ou se o útero estiver aumentado, mas flácido (NELSON; FELDMAN, 1986; ROBERTS, 1956).

As mucosas apresentam-se pálidas e anêmicas (DERIVAUX; BARNABE, 1976; ROBERTS, 1979; ROBERTS, 1956) e a vulva geralmente edemaciada e hipertrofiada (ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982; DERIVAUX; BARNABE, 1976; ROBERTS, 1956).

O curso da piometra é variável. Alguns casos se revelam agudos e graves em 1 a 2 semanas e requerem atenção imediata e precoce para que se possa salvar a vida do animal. Em outros, especialmente aqueles em que a cérvix está aberta por onde há drenagem de conteúdo purulento, a doença pode persistir por um mês ou mais (ROBERTS, 1979).

A piometra deve ser considerada em qualquer cadela de mais idade e nulípara, apresentando sinais de doença (ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982; GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986), como poliúria/polidipsia ou uma leucocitose neutrofílica observada no hemograma (ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982; NELSON; FELDMAN, 1986).

A radiografia abdominal pode ser utilizada para confirmar o aumento uterino (ALLEN, 1995; CHRISTIANSEN, 1988; DERIVAUX; BARNABE, 1976; GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986; ROBERTS, 1979). O exame radiográfico permite identificar a presença de um útero distendido que esteja causando deslocamento dorsal do cólon e deslocamento cranial do intestino delgado; este achado deve ser distinguido de uma gestação (ALLEN, 1995). O útero pode ser visualizado radiograficamente no início da quarta semana de gestação, até duas a quatro semanas após o parto. A visualização radiográfica do útero em outros períodos é anormal. Na piometra uma estrutura tubular fluído-densa é observada no abdômen ventro-caudal. A não visualização radiográfica do útero, não exclui a possibilidade da piometra estar associada com uma cérvix aberta e drenagem significativa de conteúdo pela vagina (GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986).

A palpação profunda e extensa deve ser evitada para prevenir a ruptura da parede do útero. Ocasionalmente, a piometra de cérvix aberta, irá drenar uma quantidade suficiente de conteúdo uterino, impedindo assim o aumento perceptível do útero, embora o órgão ainda assim possa estar aumentado e inflamado (NELSON; FELDMAN, 1986). Na palpação abdominal, em casos de piometra aberta, os cornos geralmente estão espessados, irregulares, e túrgidos, com 12 a 25 mm de diâmetro (ALLEN, 1995; ARTHUR, NOAKES; PEARSON, 1982; CRAIG, 1937). Em casos de piometra fechada, a distensão uterina se assemelha a uma gestação de sete a oito semanas. Muitas vezes há um visível aumento de volume abdominal (ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982).

A contagem total de leucócitos está geralmente aumentada em cadelas com piometra de cérvix fechada, muitas vezes excedendo 30.000 células/mm³ (DERIVAUX; BARNABE, 1976; GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986). Uma neutrofilia absoluta com fases variáveis de imaturidade celular pode aumentar, com infecção e septicemia. Uma anemia leve normocítica, normocrômica, não regenerativa é muitas vezes associada a piometra (GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986). Observa-se ainda a ocorrência de aumento de proteína no sangue (7,5 a 10 mg/dl) e hiperglobulinemia resultante da desidratação (CHRISTIANSEN, 1988; GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986). Frequentemente verifica-se também uma hipoalbuminemia (CHRISTIANSEN, 1988).

Ocasionalmente, ALT e FA estão aumentados devido a danos hepatocelulares causados por septicemia ou circulação hepática diminuída e hipóxia celular na cadela desidratada. A ocorrência de infecção bacteriana secundária, principalmente por *E.coli*, pode determinar toxemia a qual interfere com a reabsorção de sódio e cloro na alça de Henle. Este fenômeno reduz a hipertonicidade medular, prejudicando a habilidade dos túbulos em

reabsorver água, o que resulta em poliúria e polidipsia compensatória (NELSON; FELDMAN, 1986).

O ultrassom permite a determinação do tamanho do útero, a espessura da parede uterina e a presença de acúmulo de fluídos dentro do útero. Em alguns casos, as características do fluído no interior do útero (seroso ou viscoso), podem ser determinadas (ALLEN, 1995; NELSON; FELDMAN, 1986).

O desenvolvimento mamário não exclui a possibilidade de ocorrência de piometra uma vez que esta condição e a pseudogestação podem ocorrer concomitantemente (ALLEN, 1995).

Deve-se proceder ao diagnóstico diferencial de piometra com: gestação, insuficiência renal, diabetes mellitus, insuficiência hepática e hipoadrenocorticism, vaginite e neoplasia vaginal (CHRISTIANSEN, 1988).

A ovário-salpingo-histerectomia é o tratamento de eleição para a piometra, a não ser que o potencial reprodutivo da cadela deva ser poupado (ALLEN, 1995; ARTHUR; NOAKES; PEARSON, 1982; CHRISTIANSEN, 1988; CRAIG, 1937; GROOTERS, 1994; HIDALGO; COHEN; MÉNDEZ, 1986; NELSON; FELDMAN, 1986; ROBERTS, 1956; ROBERTS, 1979; SANDHOLM; VASENIUS; KIVISTÖ, 1975). A septicemia originária do útero infectado é, muitas vezes, responsável pela doença em estado avançado, e somente a retirada cirúrgica do útero irá resolver o estado séptico da cadela. Antibióticos de amplo espectro injetáveis e fluídos intravenosos com suplementação eletrolítica apropriada devem ser utilizados imediatamente. Terapia de suporte deve ser continuada durante e após a cirurgia (NELSON; FELDMAN, 1986). Antibióticos orais devem ser utilizados por 7 a 10 dias após a remoção do útero infectado. As chances de sobrevivência aumentam com a implementação destes procedimentos (DERIVAUX; BARNABE, 1976; GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986; ROBERTS, 1979).

Em cadelas reprodutoras valiosas, pode ser tentado o tratamento medicamentoso, mas apenas se o animal encontrar-se em boas condições físicas (CHRISTIANSEN, 1988).

As terapias medicamentosas baseadas em estrógenos, andrógenos, alcalóides de ergot, quinina e ocitocina são inconsistentes e muitas vezes sem sucesso. Antibióticos sistêmicos geralmente são ineficazes como base terapêutica para a piometra canina (ALLEN, 1995; DERIVAUX; BARNABE, 1976; NELSON; FELDMAN, 1986).

Christiansen (1988) utilizou prostaglandinas para tratamento de um pequeno número de cadelas com piometra. A aplicação de 0,1 – 0,23 mg/kg de PGF2 α foi seguida por inquietude, sinais de dor severa, vômito e copioso corrimento vaginal, por um período de 10 – 30 minutos. Esse tratamento não foi considerado eficaz, pois embora possa curar o distúrbio, pode, por outro lado, causar a ruptura do útero.

O tratamento cirúrgico é preferível, principalmente quando se trata de evitar toxemia e salvar a vida do animal. Os resultados da intervenção cirúrgica são sempre satisfatórios (DERIVAUX; BARNABE, 1976). Cadelas severamente doentes devem ser tratadas com fluídos intravenosos e devem ser monitoradas atentamente. (NELSON; FELDMAN, 1986).

O prognóstico é de reservado a mau, pois nunca ocorre recuperação completa. A afecção é progressiva e são frequentes as recidivas (DERIVAUX; BARNABE, 1976; ROBERTS, 1979). A recorrência da piometra após tratamento medicamentoso é bastante comum, podendo ser observada em até 77% das cadelas. (DERIVAUX; BARNABE, 1976; GROOTERS, 1994). A piometra é uma das causas mais comuns de morte em cadelas de mais idade (DERIVAUX; BARNABE, 1976; ROBERTS, 1979).

Segundo Grooters (1994), o prognóstico é bom quando realizada a ovariectomia, com mortalidade inferior a 10 %.

3.1 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO ÚTERO

De Bosschere et al. (2001) observaram no exame histológico que nenhum útero (n = 26) de cadelas saudáveis apresentou reação inflamatória.

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 (JUBB; KENNEDY; PALMER, 1993).

Dhaliwal, Wray e Noakes (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. O estudo realizado utilizou 34 amostras de tecido de útero, uma quantidade considerada pequena para permitir correlações adequadas entre sinais clínicos, cepas de *Escherichia coli* e a severidade das lesões, tendo em vista a diversidade das características dos sorotipos deste microrganismo. Além disso, o estudo foi realizado em diferentes clínicas com participação de diferentes cirurgiões, cada qual adotando um procedimento distinto para a retirada do útero, comprometendo assim o exame histopatológico do mesmo. Os pesquisadores concluíram que seria necessário um número de casos muito superior ao utilizado e, preferencialmente procedentes de um único local, com participação de um único cirurgião, para padronizar a amostragem.

3.2 BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA PIOMETRA

Olson e Mather (1978) concluíram através de cultura bacteriana que cadelas não apresentam bactérias no útero normalmente.

Watts, Wright e Whithear (1996) observaram que bactérias foram isoladas em 100% dos casos estudados do útero de cadelas saudáveis (n=12) durante o estro e pró-estro, e raramente em outros estágios do ciclo reprodutivo. Essa microflora observada sempre era similar á microflora da cérvix e da vagina. Concluíram que o número aumentado de bactérias encontradas no útero durante o pró-estro e estro pode ser devido às condições propícias para o crescimento bacteriano e/ou uma diminuição da resposta imunológica no útero nesse momento.

Baba et al. (1983) observaram que a contagem de totais de bactérias na vagina no estágio estro foi significativamente maior do que nos outros estágios. Nesse estudo, organismos foram isolados em 62% das amostras uterinas (n=78). Em muitas amostras examinadas, a microflora uterina era semelhante à microflora vaginal. Esses achados indicam que o conteúdo vaginal bacteriano freqüentemente se desloca para dentro do útero, mas somente algumas espécies sobrevivem.

Olson e Mather (1978) e Ling e Ruby (1978) observaram que a microflora vaginal era predominantemente formada por *Staphylococcus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus*.

Bjurström (1993) estudou 203 cadelas com doenças no trato genital (infertilidade, vaginite, piometra e mortalidade de filhotes). Ele observou que as espécies mais comumente

isoladas foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius* e *Pasteurella multocida*. Em cadelas com piometra, o isolamento de *E.coli* foi o mais freqüente em cultura pura.

Oliveira et al. (1988), isolaram do conteúdo uterino de cadelas com piometra (n=70), 50,5% de *Escherichia coli*; 7,1% de *Streptococcus* spp.; 7,1% de *Proteus* spp.; 5,7% de *Staphylococcus aureus* e 2,9% de *Micrococcus* spp.

Gandotra et al. (1994) realizaram swabs de vagina de cadelas com piometra (n=24), tendo isolado 38,47% de *Staphylococcus aureus*; 30,77% de *Streptococcus* spp.; 23,07% de *Corynebacterium pyogenes* e 7,69% de *Escherichia coli*. As amostras colhidas foram de swabs vaginais e não do conteúdo uterino, o que poderia justificar o baixo índice de isolamentos de *E. coli*.

Segundo Allen e Dagnall (1982), *E.coli* foi o microrganismo isolado com maior freqüência a partir de swabs vaginais em fêmeas no estro, infértéis ou com secreção vaginal e de swabs prepuciais em cães normais. Além disso, comprovou-se que a *E.coli* pode ser transmitida através do coito.

Segundo Sandholm, Vasenius e Kivistö 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, microrganismos estes que 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.

Segundo Dow (1958), *E.coli* foram isoladas a partir do muco uterino de 9 das 27 cadelas que estavam em metaestro e apresentavam piometra.

Fransson et al. (1997), isolaram *E.coli* de 90% das cadelas com piometra (n = 48).

Dhaliwal, Wray e Noakes (1998) isolaram *E.coli* de 96,3% dos 28 casos de piometra avaliados.

De acordo com Hagman e Kühn (2002), a bactéria mais frequentemente isolada do conteúdo uterino de cadelas com piometra é *Escherichia coli* (n=6). Foi observado através de comparação de perfis de DNA que a piometra é causada pela *E.coli* originária da flora normal dos cães e não por certos clones transmitidos por outros animais.

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 às 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 ocorre 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.

Segundo Hagman e Kühn (2002), as cepas de *E.coli* isoladas a partir de amostras de conteúdo uterino de cadelas com piometra pertenciam a certos grupos clonais com habilidade maior isto é, com determinados fatores de virulência, que poderiam lhes conferir maior capacidade para infectar o útero.

Sandholm, Vasenius e Kivistö (1975) observaram receptores específicos de *E.coli* no endométrio e miométrio da cadela, aumentando a colonização da bactéria no útero.

3.2.1 *Enterobacteriaceae*

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* abrangem um grupo grande e heterogêneo de bastonetes gram-negativos, não-esporulados e anaeróbios facultativos, cujo habitat natural é o intestino humano e animal. Possuem uma estrutura antigênica complexa (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982).

A maioria das bactérias gram-negativas apresenta lipopolissacarídeos complexos em suas paredes celulares. Estas substâncias, endotoxinas, possuem vários efeitos fisiopatológicos. Muitas enterobactérias gram-negativas também produzem exotoxinas de importância clínica (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982).

Nos humanos essas bactérias causam uma variedade de doenças, incluindo 30 a 35% de todas as septicemias, mais de 70% das infecções de trato urinário, e muitas infecções intestinais (MURRAY et al., 1998). Nos animais causam doenças como diarreia neonatal e salmonelose em animais de produção, e infecção do trato urinário e abscessos nos animais de companhia (HIRSCH; ZEE, 2003).

3.2.2.1 *Escherichia coli*

E.coli pode ser considerada como um dos microrganismos mais importantes da família *Enterobacteriaceae*, sendo normalmente encontrada na microbiota entérica animal e humana (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

Algumas cepas, no entanto, são comprovadamente patogênicas para o homem e/ou animais. No homem, o microrganismo tem sido associado a severos distúrbios gastrointestinais (FRANCO; LANDGRAF, 1996), além de infecções extra-intestinais, com referência especial às infecções urinárias, meningites do recém-nascido e septicemias. Segundo Campos e Trabulsi (1999), *E.coli* é responsável por aproximadamente 40 a 50% da casuística de septicemias causadas por microrganismos Gram-negativos no homem.

Nos animais, *E.coli* tem sido relacionada a uma grande variedade de manifestações clínicas, incluindo diarreia, mastite, endometrite, cistite, nefrite, artrite, aborto, osteomielite, endocardite, pneumonia, conjuntivite, septicemia, entre outras (KRUTH, 1998; RADOSTITIS et al., 2000).

E.coli é pleomórfica, gram-negativa, bastonete não formadora de esporo que mede 2 a 3 μm x 0,4 a 0,6 μm (WOLF, 1997). A *Escherichia coli* faz parte da flora normal do intestino de animais e do ser humano (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982). Esse organismo é associado a uma variedade de doenças nos humanos, incluindo meningite, gastroenterites, infecções do trato urinário e sepsis. Um grande número de *E.coli* está presente no trato gastrointestinal e é a bactéria mais frequentemente encontrada na causa de sepsis, meningite neonatal, infecções do trato urinário, e gastroenterites. A *E.coli* é o bastonete gram-negativo mais comumente isolado de pacientes sépticos, e é responsável por causar mais de 80% das infecções do trato urinário em humanos e a maior parte das infecções hospitalares, e é a causa principal de gastroenterite em países em desenvolvimento. A maior parte das infecções (com exceção da meningite neonatal e da gastroenterite) são endógenas. Ou seja, a flora microbiana normal da pessoa é capaz de causar infecção quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas. Tipicamente, a septicemia causada por bastonetes gram-negativos como a *E.coli* se origina de infecções do trato urinário ou gastrointestinal. A maioria dos bastonetes

gram-negativos, que produz infecções do trato urinário se origina no cólon, contaminam a uretra, ascendem pela bexiga, e podem migrar aos rins ou próstata (uma infecção ascendente, diferentemente de uma infecção causada por meio hematógeno de um organismo ao trato urinário) (MURRAY et al., 1998). A *E.coli* é a principal espécie Gram-negativa facultativa que compõe a flora normal do trato gastrointestinal dos animais, e pode ser causa de doença septicêmica em potros, bezerros, leitões, filhotes de cães e cordeiros; de diarreia enterotoxigênica em neonatos de animais de produção; e de doença edematosa em suínos. Podem ser oportunistas em quase todas as espécies animais, como na doença do trato urinário, abscessos e pneumonia (HIRSCH; ZEE, 2003).

E.coli, quase que invariavelmente, pode ser isolada de material fecal de animais com e sem diarreia (CASTRO; YANO, 1992). A *Escherichia coli* é uma das bactérias mais comumente encontrada na diarreia canina (GUILFORD; STROMBECK, 1996; GREENE, 1998). Cepas patogênicas de *E.coli* são comumente isoladas de fezes de cães aparentemente saudáveis (MARKS; KATHER, 2003).

Desta forma, a ocorrência das diferentes apresentações clínicas das colibaciloses, depende de propriedades ou fatores de virulência, que determinam o grau de patogenicidade do agente. Alguns destes fatores de virulência são componentes intrínsecos da estrutura bacteriana e também são denominados endotoxinas (CASTRO; YANO, 1992). Outros, porém, constituem-se de diferentes tipos de exotoxinas (enterotoxinas, verotoxinas, hemolisinas, fator necrosante citotóxico), bem como propriedades que permitem a multiplicação em meio com restrição de ferro ou a multi-resistência aos antimicrobianos (CAMPOS; TRABULSI, 1999; GYLES, 1992; SUSSMAN, 1997).

A presença de antígenos bacterianos denominados O, K e H, localizados respectivamente, na parede, na cápsula e no flagelo de *E.coli*, possibilitam a sua classificação

em diferentes grupos ou tipos sorológicos. Utilizando-se anti-soros direcionados contra estes antígenos de *E.coli*, são reconhecidos atualmente 174 antígenos O, 100 antígenos K e 57 antígenos H, que convencionalmente, são designados por números arábicos. Nem todas as cepas de *E.coli* possuem estes três tipos de antígenos. A identificação destes antígenos permite o estudo epidemiológico da associação de determinados sorogrupos e sorotipos com a ocorrência de afecções no homem e/ou animais (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

Os antígenos O ou antígenos somáticos ou endotoxinas correspondem à fração polissacarídica do lipopolissacarídeo (LPS), componente comum da parede bacteriana das enterobactérias em geral. Nos processos infecciosos envolvendo *E.coli*, pode ocorrer a liberação da fração LPS da parede do microrganismo. Esta fração lipopolissacarídica interage com as células epiteliais e também com leucócitos, provocando nestas últimas, a liberação de potentes mediadores da inflamação. A ativação do processo inflamatório pode, determinar tanto a morte bacteriana quanto das células do animal, provocando grave destruição tecidual e severos sintomas sistêmicos (SANDHOLM; KORHONEN, 1995).

Apesar do reconhecimento atual de um grande número de sorogrupos de *E.coli*, somente determinados grupos têm-se mostrado comprovadamente patogênicos para o homem e animais (CAMPOS; TRABULSI, 1999; ORSKOV; ORSKOV, 1992). Ainda que a função dos antígenos somáticos não tenha sido totalmente esclarecida, acredita-se que algumas cepas de *E.coli*, que possuem determinados grupos O, apresentariam material genético relacionado à codificação para determinados fatores de virulência, incluindo a produção de toxinas (EVANS et al., 1977).

A presença de cápsula (K) que é uma estrutura de constituição polissacarídica e protéica circundando a parede bacteriana, auxilia na proteção do agente contra mecanismos

imunológicos de defesa, inibindo a ativação do sistema complemento e/ou a opsonização (SMITH, 1992).

As cepas de *Escherichia* responsáveis por doenças como gastroenterites e infecções do trato urinário possuem fatores específicos de virulência. Duas categorias principais são as adesinas e as exotoxinas (MURRAY et al., 1998). A capacidade da grande maioria das cepas de *E.coli* em manifestar seus efeitos patogênicos está relacionada ao fenômeno de adesão, que ocorre mediante a interação do agente com as células eucarióticas, principalmente as epiteliais (ACRES, 1983). Este mecanismo de adesão permite a liberação de diferentes toxinas do agente para o interior celular, a invasão destas células e/ou a disseminação pelo hospedeiro (GYLES, 1992; SUSSMAN, 1997). As *E.coli* conseguem permanecer no trato gastrointestinal ou trato urinário porque são capazes de aderir nas células revestindo esses tratos e conseguem impedir sua eliminação pela motilidade intestinal ou pela ação mecânica da urina (MURRAY et al., 1998).

Em geral, após a adesão, as toxinas produzidas pelas cepas de *E.coli* interagem com receptores nas células epiteliais, e são veiculadas para o interior da célula. A ação destas toxinas determina diferentes efeitos no metabolismo levando, em alguns casos, à morte destas células (ACRES, 1983).

A produção dos diferentes fatores de virulência, incluindo os fatores de colonização, produção de toxinas, ou mesmo resistência aos antimicrobianos é regulada pelo genoma celular e, principalmente por plasmídios, (material genético extracromossomal) que pode ser transmitido a outras linhagens de *E.coli* e, ocasionalmente, para outros gêneros de microrganismos (PADILLA; COSTA, 1999).

Nos últimos anos, as linhagens de *E.coli* responsáveis principalmente por distúrbios entéricos têm sido classificadas como: enterotoxigênicas-ETEC, enteropatogênicas-EPEC,

enterohemorrágicas-EHEC, enteroinvasoras-EIEC, enteroagregativas-EaggEC e de aderência difusa-DAEC (CAMPOS; TRABULSI, 1999; FRANCO; GYLES, 1992; LANDGRAF, 1996), subdivididas, fundamentalmente, pela capacidade de produção de toxinas e/ou invasão celular. Os três patótipos que já foram estudados no cão são a enterotoxigênica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC) e a enteropatogênica (EPEC) (MARKS; KATHER, 2003).

3.2.1.1.1 ETEC

Estimativas de 1992, feitas pela World Health Organization (WHO), indicam que 3,2 milhões dos 12,9 milhões de mortes de crianças abaixo de cinco anos de idade em países em desenvolvimento são devido à diarreia. A causa mais importante de diarreia bacteriana em crianças é a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Shigella* spp. e *Campylobacter jejuni*. Cepas de ETEC são não invasivas e causam uma diarreia de tipo secretora por produzir a enterotoxina LT e/ou ST (SUSSMAN, 1997).

O grupo das ETEC é constituído por cepas com capacidade de produção de enterotoxinas, restritas a um número relativamente pequeno de sorogrupos (O6, O8, O25, O63, O78, O115, O128, O148), implicados na casuística de diarreia nos animais e no homem (CAMPOS; TRABULSI, 1999). As cepas de ETEC são a maior causadora de diarreia infantil em países em desenvolvimento e representam o agente mais frequentemente responsável pela diarreia dos viajantes (HART; BATT; SAUNDERS, 1993). Os sintomas causados por essa infecção são geralmente, diarreia aquosa, vômitos, dores abdominais, náuseas e febre baixa, e são similares àqueles causados pela cólera, mas mais brandos. A diarreia secretora causada

pela ETEC se desenvolve após um período de incubação de um a dois dias e persiste por um período médio de 3 a 4 dias. Essa doença é raramente observada nos Estados Unidos (MURRAY et al., 1998). A ETEC também é reconhecida como uma causa de doença diarréica e infecções letais em porquinhos (ALEXANDER, 1994) e é associada com até 31% dos casos de diarréia canina, principalmente em cães jovens (HAMMERMUELLER et al., 1995; OLSON; HEDHAMMER; FARIS, 1985).

Linhagens de *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) podem produzir isoladamente ou em conjunto (mediante a regulação por plasmídios), dois tipos principais e distintos de enterotoxinas denominadas LT (toxinas termolábeis - LT-I e LT-II), e ST (toxinas termoestáveis - Sta e STb) (CAMPOS; TRABULSI, 1999; FRANCO; LANDGRAF, 1996). A bactéria coloniza o intestino, onde produz LT e ST. A enterotoxina LT é relacionada com a toxina colérica, que consiste em uma subunidade A e cinco subunidades B, e causa desregulação do sistema adenil ciclase, resultando em excesso de produção de AMP cíclico. Isso resulta na abertura dos canais de cloro nas células cripticas e no bloqueio da absorção de sódio e cloro. Água e eletrólitos são perdidos no lumen intestinal, levando à diarréia, hipovolemia, e acidose metabólica. As subunidades B se ligam ao mesmo receptor da toxina colérica e permite a entrada da subunidade A para dentro da célula alvo. A subunidade A interage com uma proteína de membrana (Gs), que regula a adenil ciclase. Essa interação provoca um aumento de AMPc com a expulsão de sódio, cloro, bicarbonato de potássio, e água para fora da célula e para dentro do lúmen intestinal (diarréia aquosa). As enterotoxinas ST são pequenas, monoméricas, divididas em duas classes, Sta e STb. O receptor para Sta é a guanil ciclase C, e essa ligação leva ao aumento de GMPc intracelular, causando um efeito paralelo ao AMPc com a hipersecreção de fluidos (HART; BATT; SAUNDERS, 1993; MURRAY et al., 1998; SEARS; KAPER, 1996).

LT-II e STb são produzidas por cepas de *E.coli* isoladas de animais, mas não de humanos. Os genes de LT-I e Sta estão presentes num plasmídio transferível (MURRAY et al., 1998). A maior parte das cepas caninas de ETEC expressa a enterotoxina ST (RITCHER; GRUND; HELLMANN, 1984), e cepas produtoras de enterotoxina LT são raramente encontradas em cães (HAMMERMUELLER et al., 1995; OLSON; HEDHAMMER; FARIS, 1985; RITCHER; GRUND; HELLMANN, 1984). Cepas de ETEC de cães frequentemente foram encontradas como sendo produtoras de α -heolisina, que é encontrada em suínos, mas não em cepas de ETEC de humanos (BEUTIN; GEIER; ZIMMERMANN, 1995; PRADA; BALJER; DE RYCKE, 1991). Apesar da evidência de ETEC como causadora de diarreia em cães, a incidência real desse patotipo na diarreia canina ainda não é clara, com prevalências relatadas em cães com diarreia de 0 a 31% (HAMMERMUELLER et al., 1995; TURK; MADDOX; FALES, 1998). A LT-I já foi isolada em humanos e suínos, e a LT-II em bovinos, búfalos, humanos e em alimento (HIRSCH; ZEE, 2003).

3.2.1.1.2 EPEC

Embora *E.coli* enteropatogênica (EPEC) seja considerada um dos principais agentes implicados na casuística de diarreia no homem (CAMPOS; TRABULSI, 1999), a sua

importância na ocorrência de doença em animais ainda não foi completamente esclarecida (SUSSMAN, 1997).

Causa diarreia infantil com febre, náusea e vômito. Possui um plasmídeo responsável pela sua aderência em células epiteliais e a destruição dessas células (MURRAY et al., 1998). As cepas EPEC já foram associadas com diarreia numa gama grande de espécies animais, incluindo seres humanos. As cepas clássicas de EPEC são negativas para shiga toxina e enterotoxina ST e LT, mas carregam o gene *eaeA*, que está localizado numa ilha de patogenicidade conhecida como LEE (DONNENBERG, 1995). O gene *eaeA* codifica a proteína intimina, que facilita a adesão do organismo à célula epitelial (DONNENBERG, 1995; JERSE; YU; TALL, 1990). As cepas *eae* positivas podem causar as lesões características de adesão nas células epiteliais. A lesão característica de fixação e esfacelamento ocorre porque há um “colapso” das microvilosidades das células afetadas, dando a aparência característica dessa lesão conhecida como A/E. Um segundo marcador de virulência genético, *bfpA*, codifica um pilus, que é responsável pela aderência localizada da EPEC nas células epiteliais intestinais (PENTEADO; AIDAR; PESTANA DE CASTRO, 2001). A doença ocorre porque o organismo adere à membrana plasmática do enterócito e causa destruição das microvilosidades adjacentes. A adesão e destruição da arquitetura celular ocorrem em três estágios: adesão mediada por *Bfp*; estimulação do nível de cálcio intracelular; e finalmente, rearranjo da actina intracelular, levando à destruição das microvilosidades. O contato entre a bactéria e a célula do hospedeiro no estágio final, é mediado por uma proteína de membrana, intimina. *Bfp* é mediada por um plasmídeo (fator de aderência da EPEC ou plasmídeo EAF), e a intimina é codificada no gene *eae* localizado no cromossomo da bactéria. A diarreia ocorre devido à perda da capacidade de absorção das células infectadas. Nenhuma toxina foi identificada até o presente momento (MURRAY et al., 1998).

Num estudo recente, com 122 cães com diarreia, nas *E.coli* de 44 dos cães (36%) foi encontrado o gene *eaeA* e nenhum dos isolados desses cães produzia LT, ST, ou shiga toxina (TURK; MADDOX; FALES, 1998). Em outro estudo, foi investigada a similaridade de isolados de EPEC originários de cães, suínos e humanos. Encontrou-se uma homologia entre 81 a 84% das seqüências protéicas de *eae*, e a seqüência isolada do cão era sorologicamente relacionada à cepa do humano (NA et al., 1997).

Não está suficientemente claro se EPEC possui potencial zoonótico, mas provavelmente os animais (incluindo humanos) adquirem a cepa infectante por via fecal-oral (HIRSCH; ZEE, 2003).

Nakazato et al. (2004) no Brasil isolaram *E.coli* de 182 amostras fecais de cães de até cinco meses de idade em São Paulo e Campinas. Essas amostras foram avaliadas através de PCR (reação de polimerase em cadeia). O gene *eae* foi encontrado em 13% de cães com diarreia e em 8,3% de cães sem diarreia. Esses resultados confirmaram a presença de EPEC em cães com e sem diarreia. Os fatores de virulência encontrados nessas cepas eram semelhantes aos fatores de EPEC em humanos, sugerindo que a EPEC pode se mover entre populações de cães e de humanos.

Holland et al. (1999) estudaram *E.coli* em fezes de cães saudáveis, e observaram o gene *eae* em 38,3% dos isolados, o gene *sta* em 53,3% e ambos os genes *eae* e *sta* em 8,3% dos isolados.

3.2.1.1.3 EIEC

De maneira semelhante às *E.coli* enteropatogênicas, as cepas enteroinvasoras (EIEC) e enteroagregativas (EaggEC) não possuem participação definida na ocorrência de doenças em animais. *E.coli* enteroinvasora pode provocar infecções intestinais em crianças e em adultos, enquanto que a *E.coli* enteroagregativa ainda está sendo estudada quanto a sua capacidade de causar diarreia nos seres humanos (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

A *E.coli* enteroinvasora é responsável por uma doença diarreica em humanos caracterizada por uma diarreia mucóide sanguinolenta (HART; BATT; SAUNDERS, 1993). Essa diarreia é uma causa comum de doença em países em desenvolvimento, causando sintomas de febre, dores abdominais, diarreia aquosa seguida de disenteria com muco e sangue (MURRAY et al., 1998). Essa *E.coli* possui fatores de virulência associados à *S.dysenteriae* (HART; BATT; SAUNDERS, 1993). Apesar da *Shigella* e a EIEC serem protótipos de bactérias invasoras, essas bactérias não conseguem penetrar os enterócitos através de seu lúmen. Em vez disso, elas passam através de células M. Uma vez que essas bactérias penetraram o epitélio através dessas células, as cepas de EIEC evitam a fagocitose por induzir a apoptose dos macrófagos. O mecanismo pelo qual a EIEC causa diarreia é incerto, mas pode ser atribuída por uma enterotoxina codificada por um plasmídeo (NATARO; KAPER, 1998). Ocorre invasão e destruição de células epiteliais que revestem o cólon (MURRAY et al., 1998).

O gene da EIEC já foi amplificado por primers de PCR em fezes caninas, mas casos de EIEC em cães são desconhecidos (PASS; ODEDRA; BATT, 2000).

A *E.coli* enteroagregativa causa diarreia aquosa infantil em países em desenvolvimento, com diarreia aquosa persistente com vômitos, desidratação e febre baixa. Há uma aderência agregativa mediada por plasmídeo que impede a absorção de fluido no

intestino, provocando a diarreia. Uma toxina e uma hemolisina também já foram descritas, mas seus papéis ainda não foram definidos (MURRAY et al., 1998).

3.2.1.1.4 EHEC

Nos últimos anos, a ocorrência de *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) sorotipo O157:H7 tem sido descrita em diferentes espécies de animais, com referência especial à espécie bovina, causando diarreia e emergindo como importante causa de doença entérica e renal no homem (ALTEKRUSE; COHEN; SWERDLOW, 1997; FENG, 1996; TAUXE, 1997). Investigações epidemiológicas revelaram que bovinos frequentemente carregam EHEC nas fezes e isso pode representar uma fonte importante de infecção (WELLS et al., 1991). A EHEC é a principal cepa causadora de doenças em países desenvolvidos com uma estimativa de 20.000 casos ocorrendo anualmente nos Estados Unidos. A ingestão de menos de 100 bastonetes pode provocar a doença (MURRAY et al., 1998). Esse grupo de *E.coli* é produtor de uma toxina chamada shiga toxina. Está presente na flora fecal de animais domésticos saudáveis e mais frequentemente é encontrada em ruminantes (BEUTIN et al., 1993; CAPRIOLI et al., 1993; MONTENEGRO et al., 1990). Algumas dessas EHEC são patógenas ao homem, podendo ser transmitidas através de alimento contaminado ou contato direto com esses animais infectados (DORN, 1988; KARMALI, 1989; RENWICK et al., 1993). Essa infecção pode causar, em humanos, doenças severas como colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (KARMALI, 1989). Provoca dor abdominal severa, diarreia aquosa inicialmente, seguida de diarreia sanguinolenta e ausência de febre ou febre muito baixa. É

uma doença comum em meses mais quentes, com grande incidência em crianças com menos de 5 anos de idade. A maioria das epidemias e endemias é atribuída ao consumo de carne moída mal passada ou outros produtos derivados de carne, assim como de leite cru e sucos de frutas contaminados por fezes de bovinos (MURRAY et al., 1998).

As toxinas produzidas pelas EHEC são as SLTs, entre elas SLT-I, SLT-II e SLT-IIe (O'BRIEN et al., 1993; RUSSMANN et al., 1994). EHEC já foi isolada em cães saudáveis e com diarreia (BEUTIN, 1999) e uma condição semelhante à síndrome hemolítica urêmica já foi descrita em cães da raça greyhound (HERTZKE et al., 1995).

As cepas de EHEC se aderem às células epiteliais e produzem o mesmo tipo de lesão A/E encontrada na EPEC. As cepas EHEC são minimamente invasivas, mas produzem uma resposta inflamatória (O'BRIAN; LA VECK; THOMPSON, 1982). Inicialmente uma diarreia se desenvolve nos pacientes depois que os bastonetes se aderem ao epitélio do intestino (mediados por intimina). Em seguida, ocorre a produção de toxinas (verotoxina, Shiga toxina ou Shiga-like toxina), mediando uma diarreia sanguinolenta e dor abdominal intensa (MURRAY et al., 1998). As cepas EHEC são comumente referidas como *E.coli* verocitogênicas (VTEC). *E.coli* verocitotóxica foi primeiramente descrita em 1977 por sua habilidade de causar danos a células Vero cultivadas (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977). A verotoxina (VT ou SLT-I) é semelhante a shiga toxina da *Shigella dysenteriae* tipo I (O'BRIAN; LA VECK; THOMPSON, 1982).

As duas toxinas SLT-I e SLT-II possuem cinco subunidades B e uma subunidade A, com uma das subunidades B se ligando a um glicolípido específico na célula do hospedeiro. Depois que a subunidade A é inserida na célula, ela é dividida em duas moléculas, e o fragmento A1 se liga ao RNAr e altera a síntese protéica (MURRAY et al., 1998). Após a aderência é produzida a SLT, que afeta as células endoteliais, resultando em lesão e perda de

integridade. O efeito das toxinas é local (célula endotelial localizada abaixo da célula infectada), e sistêmico (células endoteliais situadas em outros locais do organismo, como rim e cérebro) (HIRSCH; ZEE, 2003). A síndrome hemolítica urêmica (HUS) foi preferencialmente associada com a produção de SLT-II, que mostrou a destruição de células endoteliais renais seletivamente (MURRAY et al., 1998). Aproximadamente 5 a 10% dos pacientes humanos infectados por EHEC desenvolverão HUS (HIRSCH; ZEE, 2003). Esses organismos ainda são chamados na literatura, de *E.coli* produtoras de Shiga toxina (STEC).

Dados de três estudos indicam que as cepas de *E.coli* carregando genes para Shiga toxinas não estão associadas à diarreia canina, porque os dados de portadores de STEC são similares em cães saudáveis (3,2-12,3%) e cães com diarreia (0-8,9%) (BEUTIN et al., 1993; HAMMERMUELLER et al., 1995; TURK; MADDOX; FALES, 1998).

Uma variante da SLT-II, denominada SLT-Iie, é responsável pela lesão vascular característica da doença edematosa dos suínos (HIRSCH; ZEE, 2003).

Mais de 50 sorotipos de EHEC já foram isolados, mas, a maior parte é O157:H7 (MURRAY et al., 1998). A cepa de *E.coli* de sorotipo O157:H7, é um importante patógeno transmitido por alimento ao ser humano (MEAD; SLUTSKER; DIETZ, 1995). A síndrome urêmica hemolítica (HUS) é a complicação mais importante da infecção da *E.coli* O157 (BOYCE; SWERDLOW; GRIFFIN, 1995). Há pouca informação documentada do papel da O157:H7 em cães, e um caso foi documentado do isolamento desse sorotipo nas fezes de um cão. A cepa isolada era idêntica à cepa isolada de uma criança que tinha contato com o cão. Esse achado sugere que, semelhantes aos bovinos, cães também podem servir como vetores para a transmissão da EHEC O157:H7 (TREVENA; HOOPER; WRAY, 1996).

Low et al. (1988) relataram o isolamento de O157:H7 de um cão com infecção do trato urinário. As cepas isoladas do cão foram associadas a isolados de 21% de pacientes no Canadá.

Beutin (1999) sugeriu que cães assintomáticos poderiam agir como vetores de transmissão das EHEC aos seres humanos.

Beutin et al. (1993) isolaram *E.coli* em 720 animais domésticos e identificaram como EHEC 28,9%, sendo EHEC isolado em 66,6% dos ovinos estudadas, 56,1% dos caprinos, 21,1% dos bovinos, 7,5% dos suínos e 4,8% dos cães. Com esses resultados, concluíram, que a alta incidência de EHEC em bovinos, ovinos e caprinos indica que essas espécies representam um importante reservatório natural.

Staats et al. (2003) identificaram genes de Shiga toxina (*stx1* e *stx2*) em cães da raça Greyhound com e sem diarreia (n = 60). O gene *stx1* estava presente em 3% das amostras sem diarreia e 15% das amostras com diarreia. O gene *stx2* estava presente em 36% das amostras sem diarreia e 23% das amostras com diarreia. Então a Shiga toxina estava presente em 48% dos cães com diarreia e 25% dos cães sem diarreia. Esse trabalho concluiu que a incidência de *E.coli* patogênica em cães com e sem diarreia indica um potencial zoonótico de cães para o ser humano.

Hammermueller et al. (1995) identificaram em fezes de cães com diarreia (n=20) 8,9% de genes VT1, 22,2% de VT2, 26,7% de STa e 4,4% de STb nas *E.coli* isoladas. Genes de VT2, Sta e STb não foram identificados em fezes de cães saudáveis. O gene VT1 foi observado em proporções similares em amostras de fezes diarreicas (8,9%) e de fezes de cães saudáveis (12,3%). A enterotoxina LT1 não foi detectada em nenhuma das amostras fecais observadas. Concluíram que os cães são capazes de serem portadores de *E.coli* produtora de VT1 sem apresentar sintomas de doença.

Wilson et al. (1992) observaram que *E.coli* produtora da toxina VT pode estar presente em bovinos e suínos sem causar doença.

Von Sydow et al. (2004) isolaram uma cepa de *E.coli* positiva para VT2 de amostras de fezes de cães saudáveis (n=200).

3.2.1.1.5 UPEC

Algumas cepas de *E.coli* podem se comportar como patógenos oportunistas causando infecções extra-intestinais em humanos e animais (PEETERS, 1994). Cepas de *E.coli* causando infecções extra-intestinais em cães e gatos foram associadas com alguns grupos O que também são freqüentemente isolados da flora fecal normal desses animais (LOW et al., 1988). As mesmas observações foram feitas sobre cepas de *E.coli* causando infecções extra-intestinais em humanos (JOHNSON, 1991). Dentro desse grupo temos as *E.coli* uropatogênicas (UPEC) (PEETERS, 1994). São as *Escherichia coli* que causam doenças do trato urinário tanto em humanos como em animais. A *E.coli* se move do trato gastrointestinal para o trato urinário. A maior parte das infecções de trato urinário começa com a colonização do colón por uma cepa de *E.coli* que é capaz de causar infecções do trato urinário. (SAYLERS; WHITT, 2002).

A *E.coli* foi a bactéria mais comumente isolada de urina de cães (46%) e gatos (31,4%) com cistite (DWIGHT; HIRSH, 1973).

Nos humanos, as infecções de trato urinário mais comuns são causadas por cepas uropatogênicas de *E.coli* (>80% dos casos). *Klebsiella* e *Proteus*, bactérias gram negativas,

estão em segundo lugar entre as bactérias causadoras de infecções de trato urinário. A maior parte dessas infecções ocorre em meninas com menos de dez anos e em mulheres entre 20 e 40 anos de idade. A infecção no homem ocorre, mas com menor incidência. Isso se dá devido à distância do colón e da uretra na mulher ser menor do que no homem, e a uretra do homem é maior que o da mulher dificultando a entrada da bactéria. Além disso, o trato genital feminino é mais facilmente colonizado por bactérias pela umidade do que no masculino. Acredita-se que a susceptibilidade tem uma predisposição genética. São muito comuns essas infecções serem recorrentes, e isso se dá devido a reinfecção pelas bactérias do colón (SAYLERS; WHITT, 2002). A incidência de cistite em cadelas aumenta com a idade. Na maior parte dos casos de infecção de trato urinário, a cepa de *E.coli* foi isolada da urina (PEETERS, 1994). As infecções urinárias são quase sempre infecções ascendentes. Ou seja, a bactéria infecta primeiramente a uretra (uretrite) e a bexiga (cistite). Em alguns casos, a infecção continua ascendendo, e os rins são infectados (pielonefrite) (SAYLERS; WHITT, 2002).

A colonização da vagina, principalmente a área em volta da abertura uretral, também aumenta a oportunidade da bactéria de entrar na abertura uretral. No trato vaginal, a maior parte dos nichos disponíveis está ocupada por microflora residente, principalmente lactobacilos. Qualquer desequilíbrio da microflora residente abre um meio para a colonização do trato vaginal por *E.coli* ou outros patógenos potenciais (SAYLERS; WHITT, 2002).

Apesar de grande parte das cepas de *E.coli* terem a capacidade de provocar infecções do trato urinário, a doença é mais comum com certos sorotipos específicos (MURRAY et al., 1998). A chave das bactérias uropatogênicas é sua habilidade de aderir na mucosa da bexiga. Sem essa habilidade as bactérias seriam eliminadas pela ação mecânica da urina. Além disso, as bactérias aderentes ficam mais próximas de células mucosas e assim estão numa posição para provocar uma resposta inflamatória. Um número grande de adesinas da *E.coli* já foi

reconhecido. O pili Tipo 1 são relacionadas à colonização do trato vaginal, e uma contribuição pequena na bexiga. 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 *pap* (pili associado com pielonefrite). Genes codificando o pili P estão aglomerados no cromossomo da bactéria. A regulação do gene *pap* é complexa. A expressão dos genes *pap* 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 (PARRY; ROOKE, 1985).

Cepas que possuem a fímbria P produzem uma infecção disseminada quando administradas através da via intravenosa a camundongos, sugerindo que a fímbria P pode ter um papel importante fora do trato urinário (VAN DEN BOSCH et al., 1982).

Estudos em animais sugerem que a fímbria P é importante na localização da infecção no trato urinário superior, que promove uma resposta inflamatória aumentada no local, e que contribui para a infecção renal (JOHNSON, 1991).

Johnson, Stell e Delavari (2001) analisaram 63 amostras de fezes de cães colhidos no ambiente urbano em Minnesota (EUA). *E.coli* foi isolada de 30% das amostras, e em 56% dessas foi observado o gene *pap*. Também observaram que mais de 50% dessas amostras com o gene *pap* eram diretamente relacionadas com isolados de humanos com cistite, pielonefrite, bacteremia ou meningite. Com esses dados concluíram que ExPEC (*E.coli* patogênica extra-intestinal) é bastante prevalente em fezes caninas, que conseqüentemente poderia ser um reservatório de ExPEC para a aquisição de humanos.

Wullt et al. (2001) observaram que a fímbria P pode ter um importante papel na adesão bacteriana e colonização do endométrio na patogênese da piometra.

Além dos pili, existem as fímbrias S (*sfa*), que se constituem em importantes adesinas associadas a doenças no trato urinário tanto em humanos como em animais (SAYLERS; WHITT, 2002).

As cepas uropatogênicas possuem também adesinas que não são pili, como as adesinas afimbriais (*afaI* e *afaIII*) e adesina Dr. (SAYLERS; WHITT, 2002). A aderência é uma etapa importante na infecção da bexiga, mas a habilidade da bactéria de crescer rapidamente na urina também pode ser um fator crítico para a virulência de uropatógenos (GORDON; RILEY, 1992).

A resposta inflamatória presente nessas infecções provocadas por *E.coli* é devida à estimulação por LPS e pela produção de exotoxinas. Algumas *E.coli* uropatogênicas produzem uma toxina extracelular originalmente chamada de hemolisina porque ela lisa eritrócitos e também destrói outros tipos celulares, levando à liberação de citocinas e estimulação de uma resposta inflamatória (MURRAY et al., 1998; SAYLERS; WHITT, 2002). A alfa hemolisina lisa eritrócitos de todos os mamíferos e até de peixes (RENNIE; ARBUTHNOTT, 1974). Essa alfa hemolisina é uma toxina protéica citolítica secretada pela maioria das *E.coli* hemolíticas (CAVALIERI; BOHACH; SNYDER, 1984). A produção de hemolisina é codificada por um gene *hly* localizado em isolados de *E.coli* num plasmídeo nas cepas de animais (WELCH; HULL; FALKOW, 1983). Essa hemolisina pertence a uma família de proteínas designadas hemolisinas RTX. As toxinas RTX agem criando poros nas membranas celulares dos eucariotas. O uso de cálcio pela toxina, é necessário para a formação do poro. O cálcio se liga à toxina na região que contém o aminoácido repetido. Níveis altos de toxina lisam células por causa da formação dos poros que liberam componentes citoplasmáticos. Esse tipo de ação pode causar lesão renal. Entretanto, níveis de toxinas baixos demais para causar a lise, podem causar efeitos variados nas funções da célula

eucariótica, como a liberação de citocinas, e a produção de superóxido pelas células renais. Experimentos em modelos animais comprovaram que a hemolisina media a lesão renal. Além disso, cepas de *Proteus* produzem uma hemolisina muito similar à *HlyA* da *E.coli*, e causam infecções renais (SAYLERS; WHITT, 2002). *E.coli* produz pelo menos duas hemolisinas, denominadas alfa e beta, que formam zonas claras no Agar sangue. A hemolisina beta é ligada à célula, e pouco se conhece a respeito de seu papel na virulência. A hemolisina alfa é uma proteína secretada por cepas virulentas. A hemolisina lesa membranas celulares (HIRSCH; ZEE, 2003).

Além de causar a lise de eritrócitos, a hemolisina é tóxica a uma variedade de células do hospedeiro de certas maneiras que provavelmente contribuem à inflamação, lesão tecidual, e combate às defesas do hospedeiro (BHAKDI, 1989). Monócitos e granulócitos são altamente suscetíveis à citotoxina da hemolisina, e os linfócitos são relativamente resistentes (GADEBERG; ORSKOV; RHODES, 1983).

Em algumas cepas, a produção de hemolisina é diminuída em condições com alto teor de ferro, e aumentada em condições com baixo teor de ferro (MACKMAN et al., 1986). A produção de hemolisina também é associada com aderência em células epiteliais (HUGHES et al., 1983), mas não foi relacionada com produção de aerobactina (ORSKOV SVANBORG EDEN; ORSKOV, 1988) ou com presença de *afa* (LABIGNE-ROUSSEL; FALKOW, 1988).

Alguns estudos já mostraram que a produção de *Hly* é uma propriedade associada com cepas de *Escherichia coli* que causam infecções extra-intestinais em humanos (CAPRIOLI et al., 1987; HUGHES et al., 1983). Cepas de *E.coli* isoladas de cães e gatos com infecção do trato urinário têm uma alta prevalência de *hly* (WILSON et al., 1988).

Na infecção do trato urinário em humanos, a produção de hemolisina é mais comum em cepas de pacientes com pielonefrite (49%), seguido pelos pacientes com cistite (40%) (BROOKS; BENSEMAN; PECK, 1981).

Low et al. (1988) compararam genes *pap* e *hly* de cães (n=4) e humanos (n=6) com infecção do trato urinário, e observaram que todos os isolados tinham o DNA similar. Esses resultados sugeriram que algumas cepas de *E.coli* podem ser capazes de infectar tanto cães como humanos.

O fator necrosante citotóxico (*cnf*) tem sido descrito, em anos recentes, associado à uma grande variedade de infecções no homem e em animais, sendo considerado um importante mecanismo de virulência de *E.coli* (WRAY; WOODWARD, 1997).

No homem, a primeira descrição de *E.coli* produtora de *cnf* foi realizada a partir da ocorrência de infecção entérica em uma criança (CAPRIOLI et al., 1983). Embora a produção de *cnf* ocorra geralmente em cepas isoladas de distúrbios entéricos no homem (DE RYCKE; GONZALES; BLANCO, 1990), o fator necrosante citotóxico tem sido identificado em diferentes afecções extra-intestinais, especialmente em casos de septicemia e infecções do trato urinário (ALONSO; BLANCO; GONZALES, 1987; CAPRIOLI, 1987). Em animais o *cnf* tem sido isolado nas espécies suína, canina e felina (DE RYCKE; GONZALES; BLANCO, 1990; OSWALD et al., 1991).

Dois tipos de fatores necrosantes citotóxicos, *cnf1* e *cnf2*, já foram descritos. A produção de *cnf1* é associada com a produção de α -hemolisina, e cepas de *E.coli* produtoras de *cnf1* já foram isoladas de infecções intestinais e extraintestinais de cães assim como de fezes de cães assintomáticos (POHL; OSWALD; VAN MUYLEM, 1993). *cnf2* não foi relatado em cães (POHL; OSWALD; VAN MUYLEM, 1993; PRADA; BALJER; DE RYCKE, 1991). Esses *cnfs* interagem com uma proteína Rho ligada a guanosina 5'-trifosfato

da célula epitelial, resultando em pregueamento da membrana. O gene que codifica CNF1 está localizado no cromossomo (ilha de patogenicidade), um locus que também contém o gene para inúmeros fatores de virulência codificados cromossomicamente como, hemolisina, resistência sérica e a proteína de aderência Pap. O gene que codifica *cnf2* é localizado no plasmídio (HIRSCH; ZEE, 2003). A produção de *cnf1* é intimamente relacionada a cepas de *E.coli* que causam doenças extra-intestinais em cães e gatos, mas a contribuição de *cnf1* nessas doenças não é bem conhecida (BEUTIN, 1999). *cnf2* foi isolada raramente de gatos e não foi detectado em cães. Cepas de *E.coli* produtoras de *cnf1* já foram isoladas de infecções intestinais e extra-intestinais de cães assim como de fezes de cães assintomáticos com porcentagens de isolamento muito semelhantes (POHL; OSWALD; VAN MUYLEM, 1993).

Nolte et al. (1993) observaram que o grau de infiltração de células inflamatórias no epitélio endometrial era maior em presença de *cnf*.

Caprioli et al. (1987) observaram que 70% das cepas de *E.coli* isoladas de fezes ou infecções extra-intestinais em humanos eram capazes de produzir também o fator *cnf*.

Yuri et al. (1998) demonstraram que *E.coli* isolada de urina de cães e gatos com infecção do trato urinário freqüentemente possuíam os mesmos fatores de virulência uropatogênicas que as cepas isoladas de humanos.

Outros fatores também contribuem para a virulência das *E.coli* uropatogênicas, como a aquisição de ferro. Essas *E.coli* possuem diversos mecanismos de sequestro de ferro, incluindo sistemas sideróforos (SAYLERS; WHITT, 2002).

O ferro é necessário a todas as células vivas (WEINBERG, 1978). A *E.coli* utiliza o ferro para o transporte e armazenamento de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons e no metabolismo de peróxidos (BAGG; NEILANDS, 1987).

Uma parte da resposta do hospedeiro à infecção é reduzir a quantidade de ferro disponível para o patógeno invasor através da diminuição da absorção intestinal de ferro, sintetizando proteínas adicionais de ferro, e deslocando o ferro do plasma para o armazenamento intracelular (WEINBERG, 1978). Com isso, a bactéria fica frente a um desafio para conseguir suprir suas necessidades de ferro durante a infecção. Na *E.coli*, a aerobactina (gene *iuc* – iron uptake:chelate), um sideróforo, é a mais efetiva dentre os sistemas de quelação de ferro utilizadas pelas bactérias entéricas para a aquisição de ferro (DE LORENZO; MARTINEZ, 1988).

Sideróforos permitem aos microorganismos adquirir ferro a partir do meio ambiente. Para se multiplicar no interior do hospedeiro, os microorganismos precisam adquirir ferro das proteínas carreadoras de ferro do hospedeiro, por causa da pequena disponibilidade de ferro livre no hospedeiro. Sideróforos que removem ferro das proteínas carreadoras são necessários para que a bactéria possa ter capacidade invasiva (HIRSCH; ZEE, 2003).

Cepas com o sistema de aerobactina têm uma vantagem de crescimento em condições com pouco ferro, incluindo sangue e urina diluída (BRAUN; BRAZEL-FAISST; SCHNEIDER, 1984; MONTGOMERIE et al., 1984).

O sistema aerobactina e a fímbria P são normalmente encontrados em conjunto em isolados de pacientes humanos com infecção do trato urinário (JACOBSON et al., 1988). Plasmídios carreando a região da aerobactina às vezes, também carregam genes de resistência a antimicrobianos (DELGADO-IRIBARREN et al., 1987).

O sistema de aerobactina é isolado com mais frequência em cepas de *E.coli* isoladas de pacientes com pielonefrites (73%), cistites (49%), ou com bacteremias (58%) do que de amostras de fezes (41%). Isso sugere que a aerobactina contribui para a virulência dentro e fora do trato urinário (JOHNSON, 1991).

Muitas cepas possuem cápsula e são sérico resistentes, principalmente aquelas que causam infecções renais e sistêmicas vindas de infecções do trato urinário (SAYLERS; WHITT, 2002).

Chen et al. (2003) isolaram *E.coli* de cães com piometra (n=23) e de fezes de cães saudáveis (n=24). Todas as amostras, exceto uma, possuíam pelo menos um fator de virulência de cepas uropatogênicas. Nenhum isolado foi positivo para o gene *afa1*. Eles observaram que havia uma similaridade entre as prevalências dos genes de *pap*, *hlyA*, *cnf1*, *afa1* e *sfa* nos isolados de piometra e as prevalências desses mesmos genes de isolados de cães e humanos com infecção do trato urinário, sugerindo que os determinantes de virulência no útero canino são semelhantes aos determinantes de virulência nos tratos urinários de cães e humanos. Encontraram uma alta prevalência de *pap*, *cnf1*, *hlyA* e *sfa* nos isolados de piometra e uma baixa prevalência de *iuc* e *afa1*.

Westerlund et al. (1987) concluíram que essa prevalência baixa de *iuc*, nos isolados caninos, indica que as cepas caninas utilizam sistemas diferentes para o sequestro de ferro.

O fator de resistência aos antimicrobianos ou fator, encontrado em algumas cepas de *E.coli*, também constitui importante fator de virulência. Este fator pode ser transmitido a outros microrganismos da mesma espécie, favorecendo a manutenção de linhagens resistentes às diferentes drogas dificultando, conseqüentemente, a terapia antimicrobiana frente a infecções desencadeadas pelo agente (TRABULSI; TOLEDO, 1999). Adicionalmente, evidências têm apontado que cepas de *E.coli*, de origem animal, adquiridas pelo homem por via oral, podem transferir o fator R às cepas do mesmo microrganismo de origem humana (HIRSCH; WIGER, 1978). Essa bactéria tem uma incidência elevada de resistência a antibióticos por causa da presença de uma parede celular gram-negativa e uma incidência alta

de transferência conjugativa de determinantes de resistência (MONAGHAN; TIERNEY; COLLERAN, 1981).

Os cães e gatos pertencem àquelas espécies de animais que estão vivendo próximos ao humano por milhares de anos. Como consequência, contatos entre humanos, cães e gatos são numerosos e a possibilidade de transmissão de microrganismos entre essas diferentes espécies de hospedeiros é extremamente alta (BEUTIN, 1999). A transmissão de *E.coli* patogênica enteral e extra-intestinal entre cães e humanos já foi relatada por Beutin (1999). Whittam, Wolfe e Wilson (1989) observaram que cepas de *E.coli* uropatogênicas de humanos, cães e gatos eram similares geneticamente. Low et al. (1988), sugeriram que cepas de *E.coli* de humanos e de cães poderiam ser transmitidas como patógenos urinários entre cães e humanos. Senior, Deman e Svanborg (1992) observaram que fenotipicamente, a maioria das *E.coli* uropatogênicas de cães aglutinavam eritrócitos caninos, mas não aglutinavam eritrócitos de humanos, e que aderiam a células uroepiteliais de cães, mas não de humanos, no entanto, cepas de *E.coli* de humanos agiam de modo contrário.

Cães e gatos podem ter um papel importante na transmissão como vetores de *E.coli* para outros animais e para o humano. Diversos estudos indicaram que a transmissão, de clones de *E.coli* uropatogênicas similares aos clones fecais, entre humanos, cães e gatos já ocorreu e pode ocorrer novamente (WHITTAM; WOLFE; WILSON, 1989). Beutin (1999) observou que alguns tipos isolados de *E.coli* patogênica extra-intestinal, de cães, gatos e humanos foram encontrados como sendo geneticamente próximos, mas mostraram diferenças nas suas adesinas fimbriais P, que determinam especificidade pelo hospedeiro.

3.2.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Bactéria gram-negativa com cápsula, imóvel e pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Isolada normalmente da flora intestinal de humanos e animais (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; KRIEG, 1984). O membro mais comumente isolado desse gênero é *K.pneumoniae* (MURRAY et al., 1998). A *K.pneumoniae* aparece nas vias respiratórias e nas fezes de aproximadamente 5% dos indivíduos normais da população humana. Pode ser isolada de conteúdo intestinal, solo, água, sementes e outros. Conhecida originalmente como patógeno respiratório, hoje em dia é comumente encontrada em infecções respiratórias e urinárias (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; KRIEG, 1984). Organismos desse gênero são patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário, e diversos outros tipos de infecção. O trato gastrointestinal é considerado um dos principais reservatórios e principal fator de transmissão. *K.pneumoniae* também causa metrite em éguas e mastite em bovinos (KRIEG, 1984). Membros do gênero *Klebsiella* têm uma cápsula proeminente, que é responsável pela aparência mucóide de colônias isoladas e pela virulência aumentada desse organismo (MURRAY et al., 1998). Algumas cepas de *K.pneumoniae* produzem uma enterotoxina termoestável que promove hipersecreção de líquidos e eletrólitos na luz do intestino delgado e, assim, provoca diarreia. Aparentemente, a enterotoxina possui propriedades semelhantes às da enterotoxina termoestável da *E.coli*. Existe a possibilidade dos plasmídeos carreando genes apropriados terem sido transferidos de *E.coli* para tornar as bactérias de *Klebsiella* toxigênicas. Estes plasmídios poderiam também, ser transferidos para *Citrobacter* entre outros (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982). Nos últimos anos houve um aumento no número

de infecções causadas por bactérias do gênero *Klebsiella*, devido a cepas com resistência múltipla a antimicrobianos (KRIEG, 1984).

3.2.1.3 *Salmonella*

A *Salmonella spp* primariamente tem motilidade, não forma esporos, é um bastonete gram negativo aeróbico da família *Enterobacteriaceae* (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982; MEAD; SLUTSKER; DIETZ, 1999). Como outros membros da família *Enterobacteriaceae*, as salmonelas possuem vários antígenos O e diferentes antígenos H (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982). Há atualmente mais de 2000 sorotipos descritos da *Salmonella* que já foram associadas com doenças humanas e em animais. A *Salmonella spp* é uma das principais causadoras de doença transmitida por alimento no ser humano, estimando 1,4 milhões de casos por ano nos Estados Unidos (MEAD; SLUTSKER; DIETZ, 1999; MURRAY et al., 1998). O reservatório dos integrantes do gênero *Salmonella* é o trato gastrointestinal de animais de sangue frio e quente (HIRSCH; ZEE, 2003). A maior parte das salmonelas é patogênica principalmente em animais que constituem o reservatório da infecção humana. Os animais acometidos incluem aves domésticas, porcos, roedores, gado bovino, mascotes e muitos outros. No homem as salmonelas produzem três tipos principais de enfermidades; as “febres entéricas”, bacteremia com lesões focais, e enterocolites (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982). As fontes de infecção são alimentos e bebidas contaminados por salmonelas. Outras fontes como solo contaminado, vegetação, água, leite e outros laticínios, mariscos, ovos em pó ou congelados, coco dessecado, carne e seus derivados,

corantes de origem animal, animais de estimação, fezes de casos subclínicos ou portadores e portadores são importantes (HIRSCH; ZEE, 2003; JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982). Apesar de muito ser conhecido a respeito das relações genéticas das cepas de *Salmonella*, epidemiologia das infecções, e manifestações clínicas da doença, pouco se é conhecido sobre o papel específico dos fatores de virulência. Após a ingestão e passagem através do estômago, organismos de *Salmonella* são capazes de invadir e se replicar nas células revestindo o lúmen do intestino. A aderência da bactéria as microvilosidades na superfície da célula estimula o rearranjo da actina, com englobamento da bactéria com vesículas endocíticas. A bactéria se mantém nas vesículas e se replicam até a célula sofrer lise (MURRAY et al., 1998). Os integrantes do gênero *Salmonella* secretam exotoxinas. Foram descritas três dessas toxinas, cada uma afetando uma célula-alvo (geralmente uma célula epitelial do intestino). Uma delas desregula a síntese de nucleotídeos cíclicos, outra interrompe a síntese protéica e uma terceira possui atividade de fosfolipase A. A enterotoxina, *Stn*, difere da toxina colérica e da toxina LT. A *Stn* produz níveis aumentados de AMPc com resultante influxo de íons e líquido para o lúmen intestinal, resultando em diarreia. A citotoxina causa morte da célula-alvo por interrupção da síntese protéica. A morte celular poderia resultar em anormalidades de secreção e absorção que se manifestaria sob a forma de diarreia. E, a proteína com atividade de fosfolipase A, produziria fluxo de líquido em virtude de sua atividade na via do ácido araquidônico. A salmonela produz sideróforos quando cresce em condições sob restrição de ferro. Plasmídios de vários tamanhos foram associados a virulência em salmonela (HIRSCH; ZEE, 2003).

O isolamento de *Salmonella* spp de cães adultos é de 0 a 2% em animais não diarreicos e 0 a 1% em cães diarreicos (FUKATA; NAITO; YOSHIDA, 2002; MARKS; KATHER; KASS, 2002). *Salmonella* é isolada mais comumente de filhotes e animais de canis, mas, a

maior parte dos cães é portador assintomático (MARKS; KATHER, 2003). Joffe e Schlesinger (2002) avaliaram a prevalência de *Salmonella* em cães que eram alimentados com frango cru, e isolaram *Salmonella* spp em 80% das amostras de frango e em 30% das amostras de fezes.

3.2.1.4 *Proteus*

São bastonetes gram-negativos e móveis. A maioria das espécies é de vida livre e podem ser encontradas na água, no solo, no esgoto, e algumas podem ser encontradas na flora intestinal normal. Provocam enfermidades apenas quando abandonam seu habitat normal no intestino (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982). Aproximadamente, um quarto da população humana, carrega o *Proteus* no intestino, e o próprio paciente pode adquirir uma infecção através de sua própria flora. Infecções também podem ser adquiridas através de transmissão da bactéria de outros infectados ou de um reservatório. Ocorrem também no intestino de camundongos, ratos, macacos, cães, gatos, bovinos, suínos, aves e répteis (KRIEG, 1984). São encontrados, com frequência, em infecções urinárias crônicas (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982). A infecção do trato urinário por *Proteus mirabilis* é a doença mais comum causada por esse gênero. Cepas de *Proteus* produzem grandes quantidades de urease, que divide a uréia em dióxido de carbono e amônia. Isso aumenta o pH da urina e facilita a formação de pedras renais. O aumento da alcalinidade da urina é também tóxico ao uroepitélio (MURRAY et al., 1998). Infecções urinárias causadas por *Proteus*

podem levar a uma bacteremia que são difíceis de tratar e muitas vezes levam a óbito (KRIEG, 1984).

3.2.1.5 *Morganella morganii*

Bactérias bastonetes gram-negativas e móveis, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Ocorrem nas fezes de humanos, cães, e outros mamíferos e répteis. Invasoras oportunistas, isoladas de bacteremias, trato respiratório, e infecções de trato urinário. Infecções primárias em pacientes imunocompetentes são raras (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982).

3.2.1.6 *Citrobacter*

Bactérias bastonetes gram-negativas e móveis (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982). Infecções primárias em pacientes imunocompetentes são raras (KRIEG, 1984).

Membros do gênero *Citrobacter* ocorrem em fezes de humanos e animais saudáveis, e também na água, esgoto, solo e alimento. Nas infecções são isolados de diarreia e urina, e podem causar bacteremia, meningite, otite e abscessos. Casos de meningite neonatal causado por *C. diversus* já foram relatados (KRIEG, 1984).

3.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Bactéria bastonete gram-negativa, aeróbica, móvel, pertencente à família *Pseudomonadaceae* e residente normal da flora do intestino de humanos e animais. Produz pigmentos hidrossolúveis, os quais se difundem nos meios de cultura. Está amplamente distribuída no solo, água, esgotos e ar. Também pode ser encontrada na pele humana e fezes de animais normais. *Pseudomonas* são uma mistura complexa de patógenos oportunistas de plantas, animais, e humanos. A *P.aeruginosa* só é patogênica quando introduzida em áreas desprovidas das defesas normais ou quando participa de infecções mistas (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; MURRAY et al., 1998). Nos últimos anos, devido ao uso intenso de antimicrobianos a quais as espécies de *Pseudomonas* são resistentes, esses agentes têm se tornados importantes em infecções de humanos e animais. A *P.aeruginosa* é atualmente a mais significativa desses patógenos oportunistas (KRIEG, 1984). Muitas cepas de *P.aeruginosa* podem produzir uma exotoxina que inibe a síntese protéica e promove necrose tecidual. Embora a toxina possua propriedades necróticas, seu papel exato nas infecções ainda é indeterminado (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; MURRAY et al., 1998). *P.aeruginosa* possui diversos fatores de virulência, incluindo componentes estruturais, toxinas, e enzimas. A aderência de *P.aeruginosa* a células de hospedeiro é mediada por adesinas. A *P.aeruginosa* produz uma camada mucóide que a protege de fagocitose. Causa doenças como infecções do trato respiratório, trato urinário, ouvido, e olho. Também pode causar bacteremia, endocardite e gastroenterite. Consegue crescer em

praticamente qualquer ambiente com um mínimo de requerimentos nutricionais e tolera uma grande variedade de temperaturas (MURRAY et al., 1998).

3.2.3 *Staphylococcus*

Os estafilococos são bactérias cocos gram-positivos, não móveis, anaeróbicos facultativas. O nome *Staphylococcus* é derivado do termo grego *staphylé*, significando “um cacho de uvas”. Esse nome se refere ao fato das células desses cocos gram-positivos crescerem de uma forma que se assemelha a um cacho de uvas. Esses organismos estão presentes na pele e membranas mucosas de humanos, assim como na pele e membranas mucosas de outros mamíferos e pássaros. *Staphylococcus* é um importante patógeno em humanos (MURRAY et al., 1998). Alguns estafilococos patogênicos provocam supuração, formação de abscessos, uma variedade de infecções piogênicas e até septicemia fatal, além de infecção do trato urinário (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; MURRAY et al., 1998). Normalmente, todas as pessoas têm estafilococos na sua pele, orofaringe, trato gastrointestinal, e trato urogenital. A aderência do organismo à mucosa epitelial é regulada por receptores para os ácidos teicóicos dos estafilococos. Os organismos podem ser transferidos para uma pessoa ou animal suscetível através de contato direto ou através de fômites (MURRAY et al., 1998).

Os estafilococos podem produzir doença tanto por sua capacidade de multiplicação e disseminação ampla nos tecidos, como por sua produção de muitas substâncias extracelulares. Essas substâncias podem ser:

- Exotoxina: É uma mistura termolábil, filtrável e letal para animais. Provoca necrose da pele e contém várias hemolisinas solúveis.
- Leucodicina: É um material solúvel que destrói leucócitos expostos a uma variedade de espécies animais. Sua função patogênica é desconhecida. Os estafilococos patogênicos podem não destruir os leucócitos e serem fagocitados tão eficazmente quanto as variedades não patogênicas. Entretanto, são capazes de uma multiplicação intracelular muito ativa.
- Enterotoxina: É um material solúvel produzido por certas cepas de estafilococos. A enterotoxina é uma proteína que resiste à fervura durante 30 minutos, como também à ação de enzimas intestinais. É uma causa importante de envenenamento alimentar.
- Coagulase: Por definição, o *S. aureus* é capaz de produzir coagulase, uma proteína enzima-símile que coagula o plasma oxalatado ou citratado na presença de um fator contido em muitos soros. A produção de coagulase é considerada sinônima de potencial patogênico invasor.
- Outras substâncias: Entre outras substâncias extracelulares produzidas por estafilococos, estão uma hialuronidase, ou fator de difusão; uma estafiloquinase que provoca fibrinólise; proteinases, lípases e beta-lactamases; uma toxina esfoliativa sob o controle de plasmídeos que pode causar a “síndrome de pele escaldada”; e uma provável toxina responsável pela “síndrome do choque tóxico” (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982).

Os estafilococos podem ser os microrganismos causais de pneumonia, meningite, endocardite ou septicemia com supuração em qualquer órgão (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982).

3.2.3.1 *Staphylococcus epidermidis*

É uma das espécies mais comumente associada com doenças em humanos (MURRAY et al., 1998). O habitat principal de *S.epidermidis* é a pele humana. Normalmente é a espécie predominante de *Staphylococcus* encontrada na pele humana (SNEATH, 1986). É a mais prevalente entre a flora cutânea residente dos animais, e também colonizam o trato respiratório superior (HIRSCH; ZEE, 2003). *S.epidermidis* é reconhecido como um patógeno oportunista (SNEATH, 1986). Às vezes causa mastite em bovinos (HIRSCH; ZEE, 2003).

3.2.3.2 *Staphylococcus schleiferi*

É uma das espécies mais comumente associada com doenças em humanos (MURRAY et al., 1998). Está associado à otite externa de cães (HIRSCH; ZEE, 2003). Frank et al. (2003) relataram que *S.schleiferi* é isolado de cães com piodermite recorrente.

3.2.3.3 *Staphylococcus intermedius*

O *S.intermedius* é uma espécie comum, e muitas vezes predominante, nas membranas nasais e pele de carnívoros (cães, raposas, etc.). Também já foi isolado de narinas de éguas e pombos. Raramente é isolado de humanos ou outros primatas. Pessoas que possuem carnívoros domésticos (cães) podem, às vezes, carregar populações dessa espécie (SNEATH,

1986). Também ocorrem transitoriamente no trato gastrointestinal (HIRSCH; ZEE, 2003). Essa espécie já foi relacionada a uma variedade grande de infecções em cães, como otite, ferimentos, piodermite e mastite. É um patógeno em potencial para animais (SNEATH, 1986). *Staphylococcus intermedius* é a mais freqüente bactéria piogênica em cães, sendo a principal bactéria envolvida na piodermite canina. Também ocorre em infecções respiratórias, genitais, hemolinfáticas, ósseas e articulares (HIRSCH; ZEE, 2003).

3.2.3.4 *Staphylococcus caprae*

S.caprae é isolado de leite de cabras (SNEATH, 1986). Vandenesch et al. (1995) isolaram *S.caprae* em humanos com endocardites, infecções do trato urinário e bacteremia. Kawamura et al. (1998) observaram que cepas de *S.caprae* são amplamente distribuídas em infecções em humanos, e que muitas cepas são identificadas erroneamente, por isso a prevalência relatada até então é baixa.

3.2.4 *Streptococcus*

Os estreptococos são microrganismos esféricos, caracteristicamente dispostos em cadeias, Gram-positivos, geralmente imóveis e amplamente distribuídos em natureza. A maior parte das espécies são anaeróbicas facultativas. Eles produzem uma série de substâncias extracelulares e enzimas. Sua capacidade de lisar as hemácias em diversos graus constitui um

importante critério para sua classificação (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982; MURRAY et al., 1998). Os estreptococos são responsáveis por um número grande de doenças importantes no homem e nos animais. O grupo piogênico possui a maior parte dos patógenos, mas muitas das outras espécies são comumente associadas em processos infecciosos, muitas vezes como patógenos oportunistas. Streptococos são encontrados nas mucosas da boca, trato respiratório, trato gastrointestinal, trato genitourinário, e pele de humanos e de animais. Também estão presentes no leite e produtos lácteos, alguns alimentos e plantas, solo e água contaminada por fezes (SNEATH, 1986). Podem causar infecções do trato respiratório superior com linfadenite (eqüinos, suínos, gatos, cobaias e humanos), infecções respiratórias e septicêmicas neonatais (potros, leitões, filhotes de cães e crianças), pneumonias e complicações secundárias (eqüinos, primatas, pequenos carnívoros e humanos), e infecções piogênicas não relacionadas ao trato respiratório (infecções do trato genitourinário e mastite bovina) (HIRSCH; ZEE, 2003).

3.2.4.1 *Streptococcus pyogenes*

Estreptococo beta-hemolítico do Grupo A de Lancefield. Patógeno associado à invasão local ou sistêmica e às doenças pós-estreptocócicas, causadas por reações imunológicas (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982). É um importante causador de variadas doenças supurativas e não supurativas. A virulência das bactérias desse grupo, é determinada pela

variedade de moléculas estruturais, e toxinas e enzimas elaboradas (MURRAY et al., 1998). Patogênico ao homem, e alguns animais. Isolado do trato respiratório, lesões de pele, exsudatos inflamatórios, sangue, e pó contaminado no ambiente (SNEATH, 1986). Possui uma proteína M na parede celular que impede a deposição eficiente de componentes de complemento necessários à opsonização, o que lhe confere atividade antifagocítica (HIRSCH; ZEE, 2003).

3.2.4.2 *Streptococcus canis*

Provoca linfadenite cervical em gatos e cobaias, e septicemia em filhotes de cães recém-nascidos. Também é relacionado a pneumonias e processos piogênicos inespecíficos em cães e gatos. Já foi associado a uma síndrome semelhante à síndrome do choque tóxico e a fascilite necrosante em cães (HIRSCH; ZEE, 2003).

3.2.5 *Enterococcus faecium*

Os enterococos são cocos gram-positivos, tipicamente arranjados em pares ou pequenas cadeias e imóveis. São anaeróbios facultativos (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982). É um residente de tratos intestinais de humanos e da maioria dos animais. Comum em alimentos não estéreis, mas sem contaminação fecal (SNEATH, 1986). É

encontrado nas infecções urinárias, cardiovasculares e nas meningites (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; MURRAY et al., 1998). A maior parte das infecções com enterococos originam da flora intestinal do próprio doente, mas esses organismos também podem ser adquiridos de pessoa a pessoa ou animal para animal, e através de alimento ou água contaminada (MURRAY et al., 1998).

3.2.6 *Corynebacterium*

As corinebactérias são bastonetes gram-positivos, imóveis, não-esporulados e anaeróbios facultativos. Normalmente colonizam a pele, trato superior respiratório, trato gastrointestinal, e trato urogenital de humanos (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; MURRAY et al., 1998).

O *C.jejkeium* é um patógeno oportunista bem conhecido. Esse organismo é muito resistente a antibióticos (MURRAY et al., 1998).

3.3 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

O desenvolvimento de resistência bacteriana a drogas antimicrobianas não é um fenômeno novo e tem sido documentada desde a introdução dos antibióticos. Resistência múltipla a drogas emergiu no final dos anos 50 e se tornou um problema significativo na medicina clínica durante os anos 60 (TENOVER; HUGHES, 1996).

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 microrganismos, 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 (WATANABE, 1963).

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana em animais de companhia e suas implicações à saúde humana são pouco documentadas (NORMAND et al., 2000).

Os agentes antimicrobianos fluorquinolonas são muito utilizados na medicina humana e veterinária (COHN et al., 2003). A enrofloxacin 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 *Escherichia coli* como uma mutação cromossomal no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da enzima DNA gyrase (BROWN; AYMES, 1998).

Cooke et al. (2002) observaram em cepas de *E.coli* isoladas de cães com infecções do trato urinário, 53% de resistência à enrofloxacin e 47% de sensibilidade. E observaram que houve um aumento significativo de resistência, de isolados de *E.coli* de urina de cães, à enrofloxacin de 1994 a 1997 num hospital veterinário na Califórnia, e que esse aumento seguiu um aumento no uso de enrofloxacin nesse período.

Cohn et al. (2003) observaram um aumento significativo na proporção de isolados bacterianos, de trato urinário de cães, resistentes à enrofloxacin 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.

Brothers, Gibbs e Wooley (2002) observaram que isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus spp.*, de cães com infecção do trato urinário, expostos à enrofloxacinina desenvolveram resistência rapidamente, enquanto que *Klebsiella*, *Proteus* e *Streptococcus spp* eram menos prováveis de desenvolverem essa resistência. Nenhum isolado de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* desenvolveram resistência, em algumas cepas existia uma variação de suscetível a intermediário.

Gaynes e Monnet (1997) associaram o aumento do uso de antibióticos ao aumento da resistência das bactérias a esses antibióticos.

Usualmente, *E.coli* isoladas de animais de produção são sensíveis a gentamicina, amicacina, sulfa + trimetoprim e ceftiofur. São usualmente resistentes a tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas e ampicilina (HIRSCH; ZEE, 2003).

Adwan et al. (2004) fizeram um estudo com 80 isolados de *Escherichia coli* de pacientes humanos na Palestina, com infecções do trato urinário. Eles observaram 65% de resistência à ampicilina, 75% de resistência à cefotaxima, 6,25% de resistência à gentamicina e 1,25% de resistência à amicacina.

Cui et al. (2004) observaram 83% de resistência à ampicilina em isolados de *E.coli* de pacientes com infecção no trato urogenital (n=148).

Lau, Peng e Chang (2004) observaram 80% de resistência à ampicilina, 59% à cefalotina, 29% à gentamicina e 56% à sulfa + trimetoprim em isolados de *E.coli* de pacientes com infecção do trato urinário em Taiwan.

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.

3.3.1 Bactérias Gram negativas

Resistência múltipla a antimicrobianos na família *Enterobacteriaceae* é baseada, na maioria das vezes, na presença de elementos extra cromossomais chamados de fatores R. A transmissão horizontal de resistência múltipla já foi demonstrada entre membros da família *Enterobacteriaceae*, como entre *E.coli* e *Salmonella* spp. (DWIGHT; HIRSH, 1973).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são geralmente resistentes a cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina e sulfonamida (MARKS; KATHER, 2003).

Estão se tornando cada vez mais comuns as cepas de salmonelas resistentes ao cloranfenicol e à ampicilina. O trimetoprim-sulfametoxazol pode ser uma droga útil (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982). As opções de tratamento podem ser comprometidas por aquisição de plasmídio R, que codifica resistência a múltiplos antibióticos (HIRSCH; ZEE, 2003).

P.mirabilis tem resistência intrínseca à polimixina. A maior parte de *P.mirabilis* é resistente a cloranfenicol. Geralmente é sensível à ampicilina. O *P.mirabilis* pode adquirir plasmídios que codificam resistência a antimicrobianos (KRIEG, 1984).

Cepas de *Morganella* geralmente são resistentes à ampicilina e cefalotina, e geralmente são suscetíveis a cloranfenicol. Há muita variação de susceptibilidade entre cepas à tetraciclina (KRIEG, 1984).

A terapia antimicrobiana em bactérias *Citrobacter* pode ser ineficaz devido a esses organismos serem freqüentemente resistentes a múltiplos antimicrobianos (MURRAY et al., 1998). *C.diversus* é susceptível a aminoglicosídeos, cefalosporinas, cloranfenicol e tetraciclina, e geralmente é resistente à ampicilina (KRIEG, 1984).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é resistente à maioria dos antimicrobianos determinada por plasmídios e pode mutar para cepas mais resistentes ainda durante a terapia (KRIEG, 1984; MURRAY et al., 1998). A gentamicina, tobramicina e amicacina estão entre os antimicrobianos mais efetivos contra *P.aeruginosa* (KRIEG, 1984). No trato urinário de cães, a tetraciclina alcança concentrações suficientes para destruir a maioria dos isolados (HIRSCH; ZEE, 2003).

3.3.2 Bactérias Gram positivas

Nos estafilococos, devido à freqüência de cepas resistentes aos antimicrobianos, todos os isolados devem ser submetidos a antibiogramas, a fim de ajudar na escolha das drogas de uso sistêmico. A resistência ao grupo da eritromicina costuma surgir tão rapidamente que

estas drogas não devem ser utilizadas isoladamente. A resistência à tetraciclina e à penicilina, determinada por plasmídios, pode ser transmitida entre os estafilococos por bacteriófagos, graças à transdução (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982).

Mais de 70% dos estafilococos isolados nas comunidades dos Estados Unidos são geralmente sensíveis às cefalosporinas ou vancomicinas (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982). Em geral são resistentes à penicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, vancomicina e sulfa+trimetoprim (HIRSCH; ZEE, 2003).

O *S.epidermidis* tem susceptibilidade à tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, eritromicina e gentamicina é variável, e a resistência a esses antibióticos são muitas vezes mediada por plasmídios. Susceptibilidade à tobramicina, amicacina, clindamicina, oxacilina também é variável (SNEATH, 1986).

O *S.intermedius* é suscetível a cloranfenicol e vancomicina. Susceptibilidade à tetraciclina e eritromicina é variável. O *S.intermedius* pode carregar plasmídios, mas seu relacionamento com a resistência a antimicrobianos ainda não foi determinado (SNEATH, 1986).

Todas as cepas de *S.caprae* são suscetíveis à penicilina G, eritromicina e neomicina (SNEATH, 1986).

Todos os estreptococos beta-hemolíticos do grupo A são sensíveis à penicilina G, e a maioria também o é à eritromicina. Alguns são resistentes às tetraciclina. Por outro lado, os estreptococos alfa-hemolíticos e os enterococos apresentam uma variação considerável de susceptibilidade aos antimicrobianos (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; SNEATH, 1986). O uso de antimicrobianos em humanos leva ao surgimento de cepas resistentes na flora normal (SNEATH, 1986).

As cepas de *S.pyogenes* são muito sensíveis à penicilina entre outros antimicrobianos (SNEATH, 1986).

A terapia com antimicrobianos em infecções causadas por enterococos é complicada. Mais de 25% dos enterococos são resistentes a aminoglicosídeos, e mais de 20% são resistentes à vancomicina. Essa resistência é mediada por plasmídios e pode ser transferida de uma bactéria a outra (MURRAY et al., 1998).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado utilizando-se as instalações do Laboratório de Doenças Infecciosas (Bacteriologia e Micologia) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, bem como o Laboratório de Sanidade Suína do Departamento de Patologia, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1 COLHEITA DO MATERIAL

Foram examinadas 100 cadelas, com diagnóstico confirmado de piometra todas atendidas no Setor de Obstetrícia do HOVET (Hospital Veterinário) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para os exames microbiológicos foram colhidas (após cirurgia de ovário-salpingo-histerectomia), 200 amostras do conteúdo intra-uterino, sendo uma amostra de cada corno (volume de aproximadamente 5 mL), de cadelas com piometra, utilizando-se seringas e agulhas (40x12) descartáveis estéreis. As amostras colhidas foram transportadas ao laboratório em condição de refrigeração onde foram submetidas aos exames microbiológicos.

Procedeu-se também à colheita de 200 fragmentos de útero (aproximadamente 2cm² de parede uterina) para realização de exames histopatológicos. Foi colhido um fragmento de útero de cada corno uterino. Os fragmentos colhidos foram acondicionados em frascos contendo formol a 10 %.

4.2 AVALIAÇÃO DO *STATUS* MICROBIOLÓGICO DE AMOSTRAS DE CONTEÚDO UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA

As amostras colhidas foram cultivadas em ágar sangue de carneiro (5%)¹ e ágar MacConkey² com incubação em aerobiose, a 37°C com leituras a 24-96 horas. As amostras também foram cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose³ com incubação em aerobiose, em temperatura ambiente, e mantidas por um período mínimo de 7 dias. Paralelamente as amostras foram cultivadas em caldo BHI (Brain and Heart Infusion) e caldo Sabouraud-dextrose, com incubação em aerobiose, respectivamente a 37°C por 24 horas e temperatura ambiente por cinco dias. As amostras cultivadas em caldo BHI também foram semeadas em ágar sangue de carneiro (5%) e ágar MacConkey, e as amostras cultivadas em caldo Sabouraud-dextrose foram semeadas em ágar Sabouraud-dextrose, sendo a incubação destas, similar à descrita anteriormente para o cultivo inicial.

Os microrganismos isolados foram identificados de acordo com Lennette et al. (1985) e classificados segundo Kreeger-Van-Rig (1984), Krieg e Holt (1994) e Murray et al (1999).

¹ Blood agar base - Oxoid - Hampshire - U.K.

² MacConkey agar - Oxoid - Hampshire - U.K.

³ Sabouraud-dextrose agar - Oxoid - Hampshire - U.K.

4.3 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICRORGANISMOS EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA

A partir das amostras de conteúdo oriundo de piometra das quais foram isolados microrganismos, foram preparadas diluições das mesmas em solução fisiológica estéril (0,85%).

A partir de cada diluição foi colhida uma alíquota de 0,1 mL para cultivo (utilizando-se a técnica de *spread plate* ou, espalhamento em placas) em duplicata em ágar Plate-Count, com incubação a 37°C por um período de 48 horas. Após o período de incubação foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias (u.f.c.)/mL.

4.4 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE “IN VITRO” DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Foi estudada a susceptibilidade "in vitro" dos microrganismos isolados de amostras de conteúdo oriundo de piometra. Os testes foram realizados frente a diferentes antibióticos e quimioterápicos⁵, a saber: cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), oxacilina (1µg), penicilina (10 U.I.), cefalotina (30µg), gentamicina (10µg), vancomicina (30µg), eritromicina (15µg), sulfa+trimetoprin (25µg), ampicilina (10µg), enrofloxacina (5µg), norfloxacina

⁵ Multidisco Gram + A e B - Laborclin – Brasil

(30µg), cefalexina (30µg), polimixina B (300µg), tobramicina (10µg), amoxicilina (10µg), cefoxitina (30µg), clindamicina (2µg), neomicina (30µg) e amicacina (30µg).

Os antibioGramas foram realizados em meio de Müller & Hinton⁶, empregando-se o método de difusão, segundo técnica de Kirby & Bauer.

A interpretação dos antibiogramas foi realizada pela medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento do microrganismo. As concentrações bem como o critério de interpretação foram os recomendados pela “National Commitee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS” em 1999.

4.5 EXAMES HISTOPATOLÓGICOS DE FRAGMENTOS DE ÚTERO DE CADELAS COM PIOMETRA

As 200 amostras de fragmentos de útero de cadelas com piometra colhidas para exames histopatológicos foram incluídas em parafina sendo então realizados cortes de 5 µm a partir das mesmas. Estes cortes foram corados por hematoxilina-eosina (H.E.), montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio óptico comum para avaliação de alterações histopatológicas.

Para verificar a intensidade do processo inflamatório foi utilizado um retículo calibrado acoplado à ocular do microscópio óptico. Em cada fragmento de tecido foram contados dez campos microscópicos onde houve presença de infiltrados celulares que caracterizam os processos inflamatórios.

⁶ Müller & Hinton - Oxoid - Hampshire - U.K.

Utilizando-se o aumento de 400x foi analisada a presença ou ausência de processo inflamatório. De acordo com a área ocupada pelo processo inflamatório presente foi estabelecida uma correspondência em escores de 0 a 4, conforme a tabela 1.

Tabela 1 - Interpretação dos escores correspondentes às áreas ocupadas pelos processos inflamatórios – São Paulo - 2004

Escore	Área ocupada pelo infiltrado celular que caracteriza o processo inflamatório (em porcentagem)
0	<20
1	20 – 38
2	39 – 56
3	57 – 74
4	>75

4.6 ESTUDO DA PRESENÇA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DO CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A pesquisa de fatores de virulência presentes em 151 cepas de *E.coli* isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados os primers, comercialmente disponíveis, para detectar os genes que codificam os pili associados com pielonefrite (*pap*), aerobactina (*iuc*), fator

necrotizante citotóxico 1 (*cnfI*), fímbria S (*sfa*) e adesina afímbrial I (*afa*), hemolisina (*hly*), enterotoxina termo-lábil (LT), enterotoxina termo-estável (*STa* e *STb*), verotoxinas (*VT1* e *VT2*). O tamanho dos amplicons e literatura relevante são apresentadas no tabela 2.

A extração do DNA foi realizada conforme descrito por Boom et al. (1990). A solução de amplificação padrão de PCR consistiu de 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, gelatina 0,001% (w/v), 200 µM de cada um dos deoxinucleosídeos trifosfatos, seqüências de primers e 0,5 U de Taq DNA polimerase, em um volume final de 25 µl. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% e examinados eletroforéticamente após coloração com brometo de etídio. Foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp.

4.6.1 Extração do DNA bacteriano

O protocolo para extração de DNA detalhado a seguir foi realizado segundo descrito por Boom et al. (1990).

Foram adicionados 200µl da cultura a um microtubo contendo 1 mL do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 120gr, Triton 100X 1mL, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 111,2 mL, EDTA 0,5M 8,8 mL) e 40 mL da suspensão carreadora (1gr Terra diatomácea, HCl 50 mL e 5 mL água ultrapura). O microtubo foi agitado por 30 segundos e a zaragatoa foi retirada.

O microtubo contendo a suspensão do microrganismo foi agitado por 1 minuto e deixado sobre a bancada por 10 minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por 90 segundos a 14.000 rpm. O sobrenadante obtido foi descartado e ao pélete formado foi adicionado 1 mL do tampão de lavagem (Tiocianato de Guanidina 120gr, Tris-HCl 0,1 M [pH

6,4] 100mL). O microtubo foi então agitado por 30 segundos e centrifugado por 90 segundos, o sobrenadante obtido foi descartado e o pélete novamente submetido a este procedimento. O pélete obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com etanol (70%) e uma lavagem com acetona. Os microtubos contendo o pélete tratado com acetona foram mantidos em estufa a 37° C por 20 minutos. Após a completa secagem do pélete foram adicionados 100mL de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]) ao microtubo, este foi agitado por 1 minuto e mantido a 56 °C por 10 minutos. Passado este tempo o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado em tubos limpos e numerados. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até sua utilização na PCR. A cada extração realizada utilizou-se como controle positivo uma amostra de *E.coli* sabidamente positiva.

4.6.2 Reação em cadeia da polimerase

Para a reação em cadeia da polimerase foi adicionado a um microtubo 40 pmoles de cada primer, 0,5 unidade de Taq polimerase (Invitrogen), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0.001% gelatina, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 5 mL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 25 mL. Para amplificação do DNA de *Escherichia coli* o termociclador foi programado para 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95° C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo final de 72° por 5 minutos.

A cada amplificação realizada, foram adicionados um controle positivo (contendo o DNA do agente) e um controle negativo.

4.6.3 Detecção do produto amplificado

Os produtos de PCR (10mL) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (10µg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta. O marcador de pares de bases utilizado foi o 100 bp DNA ladder (Invitrogen).

Tabela 2 - “Primers” utilizados na PCR para amplificar fragmentos de diferentes genes para enterotoxinas (LT, STa e STb) e vero citotoxinas (VT1, VT2 e VT2e), e de diferentes genes para *pap*, *sfa*, *afa*, *hly*, *iuc* e *cnf1* – São Paulo - 2004

Genes codificadores das toxinas	Nome do primer	Seqüência do oíligonucleotídeo (5'→3')	Tamanho do produto amplificado	Referência
LT	LTA-1	GGCGACAGATTATACCGTGC	696 bp	Schultsz et al. (1994)
	LTA-2	CCGAATTCTGTTATATATGTC		
Sta	STI-1	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	147 bp	Olsivik e Strockbine (1993)
	STI-2	CTTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC		
STb	STb-1	ATCGCATTCTTCTTGCATC	172 bp	Blanco et al. (1997)
	STb-2	GGGCGCCAAAGCATGCTCC		
VT1	VT1-A	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130 bp	Pollard et al (1990)
	VT1-B	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
VT2 hb ²	VT2-3	CCGTCAGGACTGTCTGAAAC	726 bp	Woodward, Carrol e Wray (1992)
	VT2-5	GAGTCTGACAGGCAACTGTC		
<i>pap</i>	<i>pap</i> -1	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336 bp	Yamamoto et al. (1995)
	<i>pap</i> -2	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		
<i>hly</i>	<i>hly</i> -1	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177 bp	Yamamoto et al. (1995)
	<i>hly</i> -2	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		
<i>iuc</i>	<i>iuc</i> -1	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602 bp	Yamamoto et al. (1995)
	<i>iuc</i> -2	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG		
<i>cnf</i>	<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498 bp	Yamamoto et al. (1995)
<i>sfa</i>	<i>sfa</i> -1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410 bp	Yamamoto et al. (1995)
	<i>sfa</i> -2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		
<i>afa</i>	<i>afa</i> -1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACCTC	750 bp	Yamamoto et al. (1995)
	<i>afa</i> -2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG		

4.7 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pela correlação de Spearman e teste qui quadrado, utilizando-se o “software” GRAPHPAD INSTAT 1992-98 para realização da mesma.

5 RESULTADOS

Foram utilizados 100 úteros de cadelas com idade entre 2 e 16 anos (média 9,18), sendo 91% dessas cadelas com idade maior ou igual a 6 anos. Dessas cadelas, 11 tinham um histórico de utilização de medicação anticoncepcional a base de progestágenos.

Além disso, 64% das cadelas eram nulíparas, 21% primíparas e 14% pluríparas. O número de nulíparas foi maior estatisticamente ($P < 0,05$) do que o número de primíparas e pluríparas.

As raças observadas durante essa pesquisa foram 35% sem raça definida, Poodle (13%), Rottweiler (10%), Pastor Alemão (8%), Cocker Spaniel Inglês (6%), Boxer (4%), Old English Sheepdog (2%), Terrier Brasileiro (2%), Dobermann (2%), Fila Brasileiro (2%), Husky Siberiano (2%), Schnauzer miniatura (2%), Dogue Alemão (2%), Maltês (2%), Pitt Bull (1%), Yorkshire Terrier (1%), Pastor Belga (1%), Fox Terrier Pelo Duro (1%), Dálmata (1%), Mastiff Inglês (1%), Weimaraner (1%) e Lhasa Apso (1%).

5.1 AVALIAÇÃO DO *STATUS* MICROBIOLÓGICO DE AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA

Foram colhidas 200 amostras de conteúdo intra-uterino, sendo essas 200 amostras equivalentes a 100 úteros.

De um total de 200 amostras, houve crescimento de microrganismos em 197 (98,5%) delas. As 3 amostras nas quais não houve crescimento de microrganismos, correspondem a

um único corno uterino de três úteros, sendo que no outro corno dos mesmos, houve crescimento de *E.coli*. Considerando-se as 197 amostras nas quais houve crescimento de microrganismos, foram isolados os seguintes agentes: *E.coli* (74,1%) a partir de 146 amostras, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (3,0%) a partir de 6 amostras, *Citrobacter diversus* (3,0%) a partir de 6 amostras, *Pseudomonas aeruginosa* (2,0%) a partir de 4 amostras, *Salmonella* spp. (2,0%) a partir de 4 amostras, *Proteus mirabilis* (2,0%) a partir de 4 amostras, *Morganella morganii* (1,0%) a partir de 2 amostras, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *azanae* (1,0%) a partir de 2 amostras, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* (1,0%) a partir de 2 amostras, *Staphylococcus intermedius* (1,0%) a partir de 2 amostras, *Staphylococcus epidermidis* (1,0%) a partir de 2 amostras, *Staphylococcus kloosii* (1,0%) a partir de 2 amostras, *Staphylococcus caprae* (1,0%) a partir de 2 amostras, *Streptococcus pyogenes* (1,0%) a partir de 2 amostras, *Streptococcus canis* (1,0%) a partir de 2 amostras, *Streptococcus* sp. (1,0%) a partir de 2 amostras e *Corynebacterium jeikeium* (1,0%) a partir de 2 amostras. Verificou-se ainda a ocorrência de associações de microrganismos em 5 amostras (2,5%) a partir de conteúdo intra-uterino dos cornos de três cadelas, tendo sido isolados *E. coli* e *Staphylococcus kloosii* nos dois cornos de um útero, *E.coli* e *Enterococcus faecium* nos dois cornos de um útero, e *E.coli* e *Streptococcus* sp. em um corno e somente *E.coli* no outro corno de um útero. A frequência de isolamentos de *E.coli* (76,6%) - considerando-se inclusive as cinco amostras nas quais o agente foi isolado em associação com outro microrganismo - foi maior estatisticamente ($P < 0,05$) do que a frequência de isolamento de todos os outros agentes. Não houve crescimento de fungos e leveduras em 100% das amostras.

Gráfico 1 – Distribuição da frequência de ocorrência de microorganismos isolados de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra

5.2 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICORGANISMOS EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA

Foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias/mL das amostras nas quais houve crescimento bacteriano.

Considerando-se as 151 amostras nas quais houve isolamento de *E.coli*, a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 7.600.000 (300 a 13.700.000.000); nas seis amostras com isolamento de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 13.450.000 (695.000 a 15.600.000); nas seis amostras com isolamento de *Citrobacter diversus* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 11.950.000 (500.000 a 99.000.000); nas quatro amostras com isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* a mediana da contagem de

u.f.c./mL foi de 907.500 (80.000 a 1.440.000); nas quatro amostras com isolamento de *Salmonella* spp. a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 12.100.000 (10.000.000 a 18.900.000); nas quatro amostras com isolamento de *Proteus mirabilis* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 850.350 (600 a 1.790.000); nas quatro amostras com isolamento de *Staphylococcus kloosii* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 1.140.500 (225.000 a 11.200.000); nas três amostras com isolamento de *Streptococcus* spp. a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 18.500.000 (16.200.000 a 104.000.000); nas duas amostras com isolamento de *Morganella morgani* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 1.450 (1.300 a 1.600); nas duas amostras com isolamento de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *azanae* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 862.500 (685.000 a 1.040.000); nas duas amostras com isolamento de *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 36.100.000 (9.700.000 a 62.500.000); nas duas amostras com isolamento de *Staphylococcus intermedius* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 1.308.000.000 (266.000.000 a 2.350.000.000); nas duas amostras com isolamento de *Staphylococcus epidermidis* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 1.185.000 (1.060.000 a 1.310.000); nas duas amostras com isolamento de *Staphylococcus caprae* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 4.600.000 (950.000 a 8.250.000); nas duas amostras com isolamento de *Streptococcus pyogenes* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 8.353.250 (6.500 a 16.700.000); nas duas amostras com isolamento de *Streptococcus canis* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 624.000 (138.000 a 1.110.000); nas duas amostras com isolamento de *Corynebacterium jeikeium* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 10.000 (5.000 a 15.000); e nas duas amostras com isolamento de *Enterococcus faecium* a mediana da contagem de u.f.c./mL foi de 440.000 (405.000 a 475.000).

5.3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE “IN VITRO” DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Foram realizados testes de susceptibilidade “in vitro” dos microrganismos isolados de 197 amostras de conteúdo intra-uterino, frente a diferentes antimicrobianos.

Das 151 cepas de *E.coli*, 86,1% apresentaram resistência a cefalotina; 68,9% a ampicilina; 46,4% a cefoxitina; 34,4% a tobramicina; 32,5% a tetraciclina; 29,8% a amicacina; 27,8% a cefalexina; 15,2% a gentamicina; 13,9% a cefotaxima; 13,2% a sulfazotrin; 12,6% a enrofloxacina; 10,6% a aztreonam; 7,9% a cloranfenicol; 6,0% a neomicina; 2,0% a norfloxacina; e 0,7% a polimixina B.

Legenda:

CLO – cloranfenicol, TET – tetraciclina, CFL- cefalotina, GEN – gentamicina, SUT – sulfazotrin, AMP – ampicilina, ENR – enrofloxacin, NOR – norfloxacin, CFX – cefalexina, POL – polimixina B, TOB – tobramicina, CFO – ceftiofina, NEO – neomicina, AMI – amicacina, ATM – aztreonam, CTX – cefotaxima

Gráfico 2 – Resistência de *E.coli* isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra a diversos antimicrobianos

Das 151 cepas de *E. coli*, 94,0% apresentaram sensibilidade a norfloxacin; 82,8% a polimixina B; 76,8% a sulfazotrin; 75,5% a cloranfenicol e enrofloxacin; 70,2% a gentamicina; 55,6% a amicacina; 54,3% a aztreonam; 50,3% a neomicina; 47,7% a tobramicina; 39,1% a cefotaxima; 37,1% a tetraciclina; 35,8% a cefalexina; 34,4% a ceftiofina; 8,6% a cefalotina; e 7,3% a ampicilina.

Legenda:

CLO – cloranfenicol, TET – tetraciclina, CFL- cefalotina, GEN – gentamicina, SUT – sulfazotrin, AMP – ampicilina, ENR – enrofloxacin, NOR – norfloxacin, CFX – cefalexina, POL – polimixina B, TOB – tobramicina, CFO – ceftioxitina, NEO – neomicina, AMI – amicacina, ATM – aztreonam, CTX – cefotaxima

Gráfico 3 – Sensibilidade de *E.coli* isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra a diversos antimicrobianos

Tabela 3 – Frequências de resistência e sensibilidade de cepas de *E.coli* isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra frente a diversos antimicrobianos – São Paulo - 2004

	S		I		R	
Antimicrobiano	N	%	N	%	N	%
cloranfenicol	114	75,5	25	16,6	12	7,9
tetraciclina	56	37,1	46	30,4	49	32,5
cefalotina	13	8,6	8	5,3	130	86,1
gentamicina	106	70,2	22	14,6	23	15,2
sulfazotrin	116	76,8	15	10,0	20	13,2
ampicilina	11	7,3	36	26,8	104	68,9
enrofloxacina	114	75,5	18	11,9	19	12,6
norfloxacina	142	94,0	6	4,0	3	2,0
cefalexina	54	35,8	55	36,4	42	27,8
polimixina B	125	82,8	25	16,5	1	0,7
tobramicina	72	47,7	27	17,9	52	34,4
cefexitina	52	34,4	29	19,2	70	46,4
neomicina	78	50,3	66	43,7	9	6,0
amicacina	84	55,6	22	14,6	45	29,8
aztreonam	82	54,3	53	35,1	16	10,6
cefotaxima	59	39,1	71	47,0	21	13,9

Nota: N=número de amostras; S=sensibilidade; R=resistência; I=intermediário

Considerando-se o total de 28 cepas de bactérias Gram negativas isoladas (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Salmonella*

sp., *Citrobacter diversus*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *azanae*, *Proteus mirabilis*) além das cepas de *E.coli* isoladas, 92,9% apresentaram resistência a ampicilina; 89,3% a cefalotina; 85,7% a ceftioxitina; 82,1% a cefalexina; 71,4% a tetraciclina; 46,4% a sulfazotrin e cefotaxima; 39,3% a enrofloxacin e amicacina; 35,7% a tobramicina; 32,1% a cloranfenicol e aztreonam; 28,6% a neomicina; 21,4% a gentamicina; 7,1% a norfloxacin e 7,1% a polimixina B.

Legenda:

CLO – cloranfenicol, TET – tetraciclina, CFL- cefalotina, GEN – gentamicina, SUT – sulfazotrin, AMP – ampicilina, ENR – enrofloxacin, NOR – norfloxacin, CFX – cefalexina, POL – polimixina B, TOB – tobramicina, CFO – ceftioxitina, NEO – neomicina, AMI – amicacina, ATM – aztreonam, CTX – cefotaxima

Gráfico 4 – Resistência de microrganismos Gram negativos (exceto *E.coli*) isolados de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra a diversos antimicrobianos

Dessas 28 cepas de bactérias Gram negativas, verificou-se ainda que, 78,6% apresentaram sensibilidade a norfloxacin; 60,7% a polimixina B; 57,1% a gentamicina; 42,9% a enrofloxacin; 39,3% a amicacin; 35,7% a tobramicin; 32,1% a neomicin; 28,6% a cloranfenicol; 25,0% a aztreonam; 21,4% a sulfazotrin; 10,7% a tetraciclina, cefalexina e cefotaxima; 7,1% a cefalotina e ampicilina; e 3,6% a cefoxitina.

Legenda:

CLO – cloranfenicol, TET – tetraciclina, CFL- cefalotina, GEN – gentamicina, SUT – sulfazotrin, AMP – ampicilina, ENR – enrofloxacin, NOR – norfloxacin, CFX – cefalexina, POL – polimixina B, TOB – tobramicina, CFO – cefoxitina, NEO – neomicina, AMI – amicacin, ATM – aztreonam, CTX – cefotaxima

Gráfico 5 – Sensibilidade de microrganismos Gram negativos (exceto *E.coli*) isolados de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra a diversos antimicrobianos

Tabela 4 - Frequências de resistência e sensibilidade de cepas de bactérias Gram negativas (exceto *E.coli*) isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra frente a diversos antimicrobianos – São Paulo - 2004

	S		I		R	
Antimicrobiano	N	%	N	%	N	%
cloranfenicol	8	28,6	11	3,6	9	32,1
tetraciclina	3	10,7	5	17,9	20	71,4
cefalotina	2	7,1	1	3,6	25	89,3
gentamicina	16	57,1	6	21,4	6	21,4
sulfazotrin	6	21,4	9	32,2	13	46,4
ampicilina	2	7,1	0	0,0	26	92,9
enrofloxacina	12	42,9	5	17,8	11	39,3
norfloxacina	22	78,6	4	14,3	2	7,1
cefalexina	3	10,7	2	7,1	23	82,1
polimixina B	17	60,7	9	32,2	2	7,1
tobramicina	10	35,7	8	28,6	10	35,7
cefoxitina	1	3,6	3	10,7	24	85,7
neomicina	9	32,2	11	39,3	8	28,6
amicacina	11	39,3	6	21,4	11	39,3
aztreonam	7	25,0	12	42,9	9	32,2
cefotaxima	3	10,7	12	42,9	13	46,4

Nota: N=número de amostras; S=sensibilidade; R=resistência; I=intermediário

Considerando-se as 23 cepas de bactérias Gram positivas isoladas (*Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus epidermidis*,

Staphylococcus intermedius, *Staphylococcus caprae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus* sp., *Corynebacterium jeikeium* e *Enterococcus faecium*), 91,3% apresentaram resistência à penicilina; 60,9% a oxacilina e ampicilina; 47,8% a tetraciclina e amoxicilina; 43,5% a eritromicina; 39,1% a cefalotina e cefoxitina; 34,8% a neomicina; 30,4% a clindamicina e gentamicina; 26,1% a polimixina B e sulfazotrin; 21,7% a cefalexina; 17,4% a enrofloxacin; 13,0% a norfloxacin; e 4,3% a vancomicina.

Legenda:

TET – tetraciclina, OXA – oxacilina, PEN – penicilina, CFL – cefalotina, GEN – gentamicina, VAN – vancomicina, ERI – eritromicina, SUT – sulfazotrin, AMP – ampicilina, ENR – enrofloxacin, NOR – norfloxacin, CFX – cefalexina, POL – polimixina B, AMO – amoxicilina, CFO – cefoxitina, CLI – clindamicina, NEO – neomicina

Gráfico 6 - Resistência de microrganismos Gram positivos isolados de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra a diversos antimicrobianos

Dessas 23 cepas, 87,0% apresentaram sensibilidade a vancomicina; 78,3% a cefalexina; 69,6% a sulfazotrin e norfloxacin; 65,2% a gentamicina; 60,9% a polimixina B; 56,6% a cefalotina; enrofloxacin e cefoxitina; 52,2% a neomicina; 47,8% a amoxicilina e clindamicina; 43,5% a tetraciclina; 39,1% a eritromicina; 34,8% a ampicilina; 21,7% a oxacilina; e 8,7% a penicilina.

Legenda:

TET – tetraciclina, OXA – oxacilina, PEN – penicilina, CFL – cefalotina, GEN – gentamicina, VAN – vancomicina, ERI – eritromicina, SUT – sulfazotrin, AMP – ampicilina, ENR – enrofloxacin, NOR – norfloxacin, CFX – cefalexina, POL – polimixina B, AMO – amoxicilina, CFO – cefoxitina, CLI – clindamicina, NEO – neomicina

Gráfico 7 - Sensibilidade de microrganismos Gram positivos isolados de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra a diversos antimicrobianos

Tabela 5 - Frequências de resistência e sensibilidade de cepas de bactérias Gram positivas isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra frente a diversos antimicrobianos – São Paulo - 2004

	S		I		R	
Antimicrobiano	N	%	N	%	N	%
tetraciclina	10	43,5	2	8,7	11	47,8
oxacilina	5	21,7	4	17,4	14	60,9
penicilina	2	8,7	0	0,0	21	91,3
cefalotina	13	56,6	1	4,3	9	39,1
gentamicina	15	65,2	1	4,3	7	30,4
vancomicina	20	87,0	2	8,7	1	4,3
eritromicina	9	39,1	4	17,4	10	43,5
sulfazotrin	16	69,6	1	4,3	6	26,1
ampicilina	8	34,8	1	4,3	14	60,9
enrofloxacina	13	56,6	6	26,1	4	17,4
norfloxacina	16	69,6	4	17,4	3	13,0
cefalexina	18	78,3	0	0,0	5	21,7
polimixina B	14	60,9	3	13,0	6	26,1
amoxicilina	11	47,8	1	4,3	11	47,8
cefoxitina	13	56,6	1	4,3	9	39,1
clindamicina	11	47,8	5	21,7	7	30,4
neomicina	12	52,2	3	13,0	8	34,8

Nota: N=número de amostras; S=sensibilidade; R=resistência; I=intermediário

5.4 EXAMES HISTOPATOLÓGICOS DE FRAGMENTOS DE ÚTERO DE CADELAS COM PIOMETRA

Foram colhidos 200 fragmentos de corno uterino para realização de exames histopatológicos. Das 146 amostras com isolamento somente de *E.coli*, 6,2% apresentaram escore 0; 21,2% apresentaram escore 1; 41,1% apresentaram escore 2; 24,7% apresentaram escore 3; e 6,8% apresentaram escore 4. Das 28 amostras com isolamento de bactérias Gram negativas (exceto *E.coli*), 0% apresentaram escore 0; 21,4% apresentaram escore 1; 50% apresentaram escore 2; 25% apresentaram escore 3; e 3,6% apresentaram escore 4. Das 18 amostras com isolamento de bactérias Gram positivas, 0% apresentaram escore 0; 44,4% apresentaram escore 1; 44,4% apresentaram escore 2; 5,6% apresentaram escore 3; e 5,6% apresentaram escore 4. Das 5 amostras com isolamento de *E.coli* e outras bactérias Gram positivas, 0% apresentaram escore 0; 40% apresentaram escore 1; 40% apresentaram escore 2; 20% apresentaram escore 3; e 0% apresentou escore 4. Das 3 amostras que não tiveram crescimento de nenhum microrganismo, 33,3% apresentaram escore 0; 0% apresentou escore 1; 33,3% apresentaram escore 2; 0% apresentou escore 3; e 33,3% apresentaram escore 4.

Gráfico 8 – Distribuição de escores dos exames histopatológicos de fragmentos de útero de cadelas com piometra

5.5 ESTUDO DA PRESENÇA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DO CONTEÚDO INTRA-UTERINO DE CADELAS COM PIOMETRA UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Um total de 151 cepas de *E.coli* isoladas foram submetidas ao estudo da presença dos fatores de virulência de pili associados com pielonefrite (*pap*), aerobactina (*iuc*), fator necrotizante citotóxico 1 (*cnf1*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa*), hemolisina (*hly*), enterotoxina termo-lábil (LT), enterotoxina termo-estável (*STa* e *STb*), verotoxinas (*VT1* e *VT2*). Dessas 151 cepas, 5 (3,3%) foram positivas para *afa*; 120 (79,5%) foram positivas para *sfa*; 87 (57,6%) foram positivas para *pap*; 51 (33,8%) foram positivas para *iuc*; 86 (57,0%) foram positivas para *cnf*; e 52 (34,4%) foram positivas para *hly*. Nenhuma amostra foi

positiva para *LT*, *STa*, *STb*, *VT1* e *VT2*. Das 151 amostras, 3 (2,0%) não apresentaram positividade para nenhum dos fatores de virulência estudados.

Legenda: pili associados com pielonefrite (*pap*); aerobactina (*iuc*); fator necrotizante citotóxico 1 (*cnf1*); fímbria S (*sfa*); adesina afimbrial I (*afa*); hemolisina (*hly*)

Gráfico 9 – Distribuição da frequência de fatores de virulência encontrados nas cepas de *E.coli* isoladas de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra

5.6 CORRELAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NOS FRAGMENTOS DE ÚTERO COM OS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Verificou-se que a relação entre o processo inflamatório evidenciado pelo exame histopatológico e a contagem de unidades formadoras de colônias/mL foi significativa ($P < 0,05$), ou seja, quanto maior o número de unidades formadoras de colônias/mL, maior a intensidade do processo inflamatório.

Observou-se que o escore 2 apresentou maior frequência estatisticamente ($P < 0,05$) que os outros escores, e que isso ocorreu mais frequentemente nas amostras de *E.coli*. Os escores 1 e 3 apresentaram maior frequência estatisticamente ($P < 0,05$) que os escores 0 e 4.

Observou-se ainda uma correlação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o tamanho do infiltrado inflamatório e o fator de virulência *sfa* sendo que, o tamanho do infiltrado inflamatório foi maior nas amostras que não apresentaram positividade para esse fator de virulência.

O tamanho do infiltrado inflamatório presente nos fragmentos uterinos onde houve isolamento de *E.coli* não foi maior do que o encontrado nas amostras nas quais isolaram-se outros agentes ($P > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

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 6 anos, e mais comumente em cadelas nulíparas (ARTHUR, 1964; CHRISTIANSEN, 1988; CRAIG, 1937; DERIVAUX; BARNABE, 1976, ROBERTS, 1956; SANDHOLM; VASENIUS; KIVISTÖ, 1975).

Nessa pesquisa apresentada observou-se a ocorrência da piometra em um número abrangente de raças, mas com uma porcentagem maior em cães de raça indefinida. Isso ocorreu provavelmente por ser a maior parte dos usuários do Hovet pessoas de baixa renda, e por isso com cães sem raça definida. Foram utilizados 100 úteros de cadelas com idade entre 2 e 16 anos (média 9,18), sendo 91% dessas cadelas com idade maior ou igual a 6 anos. Esse resultado corresponde ao mesmo observado pelos autores acima citados.

Allen (1995) observou a mesma frequência de piometra em cadelas nulíparas e pluríparas. Niskanen e Thrusfield (1998) relataram o resultado de uma pesquisa com cadelas entre nove meses e dezoito anos de idade. Concluíram que cadelas nulíparas tinham um risco moderadamente maior em desenvolver piometra do que primíparas e pluríparas.

No presente estudo observou-se que 64% das cadelas eram nulíparas, 21% primíparas e 14% pluríparas. O número de nulíparas foi maior estatisticamente ($P < 0,05$) do que o número de primíparas e pluríparas, correspondendo ao achado de Niskanen e Thrusfield (1998).

Olson e Mather (1978) concluíram através de cultura bacteriana que cadelas não apresentam bactérias no útero normalmente.

Segundo Sandholm, Vasenius e Kivistö (1975), em 100 cadelas investigadas, foram isoladas cepas de *Escherichia coli* a partir do trato urinário e do conteúdo uterino em 85

destas, microrganismos estes que tinham afinidade pelo epitélio do trato urinário bem como pelo endométrio estimulado por progesterona.

Bjurström (1993) estudou 203 cadelas com doenças no trato genital (infertilidade, vaginite, piometra e mortalidade de filhotes). Ele observou que as espécies mais comumente isoladas foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius* e *Pasteurella multocida*. Em cadelas com piometra, o isolamento de *E.coli* foi o mais freqüente em cultura pura.

Oliveira et al. (1988) isolaram do conteúdo uterino de cadelas com piometra (n=70), 50,5% de *Escherichia coli*; 7,1% de *Streptococcus* spp.; 7,1% de *Proteus* spp.; 5,7% de *Staphylococcus aureus* e 2,9% de *Micrococcus* spp.

Gandotra et al. (1994) realizaram swabs de vagina de cadelas com piometra (n=24), tendo isolado 38,47% de *Staphylococcus aureus*; 30,77% de *Streptococcus* spp.; 23,07% de *Corynebacterium pyogenes* e 7,69% de *Escherichia coli*. As amostras colhidas foram de swabs vaginais e não do conteúdo uterino, o que poderia justificar o baixo índice de isolamentos de *E. coli*.

Fransson et al. (1997) isolaram *E.coli* de 90% das cadelas com piometra (n = 48).

Dhaliwal, Wray e Noakes (1998) isolaram *E.coli* de 96,3% dos 28 casos de piometra avaliados.

De acordo com Hagman e Kühn (2002), a bactéria mais freqüentemente isolada do conteúdo uterino de cadelas com piometra é a *Escherichia coli* (n=6). Foi observado através de comparação de perfis de DNA que a piometra é causada pela *E.coli* originária da flora normal dos cães e não por certos clones transmitidos por outros animais.

Considerando-se as amostras de conteúdo intra-uterino nas quais houve isolamento de microrganismos, foram isoladas 76,6% de *E.coli*, demonstrando que a freqüência de ocorrência deste agente associado a quadros de piometra em cadelas é estatisticamente ($P<0,05$) maior do que dos outros agentes isolados, dados estes que estão de acordo com os

observados por Sandholm, Vasenius e Kivistö (1975), Fransson et al. (1997), Dhaliwal, Wray e Noakes (1998) e Hagman e Kühn (2002). Além das amostras em que foram isoladas *E.coli* deve-se considerar ainda o isolamento de 14,2% de microrganismos Gram negativos e 11,7% de microrganismos Gram positivos. Deve-se ressaltar ainda o isolamento de *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp., as quais estão em segundo lugar entre as bactérias causadoras de infecções de trato urinário no ser humano (SAYLERS; WHITT, 2002).

A *K.pneumoniae* aparece nas vias respiratórias e nas fezes de aproximadamente 5% dos indivíduos normais da população humana. Conhecida originalmente como patógeno respiratório, hoje em dia é comumente encontrada em infecções respiratórias e urinárias (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; KRIEG, 1984). Organismos desse gênero são patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário, e diversos outros tipos de infecção. O trato gastrointestinal é considerado um dos principais reservatórios e principal fator de transmissão (KRIEG, 1984). Nos últimos anos houve um aumento no número de infecções causadas por bactérias do gênero *Klebsiella*, devido a cepas com resistência múltipla a antimicrobianos (KRIEG, 1984).

Nesse estudo foi isolado 4% de *Klebsiella pneumoniae*, e conforme observado por Krieg (1984) essa bactéria é um agente oportunista importante em infecções em humanos e em animais. Como é um agente comumente observado na flora intestinal normal dos animais e dos humanos, o isolamento desse agente na piometra canina reforça a hipótese de que as bactérias envolvidas nessa enfermidade são oriundas da flora intestinal do próprio animal.

Há atualmente mais de 2000 sorotipos descritos da *Salmonella* que já foram associadas com doenças humanas e em animais (MEAD; SLUTSKER; DIETZ, 1999; MURRAY et al., 1998). O reservatório dos integrantes do gênero *Salmonella* é o trato gastrointestinal de animais de sangue frio e quente (HIRSCH; ZEE, 2003). As fontes de infecção são alimentos e bebidas contaminados por salmonelas. Outras fontes como solo contaminado, vegetação,

água, leite e outros laticínios, mariscos, ovos em pó ou congelados, coco dessecado, carne e seus derivados, corantes de origem animal, animais de estimação, fezes de casos subclínicos ou portadores e portadores são importantes (HIRSCH; ZEE, 2003; JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982).

O isolamento de *Salmonella* spp de cães adultos é de 0 a 2% em animais não diarréicos e 0 a 1% em cães diarréicos (FUKATA; NAITO; YOSHIDA, 2002; MARKS; KATHER; KASS, 2002). *Salmonella* é isolada mais comumente de filhotes e animais de canis, mas, a maior parte dos cães é portador assintomático (MARKS; KATHER, 2003). Joffe e Schlesinger (2002) avaliaram a prevalência de *Salmonella* em cães que eram alimentados com frango cru, e isolaram *Salmonella* spp em 80% das amostras de frango e em 30% das amostras de fezes.

Nesse estudo foram isoladas 2% de amostras positivas para *Salmonella* spp. da secreção intra-uterina de cadelas com piometra. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Marks e Kather (2003) e Fukata, Naito e Yoshida (2002) em fezes de cães saudáveis. Esse resultado é o esperado devido à hipótese de que as bactérias envolvidas na piometra em cadelas são oriundas do trato gastrointestinal do próprio animal.

A maioria das espécies de *Proteus* é de vida livre e podem ser encontradas na água, no solo, no esgoto, e algumas podem ser encontradas na flora intestinal normal. Provocam enfermidades apenas quando abandonam seu habitat normal no intestino (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982). Aproximadamente, um quarto da população humana, carrega o *Proteus* no intestino, e o próprio paciente pode adquirir uma infecção através de sua própria flora. Infecções também podem ser adquiridas através de transmissão da bactéria de outros infectados ou de um reservatório. Ocorrem também no intestino de camundongos, ratos, macacos, cães, gatos, bovinos, suínos, aves e répteis (KRIEG, 1984). São encontrados, com frequência, em infecções urinárias crônicas (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982).

A infecção do trato urinário por *Proteus mirabilis* é a doença mais comum causada por esse gênero (MURRAY et al., 1998).

Nesse estudo foram isoladas 2% de amostras positivas para *Proteus mirabilis*. Esse resultado é esperado devido a essa bactéria ser comumente isolada do intestino de cães saudáveis. Assim como observado por MURRAY et al.(1998) e Jawetz, Melnick e Adelberg (1982) em infecções do trato urinário em humanos, o *Proteus mirabilis* também é observado em cães com quadro de piometra.

A *Morganella morganii* ocorre nas fezes de humanos, cães, e outros mamíferos e répteis. Invasoras oportunistas, isoladas de bacteremias, trato respiratório, e infecções de trato urinário (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982).

Nesse estudo foi observado o isolamento de 1% de *Morganella morganii* em cadelas com piometra. Devido ao observado por Jawetz, Melnick e Adelberg (1982), o resultado é esperado devido a essa bactéria ser um isolado comum de intestino de cães saudáveis e ser um agente oportunista em infecções.

Membros do gênero *Citrobacter* ocorrem em fezes de humanos e animais saudáveis, e também na água, esgoto, solo e alimento. Nas infecções são isolados de diarreia e urina, e podem causar bacteremia, meningite, otite e abscessos (KRIEG, 1984).

Nesse estudo foi observado 3% de *Citrobacter diversus*, sendo esse resultado semelhante às frequências observadas de outros agentes considerados oportunistas e presentes na flora intestinal normal de animais domésticos.

Bactéria bastonete Gram-negativa, aeróbica, móvel, pertencente à família *Pseudomonadaceae* e residente normal da flora do intestino de humanos e animais. A *P.aeruginosa* só é patogênica quando introduzida em áreas desprovidas das defesas normais ou quando participa de infecções mistas (JAWET; MELNICK; ADELBERG, 1982; MURRAY et al., 1998). Nos últimos anos, devido ao uso intenso de antimicrobianos a quais

as espécies de *Pseudomonas* são resistentes, esses agentes têm se tornados importantes em infecções de humanos e animais. A *P.aeruginosa* é atualmente a mais significativa desses patógenos oportunistas (KRIEG, 1984).

Nesse estudo foi observada uma frequência de 2% de *Pseudomonas aeruginosa*. Por ser um agente oportunista e residente normal das floras intestinais de animais e humanos, esse resultado é semelhante ao observado de outras bactérias oportunistas observadas nesse estudo.

Staphylococcus é um importante patógeno em humanos (MURRAY et al., 1998). Alguns estafilococos patogênicos provocam supuração, formação de abscessos, uma variedade de infecções piogênicas e até septicemia fatal, além de infecção do trato urinário (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982; MURRAY et al., 1998).

Normalmente, todas as pessoas têm estafilococos na sua pele, orofaringe, trato gastrointestinal, e trato urogenital. A aderência do organismo à mucosa epitelial é regulada por receptores para os ácidos teicóicos dos estafilococos. Os organismos podem ser transferidos para uma pessoa ou animal suscetível através de contato direto ou através de fômites (MURRAY et al., 1998). O *Staphylococcus epidermidis* é uma das espécies mais comumente associada com doenças em humanos (MURRAY et al., 1998). O habitat principal de *S.epidermidis* é a pele humana. Normalmente é a espécie predominante de *Staphylococcus* encontrada na pele humana (SNEATH, 1986). É a mais prevalente entre a flora cutânea residente dos animais, e também colonizam o trato respiratório superior (HIRSCH; ZEE, 2003). O *S.epidermidis* é reconhecido como um patógeno oportunista (SNEATH, 1986). O *Staphylococcus schleiferi* é uma das espécies mais comumente associada com doenças em humanos (MURRAY et al., 1998). O *S.intermedius* é uma espécie comum, e muitas vezes predominante, nas membranas nasais e pele de carnívoros (cães, raposas, etc.). Pessoas que possuem carnívoros domésticos (cães) podem, às vezes, carregar populações dessa espécie (SNEATH, 1986). Também ocorrem transitoriamente no trato gastrointestinal (HIRSCH;

ZEE, 2003). Essa espécie já foi relacionada a uma variedade grande de infecções em cães, como otite, ferimentos, piodermite e mastite. É um patógeno em potencial para animais (SNEATH, 1986). *Staphylococcus intermedius* é a mais freqüente bactéria piogênica em cães, sendo a principal bactéria envolvida na piodermite canina. Também ocorre em infecções respiratórias, genitais, hemolinfáticas, ósseas e articulares (HIRSCH; ZEE, 2003). Vandenesch et al. (1995), isolaram *S. caprae* em humanos com endocardites, infecções do trato urinário e bacteremia. Kawamura et al. (1998) observaram que cepas de *S. caprae* são amplamente distribuídas em infecções em humanos, e que muitas cepas são identificadas erroneamente, por isso a prevalência relatada até então é baixa.

Nesse estudo foi observado um total de 5% de *Staphylococcus*, sendo que 1% foi de *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, 1% de *Staphylococcus intermedius*, 1% de *Staphylococcus epidermidis*, 1% de *Staphylococcus kloosii* e 1% de *Staphylococcus caprae*. Essas bactérias são normalmente observadas no trato intestinal e/ou pele de animais e de humanos, sendo observado na piometra em freqüências semelhantes às bactérias oportunistas isoladas nesse estudo.

Os estreptococos são responsáveis por um número grande de doenças importantes no homem e nos animais. O grupo piogênico possui a maior parte dos patógenos, mas muitas das outras espécies são comumente associadas em processos infecciosos, muitas vezes como patógenos oportunistas. *Streptococcus* são encontrados nas mucosas da boca, trato respiratório, trato gastrointestinal, trato genitourinário, e pele de humanos e de animais. Também estão presentes no leite e produtos lácteos, alguns alimentos e plantas, solo e água contaminada por fezes (SNEATH, 1986). Podem causar infecções do trato respiratório superior com linfadenite (eqüinos, suínos, gatos, cobaias e humanos), infecções respiratórias e septicêmicas neonatais (potros, leitões, filhotes de cães e crianças), pneumonias e complicações secundárias (eqüinos, primatas, pequenos carnívoros e humanos), e infecções

piogênicas não relacionadas ao trato respiratório (infecções do trato genitourinário e mastite bovina) (HIRSCH; ZEE, 2003).

Nesse estudo foram isoladas 3% de amostras positivas para *Streptococcus*, sendo um resultado esperado devido à descrição dos autores acima citados por este organismo ser comumente isolado de pele, trato intestinal e em infecções do trato urinário.

O *Corynebacterium* normalmente coloniza a pele, trato superior respiratório, trato gastrointestinal, e trato urogenital de humanos (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1982; MURRAY et al., 1998). O *C. jeikeium* é um patógeno oportunista bem conhecido. (MURRAY et al., 1998).

Nesse estudo foi observado o isolamento de 1% de *Corynebacterium jeikeium*. Por ser um patógeno oportunista como observado por Murray et al. (1998), esse resultado é semelhante ao observado em outros isolados de bactérias oportunistas.

Excetuando-se a *E. coli* todos os outros patógenos isolados nesse estudo tiveram uma frequência de isolamento semelhante, resultado esse esperado por serem na sua maioria patógenos oportunistas. Por isso, provavelmente quando na ausência de uma *E. coli* patogênica na flora intestinal do próprio animal, outras bactérias oportunistas se aproveitam para se proliferar no útero das cadelas estimulado por progesterona e com o sistema imunológico local debilitado.

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. Concluíram que *E. coli* associada com piometra canina, seria oriunda da microbiota fecal e que a infecção do trato urinário ocorre 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.

Segundo Hagman e Kühn (2002), as cepas de *E.coli* isoladas a partir de amostras de conteúdo uterino de cadelas com piometra pertenciam a certos grupos clonais com habilidade maior isto é, com determinados fatores de virulência, que poderiam lhes conferir maior capacidade para infectar o útero.

A predominância de *Escherichia coli* nas infecções uterinas pode ser devida à habilidade deste microrganismo em aderir a sítios antigênicos específicos no endométrio estimulado por progesterona e no miométrio (GROOTERS, 1994; NELSON; FELDMAN, 1986).

O desenvolvimento de resistência bacteriana a drogas antimicrobianas não é um fenômeno novo e tem sido documentada desde a introdução dos antibióticos. Resistência múltipla a drogas emergiu no final dos anos 50 e se tornou um problema significativo na medicina clínica durante os anos 60 (TENOVER; HUGHES, 1996).

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 microrganismos, 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 (WATANABE, 1963).

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana em animais de companhia e suas implicações à saúde humana são pouco documentadas (NORMAND et al., 2000).

O fator de resistência aos antimicrobianos ou fator, encontrado em algumas cepas de *E.coli*, também constitui importante fator de virulência. Este fator pode ser transmitido a outros microrganismos da mesma espécie, favorecendo a manutenção de linhagens resistentes às diferentes drogas dificultando, conseqüentemente, a terapia antimicrobiana frente a infecções desencadeadas pelo agente (TRABULSI; TOLEDO, 1999). Adicionalmente, evidências têm apontado que cepas de *E.coli*, de origem animal, adquiridas pelo homem por via oral, podem transferir o fator R às cepas do mesmo microrganismo de origem humana (HIRSCH; WIGER, 1978). Resistência múltipla a antimicrobianos na família *Enterobacteriaceae* é baseada, na maioria das vezes, na presença de elementos extra cromossomais chamados de fatores R. A transmissão horizontal de resistência múltipla já foi demonstrada entre membros da família *Enterobacteriaceae*, como entre *E.coli* e *Salmonella* spp. (DWIGHT; HIRSH, 1973).

Os agentes antimicrobianos fluorquinolonas são muito utilizados na medicina humana e veterinária (COHN et al., 2003). A enrofloxacin 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 *Escherichia coli* como uma mutação cromossomal no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da enzima DNA gyrase (BROWN; AYMES, 1998).

Adwan et al. (2004) realizaram um estudo com 80 amostras de *E.coli* isoladas de humanos com infecções do trato urinário. Foi observada resistência de 65% das amostras a ampicilina. O estudo realizado por Cui et al. (2004), em 148 cepas de *E.coli* isoladas de humanos com infecções urinárias, apresentou 83% de resistência a ampicilina. Lau, Peng e Chang (2004) verificaram em cepas de *E.coli* isoladas de pacientes com infecções urinárias, 80% de resistência a ampicilina e 59% a cefalotina. Oluoch et al. (2001) realizaram um estudo

com 674 cepas de *E.coli* isoladas de diversas infecções em cães incluindo do trato genitourinário, e observaram, 90% de sensibilidade a norfloxacin, 87,5% a enrofloxacin, 90,7% a gentamicin e 85,9% a amikacin. Cooke et al. (2002) observaram em cepas de *E.coli* isoladas de cães com infecções do trato urinário, 53% de resistência à enrofloxacin e 47% de sensibilidade. E observaram que houve um aumento significativo de resistência, de isolados de *E.coli* de urina de cães, à enrofloxacin de 1994 a 1997 num hospital veterinário na Califórnia, e que esse aumento seguiu um aumento no uso de enrofloxacin nesse período.

Das 151 amostras de *E.coli* isoladas, houve maior resistência aos antimicrobianos cefalotina (86,1%) e ampicilina (68,9%), e maior sensibilidade a norfloxacin (94%), polimixina B (82,8%), sulfazotrin (76,8%), cloranfenicol (75,5%), enrofloxacin (75,5%), e gentamicin (70,2%).

Os resultados obtidos de resistência de *E.coli* à ampicilina foram observados também por Adwan et al. (2004) em amostras de infecções de trato urinário de humanos. Comparando-se os resultados com os observado por Olouch et al. (2001) em cães com diversas infecções por *E.coli* verificamos que há semelhança entre os resultados de sensibilidade de norfloxacin. Não foi encontrado nenhum trabalho com testes de sensibilidade a antimicrobianos de isolados de *E.coli* de cadelas com piometra, mas comparando-se os resultados obtidos com outros trabalhos realizados em infecções em cães e em humanos houve uma semelhança com algumas pequenas diferenças entre os resultados obtidos.

Das 28 cepas de bactérias Gram negativas isoladas (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Salmonella* sp., *Citrobacter diversus*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *azanae*, *Proteus mirabilis*) excetuando as cepas de *E.coli* isoladas, houve maior resistência aos antimicrobianos ampicilina (92,9%), cefalotina (89,3%), cefoxitina (85,7%), cefalexina (82,1%), e tetraciclina (71,4%), e maior sensibilidade a norfloxacin (78,6%) e polimixina B (60,7%). Das 26 cepas de bactérias Gram positivas

isoladas (*Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus caprae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus* sp., *Citrobacter jeikeium* e *Enterococcus faecium*), houve maior resistência aos antimicrobianos penicilina (91,3%), oxacilina (60,9%) e ampicilina (60,9%), e maior sensibilidade a vancomicina (87,0%), cefalexina (78,3%), norfloxacin (69,6%), sulfa+trimetoprim (69,6%), gentamicina (65,2%), e polimixina B (60,9%).

Cohn et al. (2003) observaram um aumento significativo na proporção de isolados bacterianos, de trato urinário de cães, resistentes à enrofloxacin 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. Brothers, Gibbs e Wooley (2002) observaram que isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus spp.*, de cães com infecção do trato urinário, expostos à enrofloxacin desenvolveram resistência rapidamente, enquanto que *Klebsiella*, *Proteus* e *Streptococcus spp* eram menos prováveis de desenvolverem essa resistência. Nenhum isolado de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* desenvolveram resistência, em algumas cepas existia uma variação de suscetível a intermediário.

O antimicrobiano de eleição utilizado no pós-operatório das cirurgias de ovário-salpingo-histerectomia de cadelas com piometra no Setor de Obstetrícia do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo é a enrofloxacin. O presente estudo permitiu verificar que este ainda é um antimicrobiano eficiente na maior parte das vezes, tendo em vista que 68,8% dos microrganismos apresentaram sensibilidade ($P < 0,05$) ao mesmo, mas pelos resultados observados por Cohn et al. (2003), Cooke et al. (2002) e Olouch et al. (2001), a resistência a esse antimicrobiano em animais vêm aumentando a cada ano, mostrando que o uso

prolongado de antimicrobianos leva ao desenvolvimento de resistência em bactérias, principalmente nas cepas de *E.coli* que transferem essa característica aos seus descendentes.

De Bosschere et al. (2001) observaram no exame histológico que nenhum útero (n = 26) de cadelas saudáveis apresentou reação inflamatória. Dhaliwal, Wray e Noakes (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. O estudo realizado utilizou 34 amostras de tecido de útero, uma quantidade considerada pequena para permitir correlações adequadas entre sinais clínicos, cepas de *Escherichia coli* e a severidade das lesões, tendo em vista a diversidade das características dos sorotipos deste microrganismo. Além disso, o estudo foi realizado em diferentes clínicas com participação de diferentes cirurgiões, cada qual adotando um procedimento distinto para a retirada do útero, comprometendo assim o exame histopatológico do mesmo. Os pesquisadores concluíram que seria necessário um número de casos muito superior ao utilizado e, preferencialmente procedentes de um único local, com participação de um único cirurgião, para padronizar a amostragem.

Diferentemente do estudo de Dhaliwal, Wray e Noakes (1998), foram colhidos amostras de 100 úteros de cadelas com piometra para a realização do exame histopatológico, sendo uma amostra de cada corno uterino, totalizando 200 amostras. Além disso, um único cirurgião realizou todas as cirurgias, e a coleta foi realizada sempre pela mesma pessoa, não havendo diferença no método utilizado.

Considerando as 146 amostras de *E.coli* isoladas, 46 (30,5%) apresentaram processo inflamatório ocupando área maior que 75%, e das 51 amostras com isolamento de Gram positivas, Gram negativas exceto *E.coli*, *E.coli* associadas com Gram positivas e 03 amostras sem crescimento, 12 apresentaram processo inflamatório ocupando área maior que 75%.

Estatisticamente, o tamanho do infiltrado inflamatório presente nos fragmentos uterinos onde houve isolamento de *E.coli* não é maior do que o encontrado nas amostras nas quais isolaram-se outros agentes ($P>0,05$). Entretanto, verificou-se uma correlação entre o tamanho do infiltrado inflamatório e a quantidade de unidades formadoras de colônias/mL, sendo que quanto maior a quantidade de u.f.c./mL presentes, maior o tamanho do infiltrado inflamatório ($P<0,05$). Este resultado foi observado comparando-se todas as amostras num único grupo, bem como as analisando isoladamente o grupo das *E.coli*. Embora esta correlação tenha significância, ela também se apresentou baixa, permitindo concluir que devam existir outros fatores influenciando a presença e intensidade do processo inflamatório além do elevado número de unidades formadoras de colônias presentes.

Quando comparados os tamanhos dos processos inflamatórios observados nas amostras das quais foram isoladas *E.coli* com os tamanhos dos infiltrados inflamatórios presentes para outros microrganismos, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$).

Cepas patogênicas de *E.coli* são comumente isoladas de fezes de cães aparentemente saudáveis (MARKS; KATHER, 2003).

Linhagens de *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) podem produzir isoladamente ou em conjunto (mediante a regulação por plasmídios), dois tipos principais e distintos de enterotoxinas denominadas LT (toxinas termolábeis - LT-I e LT-II), e ST (toxinas termoestáveis - Sta e STb) (CAMPOS; TRABULSI, 1999; FRANCO; LANDGRAF, 1996). LT-II e STb são produzidas por cepas de *E.coli* isoladas de animais, mas não de humanos. Os genes de LT-I e Sta estão presentes num plasmídio transferível (MURRAY et al., 1998). A maior parte das cepas caninas de ETEC expressa a enterotoxina ST (RITCHER; GRUND; HELLMAN, 1984), e cepas produtoras de enterotoxina LT são raramente encontradas em

cães (HAMMERMUELLER et al., 1995; OLSON; HEDHAMMER; FARIS, 1985; RITCHER; GRUND; HELLMAN, 1984).

No presente estudo nenhuma cepa de *E.coli* apresentou positividade às toxinas LT-I, LT-II, STa e STb, sugerindo que *E.coli* enterotoxigênica não está envolvida na causa dessa enfermidade.

Nos últimos anos, a ocorrência de *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) sorotipo O157:H7 tem sido descrita em diferentes espécies de animais, com referência especial à espécie bovina, causando diarreia e emergindo como importante causa de doença entérica e renal no homem (ALTEKRUSE; COHEN; SWERDLOW, 1997; FENG, 1996; TAUXE, 1997).

Esse grupo de *E.coli* é produtor de uma toxina chamada shiga toxina. Está presente na flora fecal de animais domésticos saudáveis e mais freqüentemente é encontrada em ruminantes (BEUTIN et al., 1993; CAPRIOLI et al., 1993; MONTENEGRO et al., 1990).

Low et al. (1988) relataram o isolamento de O157:H7 de um cão com infecção do trato urinário.

Beutin (1999) sugeriu que cães assintomáticos poderiam agir como vetores de transmissão das EHEC aos seres humanos.

No presente estudo nenhuma cepa de *E.coli* apresentou positividade às toxinas VT1 e VT2, sugerindo que cães com piometra não apresentam *E.coli* enterohemorrágica envolvida nessa enfermidade.

Apesar do reconhecimento atual da existência de uma grande quantidade de sorogrupos de *E.coli*, somente alguns deles tem-se mostrado comprovadamente patogênicos para o homem e animais (CAMPOS; TRABULSI, 1999; ORSKOV; ORSKOV, 1992). A ocorrência das diferentes apresentações clínicas das colibaciloses, depende de propriedades ou

fatores de virulência, que determinam o grau de patogenicidade do agente (CASTRO; YANO, 1992).

Cepas de *E.coli* causando infecções extra-intestinais em cães e gatos foram associadas com alguns grupos O que também são freqüentemente isolados da flora fecal normal desses animais (LOW et al., 1988). Dentro desse grupo temos as *E.coli* uropatogênicas (UPEC) (PEETERS, 1994). São as *Escherichia coli* que causam doenças do trato urinário tanto em humanos como em animais. A *E.coli* se move do trato gastrointestinal para o trato urinário. A maior parte das infecções de trato urinário começa com a colonização do colón por uma cepa de *E.coli* que é capaz de causar infecções do trato urinário. (SAYLERS; WHITT, 2002).

Um número grande de adesinas da *E.coli* já foi reconhecido nesse processo. O pili Tipo 1 são relacionadas à colonização do trato vaginal, e uma contribuição pequena na bexiga. 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 *pap* (pili associado com pielonefrite). Genes codificando o pili P estão aglomerados no cromossomo da bactéria. A regulação do gene *pap* é complexa. A expressão dos genes *pap* muda em resposta à temperatura, nível de glicose no meio, e concentrações de aminoácidos (SAYLERS; WHITT, 2002). Receptores da fimbria P estão presentes nos eritrócitos de humanos, suínos, pombos, frangos, caprinos e cães (PARRY; ROOKE, 1985).

Johnson, Stell e Delavari (2001) analisaram 63 amostras de fezes de cães colhidos no ambiente urbano em Minnesota (EUA). *E.coli* foi isolada de 30% das amostras, e em 56% dessas foi observado o gene *pap*. Também observaram que mais de 50% dessas amostras com o gene *pap* eram diretamente relacionadas com isolados de humanos com cistite, pielonefrite, bacteremia ou meningite. Com esses dados concluíram que ExPEC (*E.coli* patogênica extra-intestinal) é bastante prevalente em fezes caninas, que conseqüentemente poderia ser um reservatório de ExPEC para a aquisição de humanos.

Wullt et al. (2001) observaram que a fimbria P pode ter um importante papel na adesão bacteriana e colonização do endométrio na patogênese da piometra.

No presente estudo 57,6% dos isolados de *E.coli* foram positivas para o gene *pap*, resultado muito semelhante ao encontrado por Johnson, Stell e Delavari (2001) em fezes de cães saudáveis. Isso sugere que *E.coli* isolada do útero de cães com piometra pode ser proveniente da flora intestinal do próprio cão como sugere Wadas et al. (1996).

Além dos pili, existem as fimbrias S (*sfa*), que se constituem em importantes adesinas associadas a doenças no trato urinário tanto em humanos como em animais (SAYLERS; WHITT, 2002).

Foram isoladas 79,5 % de *E.coli* positivas para *sfa*, mostrando que essa adesina deve ter um importante papel na colonização do útero.

As cepas uropatogênicas possuem também adesinas que não são pili, como as adesinas afimbriais (*afaI* e *afaIII*) e adesina Dr. (SAYLERS; WHITT, 2002).

Apenas 3,3% das amostras isoladas de *E.coli* apresentaram positividade para o gene *afa*. Provavelmente essa adesina tem um papel muito pequeno na colonização do útero.

Algumas *E.coli* uropatogênicas produzem uma toxina extracelular originalmente chamada de hemolisina porque ela lisa eritrócitos e também destrói outros tipos celulares, levando à liberação de citocinas e estimulação de uma resposta inflamatória (MURRAY et al., 1998; SAYLERS; WHITT, 2002). A alfa hemolisina lisa eritrócitos de todos os mamíferos e até de peixes (RENNIE; ARBUTHNOTT, 1974).

Alguns estudos já mostraram que a produção de *Hly* é uma propriedade associada com cepas de *Escherichia coli* que causam infecções extra-intestinais em humanos (CAPRIOLI et al., 1987; HUGHES et al., 1983). Cepas de *E.coli* isoladas de cães e gatos com infecção do trato urinário têm uma alta prevalência de *hly* (WILSON et al., 1988).

Na infecção do trato urinário em humanos, a produção de hemolisina é mais comum em cepas de pacientes com pielonefrite (49%), seguido pelos pacientes com cistite (40%) (BROOKS; BENSEMAN; PECK, 1981).

Low et al. (1988) compararam genes *pap* e *hly* de cães (n=4) e humanos (n=6) com infecção do trato urinário, e observaram que todos os isolados tinham o DNA similar. Esses resultados sugeriram que algumas cepas de *E.coli* podem ser capazes de infectar tanto cães como humanos.

Nesse estudo 34,4% das amostras isoladas de *E.coli* apresentaram positividade para a *hly*. É um número que está um pouco abaixo do que é observado em humanos com infecções do trato urinário, sugerindo que esse fator de virulência tem um papel menos na piometra canina do que nas infecções do trato urinário.

O fator necrosante citotóxico (*cnf*) tem sido descrito, em anos recentes, associado a uma grande variedade de infecções no homem e em animais, sendo considerado um importante mecanismo de virulência de *E.coli* (WRAY; WOODWARD, 1997).

Dois tipos de fatores necrosantes citotóxicos, *cnf1* e *cnf2*, já foram descritos. A produção de *cnf1* é associada com a produção de α -hemolisina, e cepas de *E.coli* produtoras de *cnf1* já foram isoladas de infecções intestinais e extraintestinais de cães assim como de fezes de cães assintomáticos (POHL; OSWALD; VAN MUYLEM, 1993).

A produção de *cnf1* é intimamente relacionada a cepas de *E.coli* que causam doenças extra-intestinais em cães e gatos, mas a contribuição de *cnf1* nessas doenças não é bem conhecida (BEUTIN, 1999).

Cepas de *E.coli* produtoras de *cnf1* já foram isoladas de infecções intestinais e extra-intestinais de cães assim como de fezes de cães assintomáticos com porcentagens de isolamento muito semelhantes (POHL; OSWALD; VAN MUYLEM, 1993).

Nesse estudo foi observada uma alta prevalência de *cnf* (57,0%) nas amostras de *E.coli* isoladas correspondendo ao observado por Beutin (1999), Pohl, Oswald e Van Muylem (1993) e Wray e Woodward (1997).

Nolte et al. (1993), observaram que o grau de infiltração de células inflamatórias no epitélio endometrial era maior em presença de *cnf*.

Diferentemente do que foi observado por Nolte et al. (1993) não houve correlação entre o tamanho do infiltrado inflamatório e o fator de virulência *cnf*. Esse aspecto ainda deve ser esclarecido com um número maior de amostras para se verificar se essa relação existe ou não.

Outros fatores também contribuem para a virulência das *E.coli* uropatogênicas, como a aquisição de ferro. Essas *E.coli* possuem diversos mecanismos de seqüestro de ferro, incluindo sistemas sideróforos (SAYLERS; WHITT, 2002).

Na *E.coli*, a aerobactina (gene *iuc* – iron uptake:chelate), um sideróforo, é a mais efetiva dentre os sistemas de quelação de ferro utilizadas pelas bactérias entéricas para a aquisição de ferro (DE LORENZO; MARTINEZ, 1988).

O sistema de aerobactina é isolado com mais freqüência em cepas de *E.coli* isoladas de pacientes com pielonefrites (73%), cistites (49%), ou com bacteremias (58%) do que de amostras de fezes (41%). Isso sugere que a aerobactina contribui para a virulência dentro e fora do trato urinário (JOHNSON, 1991).

Westerlund et al. (1987), concluíram que essa prevalência baixa de *iuc*, nos isolados caninos, indica que as cepas caninas utilizam sistemas diferentes para o seqüestro de ferro.

Nesse estudo 33,8% das amostras de *E.coli* isoladas apresentaram positividade para o gene *iuc*, resultado semelhante à prevalência observada por De Lorenzo e Martinez (1988) em fezes de cães saudáveis. Isso sugere novamente que a *E.coli* presente na piometra de cães provavelmente é proveniente da flora fecal do próprio cão. Conforme observado por

Westerlund et al. (1987), a aerobactina é observada com maior frequência em isolados de humanos do que em cães.

O sistema aerobactina e a fímbria P são normalmente encontrados em conjunto em isolados de pacientes humanos com infecção do trato urinário (JACOBSON et al., 1988). Plasmídios carreando a região da aerobactina às vezes, também carregam genes de resistência a antimicrobianos (DELGADO-IRIBARREN et al., 1987).

Essa correlação entre a aerobactina e o gene *pap* ocorreu em apenas 32,6% das amostras de *E.coli* isoladas e não apresentou significância estatística ($P>0,05$), sugerindo que essa correlação não ocorre na ocorrência da piometra como ocorre na infecção do trato urinário.

Chen et al. (2003) isolaram *E.coli* de cães com piometra ($n=23$) e de fezes de cães saudáveis ($n=24$). Todas as amostras, exceto uma, possuíam pelo menos um fator de virulência de cepas uropatogênicas. Nenhum isolado foi positivo para o gene *afa1*. Eles observaram que havia uma similaridade entre as prevalências dos genes de *pap*, *hlyA*, *cnf1*, *afa1* e *sfa* nos isolados de piometra e as prevalências desses mesmos genes de isolados de cães e humanos com infecção do trato urinário, sugerindo que os determinantes de virulência no útero canino são semelhantes aos determinantes de virulência nos tratos urinários de cães e humanos. Encontraram uma alta prevalência de *pap*, *cnf1*, *hlyA* e *sfa* nos isolados de piometra e uma baixa prevalência de *iuc* e *afa1*.

Nesse estudo, foram identificados fatores de virulência em 98,0% das cepas de *Escherichia coli* avaliadas, demonstrando uma alta frequência de *E.coli* potencialmente patogênica ($P<0,05$), como observado por Chen et al. (2003), mas numa amostragem bem menor. Os fatores de maior frequência foram *sfa* (79,5% das cepas), *pap* (57,6%) e *cnf* (57,0%). A realização de uma correlação estatística entre os fatores de virulência observados, o tamanho do infiltrado inflamatório e a quantidade de unidades formadoras de colônias/mL,

permitiu observar que existe uma correlação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o tamanho do infiltrado inflamatório e o fator de virulência *sfa* sendo que, o tamanho do infiltrado inflamatório é maior nas amostras que não apresentam positividade para esse fator de virulência.

Verificou-se ainda uma correlação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre a quantidade de unidades formadoras de colônias/mL e o fator de virulência *pap*. A quantidade de u.f.c./mL é maior em amostras nas quais não foi observada presença desse fator de virulência. Tendo em vista que o fator de virulência *pap* é responsável pela aderência da bactéria através de receptores específicos de bexiga e ureter (SAYLERS; WHITT, 2002), provavelmente as bactérias que apresentam *pap* se adaptam melhor a estes ambientes do que ao útero.

Procedendo-se à correlação entre a presença dos outros fatores de virulência com os tamanhos dos processos inflamatórios, bem como à quantidade de unidades formadoras de colônias/mL, não se observou nenhum resultado estatisticamente significativo ($P > 0,05$).

Von Sydow et al. (2004) verificaram a presença de 89,21% de *E.coli* em trato gastrointestinal de cães saudáveis ($N = 102$), e observaram 76% de cepas de *E.coli* com presença de fatores de virulência, sendo que 57,14% apresentaram mais de um fator de virulência. Os fatores de virulência detectados com maior frequência foram *iuc* (48%), *sfa* (40%) e *pap* (24%).

Nesse estudo 80,4% das amostras de *E.coli* isoladas apresentaram mais de um fator de virulência, prevalência maior do que na observada nas fezes de cães saudáveis. Os fatores de virulência com maior frequência na piometra foram *sfa* (79,5% das cepas), *pap* (57,6%) e *cnf* (57,0%), resultados estes um pouco diferentes dos observados por Von Sydow et al. (2004) em fezes de cães saudáveis, sugerindo que estes fatores têm um importante papel na colonização do útero e manutenção da enfermidade na piometra.

Os cães e gatos pertencem àquelas espécies de animais que estão vivendo próximos ao humano por milhares de anos. Como consequência, contatos entre humanos, cães e gatos são numerosos e a possibilidade de transmissão de microrganismos entre essas diferentes espécies de hospedeiros é extremamente alta (BEUTIN, 1999). A transmissão de *E.coli* patogênica enteral e extra-intestinal entre cães e humanos já foi relatada por Beutin (1999). Whittam, Wolfe e Wilso (1989) observaram que cepas de *E.coli* uropatogênicas de humanos, cães e gatos eram similares geneticamente. Low et al. (1988) sugeriram que cepas de *E.coli* de humanos e de cães poderiam ser transmitidas como patógenos urinários entre cães e humanos. Senior, Deman e Svanborg (1992) observaram que fenotipicamente, a maioria das *E.coli* uropatogênicas de cães aglutinavam eritrócitos caninos, mas não aglutinavam eritrócitos de humanos, e que aderiam a células uroepiteliais de cães, mas não de humanos, no entanto, cepas de *E.coli* de humanos agiam de modo contrário.

Cães e gatos podem ter um papel importante na transmissão como vetores de *E.coli* para outros animais e para o humano. Diversos estudos indicaram que a transmissão, de clones de *E.coli* uropatogênicas similares aos clones fecais, entre humanos, cães e gatos já ocorreu e pode ocorrer novamente (WHITTAM; WOLFE; WILSON, 1989). Beutin (1999) observou que alguns tipos isolados de *E.coli* patogênica extra-intestinal, de cães, gatos e humanos foram encontrados como sendo geneticamente próximos, mas mostraram diferenças nas suas adesinas fimbriais P, que determinam especificidade pelo hospedeiro.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O presente estudo confirmou a ocorrência da *Escherichia coli* como sendo o agente isolado com mais frequência nos processos de piometra em cadelas, bem como permitiu verificar a presença de fatores de virulência nas cepas isoladas. Esses fatores de virulência podem ser identificados em estirpes de *E.coli* associadas a infecções no homem e em animais, principalmente no trato genito-urinário.

Conclui-se estatisticamente que quanto maior o número de unidades formadoras de colônias/mL, maior a intensidade do processo inflamatório. Essa correlação se apresentou baixa, sugerindo que existem outros fatores envolvidos no processo inflamatório além do número de unidades formadoras de colônias/mL.

O tamanho do infiltrado inflamatório presente nos fragmentos uterinos onde houve isolamento de *E.coli* não foi maior do que o encontrado nas amostras nas quais isolaram-se outros agentes.

Observou-se ainda uma correlação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o tamanho do infiltrado inflamatório e o fator de virulência *sfa* sendo que, o tamanho do infiltrado inflamatório foi maior nas amostras que não apresentaram positividade para esse fator de virulência.

Observou-se uma maior sensibilidade de *E.coli* aos antimicrobianos norfloxacin, polimixina B, sulfazotrin, cloranfenicol, enrofloxacin, e gentamicina e uma maior resistência aos antimicrobianos cefalotina e ampicilina. Nas cepas isoladas de bactérias Gram negativas houve maior sensibilidade aos antimicrobianos norfloxacin e polimixina B e maior resistência aos antimicrobianos ampicilina, cefalotina, cefoxitina, cefalexina, e tetraciclina. Nas cepas isoladas de bactérias Gram positivas houve maior sensibilidade aos

antimicrobianos vancomicina, cefalexina, norfloxacin, sulfa+trimetoprim, gentamicina, e polimixina B e maior resistência aos antimicrobianos penicilina, oxacilina e ampicilina.

Nenhuma cepa de *E.coli* apresentou positividade às toxinas LT-I, LT-II, STa e STb, sugerindo que *E.coli* enterotoxigênica não está envolvida na causa dessa enfermidade.

Nenhuma cepa de *E.coli* apresentou positividade às toxinas VT1e VT2, sugerindo que cães com piometra não apresentam *E.coli* enterohemorrágica envolvida nessa enfermidade.

Foram identificados fatores de virulência em 98,0% das cepas de *Escherichia coli* avaliadas, demonstrando uma alta frequência de *E.coli* potencialmente patogênica.

Verificou-se ainda uma correlação estatisticamente significativa ($P<0,05$) entre a quantidade de unidades formadoras de colônias/mL e o fator de virulência *pap*. A quantidade de u.f.c./mL é maior em amostras nas quais não foi observada presença desse fator de virulência.

Procedendo-se à correlação entre a presença dos outros fatores de virulência com os tamanhos dos processos inflamatórios, bem como à quantidade de unidades formadoras de colônias/mL, não se observou nenhum resultado estatisticamente significativo ($P>0,05$).

REFERÊNCIAS

- ADWAN, K.; ABU-HASAN, N.; ADWAN, G.; JARRAR, N.; ABU-SHANAB, B.; AL-MASRI, M. Molecular epidemiology of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections in Northern Palestine. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 53, n. 1, p. 23-26, 2004.
- ACRES, S. D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p. 229-255, 1983.
- ALEXANDER, T. J. L. Neonatal diarrhoea in pigs. In: GYLES, C. L. ***Escherichia coli* in domestic animals and humans**. [S.I.]: CAB International, 1994. p. 151-170.
- ALLEN, W. E. **Fertilidade e obstetrícia no cão**. 2. ed. [S.I.]: Livraria Varela, 1995. 197 p.
- ALLEN, W. E.; DAGNALL, G. J. R. Some observations on the areobic bacterial flora of the genital tract of the dog and bitch. **Journal of Small Animal Practice**, v. 23, p. 325-335, 1982.
- ALONSO, P.; BLANCO, M.; GONZALES, E. A. Frequent production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from human urinary tract infections. **Microbiology Letters**, v. 48, n. 1, p. 391-396, 1987.
- ALTEKRUSE, S. F.; COHEN, M. L.; SWERDLOW, D. L. Emerging foodborn diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 1-12, 1997.
- ARTHUR, G. H. **Obstetricia veterinaria de Wright**. 3. ed. [S.I.]: Editorial Interamericana, S.A., 1964. 526 p.
- ARTHUR, G. H.; NOAKES, D. E.; PEARSON, H. **Veterinary reproduction & obstetrics**. 5th ed. [S.I.]: Baillière Tindall, 1982. 501 p.
- BABA, F.; HATA, H.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 4, p. 606-609, 1983.
- BAGG, A.; NEILANDS, J. B. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 509-518, 1987.

BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. **Veterinary Research**, v. 30, p. 285-298, 1999.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2483-2488, 1993.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 631-635, 1995.

BHAKDI, S.; GREULICH, M.; MUHLY, B.; EBERSPACHER, H.; BECKER, A.; THIELE, A.; HUGO, F. Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, p. 737-754, 1989.

BJURSTRÖM, L. Aerobic bacteria occurring in the vagina of bitches with reproductive disorders. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 29-34, 1993.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; GONZALEZ, E. A.; MORA, A.; JANSE, W.; GOMES, T. A. T.; ZERBINI, F.; YANO, T.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BLANCO, G. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2958-2963, 1997.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BORRESEN, B. Pyometra in the dog. II. A pathophysiological investigation. **Nordisk Veterinær Medicin**, v. 31, n. 6, p. 251-262, 1979.

BOYCE, T. G.; SWERDLOW, D. L.; GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157 and the hemolytic-uremic syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 364-368, 1995.

BRAUN, V.; BRAZEL-FAISST, C.; SCHNEIDER, R. Growth stimulation of *Escherichia coli* in serum by iron (III) aerobactin. Recycling of aerobactin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 21, p. 99-103, 1984.

BROOKS, H. J. L.; BENSEMAN, B. A.; PECK, J. Correlation between uropathogenic properties of *Escherichia coli* from urinary tract infections and the antibody-coated bacteria test and comparison with faecal strains. **Journal of Hygiene**, v. 87, p. 53-61, 1981.

BROTHERS, A. M.; GIBBS, P. S.; WOOLEY, R. E. Development of resistant bacteria isolated from dogs with otitis externa or urinary tract infections after exposure to enrofloxacin in vitro. **Veterinary Theriogenology**, v. 3, n. 4, p. 493-500, 2002.

BROWN, J. C.; AYMES, S. G. B. Quinolone Resistance. In: WOODFORD, N.; JOHNSON, A. P. **Molecular Bacteriology**. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. p. 617-639.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 215-228.

CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RUGGERI, F. M.; BALDASSARI, L.; BISICCHIA, R.; IPPOLITO, G.; ROMOLI, E.; DONELLI, G. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 146-149, 1987.

CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RODA, L. G.; RUGGERI, F. M.; ZONA, C. Partial purification and characterisation of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1300-1306, 1983.

CAPRIOLI, A.; NIGRELI, A.; GATTI, R.; ZAVANELLA, M.; BLANDO, A. M.; MINELLI, F.; DONELLI, G. Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* from pigs and cattle in northern Italy. **Veterinary Records**, v. 133, p. 323-324, 1993.

CASTRO, A. F. P.; YANO, T. Principais doenças entéricas dos bezerros de origem bacteriana. In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. **Diarréia dos bezerros**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. p. 1-38.

CAVALIERI, S. J.; BOHACH, G. A.; SNYDER, I. S. *Escherichia coli* α -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. **Microbiology Reviews**, v. 48, p. 326-343, 1984.

CHEN, Y. M. M.; WRIGHT, P. J.; LEE, C. S.; BROWNING, G. F. Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 1, p. 57-69, 2003.

CHRISTIANSEN, I. J. **Reprodução no cão e gato**. [S.l.]: Manole Ltda, 1988. 362 p.

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.

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**, v. 220, n. 2, p. 190-192, 2002.

CRAIG, J. F. **Fleming's veterinary obstetrics**. 2nd ed. London: Baillière, Tindall and Cox, 1937. 552 p.

CUI, W. L.; XU, D. X.; LI, W. L.; WANG, L. X. Analysis of anti-microbial resistance of *Escherichia coli* that caused infection in urogenital system. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 24, n. 8, p. 940-942, 2004.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M. Uterine oestrogen and progesterone receptor expression in experimental pyometra in the bitch. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, p. 99-106, 2003.

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**, v. 55, p. 1509-1519, 2001.

DE COCK, H.; DUCATELLE, R.; LOGGHE, J. P. Immunohistochemical localization of estrogen receptor in the normal canine female genital tract. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 133-147, 1997.

DELGADO-IRIBARREN, A.; MARTINEZ-SUAREZ, F.; BAZUERO, F.; PEREZ-DIAZ, J. C.; MARTINEZ, J. L. Aerobactin-producing multi-resistance plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 19, p. 552-553, 1987.

DE LORENZO, V.; MARTINEZ, J. L. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, p. 621-629, 1988.

DERIVAUX, J.; BARNABE, R. C. **Reprodução dos animais domésticos**. [S.l.]: Editorial Acribia, 1976. 446 p.

DE RYCKE, J.; GONZALES, E. A.; BLANCO, O. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factors in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 694-699, 1990.

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

DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

DONNENBERG, M. S. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: BLASER, M. J.; RAUDIN, J. L.; GREENBERG, H. B.; GUERRANT, R. L. **Infections of the gastrointestinal tract**. [S.l.]: Raven Press, 1995. p. 709-726.

DORN, C. R. Hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* in people consuming undercooked and unpasteurized milk. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 11, p. 1360, 1988.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Veterinary Record**, v. 69, n. 2, p. 1409-1415, 1957.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Veterinary Record**, v. 70, n. 49, p. 1102-1110, 1958.

DWIGHT, C.; HIRSH, D. V. M. Multiple antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from the urine of dogs and cats with cystitis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 162, n. 10, p. 885-887, 1973.

EGENVALL, A.; HAGMAN, R.; BONNETT, B. N.; HEDHAMMAR, A.; OLSON, P.; LAGERSTEDT, A-S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 530-538, 2001.

EVANS, J. D. J.; EVANS, D. J. J.; DUPONT, H. L.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Patterns of loss of enterotoxigenicity by *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: suggestive evidence for an interrelationship with serotype. **Infection and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 105, 1977.

FENG, P. *Escherichia coli* O157:H7: Novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 1996.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 33-81.

FRANK, L. A.; KANIA, S. A.; HNILICA, K. A.; WILKES, R. P.; BEMIS, D. A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 222, n. 4, p. 451-454, 2003.

FRANSSON, B.; LAGERSTEDT, A-S.; HELLMEN, E.; JONSSON, P. Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine disease. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 44, n. 7, p. 417-426, 1997.

FUKATA, T.; NAITO, F.; YOSHIDA, N. Incidence of *Salmonella* infection in healthy dogs in Gifu Prefecture, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 1079-1080, 2002.

GADEBERG, O. V.; ORSKOV, I.; RHODES, J. M. Cytotoxic effect of an α -hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 41, p. 358-364, 1983.

GANDOTRA, V. K.; SINGLA, V. K.; KOCHHAR, H. P. S.; CHAUHAN, F. S.; DWIVEDI, P. N. Haematological and bacteriological studies in canine pyometra. **Indian Veterinary Journal**, v. 71, n. 8, p. 816-818, 1994.

GAYNES, R.; MONNET, D. The contribution of antibiotic use on the frequency of antibiotic resistance in hospitals. **Ciba Found Symp.**, v. 207, p. 47-56, 1997.

GORDON, D. M.; RILEY, M. A. A theoretical and experimental analysis of bacterial growth in the bladder. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 555-562, 1992.

GREENE, C. E. Enteric bacterial infections. In: _____. **Infectious diseases of the dog and cat**. [S.l.]: W.B. Saunders, 1998, p. 243-245.

GROOTERS, A. M. Diseases of the ovaries and uterus. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Saunders manual of small animal practice**. [S.l.]: W.B. Saunders Company, 1994. 1467 p.

GUILFORD, W. G.; STROMBECK, D. R. Gastrointestinal tract infections, parasites, and toxicosis. In: GUILFORD, W. G. **Strombeck's small animal gastroenterology**. [S.l.]: W.B. Saunders, 1996. p. 411-432.

GYLES, C. L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 734-746, 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**, v. 84, n. 1,2, p. 143-153, 2002.

HAMMERMUELLER, J.; KRUTH, S.; PRESCOTT, J.; GYLES, C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 265-270, 1995.

HARDY, R. M.; OSBORNE, C. A. Canine pyometra: Pathophysiology, diagnosis and treatment of uterine and extra-uterine lesions. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 10, p. 245-268, 1974.

HART, C. A.; BATT, R. M.; SAUNDERS, J. R. Diarrhea caused by *Escherichia coli*. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 13, p. 121-131, 1993.

HERTZKE, D. M.; COWAN, L. A.; SCHONING, P.; FENWICK, B. W. Glomerular ultrastructural lesions of idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of Greyhounds. **Veterinary Pathology**, v. 32, p. 451-459, 1995.

HIDALGO, C. G.; COHEN, A. S.; MÉNDEZ, J. V. **Reproducción de animales domésticos**. [S.I.]: Editorial Limusa, 1986. 375 p.

HIRSCH, D. C.; WIGER, N. The effect of tetracycline upon the spread of bacterial resistance from calves to man. **Journal of Animal Science**, v. 46, n. 5, p. 1437-1446, 1978.

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

HOLLAND, R. E.; WALKER, R. D.; SRIRANGANATHAN, N.; WILSON, R. A.; RUHL, D. C. Characterization of *Escherichia coli* isolated from healthy dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 261-268, 1999.

HUGHES, C.; HACKER, J.; ROBERTS, A.; GOEBEL, W. Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary infections caused by *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 39, p. 546-551, 1983.

JACOBSON, S. H.; TULLUS, K.; WRETLLND, B.; BRAUNER, A. Aerobactin-mediated uptake of iron by strains of *Escherichia coli* causing acute pyellonephritis and bacteremia. **Journal of Infectiology**, v. 16, n. 2, p. 147-152, 1988.

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

JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

JOFFE, D. J.; SCHLESINGER, D. P. Preliminary assessment of the risk of Samonella infection in dogs fed raw chicken diets. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 441-442, 2002.

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

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P. Canine feces as a reservoir of Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1306-1314, 2001.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. 4th ed. Harcourt: Brace Jovanovich, Publishers, 1993. 653 p.

KARMALI, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 1, p. 15-38, 1989.

KAWAMURA, Y.; HOU, X. G.; SULTANA, F.; HIROSE, K.; MIYAKE, M.; SHU, S. E.; EZAKI, T. Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical specimens and emended description of *Staphylococcus caprae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2038-2042, 1998.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, p. 775-779, 1977.

KREEGER-VAN-RIG, N. J. W. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1984. 1082 p.

KRIEG, N. R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984. v.1, 964 p.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 2255 p.

KRUTH, S. A. Gram negative bacterial infections. In: GREENE, C. F. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 217-222.

LABIGNE-ROUSSEL, A.; FALKOW, S. Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial-adhesin-encoding operon (*afa*) among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 3, p. 640-648, 1988.

LAU, S. M.; PENG, M. Y.; CHANG, F. Y. Resistance rates to commonly used antimicrobials among pathogens of both bacteremic and non-bacteremic community-acquired urinary tract infection. **Journal of Microbiology and Immunology Infections**, v. 37, n. 3, p. 185-191, 2004.

LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HANSLER JR., W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of clinical microbiology**. 4th ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1985. 1149 p.

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

LOW, D. A.; BRAATEN, B. A.; LING, G. V.; JOHNSON, D. L.; RUBY, A. L. Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 10, p. 2601-2609, 1988.

MACKMAN, N.; NICAUD, J. M.; GRAY, L.; HOLLAND, I. B. Secretion of haemolysin by *Escherichia coli*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 125, p. 159-181, 1986.

MARKS, S. L.; KATHER, E. J. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. **Veterinary Clinic Small Animals**, v. 33, n. 5, p. 1029-1060, 2003.

MARKS, S. L.; KATHER, E. J.; KASS, P. H. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 5, p. 533-540, 2002.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 607-625, 1999.

MONAGHAN, C.; TIERNEY, U.; COLLERAN, E. Antibiotic resistance and R-factors in the fecal coliform flora of urban and rural dogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 19, n. 2, p. 266-270, 1981.

MONTENEGRO, M. A.; BULTE, M.; TRUMPF, T.; ALEKSIC, S.; REUTER, G.; BULLING, E.; HELMUTH, R. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1417-1421, 1990.

MONTGOMERIE, J. Z.; BINDEREIF, A.; NIELANDS, J. B.; KALMANSON, G. M.; GUZE, L. B. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 3, p. 835-838, 1984.

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

MURRAY, P. R. E.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. 1773 p.

NA. H.; FAIRBROTHER, J. M.; DUBREUIL, J. D.; HAREL, J. Cloning and characterization of the *eae* gene from a dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221. **FEMS Microbiology Letters**, v. 148, p. 239-245, 1997.

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A.; IRINO, K.; DA SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serptypic relationship to human enteropathogenic *E.coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 4, p. 269-277, 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NELSON, R. W.; FELDMAN, E. C. Pyometra in the bitch. In: MARROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**: Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. 1143 p.

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

NOLTE, I.; MOLLER, S.; BRASS, A.; SCHOSSIER, N.; SCHOON, H. A.; GRUNEBERG, W. Treatment of the endometritis-pyometra-complex in the bitch with low dose prostaglandin F2 alpha. **Kleintierpraxis**, v. 38, n. 6, p. 363-372, 1993.

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**, v. 146, n. 6, p. 151-155, 2000.

O'BRIAN, A. D.; LA VECK, G. D.; THOMPSON, M. R. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 146, p. 763-769, 1982.

O'BRIEN, A. D.; MELTON, A. R.; SCHMITT, C. K.; MCKEE, M. I.; BATTS, M. I.; GRIFFIN, D. E. Profile of *Escherichia coli* O157:H7 pathogen responsible for hamburguer-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 10, p. 2799-2801, 1993.

OLIVEIRA, C. A.; DE MARTIN, C. M.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. M.; GIORGI, W.; DE MARTIN, B. W. Prevalência de agentes microbianos envolvidos na piometra canina. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 2, p. 184, 1988.

OLSIVIK, O.; STROCKBINE, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga like toxin genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 271-276.

OLSON, O.; HEDHAMMER, A.; FARIS, A. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 10, p. 577-589, 1985.

OLSON, P. N. S.; MATHER, E. C. Canine vaginal and uterine bacterial flora. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 6, 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**, v. 218, n. 3, p. 381-384, 2001.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 699-704, 1992.

ORSKOV, I.; SVANBORG EDEN, C.; ORSKOV, F. Aerobactin production of serotyped *Escherichia coli* from urinary tract infections. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 177, n. 1, p. 9-14, 1988.

OSWALD, D. E.; DE RYCKE, O.; LINTERMANS, P.; VAN MUYLEM, K.; MINIL, J.; DABE, G.; POHL, P. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 2522-2527, 1991.

PADILLA, G.; COSTA, O. P. Genética bacteriana. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 55-67.

PARRY, S. H.; ROOKE, D. M. Adhesins and colonization factors of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. **The virulence of *Escherichia coli***. London: Academic Press. Inc. Ltd., 1985. p. 79-155.

PASS, M. A.; ODEDRA, R.; BATT, R. M. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 2001-2004, 2000.

PEETERS, J. E. *Escherichia coli* infections in rabbits, cats, dogs, goats and horses. In: GYLES, C. L. ***Escherichia coli* in domestic animals and humans**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 261-283.

PENTEADO, A. S.; AIDAR, L.; PESTANA DE CASTRO, A. F. *eae*-negative attaching and effacing *Escherichia coli* from piglets with diarrhea. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 75-81, 2001.

PLUMB, D. C. **Veterinary drug handbook**. Iowa: Iowa State University Press, 1999. p. 238-241.

POHL, P.; OSWALD, E.; VAN MUYLEM, K. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. **Veterinary Research**, v. 24, n. 4, p. 305-311, 1993.

POLLARD, D. R.; JOHNSON, W. M.; LIOR, H.; TYLER, S. D.; ROZES, K. R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 540-545, 1990.

PORE, R. S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, v. 90, p. 129-139, 1985.

PRADA, J.; BALJER, G.; DE RYCKE, J. Characteristics of alpha-hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 59-73, 1991.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Diseases caused by *Escherichia coli*. In: RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9th ed. London: W.B. Saunders, 2000. p. 779-809.

RENNIE, R. P.; ARBUTHNOTT, J. P. Partial characterization of *Escherichia coli* haemolysin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 7, p. 179-188, 1974.

RENWICK, S. A.; WILSON, J. B.; CLARKE, R. C.; LIOR, H.; BORCYK, A. A.; SPIKA, J.; RAHN, K.; MCFADDEN, K.; BROUWER, A.; COPPS, A.; ANDERSON, N. G.; ALVES, D.; KARMALI, M. A. Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 3, p. 792-793, 1993.

RICHTER, T.; GRUND, S.; HELLMANN, E. Occurrence of enterotoxic *E.coli* in the young dog. Description of probable pathogenicity factors. **Berl Muench Tierarztl Wochenschr**, v. 97, p. 37-43, 1984.

ROBERTS, S. J. **Obstetricia veterinaria y patologia de la reproduccion (teriogenologia)**. [S.l.]: Editorial Hemisferio Sur S.A., 1979. 1021 p.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. [S.l.]: Edwards Brothers Inc., 1956. 551 p.

RUSSMANN, H.; SCHIMDT, H.; CAPRILOI, A.; KARCH, H. Highly conserved B-subunit genes of Shiga-like toxin II variants found in *Escherichia coli* O157 strains. **FEMS Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 335-340, 1994.

SANDHOLM, M.; KORHONEN, H. Antibacterial defence mechanisms of the udder. In: SANDHOLM, M.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; KAARTNEM, L.; PYORALA, S. **The Bovine Udder and Mastitis**. Helsinki: Gunmerus Kirjapaino Oy, 1995. p. 37-48.

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

SAYLERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: A Molecular Approach**. Washington: ASM Press, 2002. p. 205-212.

SCHULTSZ, C.; POOL, G. J.; VAN KETEL, R.; WEVER, D.; SPEELMAN, P.; DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using non-radioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2393-2397, 1994.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology Reviews**, v. 60, p. 167-215, 1996.

SENIOR, D. F.; DEMAN, P.; SVANBORG, C. Serotype, hemolysin production, and adherence characteristics of strains of *Escherichia coli* causing urinary tract infections in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 4, p. 494-498, 1992.

SMITH, H. Virulence determinants of *Escherichia coli*: present knowledge and questions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 747-752, 1992.

SNEATH, P. H. A. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984. 964 p.

STAATS, J. J.; CHENGAPPA, M. M.; DEBEY, M. C.; FICKBOHM, B.; OBERST, R. D. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin (*stx*) and enterotoxin (*estA* and *elt*) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 303-312, 2003.

SUSSMAN, M. ***Escherichia coli*: Mechanisms of virulence**. United Kingdom: Cambridge University Press, 1997. 639 p.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne diseases: An evolving public health challenge. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 1-13, 1997.

TENOVER, F. C.; HUGHES, J. M. The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. **Journal of American Medical Association**, v. 275, p. 300-304, 1996.

THRELFALL, W. R. Diagnosis and medical management of pyometra. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 10, n. 1, p. 21-29, 1995.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. Resistência bacteriana a drogas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 105-109.

TREVENA, W. B.; HOOPER, S.; WRAY, C. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. **Veterinary Record**, v. 138, n. 16, p. 400, 1996.

TURK, J.; MADDOX, C.; FALES, W. Examination for heat-labile, heat stable, and Shiga-like toxins and for the eaeA gene in *Escherichia coli* isolates obtained from dogs dying with diarrhea: 122 cases (1992-1996). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 11, p. 1735-1736, 1998.

VAN DEN BOSCH, J. F.; POSTMA, P.; KOOPMAN, P. A. R.; GRAFF, J.; MACLAREN, D. M. Virulence of urinary and faecal *Escherichia coli* in relation to serotype, haemolysin and haemagglutination. **Journal of Hygiene**, v. 88, n. 3, p. 567-577, 1982.

VANDENESCH, F.; EYKYN, S. J.; BES, M.; MEUGNIER, H.; FLEURETTE, J.; ETIENNE, J. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolates as human pathogens and from goat milk. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 888-892, 1995.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; HELLEMANS, A.; CORYN, M.; LAUWERS, H. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 53, p. 773-788, 2000.

VON SYDOW, A. C. M. D. G.; MORENO, A. M.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Avaliação da presença de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71 (suppl.), em publicação, 2004.

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**, v. 52, n. 3-4, p. 293-300, 1996.

WATANABE, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 27, p. 87-115, 1963.

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**, v. 37, p. 54-60, 1996.

WEINBERG, E. D. Iron and infection. **Microbiological Reviews**, v. 42, n. 1, p. 45-66, 1978.

WELCH, R. A.; HULL, R.; FALKOW, S. Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 42, n. 1, p. 178-186, 1983.

WELLS, J. G.; SHIPMAN, L. D.; GREENE, K. D.; SOWERS, E. G.; GREEN, J. H.; CAMERON, D. N.; DOWNES, F. P.; MARTIN, M. L.; GRIFFIN, P. M.; OSTROFF, S. M.; POTTER, M. E.; TAUXE, R. V.; WACHSMUTH, I. K. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E.coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 985-989, 1991.

WESTERLUND, B.; PERE, A.; KORHONEN, T. K.; JÄRVINEN, A. K.; SIITONEN, A.; WILLIAMS, P. H. Characterisation of *Escherichia coli* strains associated with canine urinary tract infections. **Research in Veterinary Science**, v. 42, n. 3, p. 404-406, 1987.

WHITTAM, T. S.; WOLFE, M. L.; WILSON, R. A. Genetic relationships among *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections in humans and animals. **Epidemiology and Infection**, v. 102, n. 1, p. 37-46, 1989.

WILSON, J. B.; MCEWEN, S. A.; CLARKE, R. C.; LESLIE, K. E.; WALTNER-TOEWS, D.; GYLES, C. L. A case-control study of selected pathogens including verotoxigenic *Escherichia coli* in calf diarrhea on an Ontario veal farm. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 3, p. 184-188, 1992.

WILSON, R. A.; KEEFE, T. J.; DAVIS, M. A.; BROWING, M. T.; ONDRUSEK, K. Strains of *Escherichia coli* associated with urogenital disease in dogs and cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 743-746, 1988.

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 569-84, 1997.

WOODWARD, M. J.; CARROL, P. J.; WRAY, C. Detection of entero and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhea disease in animals using polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 31, n. 2-3, p. 251-261, 1992.

WRAY, C.; WOODWARD, M. J. *Escherichia coli* infections in farm animals. In: SUSSMAN, M. *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. United Kingdom: Cambridge University Press, 1997. p. 49-84.

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**, v. 183, suppl. 1, p. 43-46, 2001.

YAMAMOTO, S.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 85-90, 1995.

YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; TSUKAMOTO, T.; HASEGAWA, A. Serotypes and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 1, p. 37-40, 1998.