

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

**Pesquisa de bactérias e sua sensibilidade aos antimicrobianos
em cães com piometra, com especial interesse na
caracterização das *Escherichia coli* patogênicas extra-
intestinais (ExPEC)**

João Carlos Barbosa Santos Filho

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Medicina Veterinária
da Universidade Paulista UNIP para
obtenção do Título de Mestre em
Medicina Veterinária.

São Paulo

(2008)

UNIVERSIDADE PAUSLISTA - UNIP

João Carlos Barbosa Santos Filho

**Pesquisa de bactérias e sua sensibilidade aos antimicrobianos em
cães com piometra, com especial interesse na caracterização
das *Escherichia coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC)**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Medicina Veterinária
da Universidade Paulista UNIP para
obtenção do Título de Mestre em
Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Vania Maria
de Carvalho

São Paulo

(2008)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vania Maria de Carvalho, pela orientação, amizade, apoio; por ter acreditado em meu sucesso e, sobretudo pela sabedoria transmitida.

À minha amiga Lika Osugui, por me ter acompanhado passo a passo nos experimentos, pelo apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Kinue Irino (Instituto Adolf Lutz), pela ajuda nas sorotipagens das amostras.

À Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, Responsável pelo Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do HOVET-FMVZ-USP, e ao Médico Veterinário Marcelo Faustino pela permissão concedida e ajuda na colheita de material.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, por ter gentilmente cedido um espaço em seu laboratório para realização dos testes da PCR, e pela participação da banca definitiva.

Aos pós-graduandos e funcionários do laboratório do Departamento de Microbiologia do instituto de Ciências Biomédicas-USP, pela gentileza com que me receberam em seu espaço de trabalho.

À Médica Veterinária Fabrícia Tavorali e a todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário Campus Cantareira, pela ajuda com os materiais e processamento das amostras.

Aos colegas Veterinários e funcionários do laboratório Lab&Vet Diagnóstico e Consultoria Veterinária, pelo espaço cedido para realização do projeto, em especial à Dra. Maria Christina Christóvão Ramos, pelo apoio, e por participar do exame de qualificação.

À Profa. Dra. Selene Dall' Acqua, pelo incentivo, e por participar do exame de qualificação e banca definitiva.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro.

Ao Dr. James R. Johnson por ter gentilmente cedido as amostras padrão de ExPEC e os protocolos para a PCR.

Aos meus amigos e parentes que sempre me apoiaram.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

SANTOS FILHO, João Carlos Barbosa. Pesquisa de bactérias e sua sensibilidade aos antimicrobianos em cães com piometra, com especial interesse na caracterização das *Escherichia coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC). São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Paulista.

A piometra canina é caracterizada por alterações no ciclo hormonal e colonização bacteriana no útero. As *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC), principalmente, as associadas à infecção do trato urinário, têm sido frequentemente isoladas desta afecção. O objetivo deste trabalho foi a pesquisa de bactérias em pus e urina de cadelas com piometra, com especial interesse na avaliação dos perfis moleculares de virulência das amostras de *E. coli*, correlacionando-os com os sorotipos e a resistência a agentes antimicrobianos. Foram colhidos pus e urina de 32 cadelas com piometra durante a ovário-salpingo-histerectomia, sendo realizado o isolamento, identificação e testes de sensibilidade a antimicrobianos, segundo metodologia padronizada. Para pesquisa dos fatores de virulência de ExPEC foi realizada a técnica da PCR para os seguintes genes: *pap*; *afaI*; *sfa*; *fimH*; *iha*; *ibeA*; *cnf1*; *hlyA*; *iucD*; *fyuA*; *cvaC*; *traT* e ilha de patogenicidade I de CFT073 (PAI I CFT073). Isolou-se *E. coli* em 26 (96%) das 27 amostras de pus e 7 (100%) das 7 amostras de urina com crescimento bacteriano. Todos os isolados foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano, sendo a multiresistência observada em nove (25%) isolados. As 33 amostras de *E. coli* foram positivas para algum dos genes testados, sendo os mais frequentes a sequência *fimH*, relacionada à fímbria do Tipo I (100%) e *fyuA*, gene para yersiniabactina (94%). Dos genes testados apenas *afa*, que codifica adesina não hemaglutinante e *cvaC*, para o plasmídeo ColV, não foram detectadas. Os sorogrupos mais prevalentes foram O25 e O6. Houve grande similaridade entre as amostras de pus e urina quanto aos sorotipos e fatores de virulência pesquisados, sugerindo possível origem clonal das mesmas. Os isolados de cães com piometra apresentaram semelhanças às amostras de ExPEC isoladas de diferentes síndromes humanas. Esses resultados abrem duas frentes de discussão. A primeira delas reforça as suposições que estes podem ser agentes zoonóticos. Em segundo lugar, os resultados dão pistas de que as ExPEC podem ter relevância em processos de infecções graves em cães, fato pouco relatado na literatura.

Palavras chaves: *Escherichia coli*, extra-intestinais, piometra.

ABSTRACT

SANTOS FILHO, João Carlos Barbosa. Survey of bacterial infection and antimicrobial susceptibility in dogs with pyometra, with special interest in the characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC). São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Paulista.

Pyometra is characterized by hormones changes and bacterial colonization into the uterus. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC), mainly that strains related to urinary tract infection (UTI), are frequently associated to this disease. The aim of this work was the survey of bacteria in the pus and urine of the bitches with pyometra, with especial interest in molecular characterization, serotyping and search of drugs susceptibility of the isolates. Pus and urine were collected aseptically from 32 bitches with pyometra during hysterectomy. Bacterial isolation and identification, as well as, antimicrobial susceptibility tests were performed according to standard methods. PCR was performed to access the prevalence of genes encoding ExPEC virulence factors. The following genes were searched: *pap*, *afal*, *sfa*, *fimH*, *iha*, *ibeA*, *cnf1*, *hlyA*, *iucD*, *fyuA*, *cvaC*, *traT* and Pathogenic Island I CFT073. *E. coli* was recovered from 26 (96%) out of 27 pus samples and 7 (100%) out of 7 urine samples with bacterial growth. All of the isolated were resistant to at least one antimicrobial drug, and the multiresistance was observed in 9 (25%) isolates. All 33 *E. coli* isolated showed positivity to some of the gene tested, being the most prevalent *fimH* (100%) and *fyuA* (94%). Two out of 14 genes tested were not found, *afa* (Afa adhesion) and *cvaC* (ColvC plasmid). The serogroups more prevalent were O25 and O6. There was strong serotype and virulence factors similarity between strains recovered from pus and urine of the same bitch, suggesting that may have arisen from the same pathogenic clone. The isolates recovered from bitches with pyometra presented similarity with strains recovered from different human syndromes. These results arise two lines of discussions. The first one strengthens the hypothesis that dog's ExPEC may be zoonotic agents and, the second one suggested that, this pathogen may have relevance in generalized infections in dogs.

Keywords: *Escherichia coli*, extraintestinal, pyometra.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. CICLO REPRODUTIVO DAS CADELAS.....	10
1.2. PIOMETRA.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO.....	13
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....;	24
4.1. ANIMAIS.....	24
4.2. COLHEITA DE MATERIAL.....	25
4.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	27
4.4. ANTIBIOGRAMA.....	28
4.5. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE <i>E. coli</i> ...	28
4.5.1. Sorotipagem das amostras de <i>E. coli</i>	28
4.5.2. Pesquisa da expressão da α -hemolisina (HlyA) e Enterohemolisina (Ehly) pelas amostras de <i>E. coli</i>	28
4.6. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE <i>E. coli</i> ...	29
4.6.1. Pesquisa de fatores de virulência de <i>E. coli</i> pela técnica da PCR-Monoplex.....	29
4.6.2. Pesquisa de fatores de virulência de <i>E. coli</i> pela técnica da PCR-Multiplex.....	30
4.6.3. Eletroforese em gel.....	30
5. RESULTADOS.....	33
5.1. ISOLAMENTO BACTERIANO.....	33
5.2. ANTIBIOGRAMA.....	37
5.3. SOROTIPAGEM.....	40
5.4. FATORES DE VIRULÊNCIA.....	41

6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Representação esquemática das alterações típicas nas concentrações séricas ou plasmáticas de alguns dos hormônios tidos como ocorrentes durante o ciclo ovariano canino, e sua relação temporal com os estágios e fases funcionais do ciclo estral.....11
- Figura 2: Útero infectado exposto durante a cirurgia para a realização de punção uterina para coleta do pus intra-lumina.....25
- Figura 3: Resultado do isolamento bacteriano obtido nas amostras de pus das 32 cadelas com piometra.....33
- Figura 4: Resultado do isolamento bacteriano obtido nas amostras de urina das 32 cadelas com piometra.....34
- Figura 5: Percentual de bactérias entre os 28 isolados de pus e oito isolados de urina de cadelas com piometra.....34
- Figura 6: Percentual de resistência das *E. coli* isoladas do pus e urina de cadelas com piometra.....40
- Figura 7. Resultado do teste de produção de hemolisina. (A) leitura com 3 horas e (B) leitura com 24 horas.....42
- Figura 8: Foto de eletroforese com produto da PCR de amostras de *E. coli* isoladas de pus e urina de cadela com piometra para o gene *aer*.....46
- Figura 9: Foto de eletroforese com produto da PCR de *E. coli* isolada de pus e urina de cadela com piometra para o gene *cnf1*.....46
- Figura 10: Foto de eletroforese com produto da PCR de amostras de *E. coli* isoladas de pus de cadelas com piometra para o gene *papEF*.....46
- Figura 11: Foto de eletroforese com produto da PCR de amostras de *E. coli* isoladas de pus e urina de cadelas com piometra para o gene *α -hly*..46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características e estado clínico das cadelas com diagnóstico de piometra utilizadas na pesquisa.....	26
Tabela 2: Interpretação da avaliação quantitativa das culturas bacterianas de urina.....	27
Tabela 3: Designação, fator de virulência, sorogrupo ou sorotipo e procedência das amostras utilizadas como padrão na técnica de PCR.....	31
Tabela 4: Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR realizadas com as amostras de <i>E. coli</i> isoladas de pus e urina de cadelas com piometra.....	32
Tabela 5: Tratamento antibiótico pré-cirúrgico e crescimento bacteriano em pus e urina das 32 cadelas com piometra estudadas.....	36
Tabela 6: Sensibilidade aos antimicrobianos dos gêneros bacterianos isolados das amostras de pus e urina de cadelas com piometra.....	39
Tabela 7: Resultados de sorotipagem, pesquisa de genes de virulência, expressão de hemolisina e sensibilidade à antimicrobianos, de amostras de <i>E. coli</i>	43
Tabela 8: Frequência dos genes associados à virulência nas <i>E. coli</i> isoladas de pus e urina de cadelas com piometra.....	45
Tabela 9: Associação de genes em amostras de pus e urina e seus respectivos sorogrupos.....	47
Tabela 10: Sorotipos fatores de virulência e perfil de resistência de amostras de pus e urina obtidas dos mesmos animais.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ciclo reprodutivo das cadelas

As fêmeas da espécie canina são consideradas monoéstricas, isto é, exibem um período de estro por ano (CHRISTIANSEN, 1984; HAFEZ, 1995). A apresentação cíclica da espécie ocorre entre 5 a 12 meses e seu ciclo reprodutivo compreende três fases distintas, pró-estro, estro, metaestro/diestro (às quais se segue um período de inatividade funcional ovariana – anestro), que proporcionam modificações no perfil hormonal, nas estruturas anatômicas, histológicas e comportamento da cadela (ETTINGER, 1992; NELSON & COUTO, 1992).

O pró-estro é caracterizado pela maturação folicular nos ovários, com conseqüente aumento dos níveis séricos de estradiol 17- β , que atingem altas concentrações no final do pró-estro, estimulando a liberação de LH (“Luteinizing Hormone”) (FELDMAN & NELSON, 1996). O pico de LH ocorre normalmente no primeiro dia do estro e a ovulação se inicia aproximadamente 48 horas após o pico de LH, com duração de 24 horas. Nesta fase, há dilatação da cérvix para que ocorra a cópula. Esta alteração anatômica facilita a entrada de microrganismos para o interior do útero, e é compensada pela ativação da resposta imune inata e adquirida da cadela (FELDMAN & NELSON, 1996).

No final do estro se inicia a luteinização e conseqüente aumento gradativo de progesterona, esta transição da fase folicular para luteal é denominada de metaestro (ETTINGER, 1992).

O diestro se caracteriza pela predominância de progesterona (40 ng/mL em média) e persiste até 40 dias após o pico de LH (CHRISTIANSEN, 1984). Sob a influência deste hormônio, as glândulas endometriais sofrem hiperplasia e hipertrofia. Estas alterações endometriais fisiológicas, induzidas pelas progestinas, desaparecem com o declínio das concentrações de progesterona, de modo que ao final da fase lútea não gestante na cadela, as glândulas endometriais ficam menos numerosas e as dimensões uterinas diminuem para as proporções do anestro (JOHNSON, 1994).

Uma resposta à progesterona que seja prolongada, exagerada, ou inadequada sob qualquer aspecto, resultará numa hiperplasia endometrial cística (HEC), com acúmulo de líquido no interior das glândulas endometriais e lúmen uterino (JOHNSON, 1994).

Este ambiente uterino se torna propício para a colonização bacteriana, que é facilitada pela diminuição da atividade leucocitária, causada pelos elevados níveis séricos de progesterona (JOHNSTON *et al.*, 2001).

A ocorrência de infecção uterina e, conseqüentemente, a presença de pus no interior do útero recebe a denominação de piometra.

A Figura 1 demonstra os padrões hormonais durante os ciclos ovarianos, que caracterizam os estágios reprodutivos nos quais ocorrem as mudanças histológicas, anatômicas e comportamentais da cadela.

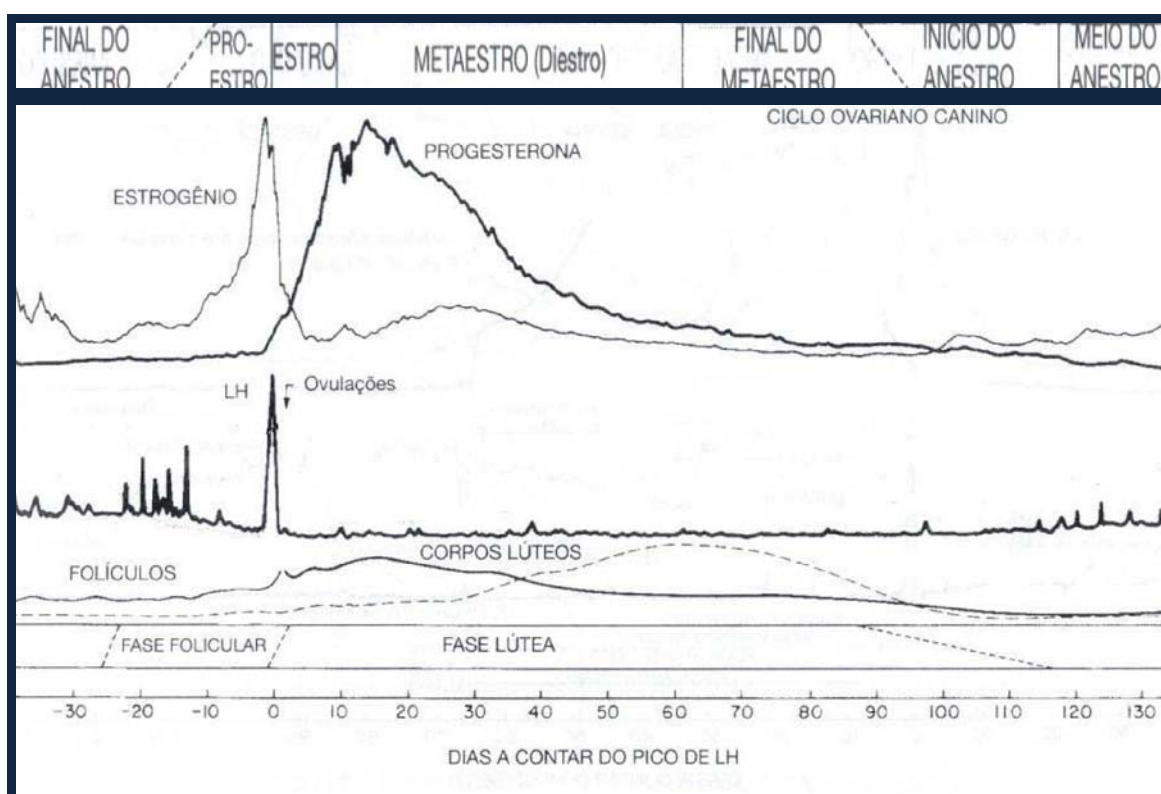


Figura 1. Representação esquemática das alterações típicas nas concentrações séricas ou plasmáticas de alguns dos hormônios durante o ciclo ovariano canino, e sua relação temporal com os estágios e fases funcionais do ciclo estral (Adaptado de CONCANNON, 1986).

1.2. Piometra

A piometra é uma desordem uterina que acomete, principalmente, cadelas na fase adulta, devido à estimulação progesterônica crônica e repetitiva a cada ciclo estral (JOHNSON, 1994; FELDMAN & NELSON, 1996). Em animais jovens, freqüentemente está associada ao uso de contraceptivos à base deste hormônio (FELDMAN & NELSON, 1996).

A incidência de piometra na cadela é alta, sendo reconhecida uma grande causa de morte desta espécie animal (ROBERTS, 1956; HAGMAN & KÜHN, 2002).

A doença é caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudatos. A patência da cérvix (aberta ou fechada) influencia na severidade da doença pois quando fechada possibilita o desenvolvimento de bacteremia e toxemia, podendo levar o animal ao óbito em poucos dias (FELDMAN & NELSON, 1996).

Os sinais clínicos da piometra variam desde uma secreção vulvar sangüínea a purulenta em processo de piometra aberta, até inapetência, depressão, letargia, distensão abdominal, poliúria, polidipsia e vômito que ocorrem na piometra de cérvix fechada (FELDMAN & NELSON, 1996; FRANSSON & RAGLE, 2003).

O diagnóstico baseia-se no histórico do paciente. A maioria das cadelas desenvolve a doença 4 a 10 semanas após o cio. Exames complementares podem revelar uma leucocitose e neutrofilia (FRANSSON *et al.*, 1997). A ultra-sonografia é o método de diagnóstico de eleição para a piometra, pois determina o tamanho do útero, a espessura da parede uterina e a presença de fluido intra-luminal (FELDMAN & NELSON, 1996).

O tratamento de escolha para a piometra é a ovário-salpingo-histerectomia, uma vez que a infecção circunscrita na cavidade abdominal leva rapidamente a uma septicemia, e apenas a retirada cirúrgica do útero pode reverter o quadro séptico. Os animais devem receber terapia de fluido intravenosos e antimicrobianos de amplo espectro antes da cirurgia. A antibioticoterapia deverá continuar por uma semana após a retirada do útero infectado (ROBERTS, 1956; CHRISTIANSEN, 1984).

Protocolos de tratamento medicamentosos a base de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) associado a antimicrobianos têm sido proposto por alguns autores (MEYERS-WALLEN *et al.*, 1986; GABOR *et al.*, 1999), entretanto, não são considerados eficazes, pelos riscos de uma ruptura uterina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agente etiológico

A infecção bacteriana, embora seja secundária às alterações hormonais, é determinante no processo infeccioso (NELSON & FELDMAN, 1986).

Bactérias presentes na vagina, trato urinário e intestino alcançam o útero através de migração ascendente, facilitada pela proximidade destes sítios anatômicos (NELSON & FELDMAN, 1986).

Além disso, estudos feitos comparando características dos microrganismos isolados de fezes e pus uterino de cadelas, reforçam a hipótese da migração fecal-uterina (JOHNSON *et al.*, 2001a; WADAS *et al.*, 1996; HANGMAN & KÜHN, 2002).

O microrganismo geralmente isolado nos processos de piometra é a *Escherichia coli* (ASHEIM, 1965; GRINDLAY *et al.*, 1973; SANDHOLM *et al.*, 1975; ALLEN, 1995; DHALIWAL *et al.*, 1998). A predominância de *E. coli* se deve à habilidade deste patógeno em aderir a sítios antigênicos específicos no endométrio estimulado por progesterona (NELSON & FELDMAN, 1986).

No gênero *Escherichia*, esta espécie é a de maior significância e compreende imensa variedade de grupos e tipos sorológicos (CAMPOS & TRABULSI, 2000).

A *E. coli* é comensal da microbiota do trato gastrointestinal (TGI) dos animais de sangue quente, colonizando o cólon já nas primeiras horas de vida e são provenientes da microbiota materna e de fontes ambientais (GYLES, 1993).

Os hospedeiros terão uma convivência de benefícios mútuos com a *E. coli*, na dependência do equilíbrio entre o estado imunológico destes e a capacidade de produção de fatores de virulência, podendo as *E. coli* ocasionarem infecções localizadas ou sistêmicas (GYLES, 1993; FALKOW, 1997).

A capacidade das *E. coli* de causar doenças foi “construída” durante o processo evolutivo da espécie, graças a ganhos genéticos que fizeram com que as *E. coli* se tornassem cada vez mais versáteis, com uma maior habilidade de adaptação à novos sítios anatômicos, e conseqüentemente, capacitada a ocasionar uma ampla variedade de doenças (KAPER *et al.*, 2004).

Os atributos de virulência desta espécie são específicos de cada patotipo de *E. coli* e possibilitam a ocorrência de diferentes síndromes clínicas em indivíduos saudáveis (KAPER *et al.*, 2004).

Entre as *E. coli* diarreio gênicas, seis patotipos já são bem caracterizados: *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC), que são subdivididos pela capacidade de produção de toxinas e interação com células eucarióticas (NATARO & KAPER, 1998).

Além das cepas responsáveis por doenças gastrointestinais, tem-se isolado *E. coli* de diversas infecções extra-intestinais em seres humanos e animais. Dentre as infecções extra-intestinais observadas no homem encontram-se infecções do trato urinário (ITUs), meningites, pneumonias, osteomielites, infecções intra abdominais e de tecidos moles (EISENTEIN & JONES, 1988; RUSSO & JOHNSON, 2000; JOHNSON & RUSSO, 2002a; JOHNSON & RUSSO 2002b; SMITH *et al.*, 2007), que são freqüentemente acompanhadas de bacteremia (GRANSDEN *et al.*, 1990). Em cães, esse grupo de patógenos, têm sido principalmente relacionado às ITUs e piometras (WADAS *et al.*, 1996; YURI *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2003; JOHNSON *et al.*, 2003).

Este grupo heterogêneo de desordens ocorridas no homem leva a uma morbidade coletiva, com queda de produtividade e elevados custos com a Saúde Pública. Entretanto, muitas vezes, estas infecções extra-intestinais causadas pelas *E. coli* não chamam a atenção de órgãos da Saúde Pública tanto quanto as *E. coli* patogênicas intestinais. Isto acontece, provavelmente, por se tratar de doenças que não ocorrem em forma de epidemias e não envolvem a contaminação de alimentos (JOHNSON & RUSSO, 2002a).

Com relação à Saúde Animal, essa situação é ainda mais crítica, uma vez que pouca importância se reserva para infecções extra-intestinais, além das ITUs e piometras.

Tradicionalmente, as *E. coli* associadas às infecções extra-intestinais têm sido estudadas de acordo com seus fatores de virulência e os sítios anatômicos acometidos (JOHNSON & RUSSO, 2002a). Desta maneira, estes clones patogênicos foram denominados de UPEC (“Uropathogenic *E. coli*”), MNEC (“Meningitis-associated *E. coli*”) e SEPEC (Septicemic *E. coli*) (WILFERT, 1978; MARTIN *et al.*, 1997).

Recentemente, através de estudos de comparação fenotípica e genotípica de *E. coli* isoladas de diferentes síndromes, sítios anatômicos e hospedeiros, observou-se uma similaridade entre estas (JOHNSON *et al.*, 2000a; JOHNSON *et al.*, 2001c).

Estas novas descobertas fizeram com que Russo e Johnson (2000) propusessem uma nova designação para esse grande grupo de *E. coli*, desta vez, com uma visão mais generalista. Desde então, essas *E. coli* têm sido denominadas de ExPEC (“Extra intestinal pathogenic *E. coli*”).

As infecções do trato urinário são as mais freqüentes entre as infecções extra-intestinais ocasionadas pelas ExPEC, tanto nos animais como no homem. Aproximadamente 15% dos cães desenvolvem esta afecção em alguma fase da vida, e os mais acometidos são os animais com menos de dois e mais de seis anos de idade (BARTGES, 2004; JOHNSON *et al.*, 2003).

Semelhante à infecção uterina, as ITUs também são usualmente causadas por bactérias constituintes da microflora intestinal ou trato urogenital baixo (BARSANTI, 1998). A pielonefrite é um dos exemplos mais comuns de infecção ascendente, já que o córtex renal é muito mais resistente à infecção do que a região medular, diminuindo as chances de infecção via hematógena (BARSANTI, 1998).

Para o desenvolvimento das infecções extra-intestinais pelas *E. coli*, um dos fatores importantes é o status do hospedeiro (JOHNSON & RUSSO, 2002a). Hospedeiros comprometidos com anormalidades anatômicas ou funcionais de sistemas de defesa se tornam mais suscetíveis à infecção por cepas de *E. coli* (JOHNSON & RUSSO, 2002a).

Certamente, o potencial virulento intrínseco das *E. coli* também tem um papel determinante no desencadeamento da doença (JOHNSON, 1991). As ExPEC exibem uma variedade de fatores de virulência (FVs) que lhes habilitam colonizar as superfícies das mucosas do hospedeiro, evadir os mecanismos de defesas, adquirir nutrientes essenciais para a sobrevivência, lesar ou invadir células do hospedeiro e estimular uma resposta inflamatória (JOHNSON, 1991).

Um desses pré-requisitos para a colonização e infecção é a adesão da bactéria à célula do hospedeiro, particularmente em um sistema de fluxo, como é o caso do peristaltismo intestinal, fluxo urinário contínuo e contrações uterinas (ARCHAMBAUD *et al.*, 1988).

As ExPEC possuem fatores de aderência específicos que lhes permitem colonizar diferentes sítios anatômicos (KAPER *et al.*, 2004). A aderência é um mecanismo de reconhecimento entre o microrganismo e as células do hospedeiro infectado (JOHNSON, 1991).

Estes fatores de adesão compreendem estruturas da superfície celular bacteriana de morfologia distinta, denominadas fímbrias ou pili. Fímbrias são estruturas filamentosas, de 5 a 10 nm de comprimento, distribuídas na superfície bacteriana. Alguns grupos de *E. coli* também produzem adesinas consideradas afimbriais, porém com as mesmas funções (KAPER *et al.*, 2004).

Além da ligação com receptores específicos das células do hospedeiro, algumas delas acionam sinais de transdução de sinais ou rearranjo do citoesqueleto e conseqüente morte celular (WRIGHT & HULTGREN, 2006).

A expressão de determinadas fímbrias é influenciada pelas condições de crescimento “in vitro” como o pH, osmolaridade do meio e temperatura do cultivo (GAASTRA & GRAAF, 1982).

Um dos testes realizados para caracterização fenotípica é o de hemaglutinação, que classifica a aglutinação bacteriana aos eritrócitos de animais e humanos. Quanto à hemaglutinação, as fímbrias de *E. coli* podem ser classificadas em três categorias: hemaglutinação manose resistente, são aquelas que não tem a aglutinação inibida pela D-manose; hemaglutinação manose sensíveis, são as fímbrias que tem a aglutinação com eritrócitos inibida pela D-manose; e as fímbrias não hemaglutinantes (JOHNSON, 1991).

As fímbrias manose sensíveis, também chamadas de fímbria do Tipo I, são comumente encontradas nas ExPEC de origem fecal e urinária de humanos e animais (JOHNSON, 1991; SCHILLING *et al.*, 2001). A aderência mediada pela fímbria do Tipo I é bloqueada por D-manose, entretanto, não tem influência da temperatura (SCHILLING *et al.*, 2001).

Esta fímbria manose específica, é composta por uma estrutura helicoidal formada por repetidas subunidades FimA, ligadas às proteínas FimG e FimF e uma adesina, FimH, codificada pelo gene *fimH* (SCHILLING *et al.*, 2001).

A importância da fímbria do Tipo I na patogenia das infecções do trato urinário já foi demonstrada (IWAHI *et al.*, 1983), contribuindo para a invasão das células epiteliais da bexiga, possibilitando a sua replicação com formação de uma grande coleção de bactérias intracelulares. Desta forma, a resistência das *E. coli* em rins e bexiga e nas infecções recorrentes, estaria associada à presença desta adesina.

A fímbria P é o principal grupo das hemaglutininas manose resistentes e está associada principalmente às infecções renais. Estas adesinas são expressas pelas

ExPEC em 80% dos casos de pielonefrite e em menos de 20% dos casos de bacteriúria assintomática (JOHNSON, 1991).

A fímbria P é um heteropolímero constituído de 10^3 subunidades helicoidais polimerizadas, com uma subunidade maior PapA constituindo o corpo da fímbria e três subunidades menores (PapE, PapF e PapG) que estão relacionadas à aderência. PapC e PapD são responsáveis, respectivamente pela polimerização e transporte das subunidades fimbriais. PapH é requerida para terminação e implantação da fímbria na superfície celular (LUND *et al.*, 1988).

Os glicofosfolípídeos são os principais receptores na célula hospedeira para as fímbrias P. A molécula PapG da adesina é quem confere especificidade de ligações para os epítomos receptores oligossacarídeos $\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta$, os quais são expressos em abundância na mucosa do trato urinário. Finalmente, Pap I e Pap B são as proteínas envolvidas na ativação transcripcional do operon (ORSKOV *et al.*, 1982).

A resposta do organismo hospedeiro para as *E. coli* fímbrias P^+ é controlado pelos domínios de TLR4, que necessitam de co-receptores como, CD14 e MD2. As *E. coli* comensais falham nessa ligação e em uma conseqüente ativação da resposta imune inata (SAMUELSSON *et al.*, 2004).

Outra fímbria freqüentemente encontrada nas *E. coli* causadoras de infecções extra-intestinais é a S-fímbria. A meningite neonatal é a síndrome na qual mais se observa e se associa esta fímbria (LE BOUGUENEC *et al.*, 1992).

A maioria dos casos de meningite neonatal se desenvolve pela via hematogênica, por meio das *E. coli* que atravessam a barreira hematoencefálica (KIM, 2001).

A S-fímbria é uma adesina que tem afinidade pelo terminal da seqüência NeuAca2,3-galactose, presentes nas glicoproteínas. A seqüência *sfa* está presente no cromossomo bacteriano e a proteína codificada por *sfa* é composta por quatro subunidades: uma subunidade maior SfaA, e três subunidades menores (SfaG, SfaS e SfaH) (HACKER *et al.*, 1993).

Acredita-se que as *E. coli sfa*⁺ possam aderir-se às células endoteliais de origem sistêmica, incluindo as de origem cerebral, uma vez que esta adesina é observada em processos de septicemia com grande freqüência (JOHNSON, 1991).

Outra adesina tem sido mais recentemente relacionada às ExPEC. Descrita primeiramente em *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, a Iha ("IrgA homologue

adhesin”), foi assim denominada devido a sua homologia com receptores sideróforos IrgA de outras bactérias Gram-negativas (TARR *et al.*, 2000).

Iha, uma OMP (“Outer Membrane Protein”) é a primeira proteína descrita em *E. coli* O157:H7 capaz de conferir fenótipo de aderência em *E. coli* (K12) (amostra padrão, não aderente) (LÉVEILLÉ *et al.*, 2006).

Johnson & Russo (2005) observaram que Iha tem uma seqüência idêntica à ORF “R4” (“Open reading frame”) de CFT073, amostra padrão de UPEC, tornando-se um marcador de virulência, encontrado freqüentemente em isolados de ITUs e bacteremia (KAO *et al.*, 1997). Além disso, observou-se que a presença de *iha* em algumas variedades de ExPEC, pode contribuir para virulência, aumentando a aderência destes microrganismos (KAO *et al.*, 1997).

A adesina afimbrial Afa codificada pelo “cluster” *afa*, é expressa por algumas *E. coli* diarreiogênicas e uropatogênicas. Embora sejam denominadas como afimbriais, parecem possuir uma fina estrutura fibrilar de difícil visualização (KELLER, *et al.*, 2002).

A citotoxicidade é também um mecanismo importante na uropatogenicidade das *Escherichia coli*, essencial na lesão de células e tecidos do hospedeiro.

O fator necrotizante citotóxico (CNF), uma toxina primeiramente detectada em *E. coli* isoladas de fezes de crianças com diarreia aguda, induz a formação de células multinucleadas em algumas linhagens celulares (Vero, HeLa, HEp-2), causa necrose em pata de coelho e morte em camundongos quando inoculada via intraperitoneal (RUSSO & JOHNSON, 2000; BOQUET, 2001).

São conhecidos dois tipos de CNF (CNF1 e CNF2). A atividade celular destas toxinas é direcionada para sua habilidade em modificar a constituição da proteína Rho, uma família de pequenas GTPases, que regulam a fisiologia do citoesqueleto celular (BOQUET, 2001).

O único gene estrutural que codifica CNF1 (*cnf1*) é localizado em uma ilha de patogenicidade (PAI) cromossomal, a qual tem sido associada a outros genes (*hly* e *pap*). O gene *cnf2* é localizado em um plasmídio de alto peso molecular (CAPRIOLI *et al.*, 1983).

CNF1 é geralmente produzido pelas ExPEC de humanos e animais com infecção do trato urinário (ITU), e é menos freqüente em isolados de fezes de crianças, animais saudáveis e com diarreia (YURI *et al.*, 1998b; BOQUET, 2001).

Outra importante toxina descrita em linhagens de ExPEC é a α -hemolisina. Esta toxina é um membro da família RTX (“Repeats-in-toxin”), a qual é tóxica para uma variedade de células, através da entrada na membrana plasmática e geração de poros transmembranáticos (MAY *et al.*, 2000).

Estudos recentes demonstraram que este fator de virulência pode diretamente induzir apoptose ou necrose em uma variedade de tipos celulares, incluindo neutrófilos (BHAKDI *et al.*, 1990).

Sendo uma das defesas do organismo hospedeiro a migração de neutrófilos para o órgão acometido, as ExPEC, que são patógenos extra-celulares, utilizam deste mecanismo para impedir a atividade microbiana dos neutrófilos (RUSSO *et al.*, 2005).

Outro mecanismo de defesa do organismo é a restrição ao íon ferro, necessário para o crescimento e metabolismo bacteriano. O ferro é essencial para toda célula viva, entretanto, encontra-se em pequena disponibilidade para as bactérias, uma vez que se apresenta ligado às proteínas do hospedeiro. A *E. coli* utiliza o ferro para o transporte de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos (SAYLERS & WHITT, 2002).

Para isso, as ExPEC possuem mecanismos envolvidos na aquisição de ferro denominados sideróforos, que favorecem o crescimento bacteriano em ambientes de baixa concentração do íon, como no soro e urina (JOHNSON, 1991).

Dois tipos de sideróforos foram descritos nas ExPEC. O sideróforo aerobactina codificado pelo gene *iucD* (“iron uptake chelate”) e yersiniabactina (JOHNSON *et al.*, 1988; SHUBERT *et al.*, 1998).

Linhagens de *Yersinia* spp. possuem ilhas de patogenicidade de aproximadamente 40 Kb, que carregam genes que codificam sistemas de “seqüestro” de ferro denominados yersiniabactina, requerido pela espécie para expressar virulência (SHUBERT *et al.*, 1998).

Uma característica particular desta ilha de patogenicidade é sua extensa distribuição entre a família das enterobactérias, incluindo as ExPEC causadoras de ITU, septicemia e meningites (JOHNSON & STELL, 2000; KOCZURA & KAZNOWISKI, 2003).

O sideróforo aerobactina, na forma hidroxamato, tem grande prevalência entre as enterobactérias, sendo os genes responsáveis pela sua síntese situados em plasmídios ou em cromossomos (BLANCO *et al.*, 1997).

Outros genes de virulência também têm sua localização em plasmídios. O plasmídio ColV é responsável pela expressão de colicina V, uma substância ativa contra diferentes membros da família Enterobacteriaceae (RILEY & GORDON, 1996).

Este plasmídio tem sido, contudo, associado a outros determinantes de virulência, incluindo sideróforos, adesinas e resistência ao soro. Entre estes se encontra uma lipoproteína de membrana (TraT), que confere resistência ao complemento e o sideróforo aerobactina (JOHNSON, 1991).

O complemento tem a habilidade de opsonizar e lisar uma grande variedade de espécies bacterianas. Essa propriedade do hospedeiro constitui um importante mecanismo de defesa contra infecções (ABBAS, 2005).

A proteína TraT, codificada pelo gene plasmidial *traT*, associado aos plasmídios R6-5 e ColV é uma OMP de peso molecular de 25,000 daltons e é um dos maiores genes do operon *tra* (BINNS *et al.*, 1982).

Agüero *et al.* (1984) demonstraram que a expressão do produto do gene *traT* resulta em restrição e alteração dos padrões de deposição de C3, interferindo principalmente na opsonização da bactéria.

Outro pré-requisito das ExPEC para causarem infecções é a invasão de células endoteliais. Na meningite bacteriana, a passagem da barreira hemato-encefálica é determinante na patogênese da doença (KIM, 2001).

Tem sido demonstrado que a eficiente penetração da *E. coli* através da barreira hemato-encefálica é mediada por múltiplos fatores. Um destes fatores é o gene *ibeA*, que codifica uma proteína de 50 KDa, cuja função continua ainda desconhecida (KIM, 2002).

Linhagens de MNEC quando deletadas para o gene *ibeA*, são menos eficientes na invasão de células do endotélio microvascular cerebral, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KIM, 2002).

Receptores para o produto de *ibeA* têm sido identificados na superfície de células vasculares cerebrais de humanos e animais. Desta forma, este gene poderia estar envolvido na invasão mediada por receptores das células do endotélio microvascular cerebral (PRASADARO *et al.*, 1999).

Vários dos fatores de virulência citados anteriormente são codificados por genes cromossômicos, muitos destes localizados dentro de ilhas de patogenicidade (PAI) (HACKER & KAPER, 2000). O conceito de PAI foi primeiramente descrito por Hacker e colaboradores na década de 1980.

As ilhas de patogenicidade são elementos genéticos móveis formados por grandes blocos de DNA (>30kb), freqüentemente localizadas adjacentes a genes de tRNA, contendo seqüências de inserção, integrases e transposases, com um conteúdo G+C diferente do genoma da bactéria hospedeira (SCHMIDT & HENSEL, 2004).

Em linhagens padrão de ExPEC, 536 (isolado de pielonefrite) e CFT073 (isolado de urosepsis) foi descrita a presença de várias PAIs (GUYER *et al.*, 1998; DOBRINDT *et al.*, 2002).

A classificação sorológica das *E. coli* foi realizada primeiramente por Kauffmann (1947), conforme os antígenos de superfície que apresentam. O antígeno capsular (K) refere-se aos polissacarídeos capsulares que envolvem a parede celular. O antígeno somático (O) é composto pelos lipopolissacarídeos presentes na membrana externa das bactérias Gram negativas, sendo o antígeno flagelar (H) estrutura de natureza protéica (ORSKOV & ORSKOV, 1992).

Para o estudo epidemiológico destes microrganismos são pesquisados os grupos O e H que geram inúmeros sorotipos (O:H) (ORSKOV & ORSKOV, 1992).

Diversos sorogrupos de *E. coli* relacionados aos genes de virulência descritos acima, têm sido isolados de infecções extra-intestinais no homem e nos cães. Dentre os sorogrupos mais encontrados estão O2, O4, O6, O11, O25, O75 e O102 (GRINDLAY *et al.*, 1973; ORSKOV *et al.*, 1982; JOHNSON *et al.*, 1994; YURI *et al.*, 1998b).

O uso indiscriminado e constante de antimicrobianos na Medicina Humana e Veterinária tem determinado o aumento da resistência bacteriana, interferindo no tratamento efetivo das infecções provocadas por estes agentes.

A resistência às drogas pode surgir a partir da seleção de bactérias que sofreram mutação ou daquelas que apresentaram uma recombinação genética (transformação, conjugação ou transcrição) (BRYAN, 1988; CHOPRA, 1989).

A resistência bacteriana às drogas é considerada um sério problema de Saúde Pública. Este mecanismo bacteriano pode ser transferido de diversas maneiras, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (BRYAN, 1988).

As bactérias podem manifestar resistência às drogas através de uma variedade de mecanismos. Algumas espécies são resistentes a todos os membros

de uma classe de antimicrobianos, muitas vezes devido à resistência adquirida por pressão seletiva do uso deste agente (CHOPRA, 1989).

Alguns destes mecanismos de resistência podem ser difundidos entre gêneros bacterianos, como no caso de organismos que adquirem genes codificadores de enzimas (β -lactamases) que destroem o agente bacteriano, ou genes que alteram a parede celular bacteriana, bloqueando o sítio ligante do agente (BRYAN, 1988).

Por razão da difusão de resistência bacteriana, muitos microrganismos têm se tornado multiresistentes, isto é, resistentes a mais de três antimicrobianos, causando uma séria preocupação, principalmente em hospitais e outras instituições de saúde (TENOVER, 2006).

Vários trabalhos de pesquisa relacionam a participação das ExPEC em processos de infecção do trato urinário em cães e humanos, além de infecções extra intestinais em humanos (EISENTEIN & JONES, 1988; RUSSO & JOHNSON, 2000; JOHNSON & RUSSO, 2002a; JOHNSON & RUSSO 2002b; SMITH *et al.*, 2007). Há, entretanto, poucos estudos epidemiológicos relacionando a presença deste patógeno em animais com piometra, e/ou a sua associação com infecções urinárias.

Chen *et al.* (2003) na Austrália e Coggan *et al.* (2004) no Brasil realizaram estudos parciais acerca da caracterização genotípica de amostras de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra.

Foi, portanto, o foco deste estudo a caracterização de amostras de *E. coli* isoladas concomitantemente de pus e urina de cadelas com piometra, atendidas em Serviço de Ginecologia de Hospital Veterinário. Neste trabalho de pesquisa, a caracterização genotípica empregada, seguiu os protocolos obtidos junto ao Dr. James R. Johnson (Medical Service, VA Medical Center, and Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota), para as amostras de ExPEC humanas.

3. OBJETIVO

Tendo em vista a importância das ExPEC como agentes causadores de ITU e piometra, o objetivo deste trabalho foi pesquisar bactérias em pus e urina de cadelas com piometra, com especial interesse na avaliação dos perfis de virulência das amostras de *E. coli*, correlacionando-os com os sorotipos e a resistência a agentes antimicrobianos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Um total de 32 cadelas com diagnóstico de piometra, escolhidas aleatoriamente, foram selecionadas para este estudo.

Os animais eram oriundos de regiões distintas da cidade de São Paulo e deram entrada no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (USP), no período de julho a dezembro de 2006. Durante a triagem verificou-se que 30 animais tiveram a idade relatada e encontravam-se entre 3 e 14 anos, sendo a média etária 7 anos. Com ralação às raças, 12 animais não apresentavam raça definida e os outros 20 animais estavam distribuídos em 12 raças diferentes, não havendo predominância de nenhuma delas (Tabela 1).

Após a detecção de sinais clínicos de infecção como: prostração, vômitos, inapetência, hipertermia ou hipotermia, associado ao histórico do paciente, todos eram encaminhados para o setor de obstetrícia com a suspeita de piometra.

Através da ultra-sonografia abdominal constatou-se aumento do volume uterino, com presença de conteúdo intra-luminal. Por se tratar de casos que exigiam cirurgia iminente, os pacientes eram encaminhados para o centro cirúrgico para a realização da ovário-salpingo-histerectomia.

Alguns cães, já haviam sido medicados com antimicrobianos no período pré-cirúrgico, sendo as drogas mais utilizadas, enrofloxacina, metronidazol, doxiciclina e a associação de enrofloxacina+metronidazol.

4.2. Colheita de material

Amostras de pus e urina foram colhidas de maneira asséptica através, respectivamente, de punção uterina e cistocentese. Para a colheita da urina utilizou-se uma seringa de 10 mL e uma agulha descartável de pequeno calibre (13X4,5), já para a punção uterina, uma seringa do mesmo volume foi utilizada, porém, com uma agulha de grosso calibre (40X16) para aspiração do material purulento (Figura 2).

Seguindo-se à colheita, o material foi mantido em caixa térmica resfriada, e semeado no prazo máximo de seis horas após a colheita.

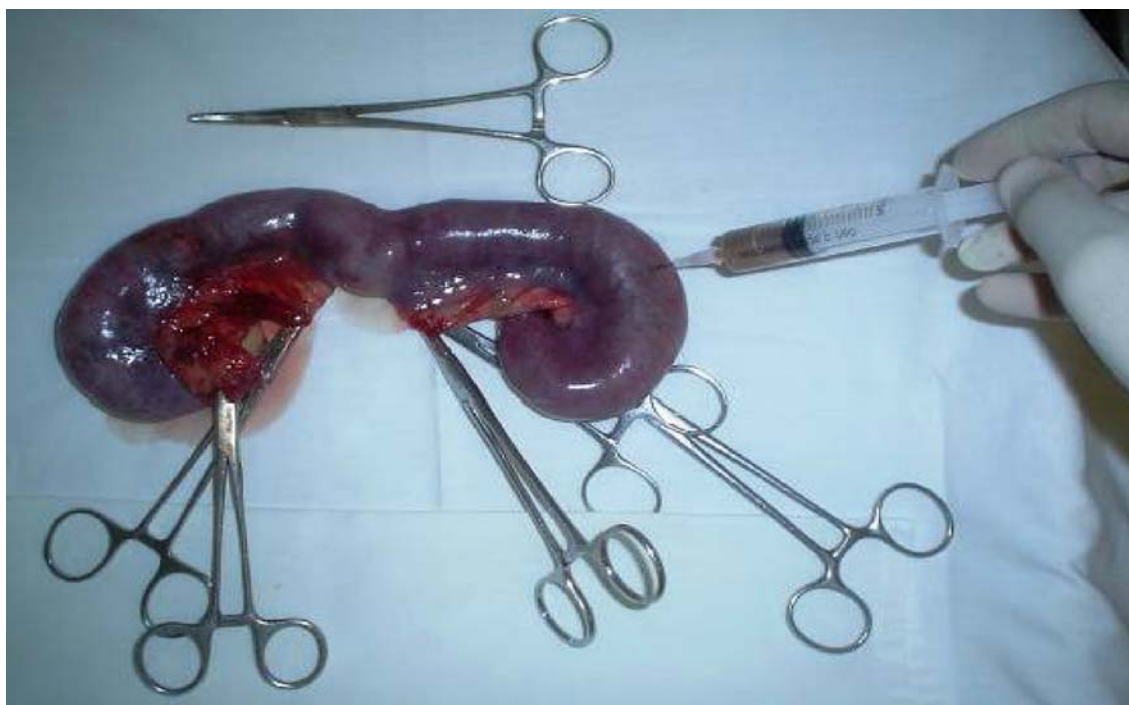


Figura 2. Útero infectado exposto durante a cirurgia para a realização de punção uterina para coleta do pus intra-lumina.

Tabela 1. Características e estado clínico das cadelas com diagnóstico de piometra utilizadas na pesquisa.

Nº Animal	Raça ^a	Idade ^b	Sinais clínico ^c
1	SRD	14a	Secreção vulvar, hipertermia, inapetência
2	Cocker	05a	Aumento de volume abdominal, vômito, febre
3	Yorkshire	05a	Aumento de volume abdominal, secreção vulvar, hipertermia
4	Cocker	04a	Secreção vulvar, hipertermia, inapetência
5	SRD	06a	Prostração, inapetência, secreção vulvar, hipertermia
6	Cocker	10a	Hipertermia, secreção vulvar, vômito
7	Pinscher	07a	Hipertermia, secreção vulvar, vômito
8	Boxer	05a	Secreção vulvar, hipertermia, inapetência, vômito
9	Husky	11a	Hipotermia, aumento de volume abdominal
10	Pitbull	04a	Hipertermia, secreção vulvar, vômito
11	SRD	NR	Prostração, inapetência, secreção vulvar
12	Rottweiler	04a	Hipertermia, poliúria, polidipsia
13	Teckel	06a	Secreção vulvar, hipertermia
14	Dog alemão	07a	Diarréia, vômito, hipertermia, secreção vulvar
15	SRD	08a	Aumento de volume abdominal, hipotermia, vômito
16	SRD	09a	Poliúria, polidipsia, hipertermia
17	Cocker	04a	Secreção vulvar, hipertermia, poliúria, polidipsia
18	Rottweiler	08a	Vômito, diarréia, prostração, inapetência
19	Poodle	09a	Hipotermia, aumento de volume abdominal
20	Poodle	06a	Secreção vulvar persistente
21	SRD	05a	Secreção vulvar, hipertermia, poliúria, polidipsia
22	SRD	NR	Diarréia, vômito, hipertermia, secreção vulvar
23	Maltês	03a	Secreção vulvar, hipertermia, inapetência
24	SRD	10a	Secreção vulvar persistente
25	SRD	12a	Secreção vulvar, hipertermia
26	SRD	10a	Aumento de volume abdominal, poliúria, polidipsia
27	Poodle	05a	Prostração, secreção vulvar, hipertermia
28	Boxer	13a	Vômito, inapetência
29	SRD	06a	Hipertermia, secreção vulvar
30	Labrador	08a	Hipertermia, secreção vulvar, vômito
31	Pitbull	07a	Letargia, diarréia, hipertermia, aumento de volume abdominal
32	SRD	08a	Vômito, diarréia, prostração, inapetência

^aSRD, sem raça definida.

^bIdade em anos de vida.

^cSinais clínicos baseados na anamnese feita com o proprietário e na avaliação física.

4.3. Isolamento e identificação bacteriana

A semeadura para a avaliação microbiológica qualitativa das amostras de pus e urina ocorreu em meio rico, caldo e ágar BHI (Difco™) e meio seletivo para enterobactérias, ágar MacConkey (Difco™), que foram incubados a 37°C, durante 24-48 horas. Os caldos com turvação foram repicados nos mesmos meios sólidos, utilizando-se os períodos e temperatura de incubação já referidos. A avaliação quantitativa, considerada padrão de referência para infecção do trato urinário (BARTGES, 2004; LULICH & OSBORNE, 2004), determinou o número de colônias bacterianas (unidades formadoras de colônias - UFC) por mililitro de urina. A quantificação bacteriana na urina foi feita em duas placas de ágar BHI (Difco™), através da semeadura e espalhamento com alça de Drigalski de 10µL e 100µL de urina, respectivamente. A interpretação dos resultados obtidos nas avaliações quantitativas foi realizada conforme o preconizado por Polzin (1994) (Tabela 2).

A identificação das amostras isoladas foi realizada de acordo com técnicas rotineiras de identificação bioquímica (KONEMAN *et al.*, 1997), incluindo os “kits” de identificação bioquímica EPM, MiLi, Citrato (Probac™) e kit para a identificação de *Enterococcus* spp. (Probac™).

As amostras de *E. coli* foram estocadas a -70°C em meio BHI acrescido de glicerol a 80% em uma proporção de (1:1).

TABELA 2: INTERPRETAÇÃO DA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS CULTURAS BACTERIANAS DE URINA DE CÃES E GATOS

Método de colheita de urina	Interpretação dos resultados obtidos na cultura (UFC/mL)*					
	Significante		Suspeito		Contaminante	
	Cães	Gatos	Cães	Gatos	Cães	Gatos
Cistocentese	≥1.000	≥1.000	100-1.000	100-1.000	≤100	≤100
Cateterização	≥10.000	≥1.000	1.000-10.000	100-1.000	≤1.000	≤100
Micção Voluntária	≥100.000	≥10.000	10.000-90.000	1.000-10.000	≤10.000	≤1.000
Compressão manual	≥100.000	≥10.000	10.000-90.000	1.000-10.000	≤10.000	≤1.000

*Unidades formadoras de colônia por mililitro de urina.

4.4. Antibiograma

A técnica de disco difusão adotada como metodologia de referência pelo NCCLS (1997) ("National Committee for Clinical Laboratory Standards"), foi utilizada para a determinação de sensibilidade e resistência das bactérias isoladas.

Foram selecionados antimicrobianos de diferentes classes, de acordo com a sua utilização na Medicina Veterinária e ação sobre os agentes microbianos. Os seguintes agentes antimicrobianos (Cefar™) e suas respectivas concentrações por disco (µg) foram utilizados: ampicilina (10), amoxiciclina (30), cefalexina (30), cefotaxima (30), cefoxitina (30), ceftiofur (30), ciprofloxacina (5), cloranfenicol (30), doxiciclina (30), enrofloxacin (5), estreptomicina (10), gentamicina (10), penicilina G (10), tetraciclina (30), trimetoprim-sulfadiazina (25) e nitrofurantoína (300).

4.5. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE *E. coli*

4.5.1. Sorotipagem das amostras de *E. coli*

Todas as amostras de *E. coli* isoladas de pus uterino e urina de cadelas com piometra, foram testadas para os antígenos somáticos (O) e flagelares (H) pela Profa. Dra. KINUE IRINO no Instituto Adolf Lutz (IAL), centro de referência para sorotipagem de *E. coli* no Brasil, sendo submetidas a testes de aglutinação utilizando-se os anti-soros O1 ao O181 e H1 ao H56.

4.5.2. Pesquisa da expressão de α -hemolisina (HlyA) e Enterohemolisina (Ehly) pelas amostras de *E. coli*

A pesquisa da expressão de HlyA e Ehly foi realizada conforme a técnica descrita por Beutin (1991). Após serem cultivadas em "Tryptic Soy Broth" - TSB (Difco™) por 18 horas a 37°C, 2µL do cultivo das amostras foram inoculados em placas de meio base para ágar sangue (Difco™), acrescido de CaCl₂ a 10mM e 5% de sangue desfibrinado de carneiro, lavado três vezes em tampão de salina-fosfato (PBS pH7,4). As placas foram incubadas por 3 horas a 37°C para a pesquisa de α -hemolisina e por 24 horas, sob a mesma temperatura, para a pesquisa de Ehly. A hemólise foi verificada pela presença de um halo claro hemolítico circundando as

colônias positivas. As amostras JJ079 e EDL933 foram utilizadas como padrão positivo e JJ055 como padrão negativo.

4.6. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE *E. coli*

4.6.1. Pesquisa de fatores de virulência de *E. coli* pela técnica de PCR-Monoplex

Foi realizada a técnica de PCR (“Polimerase Chain Reaction”) para pesquisa de diferentes genes que codificam fatores de virulência reconhecidos de ExPEC. Esta técnica descrita por Karis Muller na década de 80, baseia-se na amplificação exponencial de uma determinada região cromossômica, através da marcação feita por iniciadores específicos que reconhecem aquela seqüência de DNA. Em uma primeira fase do experimento, foram pesquisados genes associados à expressão de adesinas (*sfa*, *afa*, *papC*, *papEF* e *iha*); sideróforos (*iucD* e *fyuA*) e toxinas (*cnf1* e *hlyA*).

Foram preparadas reações de 50 µL contendo: 5µL de DNA molde lisado por fervura a 10 minutos; 1,5U de *Taq* DNA polimerase em 10X PCR Buffer; 1,5 mM de MgCl₂; 02mM (cada) de dATP, dGTP, dCTP e dTTP; 20pmol para os iniciadores de *iucD*, *afal*, *pap* e *sfa* e 30pmol para os iniciadores de *hlyA*, *cnf1*, *fyuA* e *iha*, e água mili-Q qsp (LE BOUGUENEC *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 1995; YAMAMOTO *et al.*, 1995; JOHNSON *et al.*, 2000b; JOHNSON & STELL, 2000).

A suspensão foi aquecida a 94°C, por 3 minutos, sendo então submetida a 30 ciclos térmicos nas seguintes condições: 94°C por 1 minuto para separação das fitas de DNA, 63°C a 30 segundos na fase de anelamento, 72°C para atividade da *Taq* DNA Polimerase (extensão) e um ciclo de extensão final de 7 minutos.

4.6.2. Pesquisa de fatores de virulência de *E. coli* pela técnica de PCR-Multiplex

Outros genes foram pesquisados em conjunto em reações de PCR Multiplex. Para isso foram feitos dois “pools” de genes, um primeiro para *malX* (marcador para PAI I_{CFT073}); adesina do Tipo I, (*fimH*) e a invasina, (*ibeA*). O segundo para o marcador do plasmídio ColvC, (*cvaC*) e a proteína de membrana externa, (TraT) (JOHNSON & STELL, 2000). Para realização da técnica, uma reação com volume final de 25µL contendo um “mix” de 4mM de MgCl₂; 0,8 mM de cada dNTPs; 1,25U de AmpliTaq Gold em 10X PCR Buffer (Roche); 0,6 µL de cada iniciador e água mili-Q qsp, foram adicionados à 2µL de DNA molde, lisado por fervura.

Para amplificação dos genes pesquisados esta suspensão foi submetida a uma ativação inicial a 95°C por 12 minutos, seguida por 25 ciclos a 94° C por 30 segundos na fase de desnaturação, 63°C por 30 segundos para anelamento das fitas, 68°C para extensão das novas fitas e 72°C durante 10 minutos para extensão final.

Na tabela 3 está a relação das amostras padrão utilizadas na técnica da PCR.

Na tabela 4 estão descritas as seqüências dos iniciadores, temperatura de anelamento, tamanho dos fragmentos e suas respectivas referências.

4.6.3. Eletroforese em gel

Após os ciclos de amplificação na PCR, uma alíquota de 5µL da amostra foi adicionada a 1µL de tampão de ressuspensão para uma corrida eletroforética a 100W por uma hora em gel de agarose a 2% (BIO BASIC INC.). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio, sendo realizada a leitura em transluminador UV.

Tabela 3. Designação, fator de virulência, sorogrupo ou sorotipo e procedência das amostras utilizadas como padrão na técnica de PCR.

Designação da Amostra	Fator de Virulência	Sorogrupo ou Sorotipo	Origem
K12c600	controle negativo	NF ¹	Silveira WD, Brasil
JJ055	controle negativo	NF ¹	Johnson JR, EUA isolado fecal humano de paciente saudável, derivado de K12
C7	<i>pap, sfa, cnf 1, hly</i>	O18: K1:H7	Yamamoto S, Japão isolado de cistite
C149	<i>afa 1, aer, hly</i>	O75:H5	Yamamoto S, Japão isolado de cistite
JJ079	<i>pap, sfa, fimH, hly, cnf1, fyuA, traT</i>	O4:K:H5	Johnson JR, EUA isolado de pielonefrite, Seattle, WA
BUTI 3-1-4	<i>sfa, hly, cnf1, fyuA, traT, ibeA</i> , PAI	O18ac:K1:H7	Johnson JR, EUA isolado de urosepsis, Seattle, WA
BUTI 1-7-6	<i>fimH, fyuA, cvaC, traT</i>	O9: K34:H-	Johnson JR, EUA isolado de urosepsis, Seattle, WA
BUT 1-5-1	<i>pap, sfa, iha, fimH, fyuA</i>	O2:K5:H1	Johnson JR, EUA isolado de urosepsis, Seattle, WA

Legenda: 1. NF – não fornecido

Tabela 4. Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR realizadas com as amostras de *E. coli* isoladas de piometra.

Genes	Comentários	Seqüência (5'- 3')	Temp. (°C)	Amplicon (pb)	Referência
(Adesinas)					
<i>papC</i> (f)	Pilus associado com pielonefrite Fímbria P	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	63	328	LE BOUGUENEC <i>et al.</i> , 1992
<i>papC</i> (r)		ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA			
<i>papE</i> (f)		GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	63	336	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1995
<i>papF</i> (r)		AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA			
<i>sfaD</i> (f)	Fímbria S	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC	63	410	LE BOUGUENEC <i>et al.</i> , 1992
<i>sfaE</i> (r)		CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA			
<i>afaB</i> (f)	Adesina afimbrial	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	63	750	LE BOUGUENEC <i>et al.</i> , 1992
<i>afaC</i> (r)		CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG			
<i>fimH</i> (f)	Fímbria do tipo 1	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	63	508	JOHNSON <i>et al.</i> , 2005
<i>fimH</i> (r)		GCAGTCACCTGCCCTCCGTA			
<i>iha</i> (f)	Adesina reguladora de ferro	CTG GCG GAG GCT CTG AGA TCA	63	827	JOHNSON <i>et al.</i> , 2005
<i>iha</i> (r)		TCC TTA AGC TCC CGC GGC TGA			
(Toxinas)					
<i>cnf1</i> (f)	Fator necrotizante citotóxico	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG	63	498	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1995
<i>cnf1</i> (r)		CATTTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT			
<i>hly</i> (f)	α-hemolisina	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	63	1177	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1995
<i>hly</i> (r)		ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA			
(Evasinas)					
<i>traT</i> (f)	Proteína de membrana	GGT GTG GTG CGA TGA GCA CAG	63	290	JOHNSON <i>et al.</i> , 2005
<i>traT</i> (r)		CAC GGT TCA GCC ATC CCT GAG			
<i>cvaC</i> (f)	Resistência antibiótica	CAC ACA CAA ACG GGA GCT GTT	63	680	JOHNSON <i>et al.</i> , 2005
<i>cvaC</i> (r)		CTT CCC GCA GCA TAG TTC CAT			
(Sideróforo)					
<i>iucD</i> (f)	Aerobactina	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	63	602	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1995
<i>iucD</i> (r)		AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG			
<i>fyuA</i> (f)	Yersiniabactina	TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA	63	880	JOHNSON <i>et al.</i> , 2005
<i>fyuA</i> (r)		CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA			
(Invasina)					
<i>ibeA</i> (f)	Invasão do endotélio cerebral	AGG CAG GTG TGC GCC GCG TAC	63	170	JOHNSON <i>et al.</i> , 2005
<i>ibeA</i> (r)		TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC			
(Ilha de patogenicidade)					
<i>malX</i> (f)	PAI I _{CFT073}	GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC	63	925	JOHNSON <i>et al.</i> , 2005
<i>malX</i> (r)		TCG CCA CCA ATC ACA GCC GAA			

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento bacteriano

Considerando as 32 cadelas pesquisadas, houve crescimento bacteriano em vinte e sete (84%) amostras de pus e sete (22%) amostras de urina (Figura 3 e 4).

Cinco (15,6%) animais não apresentaram crescimento bacteriano nas amostras de pus e urina. Em outros vinte (62,5%) indivíduos não se obteve isolamento bacteriano nas amostras de urina, embora bactérias tenham sido recuperadas de pus (Tabela 5).

Destas 27 amostras de pus com crescimento bacteriano, foram identificadas 25 (92,6%) culturas puras de *E. coli*, uma (3,7%) cultura pura de *Serratia liquefaciens* e uma (3,7%) cultura mista de *E. coli* e *Serratia liquefaciens* (Tabela 5).

Com relação à urina, todas as contagens bacterianas estiveram acima de 100.000UFC/mL de urina, caracterizando-se processo de infecção urinária.

Das sete amostras com crescimento positivo em urina, apenas uma (14%) apresentou cultura mista de *E. coli* e *Enterococcus faecalis*, tendo as demais culturas puras de *E. coli* (Tabela 5).

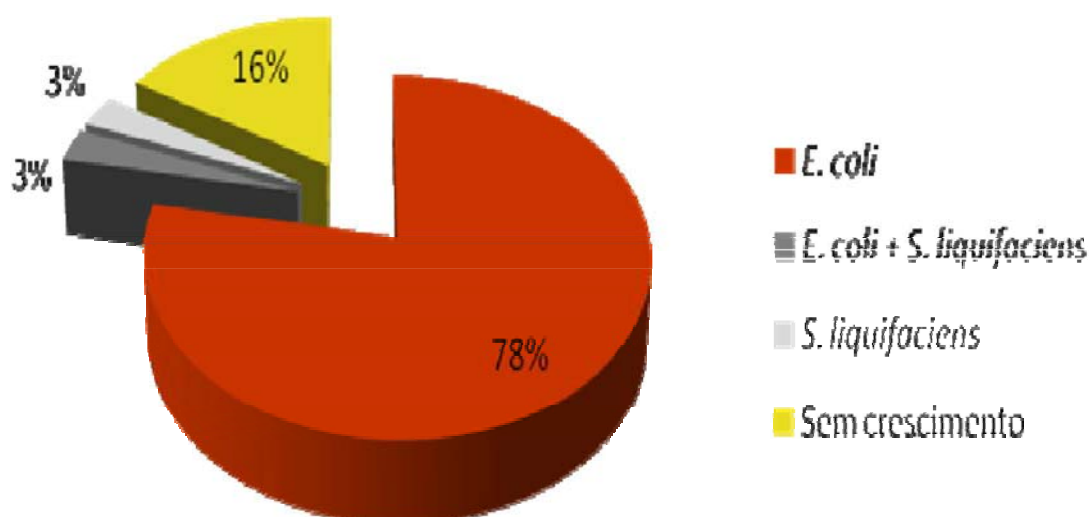


Figura 3. Resultado do isolamento bacteriano obtido nas amostras de pus das 32 cadelas com piometra.

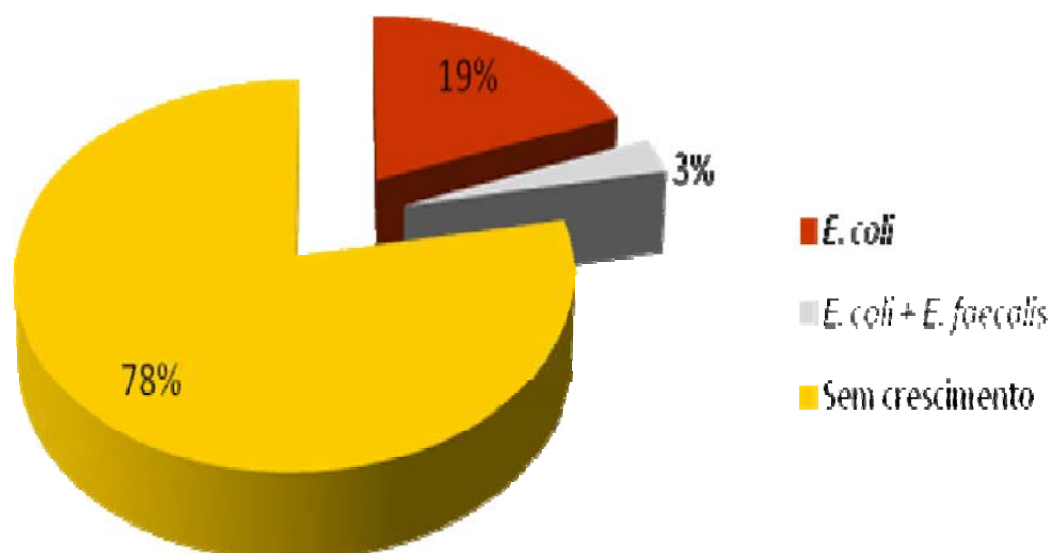


Figura 4. Resultado do isolamento bacteriano obtido nas amostras de urina das 32 cadelas com piometra.

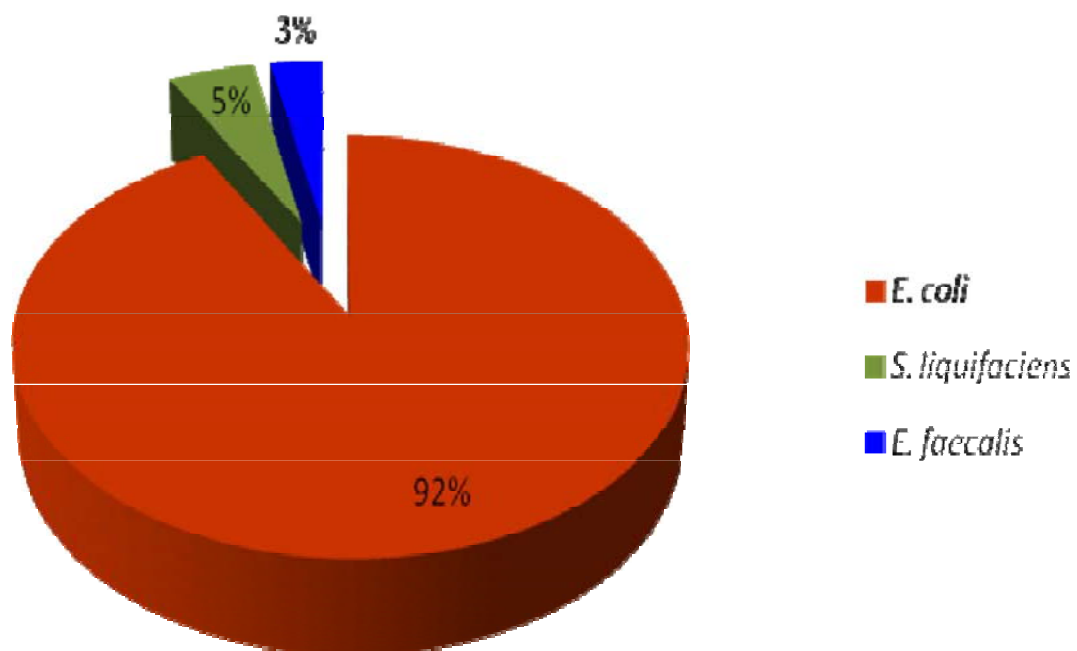


Figura 5. Percentual de bactérias entre os 28 isolados de pus e oito isolados de urina de cadelas com piometra.

Todos os animais que tiveram isolamento de *E. coli* na urina apresentaram, concomitantemente, culturas puras de *E. coli* no pus uterino (Tabela 5).

As *E. coli* predominaram entre os animais estudados com um total de 33 (92%) isolados (26 isolados de pus e 7 isolados de urina) (Tabela 5) (Figura 5).

As características bioquímicas predominantes nos 33 isolados *E. coli* provenientes de pus e urina foram: produção de gás (97%), motilidade (82%), produção de Indol (100%) e dextracarboxilação da Lisina (94%).

A maioria dos animais medicados com antimicrobianos dias antes da cirurgia apresentou isolamento bacteriano no pus, o mesmo não ocorrendo com relação à urina (Tabela 5).

Tabela 5. Tratamento antibiótico pré-cirúrgico e crescimento bacteriano em pus e urina das 32 cadelas com piometra estudadas.

No. Animal	Antimicrobiano Pré-cirúrgico		Crescimento Bacteriano	
	Princípio ativo	Tempo de administração	Pus	Urina
1	Enrofloxacin	6	<i>Serratia liquefaciens</i>	SC
2	Enrofloxacin	2	<i>E. coli</i>	SC
3	Enrofloxacin	NR	<i>E. coli</i>	<i>E.coli/ Enterococcus faecalis</i>
4	Enrofloxacin	5	SC	SC
5	Enrofloxacin	4	SC	SC
6	NR	NR	<i>E. coli</i>	SC
7	NR	NR	<i>E. coli</i>	<i>E.coli</i>
8	Enrofloxacin	1	<i>E. coli</i>	SC
9	NR	NR	SC	SC
10	Enrofloxacin	2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
11	Enrofloxacin	NR	<i>E. coli</i>	SC
12	Metronidazol	3	<i>E. coli</i>	SC
13	NR	NR	<i>E. coli</i>	SC
14	NR	NR	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
15	Metronidazol+ Enrofloxacin	NR	<i>E. coli</i>	SC
16	NR	NR	<i>E. coli</i>	SC
17	Enrofloxacin	3	<i>E. coli</i>	SC
18	NR	NR	SC	SC
19	Enrofloxacin	NR	SC	SC
20	Enrofloxacin	NR	<i>E. coli</i>	SC
21	Doxiciclina	2	<i>E. coli</i>	SC
22	NR	NR	<i>E. coli/ Serratia liquefaciens</i>	<i>E. coli</i>
23	Enrofloxacin	1	<i>E. coli</i>	SC
24	NR	NR	<i>E. coli</i>	SC
25	NR	NR	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
26	NR	NR	<i>E. coli</i>	SC
27	NR	NR	<i>E. coli</i>	SC
28	NR	NR	<i>E. coli</i>	SC
29	NR	NR	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
30	Enrofloxacin	2	<i>E. coli</i>	SC
31	Enrofloxacin	1	<i>E. coli</i>	SC
32	NR	NR	<i>E. coli</i>	SC

NR – não relatado; SC – sem crescimento.

5.2. Antibiograma

Foram estudadas 36 culturas bacterianas quanto à sensibilidade aos antimicrobianos. 100% dos isolados mostraram-se resistentes à penicilina.

A ampicilina e a tetraciclina também apresentaram um alto percentual de amostras resistentes com 64% e 58%, respectivamente. Excluindo-se as drogas trimetoprim+sulfadiazina e estreptomicina às quais, respectivamente, 36% e 33% das bactérias foram resistentes, o restante dos antimicrobianos demonstrou boa efetividade *in vitro*, entre eles, amoxiciclina (80,5%), cefalexina (97%), cefotaxima (100%), ceftiofur (100%), cefoxitina (86%), ciprofloxacina (100%), cloranfenicol (94%), doxiciclina (75%), enrofloxacina (94%), gentamicina (94%), e nitrofurantoína (92%) (Tabela 6).

A multiresistência foi observada em nove (25%) das trinta e seis amostras testadas, e proporcionalmente, foi semelhante com 26% de isolados multiresistentes obtidos da urina e 26% do pus.

Na tabela 6 estão representados os resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos de todas as bactérias isoladas.

Entre as 33 culturas de *E. coli*, as provenientes da urina apresentaram um perfil de resistência semelhante quando comparadas com as obtidas do pus (Figura 6). Como as outras bactérias isoladas neste estudo, 100% das *E. coli* foram resistentes à penicilina G, apresentando também alta resistência à ampicilina (64%), uma outra droga β -lactâmica. Entre as drogas que apresentaram diferenças no percentual de resistência entre as amostras isoladas de pus e urina, a trimetopim+sulfadiazina foi a que mais se destacou com 57% de isolados resistentes na urina e 31% no pus, seguidos pela estreptomicina com 35% de isolados no pus e 14% na urina, e a amoxiciclina que teve 11% e 28% de isolados resistentes de pus e urina, respectivamente (Figura 6).

Os antimicrobianos que alcançaram um melhor resultado *in vitro* entre as amostras de *E. coli* foram: cefalexina (100%), cefotaxima (100%), ceftiofur (100%), cefoxitina (97%), ciprofloxacina (100%), cloranfenicol (94%), enrofloxacina (94%), gentamicina (94%) e nitrofurantoína (97%) (Tabela 6).

Entre as tetraciclinas, as cepas de *E. coli* mostraram-se mais sensíveis à doxiciclina com 76%, para apenas 36% de amostras sensíveis à tetraciclina (Figura 6).

As duas cepas de *Serratia liquefaciens* obtidas do pus uterino apresentaram um perfil distinto de sensibilidade aos antimicrobianos. A cepa nº 22/2, isolada de cultura mista, associada a uma amostra de *E. coli* apresentou resistência apenas à penicilina G (Tabela 6). Já a cepa isolada de cultura pura de pus do animal número 1 foi resistente a seis das drogas testadas, entre elas, ampicilina, penicilina G, amoxiciclina, cefalexina, cefoxitina e nitrofurantoína (Tabela 6).

A única amostra de *Enterococcus faecalis* isolada de cultura mista da urina apresentou resistência à cefoxitina, trimetoprim-sulfadiazina e penicilina G (Tabela 6).

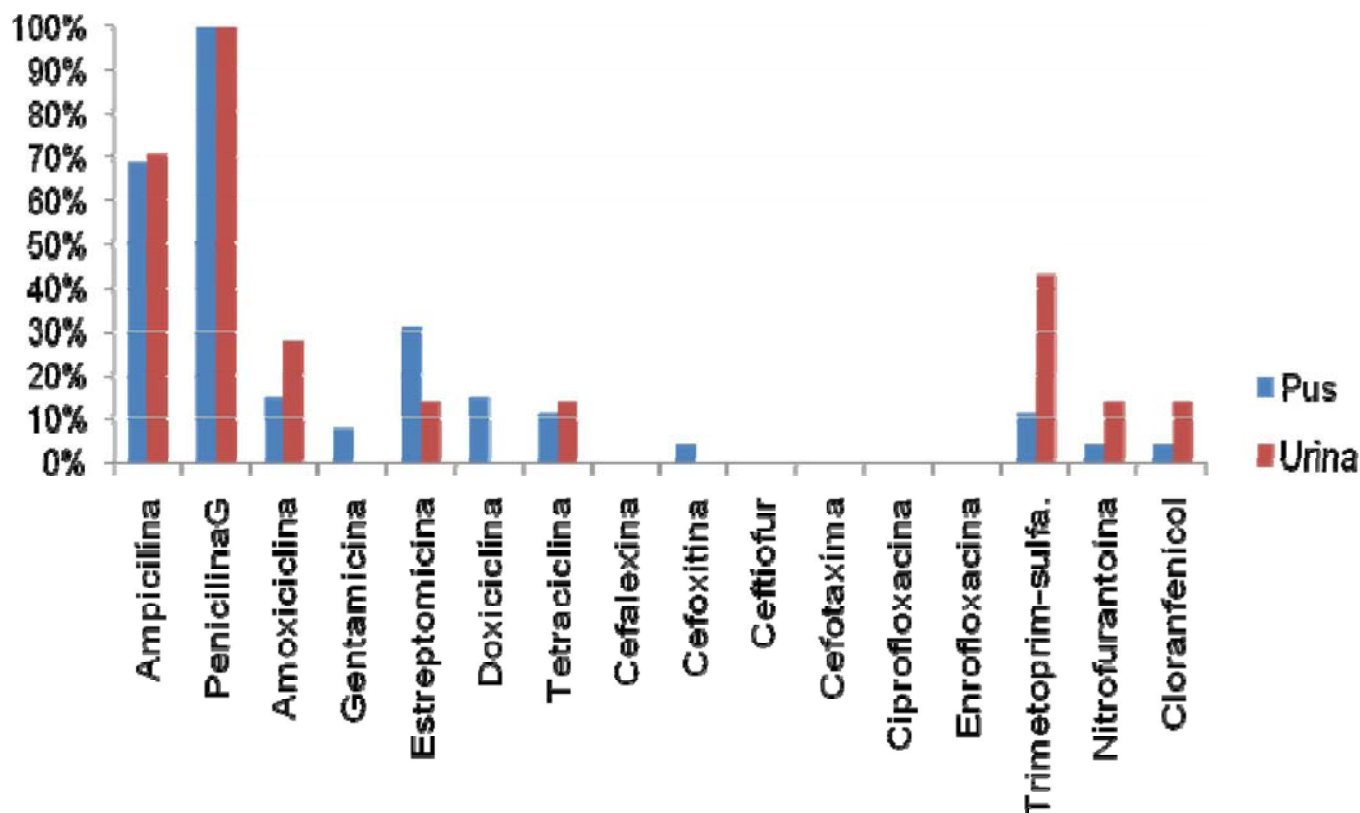


Figura 6. Percentual de resistência das *E. coli* isoladas do pus e urina de cadelas com piometra.

5.3. Sorotipagem

Os resultados da sorotipagem das *E. coli* revelaram heterogeneidade entre os isolados. Das 33 amostras de *E. coli*, 22 foram O-tipáveis e distribuídas em seis sorogrupos e nove sorotipos (Tabela 7).

O sorotipo mais prevalentes foi O25:H4 identificado em sete animais (32%), seguidos pelos sorotipos O6:H1 e O83:H31 isolados de quatro e três cadelas, respectivamente. Duas amostras foram sorotipadas como O6:H-, o restante dos sorotipos (O22:H5, O83:H27 e O91:H28) foi observado em um único animal (Tabela 7).

Com exceção do animal de número 14, todas as *E. coli* isoladas de pus e urina do mesmo animal, apresentaram o mesmo sorotipo (Tabela 10).

5.4. Fatores de virulência

Todas as 33 cepas de *E. coli* isoladas foram positivas para pelo menos um dos genes testados. Por outro lado, os genes *afal* e *cvaC* (marcador do plasmídeo ColV) não foram detectados em nenhuma das amostras (Tabela 8).

Entre as adesinas, a fímbria do Tipo I (*fimH*) foi a mais prevalente (100%), seguida da S-fímbria, presente em 71% dos isolados de urina e 54% dos de pus. Já, as seqüências de *papEF* e *papC*, estiveram presentes predominantemente em cepas isoladas de pus (27%), contra 14% em urina. A adesina Iha foi a menos prevalente e foi positiva em apenas quatro (15%) amostras isoladas do pus uterino e em uma (14%) da urina. Esta adesina, associada primariamente à PAI I de CFT073, esteve relacionada ao gene marcador desta ilha (*malX*) em três amostras (60%).

Outros genes associados a esta ilha de patogenicidade foram *cnf1* e *hlyA* ambos observados, respectivamente, em 6 (23%) isolados de pus e um (14%) de urina e relacionados em 75% das vezes à PAI pesquisada. Todas as amostras *hlyA*⁺ demonstraram atividade hemolítica no teste *in vitro* (Tabela 7) (Figura 7).

Dos sideróforos pesquisados, *fyuA* (94%) foi mais prevalente do que *iucD* (12%) (Tabela 8). O gene que codifica aerobactina (*iucD*) foi observado em percentual semelhantes nos isolados de urina (14%) e de pus (11%), mantendo uma correlação de 75% com a PAI I_{CFT073} (Tabela 7). Em apenas duas cepas, não foi detectado gene relacionado à sideróforo (nº24 e nº30) (Tabela 7).

As *E. coli* *ibeA*⁺ estiveram presentes em 100% dos isolados de urina, contra 58% das cepas isoladas de pus (Tabela 8), entretanto, em todos os animais que tiveram isolados de urina *ibeA*⁺, apresentaram também nos isolados de pus este gene (Tabela 7).

Com relação à evasina estudada (*traT*) foi observado uma proporção semelhante de positividade entre as amostras de pus (31%) e urina (29%) (Tabela 7).

A ilha de patogenicidade pesquisada, PAI I de CFT073, foi detectada em 19 (57%) do total, prevalecendo nas amostras de urina, com cinco (71%) amostras positivas (Tabela 8).

A associação de mais do que dois fatores de virulência ocorreu em 31 cepas, sendo 24 de pus e sete isolados de urina, chegando até a nove FVs em duas (8%) das 24 amostras de piometra e oito fatores de virulência em duas (28%) das

sete amostras de urina. A associação de *sfa/fimH/malX/fyuA/ibeA* foi a mais prevalente com nove isolados apresentando este perfil, sendo que seis foram encontrados em pus e três em urina (Tabela 9).

Sete animais tiveram o isolamento concomitante de *E. coli* no pus e na urina (Tabela 10). Com exceção dos isolados de um animal que apresentaram sorotipos distintos, as amostras obtidas de pus e urina dos mesmos animais foram classificadas em um mesmo sorotipo, apresentando fatores de virulência semelhantes ou idênticos, além de demonstrarem um padrão parecido de sensibilidade aos antimicrobianos testados (Tabela 10).

Nas figuras 7, 8, 9 e 10 são demonstradas fotos de corrida eletroforética com produtos de PCR realizado com amostras de *E. coli* isoladas de pus e urina de cadelas com piometra.

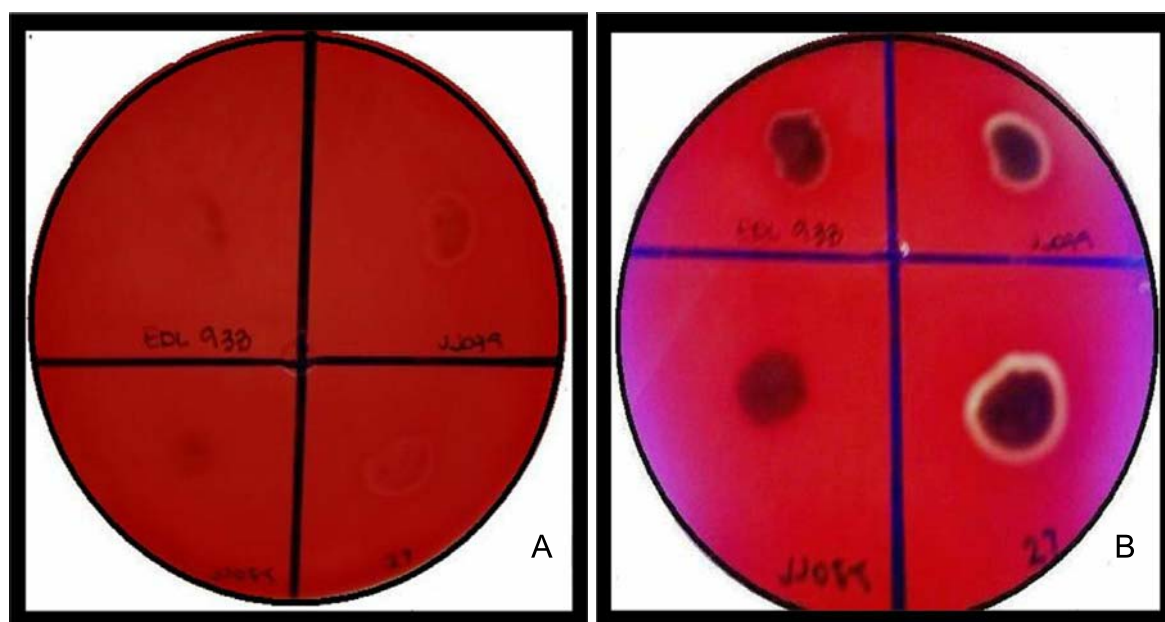


Figura 7. Resultado do teste de produção de hemolisina. (A) leitura com 3 horas e (B) leitura com 24 horas.

Tabela 7. Resultados de sorotipagem, pesquisa de genes de virulência, expressão hemolisina e sensibilidade à antimicrobianos, de amostras de *E. coli*

AMOSTRA*	ORIGEM	SOROTIPO	Genes de virulência **										Hemólise		Antibiograma ***																		
			<i>papC</i>	<i>papEF</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>fimH</i>	<i>lha</i>	<i>cnfI</i>	<i>hlyA</i>	<i>malX</i>	<i>cvaC</i>	<i>tyuA</i>	<i>iucD</i>	<i>trat</i>	<i>ibcA</i>	3 hs	24 hs	ampicilina	amoxicilina	cefalexina	cefotaxima	ceftiofur	ciprofloxacina	cloranfenicol	doxiciclina	enrofloxacina	estreptomicina	gentamicina	penicilina G	trimetoprim-sulfa.	tetraciclina	nitrofurantoina
2	Pus	ONT:H-	+		+							+						R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	-	
3/3	Pus	ONT:H6		+											+			R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	-	
3/1	Urina	ONT:H6			+									+				R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	
6	Pus	ONT:H-	+		+									+				R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
12	Pus	ONT:HNT		+														R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	S	
13	Pus	ONT:HNT	+	+			+						+	+				R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	
17	Pus	ONT:H5				+	+											R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
20	Pus	ONT:H18	+	+		+	+											R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	S	
22/1	Pus	ONT:H16				+	+							+	+			I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	
22/3	Urina	ONT:H16				+	+							+	+			I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	
24	Pus	ONT:H19				+	+											R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
7/3	Pus	O25:H4		+											+			R	R	I	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	
7/2	Urina	O25:H4		+			+								+	+		R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	
8	Pus	O25:H4					+								+	+		R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	
25/1	Pus	O25:H4					+								+	+		R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	
25/2	Urina	O25:H4		+			+								+	+		R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S

Tabela 8. Frequência dos genes associados à virulência nas *E. coli* isoladas de pus e urina de cadelas com piometra

Gene	Prevalência de genes em isolados de <i>E. coli</i>		
	Piometra (n=26)	Urina (n=7)	Total (n=33)
Adesinas	n°(%)	n°(%)	n°(%)
<i>Sfa</i>	14 (54%)	5 (71%)	19 (56%)
<i>fimH</i>	26 (100%)	7 (100%)	33 (100%)
<i>papC</i>	7 (27%)	1 (14%)	8 (24%)
<i>papEF</i>	7 (27%)	1 (14%)	8 (24%)
<i>lha</i>	4 (15%)	1 (14%)	5 (15%)
<i>afa</i>	0	0	0
Toxinas			
<i>cnf1</i>	6 (23%)	1 (14%)	7 (21%)
<i>hlyA</i>	6 (23%)	1 (14%)	7 (21%)
Sideróforos			
<i>fyuA</i>	24 (92%)	7 (100%)	31 (94%)
<i>iucD</i>	3 (11%)	1 (14%)	4 (12%)
Invasinas			
<i>ibeA</i>	15 (58%)	7 (100%)	22 (67%)
Evasinas			
<i>traT</i>	8 (31%)	2 (28%)	10 (30%)
<i>cvaC</i>	0	0	0
PAI I_{CF1073}			
<i>malX</i>	14 (54%)	5 (71%)	19 (57%)

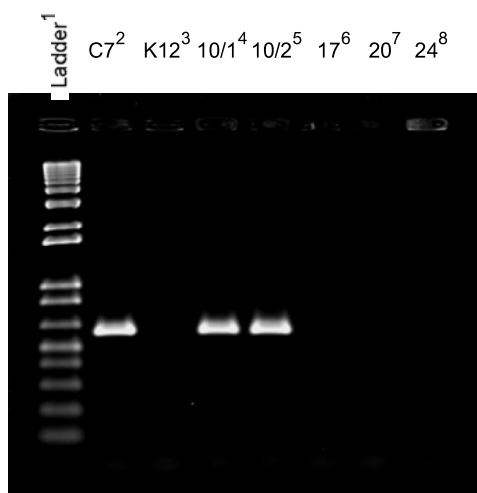


Figura 8. Foto de corrida eletroforética com produto de PCR de amostras de *E. coli* isoladas de pus e urina de cadela com piometra para o gene *aer*. Canaletas 1, 2 e 3 correspondem ao padrão de peso molecular de 1 kb plus, controles positivos e negativos para *aer*. Canaletas 4 e 5 correspondem a amostras positivas para *aer*. Canaletas 6, 7 e 8 correspondem a amostras negativas para este gene.

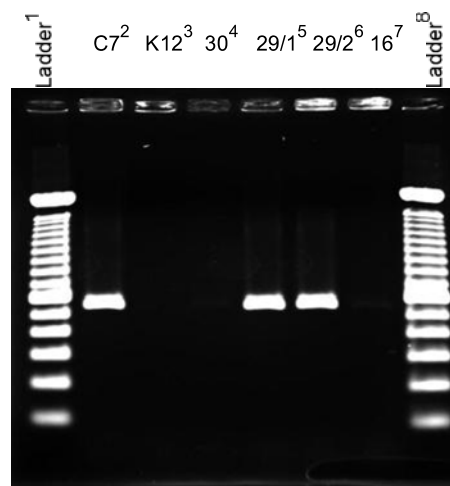


Figura 9. Foto de corrida eletroforética com produto PCR de *E. coli* isolada de pus e urina de cadela com piometra para o gene *cnf1*. Canaletas 1 e 8 correspondem ao padrão de peso molecular de 1Kb plus. Canaletas 2 e 3 correspondem aos controles positivos e negativos para *cnf1*. Canaletas 6, 7 e 8 correspondem a amostras positivas para *cnf1*. Canaleta 7 corresponde a amostra negativa para este gene

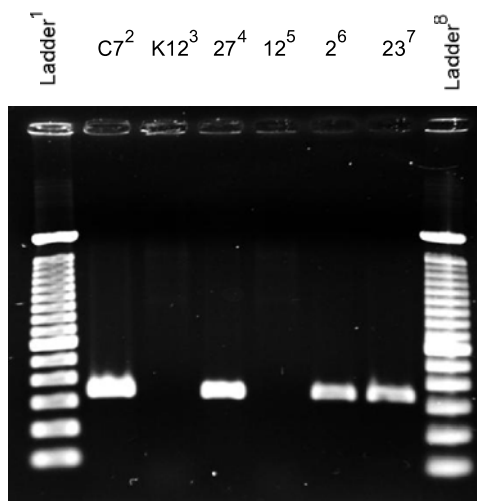


Figura 10. Foto de corrida eletroforética com produto de PCR de amostras de *E. coli* isoladas de pus de cadelas com piometra para o gene *papEF*. Canaletas 1 e 8 correspondem ao padrão de peso molecular de 1Kb plus. Canaletas 2 e 3 correspondem aos controles positivos e negativos para *papEF*. Canaletas 4, 6 e 7 correspondem a amostras positivas para *papEF*. Canaleta 5 corresponde a amostra negativa para este gene.

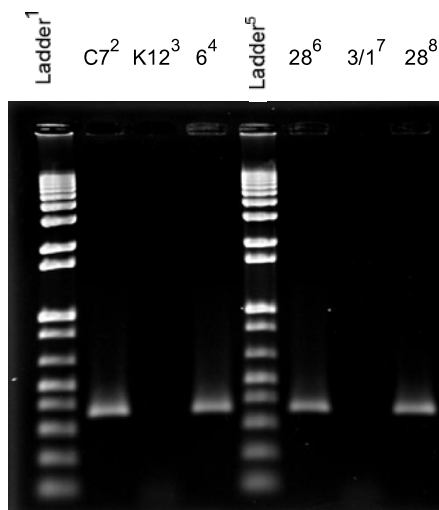


Figura 11. Foto de corrida eletroforética com produto de PCR de amostras de *E. coli* isoladas de pus e urina de cadelas com piometra para o gene α -*hly*. Canaletas 1 e 5 correspondem ao padrão de peso molecular de 1 Kb plus. Canaletas 2 e 3 correspondem aos controles positivos e negativos para α -*hly*. Canaletas 4, 6 e 8 correspondem a amostras positivas para α -*hly*. Canaleta 7 corresponde a amostra negativa para este gene

Tabela 9. Associação de genes em amostras de pus e urina e seus respectivos sorogrupos.

Nº DE ASSOCIAÇÕES	ORIGEM	Nº DE AMOSTRAS	GENÓTIPO	SOROGRUPO
1 gene	Pus	2	<i>fimH</i>	ONT, O91
2 genes	Pus	1	<i>fyuA fimH</i>	ONT
3 genes	Pus	1	<i>sfa fimH fyuA</i>	O6
	Pus	2	<i>fimH fyuA ibeA</i>	O83
4 genes	Urina	1	<i>fimH malX fyuA ibeA</i>	ONT
	Pus	2	<i>fimH fyuA traT ibeA</i>	ONT
	Urina	1	<i>fimH fyuA traT ibeA</i>	ONT, O83
	Pus	1	<i>fimH malX fyuA ibeA</i>	O22
	Pus	6	<i>sfa fimH malX fyuA ibeA</i>	ONT, O25, O83
5 genes	Urina	3	<i>sfa fimH malX fyuA ibeA</i>	O25
	Pus	1	<i>fimH malX fyuA traT ibeA</i>	O25
	Pus	1	<i>fimH iha malX fyuA traT</i>	O6
6 genes	Pus	2	<i>papC papEF fimH iha fyuA traT</i>	ONT
7 genes	Pus	1	<i>sfa fimH cnf1 hlyA malX fyuA ibeA</i>	O2
	Pus	1	<i>papC papEF sfa fimH cnf1 hlyA fyuA ibeA</i>	O2
	Urina	1	<i>papC papEF sfa fimH cnf1 hlyA fyuA ibeA</i>	O2
	Pus	1	<i>papC papEF sfa fimH cnf1 hlyA malX fyuA</i>	O6
	Pus	1	<i>papC papEF sfa fimH cnf1 hlyA fyuA iucD</i>	O6
	Urina	1	<i>sfa fimH iha malX fyuA iucD traT ibeA</i>	O6
	Pus	1	<i>sfa fimH iha malX fyuA iucD traT ibeA</i>	O6
8 genes	Pus	1	<i>papC papEF sfa fimH cnf1 hlyA malX fyuA iucD</i>	ONT
	Pus	1	<i>papC papEF sfa fimH cnf1 hlyA malX fyuA traT</i>	ONT
9 genes	Pus	1	<i>papC papEF sfa fimH cnf1 hlyA malX fyuA iucD</i>	ONT
	Pus	1	<i>papC papEF sfa fimH cnf1 hlyA malX fyuA traT</i>	ONT

Tabela 10. Sorotipos fatores de virulência e perfil de resistência de amostras de pus e urina obtidas dos mesmos animais.

Sorotipos	Amostra*	Origem	Genes													Antimicrobianos**								
			flmH	Stx	papC	papEF	ihA	cnfI	hlyA	trtA	ibeA	malX	fyuA	iucD	Amox.	Amp.	Cefalex.	Cloran.	Dox.	PenG.	Tet.	Trt+sul.	Nit.	Est.
ONT:H6	3/1	Urina	+																	R	R	R	R	
	3/3	Pus	+	+															R	R	R			
O25:H4	7/2	Urina	+	+															R	R				
	7/4	Pus	+	+															R	R				
O6:H1	10/2	Urina	+	+															R	R			R	
	10/1	Pus	+	+															R	R			R	
ONT:H16	22/3	Urina	+																R	R				
	22/1	Pus	+																R	R				
O25:H4	25/2	Urina	+	+															R	R	R	R	R	
	25/1	Pus	+	+															R	R	R		R	
O2:H6	29/2	Urina	+	+	+														R	R	R			
	29/1	Pus	+	+	+														R	R				
O25:H4	14/3	Urina	+	+															R	R				
O83:H31	14/1	Pus	+	+															R	R		R		

*Numerador comum significa mesmo animal.

**Antimicrobianos aos quais se demonstrou resistência.

Amox.-amoxicilina; Amp.-ampicilina; Cefalex.-cefalexina; Cloran.-cloranfenicol; Dox.-doxiciclina; PenG.-penicilinaG; Tet.-tetraciclina; Tri+sul.-trimetoprim+sulfadiazina; Nit.-nitrofurantoina; Est.-estreptomicina.

6. DISCUSSÃO

A fase do diestro é particularmente longa na espécie canina, esta etapa do ciclo estral é caracterizada por altos níveis séricos de progesterona, que levam o útero à alterações histológicas (ETTINGER, 1992). Este estímulo prolongado de progesterona, após vários ciclos no decorrer da vida do animal, pode levar a um processo denominado de hiperplasia endometrial cística (HEC) (FELDMAN & NELSON, 1996).

É por este motivo, que cadelas com mais de quatro anos apresentam uma maior suscetibilidade a esta alteração uterina, e o uso de contraceptivos à base de hormônios devem ser utilizados com precaução (FELDMAN & NELSON, 1996).

Estas alterações hormonais ocorridas nas cadelas durante o diestro favorecem a multiplicação bacteriana, uma vez que, entre outros fatores, diminuem a atividade leucocitária (HAWK *et al.*, 1960; SUGIURA *et al.*, 2004).

A piometra canina é uma das condições patológicas que mais acometem o trato genital das cadelas (ROBERTS, 1956).

A bactéria mais freqüentemente envolvida nestes processos é a *E. coli*. Tem sido demonstrado que cepas desta espécie, com atributos específicos de virulência, estão presentes nas fezes de cães (JOHNSON *et al.*, 2001a) existindo evidências da ascensão destas para o trato urinário (WADAS *et al.*, 1996) e útero (WADAS *et al.*, 1996; HANGMAN & KÜHN, 2002).

No presente estudo, 96% das amostras de pus com crescimento bacteriano apresentaram *E. coli*, corroborando a afirmação feita por diversos autores de que este microrganismo é o mais prevalente entre os isolados de piometra (SANDHOLM *et al.*, 1975; BORRESEN & NAESS, 1977; NOMURA, 1984; WADAS *et al.*, 1996; FRANSSON *et al.*, 1997; DHALIWAL *et al.*, 1998). Este percentual é superior, entretanto, ao observado em trabalho de pesquisa realizado no país, no qual os autores relatam 79% de amostras de *E. coli* entre os isolados de piometra (COGGAN *et al.*, 2004).

Em dois indivíduos foi isolada amostra de *Serratia liquefaciens*, uma em cultura pura e outra associada à *E. coli*. Esse gênero bacteriano tem sido

encontrado em percentuais baixos em ITU (CARVALHO, 2007 - comunicação pessoal*) e casos de piometra (TATENO & KITAGAWA, 1985), indicando uma importância menor como agente etiológico destas afecções.

A maioria dos isolados de pus dos animais tratados previamente com antibióticos apresentou crescimento bacteriano, o mesmo não ocorrendo com a urina. Este fato pode ser justificado pela dificuldade de se atingir níveis adequados da droga em infecções circunscritas intra-abdominais, como no caso da piometra e abscessos (SMITH, 2006).

A ausência de crescimento bacteriano em algumas amostras de pus, provavelmente se deva à inviabilidade da bactéria para o crescimento *in vitro*, causada pela ação das células do sistema imune do hospedeiro (BARSANTI, 1998). É pouco provável que os antimicrobianos empregados previamente tenham eliminado a infecção bacteriana, uma vez que os seus níveis de concentração uterina são insatisfatórios, devido a presença de coleção de pus (SMITH, 2006).

As *E. coli* isoladas de pus e urina tiveram um perfil de resistência semelhante para alguns antimicrobianos e distintos para outros. À semelhança de resultados obtidos por outros autores em humanos (LADHANI & GRANSDEN, 2003) e cães (HAGMAN & GREKO, 2005), observou-se níveis de resistência elevado às penicilinas. Com relação à benzilpenicilina (penicilinaG), estes resultados são esperados devido à resistência demonstrada pelas enterobactérias à esse princípio ativo (PRESCOTT & BAGGOT, 1993). No caso das aminopenicilinas (amoxiciclina e ampicilina) esse fenômeno pode ser explicado devido à ampla utilização destas drogas na rotina clínica (PRESCOTT & BAGGOT, 1993; HAGMAN & GREKO, 2005).

Os aminoglicosídeos, gentamicina e estreptomicina, mostraram maior percentual de amostras resistentes no pus do que na urina. Esses resultados diferem dos obtidos por Hagman & Greko (2005) em amostras de piometra e urina isoladas de animais hospitalizados, uma vez que as cepas obtidas de urina apresentaram maior resistência do que as de pus.

* CARVALHO, V. M. Comunicação pessoal. São Paulo, 2007.

Por outro lado, para os antibacterianos amoxiciclina, trimetoprim-sulfadiazina, nitrofurantoína e cloranfenicol, os isolados de urina apresentaram maiores percentuais de resistência. Cloranfenicol e trimetoprim-sulfadiazina são drogas freqüentemente utilizadas na clínica veterinária (BARSANTI, 1998), podendo pressionar a seleção de amostras resistentes. Já a nitrofurantoína, é a droga de primeira escolha, antes da obtenção dos resultados laboratoriais, para o tratamento de crianças com ITU (LADHANI & GRANSDEN, 2003).

Enterococcus faecalis, obtido de uma amostra de urina deste estudo, tem sido relacionada a casos complicados de ITU (HEILBERG & SCHOR, 2003). A presença desta bactéria é indicativo de que este animal, provavelmente, já sofria de infecção crônica ou recorrente.

Estudos referentes à epidemiologia molecular das *E. coli* isoladas de piometra, verificaram que esta afecção pode ter origem em infecções do trato urinário. Esta hipótese tem sido comprovada através da demonstração de homologia genética entre as cepas isoladas de pus e urina dos mesmos animais (WADAS *et al.*, 1996; HAGMAN & KÜHN, 2002). Os resultados obtidos na pesquisa em discussão, demonstraram que sete animais com piometra apresentaram, concomitantemente, amostras de *E. coli* em pus e urina.

Considerando-se a sorotipagem destas amostras, todas as cadelas, exceto uma, apresentaram cepas de mesmo sorotipo em urina e pus uterino. Por outro lado, neste animal em que as cepas de pus e urina apresentaram sorotipos distintos, o perfil de FVs foi idêntico e a sensibilidade aos antimicrobianos foi parecida, demonstrando tratar-se de cepas de origem diferentes, porém com genótipos iguais. Partindo-se da idéia de que as infecções uterinas se originam das infecções urinárias, poderia se considerar que este episódio de ITU seria um possível caso de reinfecção (BARSANTI, 1998). Os outros isolados de pus e urina, com sorotipos idênticos, apresentaram pequenas variações quanto à sensibilidade às drogas e presença de genes de virulência. Esse fato pode ser explicado pela possibilidade de aquisição ou perda de genes de virulência, notadamente aqueles presentes em plasmídios (JOHNSON & RUSSO, 2002a).

Quando se considera a patogenia das infecções por ExPEC, o primeiro passo para o estabelecimento da infecção é a adesão das bactérias às células

epiteliais do hospedeiro (BLANCO *et al.*, 1997). Neste trabalho, um número grande e variado de adesinas foi encontrado nas amostras de pus e urina.

A fímbria do Tipo I, associada principalmente à cistite, medeia a adesão ao epitélio da bexiga a partir de receptores manose-específicos (JOHNSON & RUSSO, 2002a). Existem evidências de que esta adesina atue também como uma invasina. Sua interação com receptores da membrana da célula hospedeira desencadearia vários sinais, entre eles o rearranjo do citoesqueleto da célula eucariótica, que culminaria com a internalização da bactéria (MARTINEZ *et al.*, 2000). A sequência *fimH*, responsável pela codificação da subunidade protéica que interage com os receptores do hospedeiro (MARTINEZ *et al.*, 2000) foi detectada em todas as amostras estudadas, dado semelhante ao obtido por Chen *et al.* (2003) em cadelas com piometra e por Johnson *et al.* (2003) em cepas isoladas de ITU nesta espécie animal. Além disso, esta fímbria também seria coadjuvante da resposta inflamatória, uma vez que estimula a produção de interleucina-6 e outros agentes pró-inflamatórios (SCHILLING *et al.*, 2001).

A S-fímbria, que segundo Le Bouguenec *et al.* (1992) é freqüentemente encontrada em amostras envolvidas em processos de septicemia, foi a segunda adesina mais prevalente nos isolados de piometra, com 56% de positividade. Essa fímbria comumente associada a processos de meningites e sepsis no homem (JOHNSON, 1991), foi detectada em percentuais semelhantes em cães com piometra por outros autores (CHEN *et al.*, 2003; COGGAN *et al.*, 2004), mas em menor proporção em cães com ITU em nosso meio (OSUGUI, 2007 – em fase de elaboração*). Sendo a septicemia uma das conseqüências da piometra (SMITH, 2006), poderia se considerar que a presença deste fator de virulência associado a outros que serão discutidos a seguir, poderia contribuir para os quadros de generalização da infecção.

Outra adesina descrita nas ExPEC é a P-fímbria codificada pelo operon *pap* e associada à grande parte das pielonefrites e bacteremias decorrentes de ITU em humanos (JOHNSON, 1991; YAMAMOTO *et al.*, 1995). Nos isolados de animais com ITU, genes para esta fímbria têm sido detectados em

* OSUGUI, L. Em fase de elaboração. São Paulo, 2007.

percentuais elevados (LOW *et al.*, 1988; YURI *et al.*, 1998a), bem como, em cepas obtidas de piometra (CHEN *et al.*, 2003; COGGAN *et al.*, 2004).

No presente trabalho de pesquisa, tanto *papC* quanto *papEF* mostraram-se presentes em maior proporção nas amostras de pus, quando comparadas com as amostras de urina.

Embora, neste estudo, os percentuais detectados no pus (27%) sejam inferiores aos observados pelos outros autores acima citados, um maior percentual nos isolados de pus quando comparado com os de urina, poderia ser indicativo de uma maior qualificação destas amostras para as infecções ascendentes.

Esta suposição é reforçada pelo estudo feito por Snyder e colaboradores (2005), que observaram que a expressão da fímbria do Tipo I é coordenada de maneira inversa pela expressão da P-fímbria, em um cenário onde a FimH seria importante para a colonização inicial do trato urinário, e a P-fímbria, com expressão mais tardia, para a ascendência e estabelecimento de infecção renal.

As adesinas não fimbriais (Afa) relacionada à cistite no homem (JOHNSON, 1991) têm baixa frequência em amostras de ITU em cães e gatos (YURI *et al.*, 1998b). A sequência relacionada a esta adesina não foi detectada na presente pesquisa, dados compatíveis aos observados por Chen *et al.* (2003) em cadelas com piometra.

Léveillé *et al.* (2006), observaram em modelos experimentais que o gene *iha*, presente em uma ilha de patogenicidade de amostra protótipo de UPEC (CFT073), poderia apresentar dupla função. Além de sua similaridade com sideróforos de outras bactérias Gram-negativas (TARR *et al.*, 2000), esta proteína de membrana externa, também teria a função de adesina. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que 15% dos isolados de pus e urina das cadelas com piometra apresentou esse gene, percentual superior ao verificado em animais com ITU (FREITAG *et al.*, 2005; OSUGUI, 2007 – em fase de elaboração), e inferior ao verificado em isolados humanos de urosepsis (JOHNSON *et al.*, 2000b).

O “fator citotóxico necrotizante 1” (“Cytotoxic Necrotizing Factor” – CNF-1), toxina produzida pelas ExPEC, era associada à uropatogênese apenas

devido aos achados epidemiológicos (CHEN *et al.*, 2003). Estudos feitos em culturas de neutrófilos humanos, contudo, indicaram que esta toxina pode influenciar na resposta imune do hospedeiro, uma vez que parece possibilitar a resistência bacteriana à morte por neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (RIPPERE-LAMPE *et al.*, 2001). No presente estudo, 23% das amostras isoladas de piometra foram positivas para a sequência *cnf1*. Esses resultados são inferiores aos obtidos por Chen *et al.* (2003) e superiores aos demonstrados por Coggan *et al.* (2004). Na urina dos mesmos animais, entretanto, o percentual de amostras *cnf1*⁺ foi menor (14%).

Considerando-se que a resposta imunológica do hospedeiro, nos casos de piometra consiste em migração em grande escala de PMN, e que estes apresentam sua atividade diminuída nestas circunstâncias, a presença de uma toxina que favoreça a sobrevivência bacteriana no interior destas células (RIPPERE-LAMPE *et al.*, 2001), é mais um atributo de virulência que facilitaria a infecção uterina.

Outra citotoxina descrita em amostras de ExPEC e que apresenta alta correlação com CNF1 é a α -hemolisina (HlyA). Esta, quando testada *in vivo* através da inoculação de *E. coli hly*⁺ na cavidade peritoneal de ratos, medeia efeitos citotóxicos em leucócitos e outros tipos celulares, potencializando também os efeitos endotóxicos (MAY *et al.*, 2000).

No estudo em discussão foram verificados os mesmos percentuais de amostras positivas para os dois genes (*cnf1* e *hlyA*), indicando, mais uma vez, a sua conhecida associação em ilhas de patogenicidade, como a PAI II de J96 (BLUM *et al.*, 1995).

O íon ferro é considerado elemento essencial no metabolismo bacteriano. Determinadas linhagens de *E. coli* possuem mecanismos de captação exógena deste íon, como a síntese de exoproteínas reconhecidas como sideróforos (SAYLERS & WHITT, 2002). A capacidade de *E. coli* de captar o ferro no organismo animal, ou mesmo adaptar-se à multiplicação em baixas concentrações do íon, é considerado importante mecanismo de virulência, principalmente em infecções extra-intestinais.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que a maioria (94%) dos isolados de *E. coli* apresentou pelo menos um sistema de “seqüestro” de ferro.

Esta característica pode contribuir para a alta patogenicidade e facilitar a colonização do organismo hospedeiro (SAYLERS & WHITT, 2002).

Enquanto os mecanismos de captação de ferro mediados pela aerobactina são extensamente estudados, o papel da yersiniabactina na virulência da *E. coli* ainda não é bem esclarecido (JOHNSON, 1991).

Recentemente, Schubert *et al.* (1998), utilizando o camundongo como modelo de infecção, demonstraram que yersiniabactina contribui para virulência das ExPEC que carecem de ambas, aerobactina e hemolisina. Além disso, a função destes sistemas sideróforos varia de acordo com os ambientes dentro do hospedeiro, ou com os diferentes estágios durante o curso da infecção (TORRES *et al.*, 2001).

O gene *fyuA* (“ferric yersiniabactin uptake”) foi o sideróforo mais prevalente, tanto nas amostras de pus quanto de urina. Resultados semelhantes têm sido demonstrados por Johnson & Stell (2000) em isolados de ExPEC obtidos de pacientes humanos. Em quatro amostras, este gene esteve associado ao *iucD* (aerobactina) e, em duas, nenhum sideróforo foi detectado indicando, provavelmente, que linhagens caninas possam utilizar-se de outros sistemas de seqüestro de ferro, embora a yersiniabactina pareça ter maior importância.

Um importante marcador de patogenicidade das amostras de ExPEC, especialmente das que ocasionam meningite, é a presença do gene *ibeA* (“Invasion of brain endothelial cells”) (KIM, 2001). Este marcador de patogenicidade não foi estudado até o momento em amostras de piometra, entretanto, em amostras de ITU humanas, tem sido relatado em frequências que variam de 13% em isolados de cistite a 29% nos de pielonefrite (JOHNSON *et al.*, 2005). No estudo em discussão, observou-se uma superioridade de isolados positivos na urina em relação aos resultados citados acima, com 100% das amostras de origem urinária positivas para o gene *ibeA*, e 58% das de pus. Todos os isolados do sorogrupo O83 apresentaram este gene, fato semelhante ao observado por Johnson e colaboradores (2001a), quando compararam cepas de fluido cerebrospinal de crianças com meningite com as de fezes caninas.

Esses achados indicam que amostras relacionadas a infecções extra-intestinais apresentam diferenças em seu potencial patogênico, já que as *E. coli* *ibeA*⁺ são capazes de invadir células do endotélio microvascular sangüíneo, desencadeando processos de bacteremia e meningites (KIM, 2001). Esses resultados são também indicativos de que as amostras de piometra apresentam um potencial de virulência que possibilitaria a invasão de outros sistemas. Tais observações sustentam a nova denominação dada por Russo & Johnson (2000), que vincularam todas *E. coli* capazes de causar doenças extra-intestinais a um único grupo denominado ExPEC.

Para estabelecer as infecções extra-intestinais no hospedeiro, as *E. coli* necessitam ainda de mecanismos de evasão do sistema imune. O plasmídio ColV (*cvaC*), presente em algumas cepas, além de carrear genes que codificam colicinas (FERNANDEZ-BEROS *et al.*, 1990), podem codificar uma lipoproteína de superfície (*traT*), que inibe a fagocitose da bactéria por células do sistema imune, aumentando a sua sobrevivência ao soro (PRAMOONJAGO *et al.*, 1992).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que nenhuma amostra apresentou *cvaC*, embora 28% dos isolados de pus e urina tenham apresentado o gene *traT*. Estes resultados são inferiores aos encontrados em isolados de ITU em humanos, onde Johnson *et al.* (2005) observaram em pielonefrite, 65% dos isolados *traT*⁺, e em 17%, a presença do plasmídio ColV (*cvaC*). A falta de correlação entre os genes *traT* e *cvaC*, também foi verificada pelo estudo acima citado, e pode ser justificada pelo fato de outros plasmídios terem a possibilidade de carrear o gene *traT*, como já citado anteriormente por Johnson (1991).

Os plasmídios, junto com outros elementos genéticos móveis, têm a capacidade de transferir genes associados à virulência entre linhagens patogênicas (JOHNSON *et al.*, 2003). Um dos elementos pesquisados no presente estudo foi a ilha de patogenicidade da amostra padrão de UPEC CFT073 (PAI I_{CFT073}). Estas largas regiões de aproximadamente 30Kb, com conteúdo G+C diferente do DNA restante da bactéria hospedeira, são os principais responsáveis pelo conceito de clones virulentos. Os resultados demonstrados nos isolados de urina (71%) foram inferiores aos constatados

por Johnson *et al.* (2005) em amostras de pielonefrite (82%) e, superiores aos de cepas oriundas de cistite (61%). Já para os isolados do pus intra-uterino, não se tem referências quanto à presença desta ilha de patogenicidade, entretanto, verificou-se que 54% dos isolados de pus foram PAI_{CFT073}⁺. Em 57% das vezes esta ilha esteve correlacionada com linhagens com potencial toxigênicos, o que facilitaria a transmissão conjunta de genes associados à virulência.

A presença de isolados de pus e urina com associação de genes é consistente com estudos realizados em amostras humanas de ITU (BLANCO *et al.*, 1997), de fezes (JOHNSON *et al.*, 2001a), e amostras animais de urina (JOHNSON, 1991) e pus uterino (CHEN *et al.*, 2003).

Características moleculares semelhantes em sorotipos isolados de diferentes síndromes clínicas já foram observadas por outros autores (JOHNSON *et al.*, 2001a; JOHNSON *et al.*, 2005). Esta similaridade foi demonstrada também entre amostras humanas e animais (YURI *et al.*, 1998b; JOHNSON *et al.*, 2001b).

A sorotipagem dos isolados de pus e urina deste trabalho, bem como, o seu perfil de virulência, revelou semelhança com as ExPEC isoladas em infecções extra-intestinais humanas. Tal fato corrobora a afirmação feita por outros autores de que, clones patogênicos podem se constituir em agentes zoonóticos (JOHNSON *et al.*, 2001a; JOHNSON & CLABOTS, 2006). Segundo Johnson & Russo (2005) esses clones seriam originários de uma linhagem evolucionária, que se adaptou a determinados sítios anatômicos, onde a presença de certos genes poderia ser necessária para algumas cepas e dispensável para outra.

Os resultados obtidos nesta investigação apontam que as ExPEC isoladas de processos de piometra, apresentam atributos de virulência que possibilitam infecções de grande gravidade. Embora as bacteremias tenham sido listadas como complicações decorrentes de piometra, ocorrem com menor frequência em Medicina Veterinária, o diagnóstico e acompanhamento de doenças mais graves, como septicemias e meningites.

Os resultados referentes a este grupo de patógenos em Medicina Veterinária estão apenas se iniciando e uma melhor compreensão da

participação das ExPEC em doenças extra-intestinais nos cães, representará importante salto para a Saúde Animal.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Houve predominância de isolamento de *Escherichia coli* entre as bactérias recuperadas de pus e urina dos animais com piometra,

sendo que a maioria dos isolados apresentou pelo menos um fator ligado à virulência.

- ✓ Os sorogrupos mais prevalentes, O25, O6, O83 e O2, foram aqueles associados às infecções urinárias de cães e gatos, bem como, às infecções extra-intestinais no homem.
- ✓ Gene relacionado à fímbria do Tipo I e o sideróforo, yersiniabactina, foram os mais prevalentes fatores de virulência encontrados.
- ✓ Todas as amostras positivas para o gene *hlyA*, também expressaram a toxina no teste fenotípico.
- ✓ Dois dos genes (*cvaC* e *afa*) selecionados como marcadores de virulência neste trabalho, não foram observados em nenhuma das amostras estudadas.
- ✓ Foi observado alto percentual de amostras resistentes para as penicilinas e uma ótima eficácia *in vitro* das fluorquinolonas e cefalosporinas.
- ✓ Com exceção de uma cadela, os isolados de urina e pus de um mesmo animal, apresentaram sorotipo, perfil de virulência e sensibilidade aos antimicrobianos similares, indicando uma possível origem clonal de ambas as amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. **Imunologia celular e molecular**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AGÜERO, M. E.; ARON, L.; DELUCA, A. G.; TIMMIS, K. N.; CABELLO, F. C. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. **Infect. Immun.**, v. 83, p.740-746, 1984.

ALLEN, W. E. **Fertilidade e obstetrícia no cão**. 1 Ed. São Paulo: Varela, Cap.3, 1995. 197p.

ARCHAMBAUD, M.; COURCOUX, P.; LABIGNE-ROUSSEL, A. Detection by molecular hybridization of Pap, Afa, and Sfa adherence systems in *Escherichia coli* strains associated with urinary and enteral infections. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, v.139, p.575-588, 1988.

ASHEIM, A. Pathogenesis of renal damage and polydipsia in dogs with pyometra. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.147, p.736-745, 1965.

BARSANTI, J. A. Genitourinary infections. In: Greene C. E., editor. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd Ed. Philadelphia:WB Saunders; 1998, p.626-646.

BARTGES, J. W. Diagnosis of urinary tract infections. **Vet. Clin. Small. Anim.**, v.34, p.923-933, 2004.

BEUTIN, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.80, p.167-182, 1991.

BINNS, M. M.; MAYDEN, T. J.; LEVINE, R. P. Further Characterization of Complement Resistance Conferred on *Escherichia coli* by the Plasmid Genes *traT* of R100 and *iss* of ColV,I-K94. **Infect. Immun.**, v. 35, p.654-659, 1982.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; ALONSO, M. P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUÑOZ, F.; JUÁREZ, A. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Res. Microbiol.**, v.148, p.745-755, 1997.

BHAKDI, S.; MUHLY, M.; KOROM, S.; SCHMIDT, G. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. **J. Clin. Investig.**, v. 85, p.1746–1753, 1990.

BLUM, G.; FALBO, V.; CAPRIOLI, A.; HACKER, J. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and α -hemolysin from the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.126, p.189-196, 1995.

BOQUET, P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. **Toxicon.**, v.39, p.1673-1680, 2001.

BORRESEN, B.; NAEISS, B. Microbial, immunological and toxicological aspects of canine pyometra. **Acta Vet. Scand.**, v.18, p.569-571, 1977.

BRYAN, L. E. General mechanisms of resistance to antibiotics. **J. Antimicrobiol. Chemother.**, v.22, p.1-15, 1988.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3 Ed., São Paulo: Atheneu, 2000, p. 215-228

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

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

CHOPRA, I. Mechanism of resistance to antibiotics and other chemotherapeutic agents. **J. Appli. Bacteriol.**, v.65, p.149-166, 1989.

CHRISTIANSEN, I. J. **Reproduction in the dog & cat**. São Paulo: Bailliere Trindall. Cap.7, 1984, p.154-170.

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

CONCANNON, P. W. Canine pregnancy and parturition. *Vet. Clin. North Am*: **Sm. Anim. Pract.**, v.16, 1986. 453p.

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

DOBRINDT, U.; BLUM-OEHLER, G.; NAGY, G.; SCHNEIDER, G.; JOHANN, A.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands PAI I (536) to PAI IV(536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. **Infect. Immun.**, v.70, p.6365-6372, 2002.

EISENTEIN, B. I.; JONES, G. W. The spectrum of infections and pathogenic mechanisms of *Escherichia coli*. **Adv. Intern. Med.**, v.33, p.231-252, 1988.

ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3 Ed. São Paulo: Manole. v.4, 1992, p.1877-1885.

FALKOW, S. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interaction. **J. Clin. Invest.**, v.100, p. 239-243, 1997.

FELDMAN, E. D.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: Saunders, 1996. Cap. 18, p.547-571.

FERNANDEZ-BEROS, M. E.; KISSEL, V.; LIOR, H.; CABELLO, F. C. Virulence-related genes in ColV plasmids of *Escherichia coli* isolated from human blood and intestines. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.742-746, 1990.

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. **J. Am. Vet. Assoc.**, v.44, p.417-426, 1997.

FRANSSON, B. A., RAGLE, C. A. Canine Pyometra: An Update on Pathogenesis and treatment. **Compendium**, v.25, p.602-612, 2003.

FREITAG T., SQUIRES R.A., SCHMID J., ELLIOTT J. Feline uropathogenic *Escherichia coli* from Great Britain and New Zealand have dissimilar virulence factor genotypes. **Vet. Microbiol.**, v. 106, p. 79-86, 2005.

GAASTRA, W.; DE GRAAF, F.K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escheichia coli* strains. **Microbiol. Rev.**, v.46, p.129-161, 1982.

GABOR, G.; SILVER, L.; SZENCI, O. intravaginal prostaglandin F2 alpha for the treatment of metritis and pyometra in the bitch. **Acta Vet. Hung.**, v. 47, p.103-108, 1999.

GRANSDEN, W. R.; EYKYN, S. J.; PHILIPS, I.; ROWE, B. Bacteremia due to *Escherichia coli*: a study of 861 episodes. **Rev. Infec. Dis.**, v.12, p.1008-1018, 1990.

GRINDLAY, M.; RENTON, J. P.; RAMSAY, D. H. O-groups of *Escherichia coli* associated with canine pyometra. **Res. Vet. Sci.**, v.14, p.75-77, 1973.

GUYER, D. M.; KAO, J. S.; MOBLEY, H. L. T. Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and Catheter-associated bacteriuria and from fecal samples. **Infect. Immun.**, v.66, p.4411-4417, 1998.

GYLES, C. L. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; THON, C. O. **Pathogenesis of bacterial infection in animals**. 2 Ed. Ames: Iowa University Press, 1993, p.164-187.

HACKER, J.; KESTLER, H.; HOSCHÜTZKY, H.; JANN, K.; LOTTSPEICH, F.; KORHONEN, T. K. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. **Infect. Immun.**, v.61, p.544-550, 1993.

HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity island and the evolution of microbes. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.54, p.641-679, 2000.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6 Ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap 4, p.95-125

HAGMAN, R.; GREKO, C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. **Vet. Rec.**, v.157, p.193-197, 2005.

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. **Vet. Microbiol.**, v.84, p.143-153, 2002.

HAWK, H. W.; TURNER, G. D.; SYKES, J. F. The effects of ovarian hormones on the uterine defense mechanism during the early stage of induced infection. **Am. J. Vet. Res.**, v. 21, p.644-648, 1960.

HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.49, p.109-116, 2003.

HUANG, S. H.; WASS, C.; FU, Q.; PRASADARAO, N. V.; KIM, K. S. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. **Infect. Immun.**, v.63, p.4470-4475, 1995.

IWAHI, T.; ABE, Y.; NAKAO, M.; IMADA, A.; TSUCHIYA, K. Role of type 1 fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by *Escherichia coli* in mice. **Infect. Immun.**, v.39, p.1307-1315, 1983.

JOHNSON, J. R.; MOSELEY, S. R.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. **Infect. Immun.**, v.56, p.405-412, 1988.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, p.80-128, 1991.

JOHNSON, C.A. Hiperplasia endometrial cística/piometrite. In: NELSON, R.W. & COUTO, C.G. **Fundamentos de medicina interna veterinária de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 737 p.

JOHNSON, J. R.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; GOULLET, P.; PICARD, B.; MOSELEY, S. L.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. O, K and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* strains causing urosepsis. **J. Infect. Dis.**, v.169, p.119-126, 1994.

JOHNSON, J. R.; O'BRIAN, T. T.; LOW, D. A.; LING, G.; DELAVARI, P.; FASCHING, C, *et al.* Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* that express papG allele III. **Infect. Immun.**, v. 68, p.3327-3336, 2000a.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A.; TARR, P. I.; CARLINO, U.; BILGE, S. S.; VARY, J. C.; STELL, A. L. Molecular epidemiological and phylogenetic association of two novel putative virulence genes, *iha* and *iron* *E. coli*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. **Infec. Immun.**, v.68, p.3040-3047, 2000b.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.261-272, 2000.

JOHNSON, J. R.; DELAVARI, P.; STELL, A. L.; WHITTAM, T. S.; CARLINO, U.; RUSSO, T. A. Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.154-159, 2001a.

JOHNSON, J. R.; O'BRYEN, T. T.; KUSKOWSKI, M.; MASLOW, J. N. Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and papA alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. **Infec. Immun.**, v.69, p.5363-5374, 2001b.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P.; MURRAY, A. C.; KUSKOWSKI, M.; GAASTRA, W. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.897-906, 2001c.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): the "other bad *E. coli*." **J. Lab. Clin. Med.**, v.139, p.155-162, 2002a.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. "Uropathogenic" *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary-tract extraintestinal infections. **J. Infect. Dis.**, v.186, p.859-864, 2002b.

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

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; GAJEWSKI, A.; SOTO, S.; HORCAJADA, J. P.; JIMENEZ de ANTA, M. T.; VILA, J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. **J. Infect. Dis.**, v.191, p.46-50, 2005.

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

JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C. Sharing of virulent *Escherichia coli* clones among household members of a woman with acute cystitis. **Clin. Infect. Dis.**, v.43, p.101-108, 2006.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. 1 Ed. Philadelphia: Saunders, 2001, p.19-104.

KAO, J.; STUCKER, D. M.; WARREN, J. W.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. **Infect. Immun.**, v.65, p.2812-2820, 1997.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. rev. Microbiol.**, v.2, p.123-140, 2004.

KAUFFMANN, F. The serology of the coli group. **J. immunol.**, v.57, p.71-100, 1947.

KELLER, R.; ORDOÑEZ, J. G.; DE OLIVEIRA, R. R.; TRABULSI, L. R. ; BALDWIN, T. J.; KNUTTON, S. Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.70, p.2681-2689, 2002.

KIM, S. K. *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. **Infect. Immun.**, v.69, p.5217-5222, 2001.

KIM, S. K. Strategy of *Escherichia coli* for Crossing the Blood-Brain Barrier. **J. Infect. Dis.**, v.186, p.220-224, 2002.

KOCZURA, R.; KAZNOWSKI, A. The *Yersinia* high-pathogenicity island and iron-uptake systems in clinical isolates of *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 637-642, 2003.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**, 5th Ed. Lippincott, 1997. 1395p.

LADHANI, S.; GRANSDEN, W. Increasing antibiotic resistance among urinary tract isolates. **Arch. Dis. Child.**, v.88, p.444-445, 2003.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.1189-1193, 1992.

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

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. **Infect. Immun.**, v.56, p.2601-2609, 1988.

LULICH, P. J.; OSBORNE, C. A. Urine culture as a test for cure: why, when, and how? **Vet. Clin. Small. Anim.**, v.34, p.1027-1041, 2004.

LUND, B.; MARKLUND, B. I.; STRÖMBERG, N.; LINDBERG, F.; KARLSSON, K. A.; NORMARK, S. Uropathogenic *Escherichia coli* can express serologically identical pili of different receptor binding specificities. **Mol. Microbiol.**, v.2, p.255-263, 1988.

MARTIN, C.; ROUSSET, E.; DE GREVE, H. Human uropathogenic and bovine septicaemic *Escherichia coli* strains carry an identical F17-related adhesin. **Res. Microbiol.**, v.148, p.55-64, 1997.

MARTINEZ, J. J.; MULVEY, M.A.; SCHILLING, J. D.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO J.**, v.19, p. 2803-2812, 2000.

MAY, A. K.; GLEASON, T. G.; SAWYER, R. G.; PRUETT, T. L. Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. **Infect. Immun.**, v.68, p.176-183, 2000.

MEYERS-WALLEN, V. N.; GOLDSCHIMIDT, M. H.; FLICKINGER, G. L. Prostaglandin F2 alpha treatment of canine pyometra. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.189, p.1557-1561, 1986.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p.142-201, 1998.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: **Approved Standard M7-T2**. NCCLS, Wayne, PA, USA, 1997.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Fundamentos da medicina interna de pequenos animais**. 1 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1992. Cap. 55, 737p.

NELSON, R. W.; FELDMAN, E. C. Pyometra in the bitch. In: MARROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**: Diagnosis, treatment and prevention of reproductive disease in small and large animals. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1986, p.484-491.

NOMURA, K. Clinical signs, intrauterine bacteria and plasma progesterone level in bitches with pyometra. **J. Jpn. Vet. Med. Assoc.**, v.37, p.83-89, 1984.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; BIRCH-ANDERSEN, A.; KANAMORI, M.; SVANBORG EDEN, C. O, K , H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.33, p.18-25, 1982.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Can. J. Microbiol.**, v.38, p.699-704, 1992.

POLZIN, D. J. Management of recurrent bacterial urinary tract infections. **Compend. Cont. Ed.**, v.16, p.1565-1570, 1994.

PRAMOONJAGO, P.; KANEKO, M.; KINOSHITA, T.; OHTSUBO, E.; TAKEDA, J.; HONG, K.; INAGI, R.; INOUE, K. Role of TraT protein, an anticomplementary protein produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance. **J. Immunol.**, v.148, p.827-836, 1992.

PRASADARO, N. V.; WASS, C. A.; HUANG, S. H.; KIM, K. S. Identification and characterization of a novel Ibe10 binding protein that contributes to *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells. **Infect. Immun.**, v. 67, p.1131–1138, 1999.

PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D. **Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine**. 2^a Ed. Towa: Iowa State University Press, 1993. 612p.

RILEY, M. A.; GORDON, D. M. The ecology and evolution of bacteriocins. **J. Ind. Microbiol.**, v.17, p.151-158, 1996.

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

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

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v.181, p.1753-1754, 2000.

RUSSO, T. A.; DAVIDSON, B. A.; GENAGON, S. A.; WARHOLIC, N. M.; MACDONALD, U.; PAWLICKI, P. D.; BEANAN, J. M.; OLSON, R.; HOLM, B. A.; KNIGHT, P. R. *E.coli* virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis “in vitro” and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. **Am. J. Physiol. Lung cell. Mol. Physiol.**, v.289, p.207-216, 2005.

SAMUELSSON, P.; HANG, L.; WULLT, B.; IRJALA, H.; SVANBORG, C. Toll-Like Receptor 4 Expression and Cytokine Responses in the Human Urinary Tract Mucosa. **Infect. Immun.**, v.72, p.3179-3186, 2004.

SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTO, A. K. Pathogenesis of canine pyometra. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.167, p.1006-1010, 1975.

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

SCHILLING, J. D.; MULVEY, M. A.; HULTGREN, S. J. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.36-40, 2001.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity island in bacterial pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, p.14-56, 2004.

SHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, H.; CARNIEL, E.; HEESEMANN, J. Prevalence of the "High-Pathogenicity Island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infect. Immun.**, v.66, p.480-485, 1998.

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

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

SNYDER, J. A.; HAUGEN, B. J.; LOCKATELL, C. V.; MARONCLE, N.; HAGAN, E. C.; JOHNSON, D. E.; WELCH, R. A.; MOBLEY, H. L. T. Coordinate expression of frimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.73, p.7588-7596, 2005.

SUGIURA, K.; NISHIKAWA, M.; ISHIGURI, K.; TAJIMA, T.; INABA, M.; TORII, R. Effects of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. **Immunobiol.**, v.209, p.619-627, 2004.

TARR, P. I.; BILGE, S. S.; VARY, J. C.; JELASSIC JR. S.; HABEEB, R. L.; WARD, T. R.; BAYLOR, M. R.; BESSER, T. E. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infect. Immun.**, v.68, p.1400-1407, 2000.

TATENO, M.; KITAGAWA, Y. Clinical studies on cefpiramide in the field of obstetrics and gynecology. **Jpn. J. Antibiot.**, v.38, p.2367-2373, 1985. [Abstract]

TENOVER, F. C. Mechanism of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Med.**, v.119, p.3-19, 2006.

TORRES, A. G.; REDFORD, P.; WELCH, R. A.; PAYNE, S. M. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. **Infect. Immun.**, v.69, p.6179-6185, 2001.

WADAS, B.; KUHN, I.; LAGERTEDT, 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. **Vet. Microbiol.**, v.52, p.293-300, 1996.

WILFERT, C. M. *E. coli* meningitis: K1 antigen and virulence. **Annu. Rev. Med.**, v.29, p.129-136. 1978.

WRIGHT, K. J.; HULTGREN, S. J. Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. **Future Microbiol.**, v.1, p.75-87, 2006.

YAMAMOTO, S.; TERA, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.12, p.85-90, 1995.

YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; TSUKAMATO, T.; HASEGAWA, A. Serotypes and virulence factor of *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.61, p.37-40, 1998a.

YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; YAMAMOTO, S.; HASEGAWA, A. Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.60, p.287-290, 1998b.

YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; HASEGAWA, A. Pathogenicity of *Escherichia coli* from dogs with UTI in relation to urovirulence factors. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.1197-1200, 2000.