

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIVERSIDADE GENÉTICA, FATORES DE VIRULÊNCIA E
PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE
ISOLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DO
ÚTERO, DA BOCA E DAS FEZES DE CADELAS COM
PIOMETRA**

Juliana Maria Avanci Agostinho

Médica Veterinária

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIVERSIDADE GENÉTICA, FATORES DE VIRULÊNCIA E
PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE
ISOLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DO
ÚTERO, DA BOCA E DAS FEZES DE CADELAS COM
PIOMETRA**

Juliana Maria Avanci Agostinho

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agropecuária**

2013

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA MARIA AVANCI AGOSTINHO – Nascida em 28 de março de 1984, em Ribeirão Preto-SP. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Faculdade Doutor Francisco Maeda, Ituverava-SP em agosto de 2009. Concluiu o Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária, nas áreas de Clínica Médica e Clínica Cirúrgica de Animais Domésticos, junto ao Hospital Veterinário da Faculdade Doutor Francisco Maeda, no período de novembro de 2009 a outubro de 2010. Em março de 2011 iniciou curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na FCAV-UNESP Jaboticabal. Atua como médica veterinária clínica de pequenos animais na cidade de Ituverava-SP.

**Ninguém conhece as suas próprias capacidades enquanto
não as colocar em prova.**

Publílio Siro

Dedico,

Aos meus pais **Antônio Agostinho** (*in memoriam*) e **Vera Lúcia Avanci Agostinho**, por serem meu alicerce e exemplo de caráter, ensinando a verdadeira essência da vida.

A minha irmã **Ana Paula Avanci Agostinho**, que acredita em mim, me apoia e respeita nossa amizade.

Aos animais, que fazem desse mundo um lugar melhor pra se viver, dando exemplo de amizade, companheirismo, fidelidade e amor verdadeiros.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser presente em todos os momentos da minha vida.

Aos **meus pais**, pela oportunidade de estudo.

Ao professor **Dr. José Moacir Marin**, pela oportunidade que me foi dada, pela orientação, ensinamentos, sabedoria e competência.

À **Marly**, pela indicação, confiança, e pela grande ajuda e sugestões, imprescindíveis para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Cléber**, pela disponibilidade em passar horas no laboratório me auxiliando nas técnicas utilizadas, além das preciosas sugestões.

À **Clínica Veterinária Arca de Noé**, pela disponibilização das amostras, um agradecimento especial à **Marisa**.

Ao **Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinária da Faculdade Dr. Francisco Maeda**, em especial às funcionárias **Paula e Aline**, pela disponibilização do laboratório.

Ao **Laboratório Lamounier da Santa Casa de Misericórdia de Ituverava**, em especial ao **Rogério, Ana Luisa, Dr. Paulo e Ana Paula**, pela disponibilização do laboratório.

Às colegas **Lívia, Clarissa e Andressa**, pelo auxílio e ensinamentos em biologia molecular.

À **Tânia**, técnica do Laboratório de Genética do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Estomatologia da USP, pela disponibilidade, ajuda e amizade durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À **Edna**, secretária do Departamento de Microbiologia da UNESP – Jaboticabal, pela colaboração.

Aos **funcionários da pós-graduação**.

Aos **docentes do Programa de Microbiologia Agropecuária**.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 – Fisiologia do ciclo estral.....	3
2.1.1 – Ciclo estral da cadela.....	4
2.2 – Imunidade local uterina.....	6
2.3 – Piometra.....	6
2.4 – Bactérias isoladas na piometra.....	9
2.4.1 – <i>Escherichia coli</i>	9
2.4.1.1 – <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	10
2.4.1.2 – <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	11
2.4.1.3 – <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	11
2.4.1.4 – <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	12
2.4.1.5 – <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	12
2.4.1.6 – <i>E. coli</i> de aderência difusa (DAEC).....	13
2.4.1.7 – <i>E. coli</i> patogênicas extra intestinais (ExPEC).....	13
2.4.2 – <i>Klebsiella</i> sp.....	15
2.4.3 – <i>Edwardsiella</i> sp.....	15
2.4.4 – <i>Enterobacter</i> sp.....	16
2.5 – Fatores de virulência.....	16
2.6 – Caracterização molecular microbiana.....	18
2.7 – Antimicrobianos.....	20
2.8 – Resistência a antimicrobianos.....	23
2.9 – Papel dos animais de companhia na sociedade.....	24
3 – OBJETIVOS.....	27
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 – Coleta e cultura das amostras.....	28
4.2 – Manutenção das amostras de <i>E. coli</i>	30
4.3 – Extração do DNA bacteriano.....	31

4.4 – Procedimento da PCR para detecção dos genes.....	31
4.5 – Pesquisa de semelhança genética entre as cepas de <i>E. coli</i> provenientes do conteúdo intra uterino e boca.....	33
4.5.1 – Extração do DNA.....	33
4.5.2 – Análise da diversidade genética.....	34
4.6 – Testes de susceptibilidade a antimicrobianos.....	35
5 – RESULTADOS.....	36
5.1 – Origem das amostras.....	36
5.2 – Isolamento bacteriano.....	37
5.3 – Pesquisa de genes precursores de fatores de virulência.....	40
5.4 – Pesquisa de cepas semelhantes provenientes de conteúdo intra uterino e boca.....	46
5.5 – Antibiógrama.....	52
6 – DISCUSSÃO.....	59
7 – CONCLUSÃO.....	68
8 – REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A: Tubo com meio Rugai Modificado sem inóculo; B: Amostras positivas para <i>E. coli</i> sacarose negativa (à esquerda) e sacarose positiva (à direita) em meio Rugai Modificado.....	29
Figura 2 – Identificação bioquímica de Enterobactérias contendo provas de Indol, LTD, sacarose, glicose, produção de gás, urease, H ₂ S, lisina e motilidade.....	30
Figura 3 – Distribuição da frequência de ocorrência de piometra em diferentes raças de cadelas.....	36
Figura 4 – Distribuição da frequência de crescimento bacteriano entre as amostras coletadas de cadelas com piometra (A); Distribuição da frequência da origem das amostras entre as que tiveram crescimento bacteriano (B).....	38
Figura 5 – Distribuição da frequência de ocorrência de micro-organismos isolados de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra.....	38
Figura 6 – Distribuição da frequência de ocorrência de micro-organismos isolados da boca de cadelas com piometra.....	39
Figura 7 – Distribuição da frequência de ocorrência de micro-organismos isolados das fezes de cadelas com piometra.....	39
Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR).....	40
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR).....	41
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR).....	41
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR).....	42
Figura 12 – Representação da prevalência de genes de virulência de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de cadelas com piometra.....	43

Figura 13 – Representação da prevalência de genes de virulência de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas com piometra.....	45
Figura 14 – Padrão de amplificação utilizando-se os primers Rep1R-I e Rep2-I (REP-PCR).....	47
Figura 15 – Padrão de amplificação utilizando-se os primers ERIC1R e ERIC2 (ERIC-PCR).....	47
Figura 16 – Padrão de amplificação utilizando-se os primers BOX A1R (BOX-PCR).....	48
Figura 17 – Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando as distâncias genéticas obtidas com a REP-PCR.....	51
Figura 18 – Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando as distâncias genéticas obtidas com a ERIC-PCR.....	51
Figura 19 – Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando as distâncias genéticas obtidas com a BOX-PCR.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – PCR: Combinação de primers para detecção de genes de virulência, temperatura de anelamento e tamanho dos ensaios amplificados.....	32
Tabela 2 – Prevalência dos genes codificadores dos fatores de virulência identificados por PCR em cepas de <i>E. coli</i> provenientes cadelas com piometra.....	42
Tabela 3 – Associação de genes codificadores dos fatores de virulência identificados por PCR em cepas de <i>E. coli</i> provenientes de conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas com piometra.....	44
Tabela 4 – Prevalência dos genes codificadores dos fatores de virulência identificados por PCR em cepas de <i>E. coli</i> provenientes do conteúdo intra-uterino, da boca e das fezes de 6 cadelas com piometra.....	45
Tabela 5 – Distância Genética entre os isolados de <i>E. coli</i> obtido pelo método de Tamura-Nei (1993), pelo padrão de bandeamento da REP-PCR.....	49
Tabela 6 – Distância Genética entre os isolados de <i>E. coli</i> obtido pelo método de Tamura-Nei (1993), pelo padrão de bandeamento da ERIC-PCR.....	50
Tabela 7 – Distância Genética entre os isolados de <i>E. coli</i> obtido pelo método de Tamura-Nei (1993), pelo padrão de bandeamento da BOX-PCR.....	50
Tabela 8 – Frequências de sensibilidade e resistência de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de cadelas com piometra.....	53
Tabela 9 – Resistência antimicrobiana de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de conteúdo intra uterino, boca e fezes de 6 cadelas com piometra.....	54
Tabela 10 – Caracterização da presença de determinantes de virulência, expressos na quantidade de genes e da presença dos fenótipos de resistência dos isolados conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas com piometra.....	55
Tabela 11 – Comparação de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos em cepas de <i>E. coli</i> isoladas do conteúdo intra uterino (UT) e da boca de cadela com piometra.....	58

**DIVERSIDADE GENÉTICA, FATORES DE VIRULÊNCIA E PERFIS DE
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli*
PROVENIENTES DO ÚTERO, DA BOCA E DAS FEZES DE CADELAS COM
PIOMETRA**

RESUMO – A piometra canina é uma enfermidade caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudatos, acometendo principalmente fêmeas adultas. Ocorre na fase lútea do ciclo estral em decorrência de alterações hormonais e infecção bacteriana. É reconhecida como uma das principais causas de morte em cadelas e a *Escherichia coli* é o principal patógeno associado a esta doença. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar cepas de *E. coli* provenientes de conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas diagnosticadas com piometra, estudar a prevalência de genes codificadores de fatores de virulência uropatogênicos das cepas obtidas testando ainda a semelhança genética entre as cepas isoladas de conteúdo intra uterino e boca e avaliar a susceptibilidade “in vitro” das bactérias isoladas frente a 12 agentes antimicrobianos. Setenta cepas de *E. coli*, 25 provenientes do conteúdo intra uterino, 26 provenientes da boca e 19 provenientes das fezes, isoladas de 6 cadelas foram examinadas por PCR. Entre as cepas examinadas, 67 (95,7%) foram positivas para o gene *fim*, 19 (27,1%) foram positivas para *iss*, 18 (25,7%) foram positivas para *hly*, 13 (18,5%) foram positivas para *iuc* e 12 (17,1%) foram positivas para *usp*. Três animais apresentaram grande similaridade entre as cepas de *E. coli* isoladas do conteúdo intra uterino e da boca, através da análise da diversidade genética realizada mediante emprego da técnica REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR. Resistência antimicrobiana predominante foi detectada para cefalotina (67,1%), ampicilina (65,7%), tetraciclina (61,4%) e nitrofurantoina (58,5%) entre as cepas isoladas. Resistência a múltiplos antimicrobianos foi detectada em 12 (48,0%) dos isolados do conteúdo intra uterino, em 22 (84,6%) dos isolados da boca e em 14 (73,6%) dos isolados das fezes. Deve ser levado em consideração que os cães são animais que convivem em um íntimo contato com os seres humanos e representam uma importante fonte de transmissão de *E. coli* para outros animais e para humanos, ressaltando os grandes riscos frente ao elevado número de UVF e genes de resistência antimicrobiana encontrados entre as cepas de *E. coli* recuperadas das amostras de cadelas.

PALAVRAS-CHAVE: cadelas, *E. coli*, piometra, resistência antimicrobiana, fatores de virulência.

GENETIC DIVERSITY, VIRULENCE FACTORS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY FROM *Escherichia coli* ISOLATED FROM THE UTERUS, THE MOUTH AND FECES OF BITCHES WITH PYOMETRA

ABSTRACT – Canine pyometra is a disease characterized by the inflammation of the uterus with accumulation of purulent discharge, affecting mainly adult animals. Occurs in the luteus phase of the estrus cycle in result of hormone alterations and generally is associated with bacterial infections. It is recognized as one of the main causes of disease and death in the bitch and *Escherichia coli* is the major pathogen associated with this disease. The aim of this study was to research, isolation and identification of *Escherichia coli* strains from intrauterine contents, mouth and feces of bitches diagnosed with pyometra, studying the prevalence of uropathogenic virulence factors genes in strains isolated, still testing the genetic similarity among strains isolated from intrauterine contents and mouth and evaluate the susceptibility "in vitro" of the isolated bacteria to 12 antimicrobial drugs. Seventy *E. coli* strains, 25 from intrauterine contents, 26 from mouth and 19 from feces isolated from six bitches were examined by PCR. Among the strains 67 (95.7%) were positive for *fim*, 19 (27.1%) were positive for *iss*, 18 (25.7%) were positive for *hly*, 13 (18.5%) were positive for *iuc* and 12 (17.1%) were positive for *usp*. Multiple antimicrobial resistance was detected for cephalothin (68.0%), nalidixic acid (56.0%) and ampicillin (56.0%) among the pyometra *E. coli* isolates. Multidrug resistance was found in 12 (48.0%) of the isolates from pyometra, in 22 (84.6%) of the isolates from mouth and in 14 (73.6%) of the isolates from feces. It must be considered that dogs are animals that are living in close proximity to human and have an important role in the transmission of *E. coli* to others animals or human, highlighting the major risks facing the large number of UVF and multidrug resistance found in the *E.coli* strains recovered from the pet samples. Three animals showed strong similarity among *E. coli* strains isolated from intrauterine contents and mouth, through the analysis of genetic diversity performed by use of the technique REP-PCR, ERIC-PCR and BOX-PCR. Multiple antimicrobial resistance was detected for cephalothin (67.1%), ampicillin (65.7%), tetracycline (61,4%) and nitrofurantoin (58,5%) among the *E. coli* isolates. Multidrug resistance was found in 12 (48.0%) of the isolates from intrauterine contents, in 22 (84.6%) of the isolates from mouth and in 14 (73.6%) of the isolates from feces. It must be considered that dogs are animals that are living in close proximity to human and have an important role in the transmission of *E. coli* to others animals or human, highlighting the major risks facing the large number of UVF and multidrug resistance found in the *E.coli* strains recovered from the pet samples.

KEYWORDS: bitches, *E.coli*, pyometra, antimicrobial resistance, virulence factors.

1 - INTRODUÇÃO

A piometra canina é uma enfermidade caracterizada por inflamação do útero com acúmulo de exsudatos, acometendo principalmente animais adultos. Ocorre na fase lútea do ciclo estral e está associada a alterações hormonais (compostos progestacionais ou estrogênicos) e infecção bacteriana, podendo acometer vários sistemas do organismo (GROOTERS, 1994; THREFALL, 1995).

Pode ser considerada como uma das condições patológicas mais comuns do trato genital das cadelas, apresentando alta incidência e sendo reconhecida como uma grande causa de morte desta espécie animal (HAGMAN; KUHN, 2002). Tal enfermidade apresenta-se com secreção vulvar sanguinolenta a purulenta, inapetência, letargia, depressão, distensão abdominal, poliúria, polidipsia e emese (FRANSSON; RAGLE, 2003).

A infecção bacteriana é uma condição secundária (HIDALGO et al., 1986). Durante o estro, bactérias da flora normal da vagina ascendem pela cérvix relaxada até o útero. Além disso, micro-organismos fecais podem migrar para este órgão, o que pode ser evidenciado pela similaridade de microrganismos isolados de fezes e conteúdo uterino (JOHNSON et al., 2001). Os mecanismos de defesa do útero, geralmente, são capazes de eliminar estas bactérias. Porém, elevadas concentrações de progesterona podem interferir nestas defesas por reduzir a velocidade da resposta inflamatória (ALLEN, 1995; HANGMAN; KUHN, 2002).

O micro-organismo predominantemente isolado na piometra é a *Escherichia coli* (CHEN et al., 2003). Isso se deve à capacidade deste patógeno em se aderir a sítios receptores específicos no endométrio estimulado por progesterona (FELDMAN; NELSON, 1996; KREKELER et al., 2012). Apesar de não fazer parte da flora bacteriana normal da vagina, a *E. coli* possui grande afinidade pelo endométrio e miométrio, com habilidade de se aderir em receptores na parede uterina sob influência da progesterona, dificultando sua eliminação pelo sistema de defesa local (HAGMAN et al., 2006). Embora a infecção bacteriana não seja a causa desencadeante da doença, é a responsável pela maioria dos casos de morbidade e mortalidade (CLARENCE, 1997).

De acordo com a teoria geralmente aceita as linhagens de *E. coli* encontradas nesta doença são originárias da flora normal do intestino da cadela ou de uma infecção do trato urinário (FREITAG et al., 2005). A habilidade da *E. coli* em causar infecções extra intestinais depende de diversos fatores de virulência os quais auxiliam a bactéria em sobreviver em condições adversas no sitio de infecção, entre eles fimbrias que facilitam a adesão da bactéria a mucosa (*fim H*), hemolisina que libera nutrientes para a bactéria (*hly A*), aerobactina associada a disponibilização de ferro para a bactéria (*iuc*), fator de sobrevivência aumentada ao soro (*iss*) e proteína uropatogênica específica (*usp*). Cães e gatos têm um papel importante na transmissão de *E. coli* para outros animais e humanos, já que clones de *E. coli* uropatogênicas similares aos fecais já foram identificados causando infecções entre humanos e animais (JOHNSON et al., 2008).

Ao mesmo tempo o tratamento de infecções provocadas por *E. coli* está se tornando cada vez mais difícil devido a multirresistência exibida por este organismo (GUARDABASSI et al., 2004). As drogas antimicrobianas frequentemente utilizadas na terapêutica de pequenos animais na maioria das vezes são as mesmas classes de antimicrobianos utilizados no tratamento de seres humanos. A transferência de bactérias resistentes ou de elementos móveis de resistência entre animais de companhia e a partir desses animais para humanos já foi demonstrada e representa um perigo a saúde pública (VAN DEN BOGAARD; STOBBERING, 2000; GUARDABASSI et al., 2004), comprometendo a eficácia terapêutica.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Fisiologia do ciclo estral

De acordo com Hagman (2004), o aparelho genital feminino dos carnívoros apresenta modificações estruturais durante todo o período de atividade sexual que se repetem em intervalos periódicos. Estas modificações estruturais são conhecidas por ciclo estral, sendo este iniciado a partir da puberdade, sucedendo-se ao longo de toda a vida reprodutiva, sendo interrompido apenas pela gestação.

O hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrógenos e progesterona são os hormônios, dentre outros, que participam do ciclo estral (JEFFCOATE, 1999). Assim, sob influência do FSH, os folículos ovarianos em quiescência se desenvolvem e as células foliculares produzem estrógeno. O estrógeno, então, é o hormônio responsável pelo desencadeamento dos sinais clínicos e comportamentais do proestro (WANKE; GOBELLO, 2006). Além disso, este hormônio também influencia a proliferação das células epiteliais da mucosa vaginal, aumento da espessura da camada endometrial, aumento do número de receptores de progesterona do endométrio, abertura da cérvix, aumento do fluxo sanguíneo e desencadeia resposta inflamatória celular (JEFFCOATE, 1999).

Após o pico de LH, mais ou menos 48 horas, ocorre a ovulação, fazendo com que o folículo ovariano se transforme em corpo lúteo, produzindo então a progesterona, cujas principais funções englobam a manutenção de um ambiente favorável a uma possível gestação, fechamento da cérvix, aumento do número e atividade das glândulas endometriais, diminuição da motilidade miométrica e diminuição da resposta inflamatória (HAGMAN, 2004).

Smith (2006) cita que as respostas ou efeitos provocados pelo estrógeno e pela progesterona no útero tem efeito cumulativo a cada ciclo estral. Tais respostas podem ser aumentadas caso o ovário estiver sob influência de cistos foliculares, tumor ovariano ou até mesmo recebendo progesterona exógena.

2.1.1 - Ciclo estral da cadela

Na cadela, o primeiro estro ocorre entre 6 e 18 meses de idade, sendo esta espécie considerada monoéstrica anual, ou seja, sua ovulação ocorre uma ou duas vezes no ano, com intervalo entre ciclos estrais de 7 a 12 meses. Cada ciclo tem duração de 3 meses, sendo que após esse período, a cadela entra em anestro, ou seja, em inatividade reprodutiva. Com a idade, principalmente após 8 anos, os ciclos reprodutivos tornam-se menos regulares, diminuindo a duração e a frequência (WANKE; GOBELLO, 2006).

O ciclo estral da cadela é dividido em proestro, estro, diestro e anestro (SHILLE, 1992). O proestro apresenta uma duração de 9 a 11 dias, sendo que nesse período os animais encontram-se sexualmente atrativos, porém não receptivos. As concentrações séricas de estradiol estão aumentadas causando aumento do volume da vulva, edemaciação e corneificação das células vaginais (FELDMAN; NELSON, 2003). A cadela apresenta nessa fase secreção vaginal serosanguinolenta (WANKE; GOBELLO, 2006).

Os altos níveis de estrógeno também influenciam a proliferação das células epiteliais da mucosa vaginal, aumento da espessura da camada endometrial e do número de receptores de progesterona, além de promover abertura da cérvix e resposta inflamatória celular (JEFFCOATE, 1999).

O estro tem duração de 12 dias, podendo variar de 4 a 24 dias, correspondendo ao período em que as fêmeas tornam-se receptivas aos machos (JOHNSTON, 2001). Nesta fase, a concentração estrogênica começa a declinar e os níveis de progesterona aumentam. O estrógeno exerce *feedback* positivo sobre o hipotálamo e hipófise dando início à elevação sérica do hormônio luteinizante (LH). Atingida a concentração máxima do LH, ocorre a ovulação (FELDMAN; NELSON, 2003). Nesse período, ocorre dilatação da cérvix devido à possibilidade de cópula. Tal evento facilita a entrada de micro-organismos para o interior do útero, e é compensada pela ativação da resposta imune inata e adquirida da cadela (FELDMAN; NELSON, 1996).

Já o diestro, também denominado de fase luteal, tem duração de 2 a 3 meses. A atração pelos machos decresce e a cadela não é mais receptiva (FELDMAN; NELSON, 2003). Após a ovulação, as células da granulosa dos folículos sofre luteinização, passando a denominar-se corpo lúteo. Esta estrutura atua na produção de progesterona, aumentando seus níveis gradativamente por uma a duas semanas, declinando gradualmente até atingir valores basais no final do período (CHRISTIANSEN, 1998). Tal hormônio promove o desenvolvimento das mamas e de seus ácinos para a fase de lactação e também é responsável pela manutenção da gestação (FELDMAN; NELSON, 2003). O útero, sob a influência deste hormônio, apresenta glândulas endometriais hiperplásicas e hipertrófica, alterações fisiológicas que 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).

O anestro caracteriza-se como o período de inatividade sexual (WANKE; GOBELLO, 2006). Essa fase tem duração de 1 a 6 meses, com média de 125 dias. A vulva regride ao seu tamanho normal e o endométrio e o miométrio diminuem em tamanho e atividade (CHRISTIANSEN, 1998).

Apesar do eixo hipofisário-ovariano e útero permanecerem ativos durante o anestro, e a liberação de gonadotrofinas serem suficientes, a responsividade dos ovários está baixa nesse período devido à presença de prolactina (JEFFCOATE, 1999).

Deve-se ressaltar que uma resposta à progesterona prolongada, exagerada, ou inadequada sob qualquer aspecto, pode resultar em uma hiperplasia endometrial cística (HEC), com acúmulo de líquido no interior das glândulas endometriais e lúmen uterino (JOHNSON, 1994). Dessa forma, o 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, 2001).

2.2 - Imunidade local uterina

De acordo com Nascimento e Santos (1997), a resistência do útero frente a infecções depende da atividade dos neutrófilos, da motilidade e do tônus uterino, da eliminação de micro-organismos e da presença de imunoglobulinas. Durante a fase estrogênica, tais fatores estão em evidencia devido à vasodilatação, maior afluxo sanguíneo, maior presença de imunoglobulinas e maior contratilidade do útero presentes nesta fase. Já na fase progesterônica, o útero fica mais susceptível à infecções devido a diminuição da contratilidade uterina e da atividade leucocitária, menor afluxo sanguíneo e imunossupressão durante a gestação.

Gobello et al. (2003) cita que a fagocitose exercida pelos macrófagos com consequente destruição de micro-organismos é o primeiro meio de defesa do útero contra infecções. Sob influencia da progesterona, o pH intra uterino torna-se baixo e o epitélio deste órgão fica menos permeável à bactérias, resultando em um meio favorável ao crescimento das bactérias e estimulação tardia do sistema leucocitário, respectivamente.

Neste período onde a progesterona é o hormônio predominante, a hiperplasia uterina associada à diminuição das defesas celulares e imunitárias locais torna o útero um ambiente em condições propícias para a multiplicação de micro-organismos que podem ter origem tanto da flora vaginal quanto intestinal (FELDMAN; NELSON, 2003).

2.3 - Piometra

Também denominada Complexo Hiperplasia-cística-endometrial, a piometra canina é uma inflamação no útero com acúmulo de exsudatos ocorrendo na fase luteal do ciclo estral em decorrência de alterações hormonais por compostos progestacionais ou estrogênicos e infecções bacterianas (TONIOLLO et al., 2000; WEISS et al., 2004; JONES et al., 2007).

Trata-se de uma enfermidade com alta incidência dentro da espécie canina, sendo reconhecida como uma das causas mais comuns de óbito nesta espécie (HAGMAN; KÜHN, 2002). Pode acometer todas as raças e todas as idades, sendo mais comum em animais com mais de 6 anos, principalmente nulíparas (NISKANEN; THRUSFIELD, 1998).

O estímulo prolongado e/ou repetido da progesterona resulta em mudanças patológicas no endométrio, que associado à colonização bacteriana causa a piometra (GANDOTRA et al., 1994; THRELFALL, 1995, FELDMAN; NELSON, 2003). Após a ovulação, num período de aproximadamente 2 meses, ocorre um aumento na concentração plasmática de progesterona que age no útero promovendo crescimento endometrial, secreção glandular e diminuição da atividade do endométrio (NOAKES et al., 2001 ; FRASSON; RAGLE, 2003). Com isso, permite-se o acúmulo de secreção das glândulas uterinas, sendo um excelente meio de cultura para crescimento bacteriano (SUGIURA, et al 2004). Além disso, a resposta leucocitária local uterina fica prejudicada pela ação da progesterona, o que contribui para a permanência das bactérias neste órgão (GROOTERS, 1994; THRELFALL, 1995).

A ação hormonal é considerada a condição primária para o desenvolvimento da piometra, sendo a infecção bacteriana a condição secundária (HIDALGO; COHEN; MÉNDEZ, 1986). Durante a fase do estro, período fértil da cadela, bactérias da flora normal da vagina ascendem para o útero através da cérvix que se apresenta relaxada para uma possível cópula. Com o fim do estro e início do diestro, onde as concentrações de progesterona estão aumentadas, a resposta inflamatória no útero fica diminuída, prejudicando a eliminação desses micro-organismos, sendo o mais comumente isolado nestes casos a *E. coli* (ALLEN, 1995; JOHNSTON, 2001).

Administrações de altas doses de progesterona usadas como contraceptivos em cadelas podem resultar no desenvolvimento de lesões uterinas compatíveis com piometra (GOBELLO et al., 2003) . O uso de compostos progestágenos de longa duração para retardar ou suprimir o estro e administração de estrógenos em cadelas indesejavelmente acasaladas contribuem na etiologia da doença (FELDMAN; NELSON, 2003).

Os sinais clínicos da piometra ocorrem 1 a 2 meses após o estro (GROOTERS, 1994), os quais: secreção sanguinolenta a purulenta, letargia, depressão, inapetência, poliúria, polidipsia e vômitos, sinais estes característicos de piometra aberta, ou seja, aquela em que a cérvix se mantém relaxada. Na piometra fechada, o animal não apresenta secreção vaginal, o que pode atrasar o diagnóstico da doença. Nestes casos, há distensão uterina progressiva e o abdômen aumenta de volume, podendo ocorrer ruptura do corno do útero. A ocorrência de septicemia e choque seguidos de óbito é mais frequente em piometras de cérvix fechada (FRANSSON; RAGLE, 2003; WANKE; GOBELLO, 2006).

Como meios de diagnóstico da piometra, pode-se fazer uso de exames laboratoriais como hemograma e perfil bioquímico, exames radiográficos e ultrassonografia. O primeiro apresenta-se com aumento na contagem total de leucócitos e neutrofilia com desvio à esquerda (FRANSSON et al., 1997). Uma anemia leve, normocítica e normocrômica, não regenerativa, pode estar associada à piometra devido à supressão da eritropoiese causada pela toxemia e pela perda de hemácias que migram para o local da infecção por diapedese (ALLEN, 1995).

A uréia e a creatinina podem estar aumentadas, indicando um comprometimento renal. Como consequência, azotemia pré-renal pode estar presente se o consumo de água não for compensatório à poliúria causada pela redução da habilidade dos túbulos renais em concentrar urina, fenômeno causado por toxemia a qual interfere com a reabsorção de sódio e cloro, prejudicando a reabsorção de água (GROOTERS, 1994; FELDMAN; NELSON, 2003). Observa-se ainda hiperproteinemia e hiperglobulinemia resultante da desidratação e aumento das enzimas hepáticas aspartato amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina devido à lesão em hepatócitos pela endotoxemia ou diminuição da circulação no fígado pelo quadro de desidratação (FELDMAN; NELSON, 2003).

A radiografia permite visualizar um útero distendido causando deslocamento dorsal do cólon e deslocamento cranial do intestino delgado. Observa-se uma estrutura tubular fluído-densa no abdômen ventro-caudal, porém a não visualização radiográfica do útero não descarta a piometra (GROOTERS, 1994; FELDMAN; NELSON, 2003).

Já o exame ultrassonográfico é o de eleição para a confirmação de casos de piometra (BIGLIARI, et al., 2004). Este permite determinar o tamanho do útero, a espessura de sua parede e a presença de fluídos em seu interior, podendo até mesmo determinar as características desse fluído como seroso ou viscoso (ALLEN, 1995; JONSTON, 2001).

O tratamento mais indicado para a piometra é a retirada cirúrgica do útero, denominada ovarioisterectomia. Além disso, antimicrobianos de amplo espectro e suplementação eletrolítica intravenosa para manter a perfusão tecidual correta e corrigir déficits eletrolíticos devem ser instituídos imediatamente (FELDMAN; NELSON, 2003; FIENI, 2006).

Uso de estrógenos, andrógenos, alcaloides de ergot, quinina e ocitocina é uma alternativa terapêutica, porém tem se mostrado sem sucesso na rotina veterinária (ALLEN, 1995; FELDMAN; NELSON, 2003). Piometras onde se é instituído apenas tratamento medicamentoso, apresentam recorrência em até 77% das cadelas (GROOTERS, 1994).

2.4 - Bactérias isoladas na piometra

2.4.1 - *Escherichia coli*

A *E. coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, normalmente é encontrada na microbiota entérica animal e humana (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Porém, algumas cepas são patogênicas para o homem e animais, estando relacionadas a severos distúrbios gastrointestinais e infecções extra-intestinais (infecções urinárias, meningites do recém-nascido e septicemias) no primeiro; e grande variedade de manifestações clínicas no segundo (CAMPOS; TRABULSI, 1999; RADOSTITIS et al., 2000).

Trata-se de uma bactéria pleomórfica, anaeróbia facultativa, gram-negativa, bastonete não formadora de esporos. Pode ser classificada quanto a sua

sorotipagem baseada na presença de antígenos somáticos – antígeno O, localizados na parede; antígenos flagelares – antígeno H; antígenos capsulares – antígeno K (NATARO; KAPER, 1998), sendo reconhecidos mais de 180 sorogrupos O e mais de 60 sorogrupos H, sendo possíveis mais de 10.000 combinações entre estes antígenos (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002).

Além disso, cepas de *E. coli* podem ser agrupadas em três categorias, sendo elas, *E. coli* comensais, *E. coli* patogênicas intestinais e *E. coli* patogênicas extra intestinais, de acordo com a caracterização clínica, epidemiológica e genética das cepas (NATARO; KAPER, 1998). As linhagens responsáveis por distúrbios entéricos são classificadas em seis patotipos: enteropatogênicas (EPEC); enterotoxigênicas (ETEC); enterohemorrágicas (EHEC); enteroinvasivas (EIEC); enteroagregativas (EAEC) e de aderência difusa (DAEC), de acordo com sua capacidade de produção de toxinas, patogenicidade, fatores de virulência e manifestação clínica (MARKS; KATHER, 2003; KAPER et al., 2004).

2.4.1.1 - *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

Um dos principais agentes responsáveis pelos casos de diarreia no homem (CAMPOS; TRABULSI, 1999), não tendo sua importância completamente esclarecida em doenças nos animais (SUSSMAN, 1997). Possui um plasmídeo que lhe confere a capacidade de se aderir na membrana plasmática dos enterócitos causando destruição das microvilosidades adjacentes (MURRAY et al., 1998).

Com a adesão do micro-organismo, ocorre um rearranjo do citoesqueleto da célula do hospedeiro causando encurtamento das microvilosidades e perda da capacidade absorptiva. A adesão e destruição da arquitetura celular ocorrem em três etapas, sendo elas: aderência localizada, transdução de sinal e íntima aderência (NATARO; KAPER, 1998).

2.4.1.2 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

Cepas de ETEC são as maiores causadoras de diarreia infantil em países em desenvolvimento e diarreia dos viajantes (KUHNERT et al., 2000; ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Não são invasivas e causam uma diarreia do tipo secretora através da produção da enterotoxina LT (toxinas termolábeis) e/ou ST (toxinas termoestáveis) (SUSSMAN, 1997).

A infecção causada por estas cepas é manifestada por diarreia aquosa, vômitos, dores abdominais, náuseas e febre baixa (KAPER et al., 2004). As enterotoxinas atuam na abertura de canais de cloro nas células crípticas e no bloqueio da absorção de sódio e cloro resultando em perda de água e eletrólitos para o lúmen intestinal (MURRAY et al., 1998).

Tal infecção também acomete animais recém-nascidos, principalmente leitões, bezerros, cordeiros e cães (HAMMERMUELLER et al., 1995; KUHNERT et al., 2000).

2.4.1.3 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Importante causa de doença entérica e renal no homem, esse grupo de *E. coli* está presente na flora normal de animais domésticos saudáveis, em especial nos ruminantes (BEUTIN et al., 1993; CAPRIOLI et al., 1993). Algumas dessas cepas são patogênicas ao homem, sendo transmitidas através de alimentos contaminados (leite e carne) ou contato direto com esses animais.

Em humanos se manifesta como colite hemorrágica ou Síndrome Hemolítica Urêmica (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Provoca dor abdominal intensa, diarreia aquosa evoluindo para diarreia sanguinolenta (MURRAY, et al., 1998).

Produz uma toxina denominada shiga toxina capaz de atravessar o epitélio intestinal e alcançar células do endotélio de vasos que suprem o intestino, o rim, pâncreas e outras vísceras como cérebro e coração. A partir desta lesão vascular,

pode ocorrer coagulação intravascular, que por sua vez resulta em trombocitopenia, micro angiopatia, anemia hemolítica, com hemólise e consequente falência renal, caracterizando a síndrome clássica da Síndrome Hemolítica Urêmica (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002).

2.4.1.4 - *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Esse tipo de *E. coli* não possuem participação definida na ocorrência de doenças em animais. Provoca infecções intestinais em humanos de todas as idades, sendo mais comum em países menos desenvolvidos (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002).

É caracterizada por uma diarreia mucóide sanguinolenta (HART; BATT; SAUNDERS, 1993). Ocorre uma íntima penetração da bactéria na mucosa causando inflamação e erosão da mesma, principalmente no intestino grosso. A penetração dos enterócitos pela bactéria não se dá pelo lúmen e sim através das células M, que são as principais constituintes do tecido que circunda o folículo linfóide. Uma vez que penetram o epitélio, conseguem evitar a fagocitose por induzir apoptose nos macrófagos. O mecanismo pelo qual causam diarreia é incerto, porém sugere-se que pode haver uma enterotoxina codificada por um plasmídeo (NATARO; KAPER, 1998).

2.4.1.5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Caracterizada por uma diarreia persistente, acomete principalmente crianças de países em desenvolvimento e viajantes destas áreas (THEA et al., 1993; MAYER; WANKE, 1995; DAVID et al., 2003).

A infecção intestinal pela EAEC possui três estágios: aderência por meio de fimbrias de aderência agregativa, formação de biofilme e processo inflamatório, causando lesões na mucosa (CZECZULIN et al., 1999; NATARO; KAPER, 1998).

2.4.1.6 *E. coli* de aderência difusa (DAEC)

A DAEC acomete crianças com mais de um ano de idade causando diarreia (KAPER et al., 2004). Possuem fimbrias que lhe confere aderência nas células hospedeiras, além de adesinas em sua superfície celular envolvidas com o rearranjo do citoesqueleto causando lesões celulares (NATARO et al., 1996; KAPER et al., 2004).

Não possuem participação definida na ocorrência de doenças em animais (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

2.4.1.7 *E. coli* patogênicas extra intestinais (ExPEC)

Grupo de cepas patogênicas oportunistas capazes de provocar infecções extra intestinais no homem e nos animais, frequentemente associadas à flora intestinal normal (PEETERS, 1994; LOW et al., 1988).

No homem, associa-se às infecções do trato urinário (ITUs), meningites, pneumonias, osteomielites, infecções intra abdominais e de tecidos moles (EISENTEIN; JONES, 1988; RUSSO; JOHNSON, 2000; JOHNSON; RUSSO, 2002; SMITH et al., 2007), sendo frequentemente acompanhadas de bacteremia (GRANSDEN et al., 1990). Na espécie canina, estão associadas às ITUs e piometras (WADAS et al., 1996; YURI et al., 2000; CHEN et al., 2003; JOHNSON et al., 2003).

Sendo estas cepas estudadas de acordo com seus fatores de virulência e os sítios anatômicos acometidos (JOHNSON; RUSSO, 2002), foram denominados de UPEC (“Uropathogenic *E. coli*”), MNEC (“Meningitis-associated *E.coli*”) e SEPEC

(Septicemic *E. coli*) (WILFERT, 1978; MARTIN et al., 1997). Porém, comparando fenotípica e genotipicamente estes clones de *E. coli* isoladas de diferentes tipos de infecções, sítios anatômicos e hospedeiros, pode-se observar similaridade entre eles, propondo-se uma nova designação para esse grupo, sendo estas cepas então denominadas de ExPEC (“Extra intestinal pathogenic *E. coli*”) (JOHNSON et al., 2000; JOHNSON et al., 2001).

Tanto no homem quanto nos animais, as infecções do trato urinário são as mais frequentes entre as infecções extraintestinais ocasionadas pelas ExPEC. As cadelas com menos de dois e mais de seis anos de idade são as mais acometidas (BARTGES, 2004; JOHNSON et al., 2003), sendo que a incidência aumenta com a idade (PEETERS, 1994). Este tipo de infecção quase sempre é ascendente, acometendo desde a uretra, bexiga, podendo atingir até os rins (SAYLERS; WHITT, 2002). Assim como nas ITUs, a piometra também é usualmente causada por bactérias residentes na microflora intestinal ou trato urogenital baixo (BARSANTI, 1998).

Estas infecções extra intestinais causadas pela *E. coli* dependem de fatores para sua ocorrência, sendo eles os status do hospedeiro e o potencial virulento da bactéria. O primeiro está relacionado com anormalidades anatômicas ou funcionais de sistemas de defesa do hospedeiro que o tornam mais susceptível às infecções (JOHNSON; RUSSO, 2002); e o segundo está relacionado com os fatores de virulência que as ExPEC apresentam conferindo-lhes capacidade de colonizar as superfícies das mucosas do hospedeiro, evadir seus mecanismos de defesas, adquirir nutrientes essenciais para a sobrevivência, lesar ou invadir células do hospedeiro e estimular uma resposta inflamatória (JOHNSON, 1991; WILES et al., 2008). Dentre os vários fatores de virulência, destacam-se as adesinas, invasinas, toxinas, sideróforos e evasinas, sendo encontrados em plasmídeos ou ilhas de patogenicidade (BOWER et al., 2005).

2.4.2 *Klebsiella* sp.

Pertencente à família Enterobacteriaceae é uma bactéria gram-negativa, encapsulada e imóvel. É isolada normalmente da flora intestinal normal de humanos e animais (KRIEG, 1984). A espécie mais comumente isolada desse gênero é a *Klebsiella pneumoniae* (MURRAY et al., 1998), aparecendo nas vias respiratórias e nas fezes de indivíduos saudáveis, porém é encontrada em infecções respiratórias e urinárias (KRIEG; HOLT, 1994).

São micro-organismos oportunistas podendo causar bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário, metrite em éguas e mastite em bovinos, sendo o trato gastrointestinal o principal reservatório e fonte de infecção (KRIEG; HOLT, 1994).

A presença da cápsula aumenta a virulência desse micro-organismo (MURRAY et al., 1998), além de algumas cepas produzirem uma enterotoxina que promove hipersecreção de líquidos e eletrólitos na luz intestinal provocando diarreia (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 1982).

2.4.3 *Edwardsiella* sp.

Bactérias em forma de bastonetes pequenos, gram-negativas, apresentando-se geralmente móveis por flagelos peritríquios, pertencentes ao grupo das enterobactérias. Ocorrem mais frequentemente no intestino e fezes de peixes e no ambiente destes, particularmente em águas doces, parecendo ser um componente normal da microbiota destes animais. Também habitam o intestino de invertebrados, répteis, anfíbios e aves (ROBERTS, 1981; PAVANELLI et al., 1998; KUBITZA, 2000), podendo ocorrer em mamíferos e seres humanos (HOLT et al., 1994).

Esta bactéria provoca a denominada septicemia dos peixes, porém pode provocar doenças em outros hospedeiros como bovinos e aves (PAVANELLI et al., 1998; KUBITZA, 2000). Tem caráter zoonótico causando graves doenças no homem, tendo sido associada a meningites, abscessos hepáticos e gastroenterites.

Pode ser isolada de urina e fezes de muitos mamíferos, incluindo o homem e mamíferos marinhos, contudo é normalmente associada a ambientes de água doce (CLARRIDGE et al., 1980; NOGA, 1995). *Edwardsiella tarda* é considerada como bactéria emergente para enfermidades transmitidas através de alimentos (DOYLE, 1994).

2.4.4 *Enterobacter* sp.

Bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, pequenas gram-negativas, anaeróbias facultativas e sem motilidade. São amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em água doce, solo, esgoto, plantas, vegetais, animais e fezes de seres humanos (SANDERS; SANDERS, 1997). Algumas espécies são patogênicas oportunistas estando relacionadas a infecções urinárias e, ocasionalmente, septicemias e meningite (HOLT et al., 1994).

2.5 Fatores de virulência

Os fatores de virulência podem ser considerados como estratégias adotadas pelos micro-organismos para vencer as barreiras imunológicas do hospedeiro e permitir a sua colonização (CALIMAN, 2010). Um desses pré-requisitos para a colonização da bactéria e consequente infecção é a adesão desta à célula do hospedeiro, principalmente em sistemas de fluxo, como peristaltismo intestinal, fluxo urinário e contrações uterinas (ARCHAMBAUD et al., 1988).

A uropatogenicidade em *E. coli* está relacionada a dois mecanismos: adesão e citotoxicidade (ROSS et al., 1999). Os fatores de aderência permitem à bactéria colonizar diferentes sítios anatômicos, compreendendo estruturas filamentosas distribuídas na superfície celular bacteriana (KAPER et al., 2004). Estas estruturas são denominadas fímbrias ou pili que, além de exercer o papel de ligação com

receptores específicos nas células dos hospedeiros, podem acionar sinais de transdução causando rearranjo do citoesqueleto e consequente morte celular (KAPER et al., 2004; WRIGHT; HULTGREN, 2006). Alguns grupos de *E. coli* também produzem adesinas afimbriais, exercendo as mesmas funções das fimbrias (KAPER et al., 2004; SNYDER et al., 2005).

As fimbrias do tipo I são comumente encontradas nas ExPEC de origem fecal e urinária de humanos e animais (JOHNSON, 1991; SCHILLING et al., 2001). Estas fimbrias são compostas 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).

O pili, adesina implicada na patogênese de infecções extra intestinais, é codificada pelos genes *pap*. Está associada principalmente às cepas uropatogênicas porém além de conferir adesão das bactérias em células epiteliais do trato urinário, confere ligação também ao epitélio intestinal (MULVEY, 2002). A molécula PapG da adesina P-fimbrial ocorre em três variantes: classe I, II, e III. A associação clínica da classe I não é muito conhecida enquanto que a classe II está associada à pielonefrites e bacteremias em humanos (LANE et al., 2007; NAVEEN; MATHAI, 2005).

Outros fatores também contribuem para a virulência das ExPEC como a aquisição de ferro, através de diversos mecanismos incluindo sistemas sideróforos (SAYLERS; WHITT, 2002). Uma parte da resposta de defesa do hospedeiro frente à infecção é a restrição ao íon ferro, necessário para o crescimento e metabolismo bacteriano. A *E. coli* o utiliza para transporte e armazenamento de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons e no metabolismo de peróxidos (SAYLERS; WHITT, 2002).

A aerobactina, um sideróforo codificado pelo gene *iucD* ("iron uptake chelate"), situado em plasmídios ou em cromossomos (BLANCO et al., 1997), é a forma mais efetiva de aquisição de ferro pelas bactérias entéricas (DE LORENZO; MARTINEZ, 1988). Segundo Johnson (1991), em ambientes com condições adversas para obtenção de ferro, como sangue e urina, cepas com o sistema de aerobactina tem vantagem de crescimento.

A produção de exotoxinas por cepas de *E. coli* é responsável pela resposta inflamatória presente nas infecções. A hemolisina, uma toxina extracelular, lisa eritrócitos e outros tipos celulares, liberando citocinas estimulando a resposta inflamatória (MURRAY et al., 1998; SAYLERS; WHITT, 2002). Essa hemolisina é secretada pela maioria das *E. coli* hemolíticas e é codificada pelo gene *hly* localizado em plasmídeos (CAVALIERI; BOHACH; SNYDER, 1984; WELCH; HULL; FALKOW, 1983). Ela age criando poros nas membranas celulares eucarióticas que liberam componentes citoplasmáticos (SAYLERS; WHITT, 2002). Além da lise de eritrócitos, esta hemolisina é considerada tóxica a outras células do hospedeiro, entre elas leucócitos, células endoteliais e células do epitélio renal, contribuindo para inflamação, lesão tecidual e combate às defesas do organismo (GARCIA; LE BOUGUENEC, 1996; USEIN et al., 2001).

Outro fator de virulência das ExPEC é a capacidade de resistência à atividade bactericida do soro. Tal habilidade é codificada pelo gene *iss* (increased serum survival), uma proteína de membrana que interfere com a atividade complemento do soro (JOHNSON et al., 2001). Este gene bloqueia o complexo terminal do sistema do complemento que atua na membrana celular causando a opsonização e lise da célula bacteriana. Desta forma, ele confere à bactéria resistência a esse mecanismo de defesa do hospedeiro (BINNS et al., 1982).

A proteína uropatogênica específica (*usp*), identificada em uma ilha de patogenicidade, age como uma bactericina conferindo à bactéria maior infectividade (KURAZONO et al., 2000). Está relacionada às *E. coli* uropatogênicas tanto em humanos quanto em animais de estimação, sugerindo a hipótese desses últimos serem reservatórios para as ITUs humanas (DRESCHER et al., 2006; WEBER et al., 2006).

2.6 Caracterização molecular bacteriana

O estudo dos fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, gerados a partir da amplificação de sequências repetitivas existentes no genoma bacteriano, através da

utilização de oligonucleotídeos específicos pela PCR é capaz de demonstrar a variabilidade genética presente em uma espécie de bactéria (SAIKI et al., 1988). A descoberta de que os genomas procarióticos continham sequências repetitivas de DNA expandiu as metodologias de biologia molecular para estudos de variabilidade clonal em muitas espécies bacterianas, incluindo *E. coli* (CHANSIRIPORNCHAI et al., 2001). Algumas técnicas moleculares de tipagem baseadas em PCR utilizam “primers” homólogos a essas sequências que, após a amplificação, geram um perfil específico para cada amostra bacteriana (VERSALOVIC et al., 1991).

O número de cópias de sequências ERIC varia com a espécie: na *E. coli*, alguns autores estimam esse número em 30 cópias (DUCHAD et al., 2003) enquanto que outros relatam números variando de 30 a 50 (MARTIN et al., 1992). As sequências ERIC compreendem um conjunto de sequências conservadas distribuídas no genoma da maioria das espécies de eubactérias e estão presentes apenas em regiões intergênicas, dentro de regiões transcritas (HULTON et al., 1991).

De acordo com Johnson e Russo (2005), com a utilização da ERIC-PCR é possível discriminar linhagens em nível de subespécies devido à ampla distribuição desses elementos no genoma de vários membros das enterobactérias.

Apesar da PFGE e RFLP estarem entre as melhores técnicas de caracterização molecular, por apresentarem grande capacidade de diferenciação entre as amostras bacterianas analisadas, sendo também as metodologias mais usadas, estes métodos exigem grande quantidade de DNA, além de serem demoradas, requerem equipamentos caros e mão-de-obra especializada (SILVEIRA et al., 2002).

Desta forma, o uso destas técnicas de identificação de características específicas possibilita melhor entendimento da patogenia de doenças extraintestinais, podendo auxiliar na definição de estratégias de controle ou prevenção de enfermidades associadas às ExPEC (RILEY, 2004).

2.7 Antimicrobianos

Segundo Wright (2007), a procura pelo homem por substâncias capazes de eliminar ou inibir o crescimento de micro-organismos foi influenciada primeiramente pela aceitação da teoria microbiana e, conseguinte, pela ideia de que doenças infecciosas poderiam ser combatidas pela eliminação dos micro-organismos infectantes. Desta forma, a busca por drogas eficientes e com baixos efeitos colaterais para a célula hospedeira, desenvolveu os estudos sobre antimicrobianos, incluindo antibióticos e quimioterápicos. Os antibióticos, então, referem-se a substâncias produzidas por micro-organismos que tem a capacidade de inibir o crescimento ou destruir micro-organismos causadores de doenças, sendo a penicilina, produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* o primeiro exemplar dessa classe. Já os quimioterápicos referem-se a substâncias químicas sintetizadas artificialmente em laboratório, sendo as sulfas os primeiros quimioterápicos desenvolvidos.

A ação de um antimicrobiano depende, primeiramente, da interação deste com o micro-organismo. Esta interação pode ser iniciada por um processo ativo específico da célula, aumentando a concentração intracelular do antimicrobiano, ou por difusão passiva, sendo que não há necessidade de ligação específica da droga com componentes intracelulares (JAWETZ et al., 1998).

Os mecanismos de ação da maioria dos antimicrobianos não estão totalmente elucidados. Porém, esses mecanismos podem ocorrer através da inibição da síntese da parede celular, inibição da função da membrana celular, inibição da síntese de proteínas (inibição da tradução do material genético), inibição da síntese de ácidos nucleicos ou ação como antimetabólicos (JAWETZ et al., 1998).

Os antimicrobianos inibidores da síntese da parede celular contêm um núcleo básico comum, o anel betalactâmico, e uma região variável conforme o subtipo. Esta classe apresenta capacidade de inibir a síntese de peptideoglicano, componente da parede celular, acoplando-se ao receptor desta parede e bloqueando a transpeptidação que ancora o peptideoglicano. As ligações entre tetrapeptídeos de cadeias adjacentes são impedidas ocasionando perda da rigidez da parede celular

(PELCZAR Jr. et al., 1997; LOMAR; DIAMENT, 1998; JAWETZ et al., 1998; TAVARES, 2001).

Estes antimicrobianos atuam sobre células em crescimento, portanto inativas na fase estacionária e em células que não possuem parede celular (micobactérias, bactérias em forma de L e protoplastos que regeneram a parede celular) (PELCZAR Jr. et al., 1997; LOMAR; DIAMENT, 1998; JAWETZ et al., 1998; TAVARES, 2001).

São considerados betalactâmicos a penicilina, ampicilina, cefalosporinas de primeira geração (cefalotina), segunda (cefuroxima e cefoxitina), terceira (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) e quarta geração (cefepina), que inibem a enzima envolvida na transpeptidação; as bacitracinas que interferem com o carreador lipídico que transporta os precursores da parede pela membrana; e as vancomicinas que se ligam diretamente à porção lipídica do peptideoglicano (PELCZAR Jr. et al., 1997; LOMAR; DIAMENT, 1998; JAWETZ et al., 1998; TAVARES, 2001).

Os antimicrobianos inibidores das funções das membranas celulares englobam as polimixinas e os ionóforos. As polimixinas alteram a permeabilidade da membrana plasmática microbiana ligando-se entre os fosfolípidos; tem ação detergente. Os ionóforos têm a capacidade de penetrar na membrana plasmática, permitindo assim a entrada e saída de compostos ionizados na célula (PELCZAR Jr. et al., 1997; LOMAR; DIAMENT, 1998; JAWETZ et al., 1998; TAVARES, 2001).

Os antimicrobianos responsáveis pela inibição da síntese de proteínas atuam em diversos sítios dos ribossomos. Dentre eles estão o grupo dos aminoglicosídeos, dos macrolídeos e das tetraciclínas (PELCZAR Jr. et al., 1997; LOMAR; DIAMENT, 1998; JAWETZ et al., 1998; TAVARES, 2001).

O grupo dos aminoglicosídeos atua sobre o micro-organismo induzindo a síntese anormal de proteínas, ligando-se a uma proteína específica da subunidade 30S do ribossomo microbiano bloqueando a atividade do complexo de iniciação para a formação de peptídeos. Após isto, a leitura correta do RNA mensageiro e a síntese da proteína correspondente são impedidas e ocorre lise dos polissomas em monossomas incapazes de sintetizar proteínas, eventos que levam a bactéria à morte. São considerados aminoglicosídeos os seguintes antibióticos: amicacina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina entre outros (JAWETZ et al., 1998).

Os macrolídeos são capazes de inibir a síntese proteica através da ligação à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, podendo também atuar sobre fungos e protozoários através da indução de distorções em suas membranas celulares por interferir com os esteróis. Exemplos de macrolídeos bactericidas são a eritromicina, espiramicina, oleandomicina e leucomicinas; e anfotericina B, agindo sobre fungos (PELCZAR Jr. et al., 1997; LOMAR; DIAMENT, 1998; JAWETZ et al., 1998; TAVARES, 2001).

O grupo das tetraciclina é inibidor da síntese proteica no ribossomo bacteriano, bloqueando o receptor na subunidade 30S que se ligaria ao t-RNA durante a transdução gênica. São consideradas bacteriostáticas e caracterizam-se por possuírem amplo espectro de ação (JAWETZ et al., 1998).

Alguns antimicrobianos podem atuar como inibidores da replicação e transcrição do ácido nucleico de várias formas. A novobiocina atua impedindo a replicação do DNA afetando seu desenovelamento. As ansamicinas (rifamicina) inibem a enzima RNA polimerase, impedindo a transcrição. Já as quinolonas inibem a DNA-girase, afetando a replicação, transcrição e reparo. Dentre as quinolonas estão o ácido nalidíxico e as fluorquinolonas (enrofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina) (PELCZAR Jr. et al., 1997; LOMAR; DIAMENT, 1998; JAWETZ et al., 1998; TAVARES, 2001).

Os antimetabólicos são um grupo de substâncias naturais ou sintéticas que inibem e antagonizam metabólitos, sendo esta inibição competitiva e dependente do grau de afinidade entre a enzima do análogo e do metabólito natural. Podem ser incorporados a polímeros como DNA, RNA e proteínas, resultando em alterações de informação e também podem agir como inibidores seletivos da transcriptase reversa (PELCZAR Jr. et al., 1997; LOMAR; DIAMENT, 1998; JAWETZ et al., 1998; TAVARES, 2001).

Um exemplo destes agentes são as sulfonamidas que possuem uma estrutura central semelhante à estrutura de um composto bioquímico natural denominado ácido para amino benzoico (PABA), requerido como um precursor do ácido tetraidrofólico (THFA), que é capaz de sintetizar aminoácidos e timina, componentes essenciais ao DNA. Desta forma, as enzimas bacterianas são “enganadas” pela droga, resultando em uma inibição competitiva da atividade da enzima, no caso a

diidropteroato sintetase e por consequência o THFA não será produzido pela célula. Assim, as sulfonamidas são consideradas compostos bacteriostáticos (JAWETZ et al., 1998).

2.8 Resistência a antimicrobianos

A resistência bacteriana a drogas antimicrobianas não é um fenômeno recente, documentada desde a introdução dos antibióticos. Já a resistência a múltiplas drogas emergiu no final dos anos 50 estando relacionada tanto pela pressão de seleção pelo uso destas, quanto por causas intrínsecas do micro-organismo ou à sua adaptação ao ambiente, envolvendo mutações dos genes de resistência e troca de material genético entre os micro-organismos (WRIGHT, 2007).

A emergência da resistência antimicrobiana, especialmente a multirresistência, é um sério problema de saúde pública, combinando o aumento de sua frequência e severidade e a diminuição do desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos pelas companhias farmacêuticas, tornando-se um desafio à ciência (COHEN, 2000; SIQUEIRA et al., 2008).

A resistência gerada pela pressão seletiva dá-se pelo uso de drogas antimicrobianas utilizadas de forma errônea, desnecessária ou terapêutica para o tratamento de infecções em Medicina veterinária e humana, favorecendo os genótipos resistentes. Desta forma, tem-se observado um aumento extraordinário do nível de resistência a agentes antimicrobianos, apresentado pelas bactérias de origem humana ou animal (ANGULO, et al., 2000; TEUBER, 2001; LEVY, 2002).

Porém, a evolução da resistência, e a multirresistência em particular, entre bactérias gram-negativas tem sido principalmente atribuída a elementos genéticos móveis e transferência horizontal de genes. (DÍAZ-MEJÍA et al., 2008). Plasmídeos, moléculas de DNA extragênicos contendo genes de resistência antimicrobiana, podem ser transferidos entre cepas de uma mesma espécie ou espécies diferentes por conjugação. (NORMAND et al., 2000).

Com os avanços sobre o conhecimento das bases genéticas da resistência antimicrobiana, estudos têm sido direcionados à resistência da flora normal. Antibióticos usados como aditivos alimentares em animais de produção têm sido relacionados com o surgimento de cepas resistentes da microbiota, sendo um motivo de preocupação já que a microbiota pode atuar como um reservatório potencial de genes de resistência, podendo ser transferidas para uma bactéria patogênica dentro de um mesmo hospedeiro (SUMMERS, 2002).

Além disso, estas bactérias resistentes podem ser transferidas por humanos por transmissão pessoa a pessoa, exposição ambiental e em contato direto com animais. Cães e gatos representam fontes potenciais de disseminação de genes de resistência antimicrobiana devido ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos nestes animais e seu íntimo contato com humanos (GUARDABASSI et al., 2004), ressaltando que cepas de *E. coli* multirresistentes também têm sido isoladas da flora de animais de companhia (GUARDABASSI et al., 2004; MOYAERT et al., 2006).

2.9 Papel dos animais de companhia na sociedade

Desde o início da domesticação dos animais, a interação destes com o ser humano vêm mudando, especialmente a relação entre as famílias com o seu animal de estimação. Atualmente são considerados muito mais que animais, sendo considerados membros da família com acesso irrestrito a casa (SIMJEE et al., 2002). Cada vez mais aumenta o número de lares com habitantes de outras espécies que não a humana, sendo estes cães, gatos, iguanas, hamstes, pássaros, peixes, serpentes, entre outros (BERNARD; DEMARET, 1996).

O mercado pet vem apresentando um crescimento extraordinário confirmado pelos dados comerciais envolvidos neste segmento. Segundo dados de pesquisas do IBOPE-NPD, estima-se em 31,287 milhões a população de animais de estimação no Brasil, sendo que 22.276 milhões envolve cães e 9.011 milhões, gatos; 71% das residências possuem cães e 17,5% dos lares possuem gatos. Com isso, o setor de pet shops vem apresentando um crescimento, em média, de 17% ao ano, desde

1995, segundo a Associação dos revendedores e prestadores de Serviços ao mercado Pet – ASSOFAUNA (CEMIGNANI, 2003).

Dias et al. (2004) explicam que o aumento de animais de estimação pode ser atribuído à solidão e medos que acometem a sociedade frente aos problemas que a vida moderna traz. Desta forma, os laços afetivos que envolvem o homem e os animais, desde tempos remotos e com explicações bioevolutivas, tornam-se, diante deste panorama, ainda mais fortes. A presença do animal acalma e alegra, aliviando as dores e tensões do dia (FARACO; SEMINOTTI, 2004), podendo considerar cães e gatos como uma terapia para problemas de solidão. Isto é notório principalmente em pessoas idosas. Além dos animais poderem lhes servir de companhia, buscam, também, alguém de quem possam cuidar e trocar afeto. Todavia, não só os idosos buscam estas características nos animais de estimação. Famílias recém-formadas, com filhos em crescimento, estão valorizando a posse de cães como parte do relacionamento das crianças com animais e os benefícios propagados por psicólogos e educadores. Há cada vez mais casais jovens buscando possuir animais de estimação. É crescente o número de pessoas, especialmente mulheres, vivendo sozinhas e que fazem dos cães e gatos suas companhias. São pessoas dispostas a direcionar parte de sua renda para garantir a saúde e o bem-estar dos seus pets (BECKER, 2003).

O relacionamento entre ser humano e o animal é muito amplo, compreendendo desde pesquisa aplicada, clínica, terapêutica e estudos de comunicação (FUCHS, 1988). Psicólogos, assistentes sociais, médicos e veterinários acreditam que os animais despertam emoções comunicativas nas pessoas, facilitando o processo de autoconhecimento (ROCHA, 2005). Além disso, pesquisadores concluíram que a relação entre as pessoas e seus animais de estimação gera grande melhora psicológica e emocional, diminuindo tensões entre os membros da família, aumentando a compaixão inclusive no convívio social (BARKER, 1999). Crianças mantidas em convívio com animais adquirem mais segurança, compreensão, zelo, amor e iniciativa (SOUZA, 2005; BARKER, 1999).

Com tantos benefícios creditados à interação entre homem e animais, terapias utilizando estes últimos estão sendo disseminadas pelo mundo todo. Estas terapias denominadas “pet therapy”, terapia assistida por animais (TAA), atividades

assistidas por animais (AAA) ou terapia facilitada por cão (TFC) abrangem tanto crianças como idosos, destacando-se a equinoterapia e a aquarioterapia como métodos terapêuticos comprovadamente benéficos, ajudando muitas pessoas com doenças graves como câncer, Alzheimer, Síndrome de Down e Autismo (OLIVA, 2004; SERPEL, 1993; BARAK et al., 2001; BARKER, 1999). Os campos de aplicação da “pet therapy” são muito vastos e vão desde a terapia de reabilitação para pacientes com distúrbios físicos ou comportamentais, à prevenção de estados depressivos e até com a pura e simples função de formação e educação das crianças em idade evolutiva (CHIEPPA, 2002). Estas terapias fazem parte de instituições como abrigo de idosos, orfanatos e até presídios (BUSSOTI, et al., 2005).

Apesar da proximidade dos animais com o homem implicar em riscos à saúde para este último frente às zoonoses e à possibilidade de troca de micro-organismos patogênicos resistentes e/ou de seus genes entre animais e seres humanos (GUARDABASSI et al., 2004), os animais de estimação apresentam relevantes benefícios para quem os possui. Além disso, a interação com esses indivíduos de maneira harmoniosa, respeitando limites entre homem-animal, pode ser a forma mais eficaz de reduzir estes riscos (NETA, 2004, apud ANDERLINI; ANDERLINI, 2007).

3 – OBJETIVOS

Tendo em vista o crescente papel dos animais de companhia junto à população humana, a similaridade entre cepas de *E. coli* entre animais e humanos e a importância da piometra em cadelas, por ser uma das causas mais importante de óbito nesta espécie, o presente estudo teve como objetivos:

- Isolar e identificar cepas de *E. coli* provenientes de conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas diagnosticadas com piometra;
- Avaliar a susceptibilidade “in vitro” frente aos antimicrobianos das bactérias isoladas;
- Estudar a prevalência de genes codificadores de fatores de virulência uropatogênicos das cepas obtidas;
- Testar a semelhança genética entre as cepas isoladas de conteúdo intra uterino e boca de cadelas com piometra;

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Coleta e cultura das amostras

As amostras foram obtidas de 28 cadelas diagnosticadas com piometra em clínicas veterinárias da cidade de Ituverava, SP, as quais foram submetidas a tratamento cirúrgico (ovarioisterectomia). Durante este procedimento foram colhidas amostras de conteúdo intra-uterino, fezes e boca. As amostras uterinas foram obtidas por punção em agulha de grosso calibre (40x16), realizada somente após a retirada cirúrgica do útero; as fecais e orais foram colhidas com swab com algodão estéril, imediatamente após o término da cirurgia, sob supervisão de um médico veterinário. Todos os animais submetidos à coleta já estavam passando por um tratamento prévio com antibiótico especificamente o ceftiofur.

As amostras coletadas foram transportadas ao laboratório em meio Stuart, sendo então transferidas para o meio ágar MacConkey (Mac-Difco Laboratories, Detroit, USA), semeadas por esgotamento e incubadas à 37° por 24 horas. De cada placa foram isoladas 5 colônias que apresentavam características presuntivas de *E. coli* sendo estas submetidas aos testes bioquímicos confirmatórios, utilizando-se, de acordo com o sugerido por Koneman et al. (1997), o meio de RUGAI modificado (testes bioquímicos de indol, glicose, sacarose, produção de gás, lisina, motilidade, uréia e H₂S) (Figura 01). Cada colônia foi semeada em RUGAI modificado pelo método de picada na base do meio associada a técnica de estrias no ápice. Tais amostras foram incubados por 18 horas à 37°C e então realizou-se a interpretação dos resultados (Figura 2), levando-se em conta a tabela do perfil bioquímico das enterobactérias (KONEMAN et al., 1997), de forma que a produção de Indol é observada no papel da face interna da tampa após a adição de uma ou duas gotas do reativo de Kovacs. O aparecimento da cor vermelha indica reação positiva e o não aparecimento indica reação negativa; a LTD (Desaminação do L-triptofano) é observada do ápice até a base da inclinação do meio. O aparecimento da cor verde garrafa é considerado reação positiva para organismos sacarose negativos e o

aparecimento da cor marrom, positiva para os sacarose positivos; a fermentação da sacarose é observada entre o pico da inclinação até a base da mesma. O aparecimento da cor amarela indica reação positiva e o não aparecimento, reação negativa; a fermentação de glicose é observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. A reação foi considerada positiva com o aparecimento da cor amarela no meio; a produção de gás é observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento de bolhas ou o arredondamento do meio indica que a reação foi positiva e o não aparecimento, negativa; a hidrólise-produção de urease é observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor azul escura indica reação positiva e o meio inalterado, reação negativa; a produção de H_2S é observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor preta indica reação positiva e o não aparecimento, reação negativa. A descarboxilação da lisina é observada na fase inferior, sendo que o aparecimento da cor púrpura indica que a reação foi positiva e o aparecimento da cor amarela indica que a reação foi negativa; a motilidade é observada na face inferior. Qualquer crescimento observado além da linha de picada foi considerado positivo.

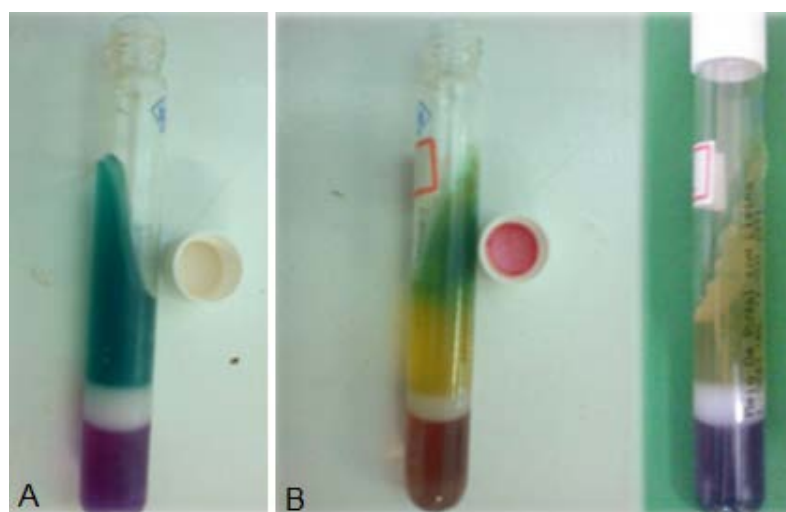


Figura 1 – A: Tubo com meio Rugai Modificado sem inóculo; **B:** Amostras positivas para *E. coli* sacarose negativa (à esquerda) e sacarose positiva (à direita) em meio Rugai Modificado.

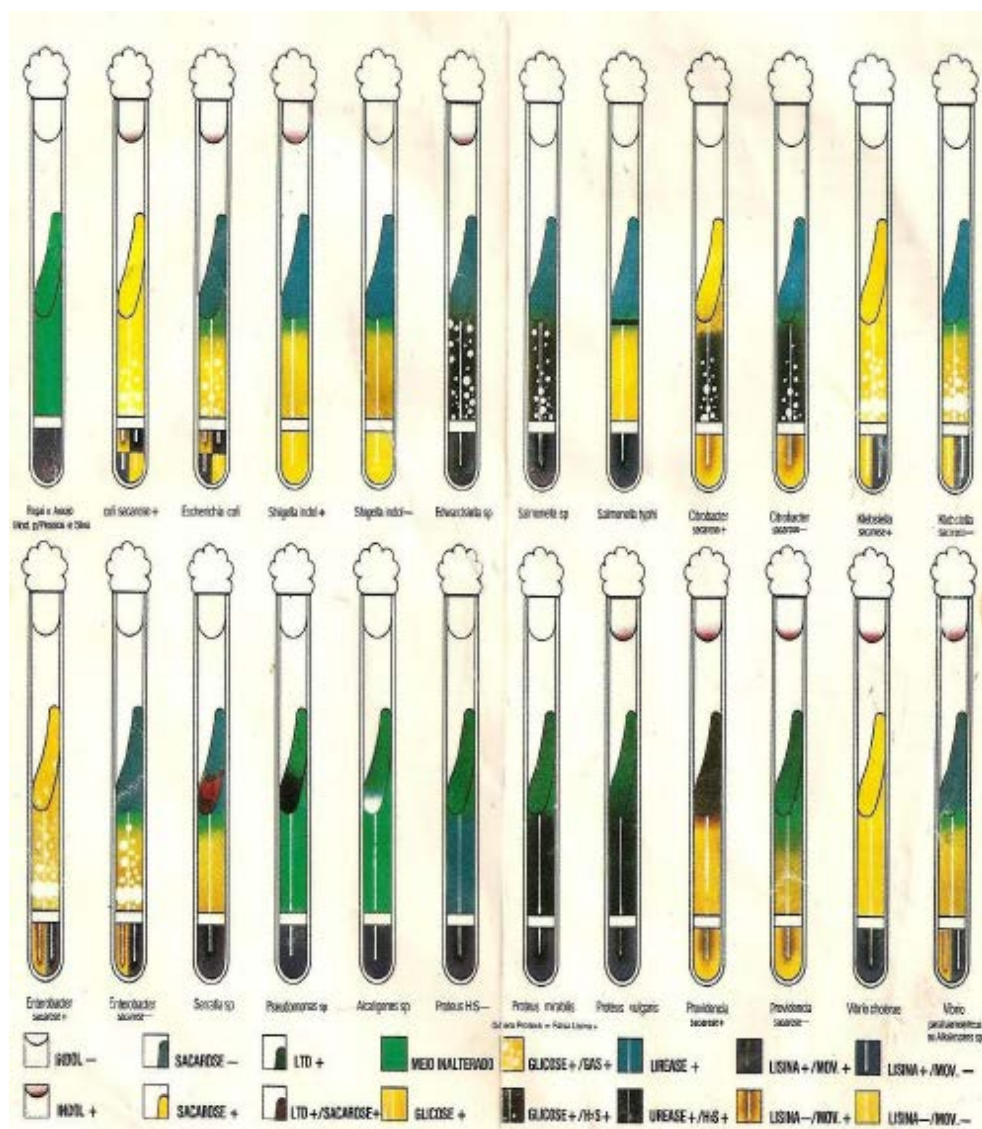


Figura 2 - Identificação bioquímica de Enterobactérias contendo provas de Indol, LTD, sacarose, glicose, produção de gás, urease, H₂S, lisina e motilidade. Fonte: Cecon- Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico.

4.2 – Manutenção das amostras de *E.coli*

Após o isolamento, as amostras obtidas foram mantidas das seguintes maneiras: repique semanal em placas de Petri ou quinzenal em tubo de ágar inclinado, sempre em meio de LB (Luria Bertani), conservadas a 4°C em geladeira;

em freezer a -20°C em tubos de plástico de microcentrífuga contendo 50% de um crescimento bacteriano em LB (Luria Bertani) líquido e 50% de uma solução de glicerol a 70%.

4.3 – Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano para o procedimento da PCR para a detecção dos genes foi feita segundo técnica proposta por Keskimaki et al. (2001), sendo o DNA liberado do micro-organismo por lise térmica.

Cada amostra de *E. coli* foi incubada à 37°C por 12 horas em um tubo de ensaio contendo meio de cultura Luria Broth (caldo LB). A seguir, 1 mL dessa cultura foi transferido para um eppendorf e submetido à centrifugação a 14000 rpm, descartando-se o sobrenadante. O conteúdo bacteriano foi resuspendido em 250 µl de água Milli-Q esterilizada e agitado em vortex por 30 segundos. A centrifugação e a ressuspensão foram novamente realizadas e em seguida o tubo eppendorf foi submetido ao calor em água fervente por 10 minutos para lise da parede celular. Após outra centrifugação a 14000 rpm efetuada durante 30 segundos, 150 µl do sobrenadante foi coletado e estocado a -20 °C como molde de DNA (DNA template).

4.4 – Procedimento da PCR para a detecção dos genes

Os genes codificadores de fatores de virulência foram detectados através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Primers foram utilizados para detectar os genes associados à expressão de adesinas (*fimH* – fimbria do tipo 1; *papGII* – pili de adesão); toxinas (*hlyF* – hemolisina); sideróforos (*iucD* - aerobactina); genes que codificam resistência às defesas do hospedeiro (*iss*) e invasão do entodélio urogenital (*usp*) (Tabela 1).

Foram preparadas reações de 20 µL contendo 4 µL de DNA, 0,4 µL de dNTP (2 mM), 3,6 µL de solução tampão 10X (100 mM Tris-HCl [pH 8.8] 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 0,8 µL de cada primer (40 mM) e 0,2 µL Taq DNA polimerase e água Milli-Q até o volume final. Para amplificação, o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient foi programado para 1 ciclo a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e um ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da reação foram acrescentados com 5 µL de carga de tintura (0,25% azul de bromofenol em 50% de glicerol) e então separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (1µg/mL) em tampão TEB. Utilizou-se o marcador molecular de 100 pb. Os produtos de amplificação foram visualizados e fotografados sob exposição do gel em luz ultravioleta.

Tabela 1 – PCR: Combinação de primers para detecção de genes de virulência, temperatura de anelamento e tamanho dos ensaios amplificados.

Genes	Comentários	Sequência (5'-3')	TA (°C)	Tamanho (pb)	Referência
<i>fimH</i>	Fímbria do tipo I	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	63	508	Siqueira et al., 2009
<i>iucD</i>	Aerobactina	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	63	602	Siqueira et al., 2009
<i>hlyF</i>	Hemolisina	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	62	450	Johnson et al., 2008
<i>usp</i>	Proteína uropatogênica	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT	66	1000	Siqueira et al., 2009
<i>iss</i>	Resistência ao soro	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	57	323	Johnson et al., 2008
<i>papGII</i>	Fímbria P	GGAATGTGGTGATTACTCAAAGG TCCAGAGACTGTTCAAGAAGGAC	63	562	Siqueira et al., 2009

TA- temperatura de anelamento

4.5 – Pesquisa de semelhança genética entre as cepas *E. coli* provenientes do conteúdo intra uterino e boca

4.5.1 Extração do DNA

As cepas de *E. coli* selecionadas para análise de diversidade genética por Rep-PCR foram multiplicadas em meio de cultura LB. Para extração de DNA o *pellet* de células bacterianas foi lavado com tampão PBS (8 mM Na₂HPO₄.12H₂O; 1,76 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) e logo após, ressuscitado em 600 µL de tampão para extração de DNA [Tris-HCl 100mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0, NaCl 100mM e SDS 0,5% (p/v)]. As amostras foram agitadas em vortex e mantidas em banho-maria a 65°C por 40 minutos, sendo agitadas a cada 15 minutos, gentilmente. Posteriormente, foram acrescentados 300µL de acetato de potássio 5M à solução que foi misturada gentilmente por inversão e mantida no gelo por 30 minutos. Após, acrescentou-se às amostras 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguido de agitação em vortex. Para separação das fases e limpeza do DNA, as amostras foram centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 10°C. Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para tubos novos, cuidadosamente para não tocar na interface inferior. Visando a precipitação do DNA, acrescentou-se 1000µL de etanol absoluto gelado ao sobrenadante coletado e a solução, após ser misturada gentilmente, foi mantida em freezer -20°C 'over night'.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 13.400 x g por 17 minutos a 10°C. A fase líquida foi descartada e o *pellet* foi lavado com 1000µL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o *pellet* foi colocado para secar em temperatura ambiente ±25°C por 60 minutos. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 30µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0).

A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-100 (Uniscience), medindo-se a

absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação da absorbância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, que se estiver no intervalo de 1,8 a 2,0 caracteriza um DNA de boa qualidade (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

4.5.2 Análise da diversidade genética

A análise da diversidade genética entre os microrganismos selecionados foi realizada mediante emprego da técnica REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e BOX-PCR. Os primers utilizados para o estudo foram: Rep1R-I (5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3') e Rep2-I (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3') constituindo a REP-PCR, ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') e ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') constituindo a ERIC-PCR e, BOX A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') a BOX-PCR (VERSALOVIC et al., 1994).

Para a reação PCR de amplificação dos fragmentos, utilizou-se tampão 1X [100 mM Tris-HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40]; $MgCl_2$ 2 mM; dNTP's 0,2 mM, 1,5 U de *Taq DNA polimerase*, 5 pmol de primer, 60 ng de DNA genômico e água pura estéril q.s.p. 20 μ L. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) programado para realizar 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 40°C para REP-PCR, 50°C para ERIC-PCR e 55°C para BOX-PCR, e 72°C por 1,5 minuto. Para finalizar um ciclo a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Assim, os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad).

O conjunto de bandas obtidas pela amplificação dos primers de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR foi analisado manualmente. Assim, foram construídas

matrizes binárias com o número 1 significando presença de banda e o número 0, ausência. A matriz binária foi convertida em uma matriz de distância com auxílio do software PAUP Versão 4.0b10 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) (SWOFFORD, 2002), que foi utilizada na construção do dendrograma, para a visualização das relações genéticas estabelecidas entre os diferentes isolados. O dendrograma foi construído pelo método da Distância (Nei, 1986) e algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*) pelo software MEGA 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2007). O mesmo software foi utilizado para o cálculo das distâncias genéticas entre os isolados.

4.6 – Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

A sensibilidade a antimicrobianos das cepas de *E.coli* foi verificada pelo método de difusão em disco como recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). Foram testados 12 antibióticos, sendo estes ácido nalidíxico (NAL, 30µg), ampicacina (AMI, 30µg), norfloxacin (NOR, 10 µg), cefoxitina (CFO, 30 µg), tobramicina (TOB, 10 µg), nitrofurantoina (NIT, 300 µg), ampicilina (AMP, 10µg), cefalotina (CFL, 30µg), ceftriaxona (CRO, 30µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), gentamicina (GEN, 10µg) e tetraciclina (TET, 30µg).

Cada cepa identificada como *E. coli* foi inoculada com auxílio de swabs estéreis em uma placa com meio ágar Mueller-Hinton e então foram colocados os discos com agentes antimicrobianos de forma equidistante. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação, através das medidas dos diâmetros dos halos de inibição obtidas com uma régua milimetrada, segundo a tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados. Como controle, utilizaram-se as cepas de referência *E. coli* ATCC 25922 e ATCC 35218.

5 – RESULTADOS

5.1 – Origem das amostras

As 28 cadelas pesquisadas, com idades entre 2 a 16 anos, apresentavam secreção vaginal purulenta, inapetência, apatia e graus variáveis de desidratação quando examinadas e, após a realização de hemograma e testes bioquímicos para verificação das funções hepáticas e renais foram submetidas a tratamento cirúrgico (ovarioisterectomia). De cada um destes animais foram obtidas 3 amostras (conteúdo uterino, boca e fezes), obtendo-se um total de 84 amostras. As frequências da enfermidade, segundo as raças, foram: SRD (sem raça definida) (39%), Poodle (28%), Pit Bull (7%), Fox Paulistinha (7%), Dog Alemão (3%), Pinsher (3%), Shih Tzu (3%), Lhasa Apso (3%) e Dachshund (3%) (Figura 3).

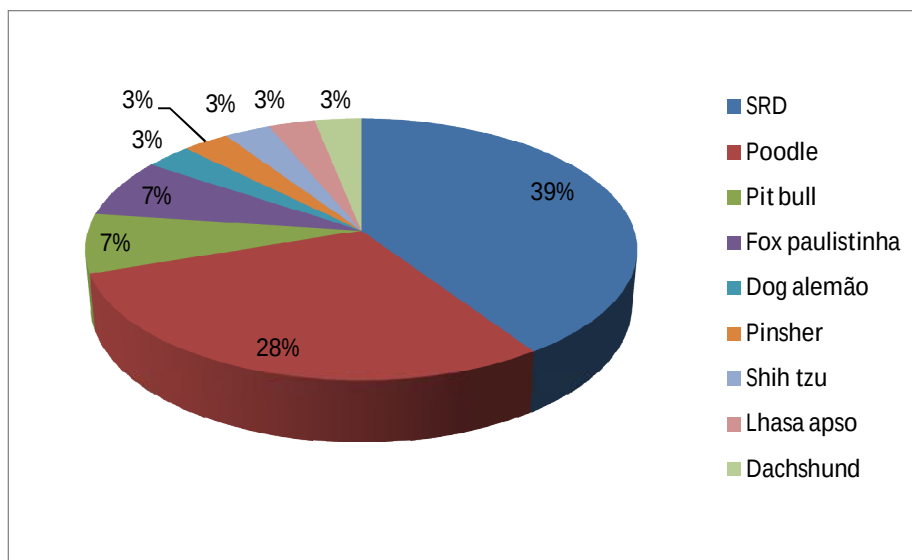


Figura 3 – Distribuição da frequência de ocorrência de piometra em diferentes raças de cadelas.

5.2 – Isolamento bacteriano

Das 84 amostras (amostras de conteúdo intra uterino, boca e fezes) e urina de cada animal), houve crescimento bacteriano em 57 (67,8%). Destas 57 amostras, dezesseis (28,0%) foram provenientes de conteúdo intra uterino, dezesseis (28,0%) da boca e vinte e cinco (43,8%) das fezes; não houve crescimento bacteriano em 32,1% das amostras (Figura 4).

Destas 16 amostras de conteúdo intra uterino com crescimento bacteriano, foram identificadas seis (38%) culturas puras de *E. coli*, cinco (31%) culturas puras de *Enterobacter* spp., duas (12%) culturas puras de *Edwardsiella* spp, duas (12%) culturas mistas de *E. coli* e *Enterobacter* spp. e uma (6%) cultura mista de *E. coli* e *Klebsiella* spp. (Figura 5).

Com relação à boca, foram identificadas sete (44,7%) culturas puras de *E. coli*, quatro (25%) culturas puras de *Enterobacter* sp., uma (6%) cultura pura de *Edwardsiella* sp., uma (6%) culturas puras de *Proteus* sp. e três (19%) culturas mistas de *E. coli* e *Enterobacter* sp (Figura 6).

Já nas amostras fecais, foram identificadas treze (52%) culturas puras de *E. coli*, cinco (20%) culturas puras de *Enterobacter* sp., duas (8%) culturas puras de *Edwardsiella* sp., uma (4%) cultura pura de *Citrobacter* sp. e quatro (16%) culturas mistas de *E. coli* e *Enterobacter* sp (Figura 7).

Destas 28 cadelas estudadas, 9 (32,1%) apresentaram crescimento de *E. coli* no conteúdo intra uterino, sendo que 6 (21,4%) apresentaram crescimento concomitante em pelo menos dois dos materiais pesquisados. A partir destas 6 cadelas foram selecionadas 25 cepas de *E. coli* isoladas do conteúdo intra uterino, 26 cepas da boca e 19 cepas das fezes.

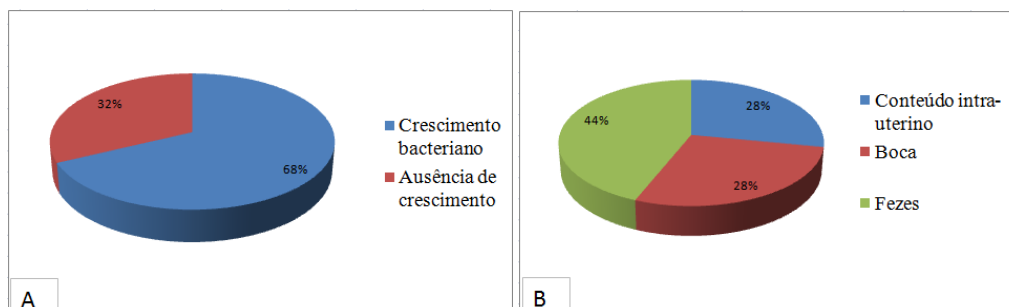


Figura 4 – Distribuição da frequência de crescimento bacteriano entre as amostras coletadas de cadelas com piometra (A); Distribuição da frequência da origem das amostras entre as que tiveram crescimento bacteriano (B).

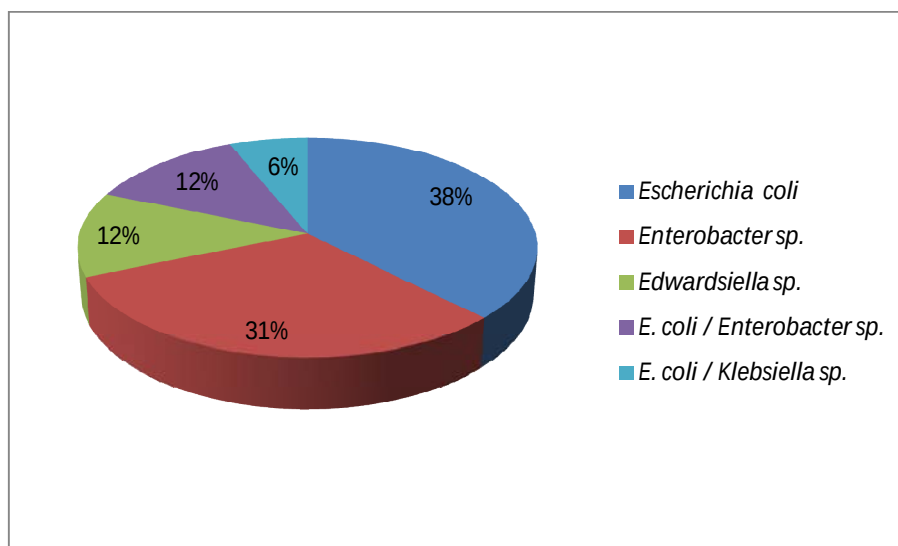


Figura 5 – Distribuição da frequência de ocorrência de micro-organismos isolados de conteúdo intra uterino de cadelas com piometra.

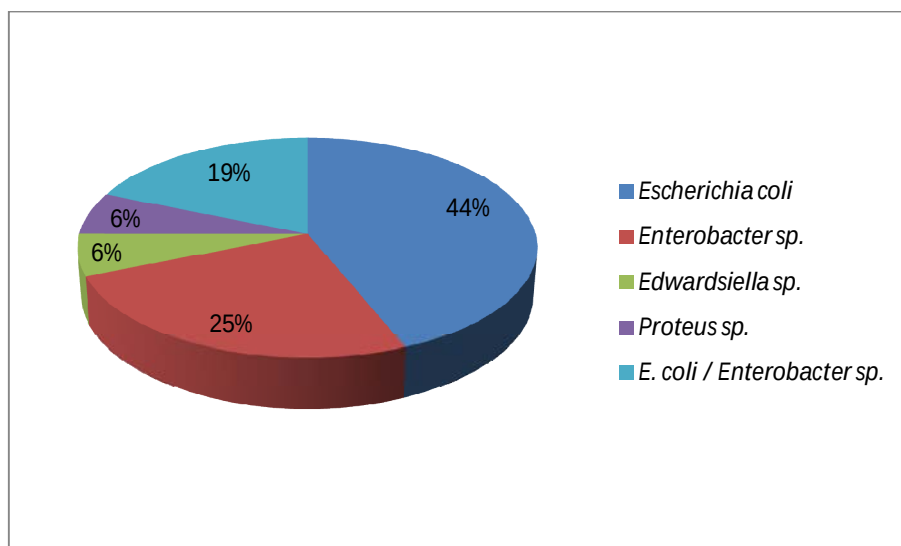


Figura 6 – Distribuição da frequência de ocorrência de micro-organismos isolados da boca de cadelas com piometra.

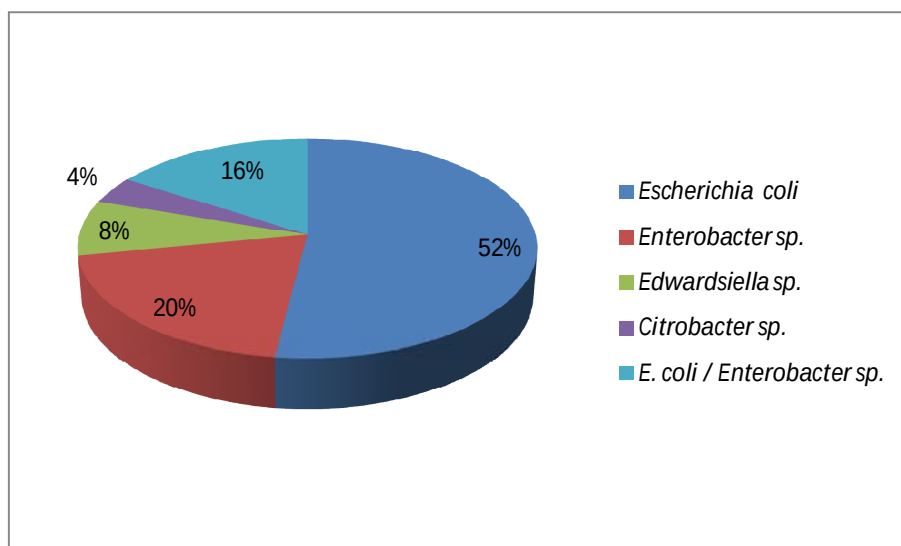


Figura 7 – Distribuição da frequência de ocorrência de micro-organismos isolados das fezes de cadelas com piometra.

5.3 – Pesquisa de genes precursores de fatores de virulência

Um total de 70 cepas de *E. coli* isoladas foram submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR) a fim de se detectar a presença de genes precursores de fatores de virulência, sendo estes *fimH*, *iucD*, *hlyF*, *usp*, *iss* e *papGII* (Figuras 8 a 11).

Dessas 70 cepas, 67 (98,7%) foram positivas para *fimH*; 13 (18,5%) para *iucD*; 18 (25,7%) para *hlyF*; 12 (17,7%) para *usp*; e 19 (27,1%) para *iss*. Nenhuma amostra foi positiva para *papGII* (Tabela 2). Das 70 amostras, 2 (2,8%) não apresentaram positividade para nenhum dos fatores de virulência testados e 30 destas amostras (42,8%) apresentaram mais de um fator de virulência (Tabela 3).

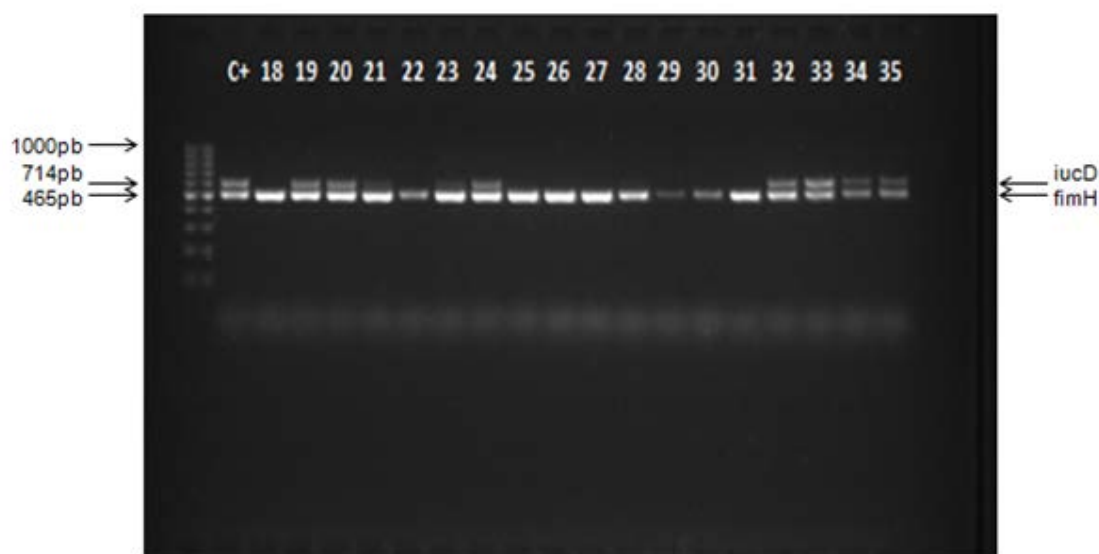


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo iucD + e fimH +; Demais canaletas isolados fimH e iucD positivos.

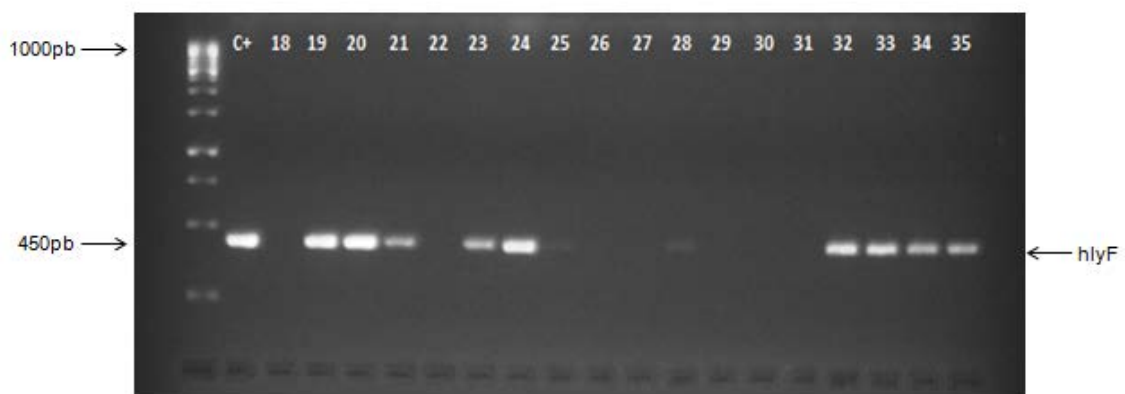


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo hlyF +; Demais canaletas isolados hlyF positivos.

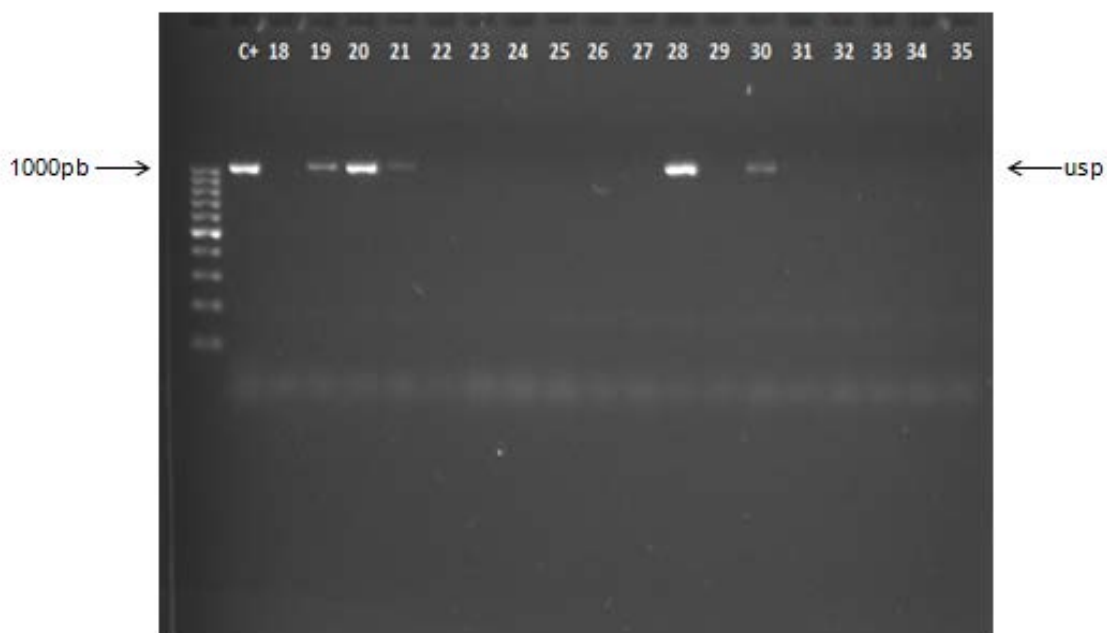


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo usp +; Demais canaletas isolados usp positivos.

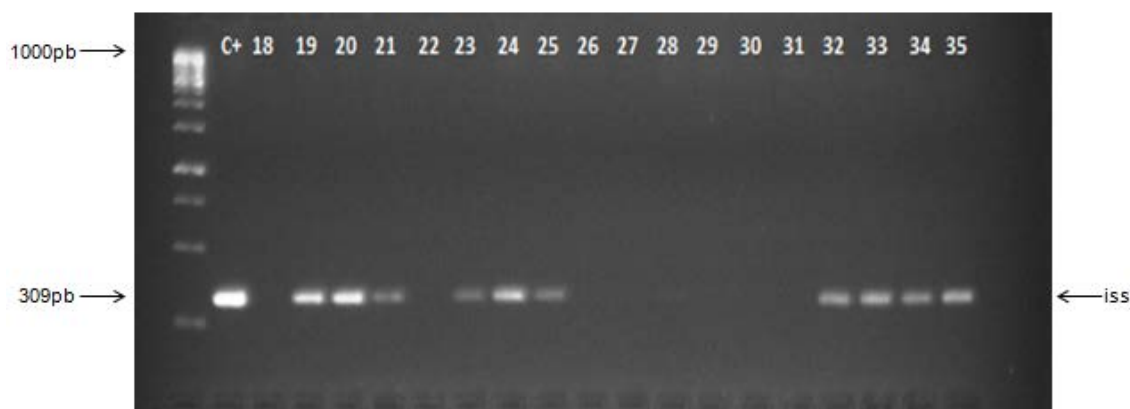


Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo iss +; Demais canaletas isolados iss positivos.

Tabela 2 - Prevalência dos genes codificadores dos fatores de virulência identificados por PCR em cepas de *Escherichia coli* provenientes cadelas com piometra.

Gene	Frequência de prevalência
<i>fimH</i>	67 (95,70%)
<i>iucD</i>	13 (18,50%)
<i>hlyF</i>	18 (25,70%)
<i>usp</i>	12 (17,10%)
<i>iss</i>	19 (27,10%)
<i>papGII</i>	0 (0,00%)

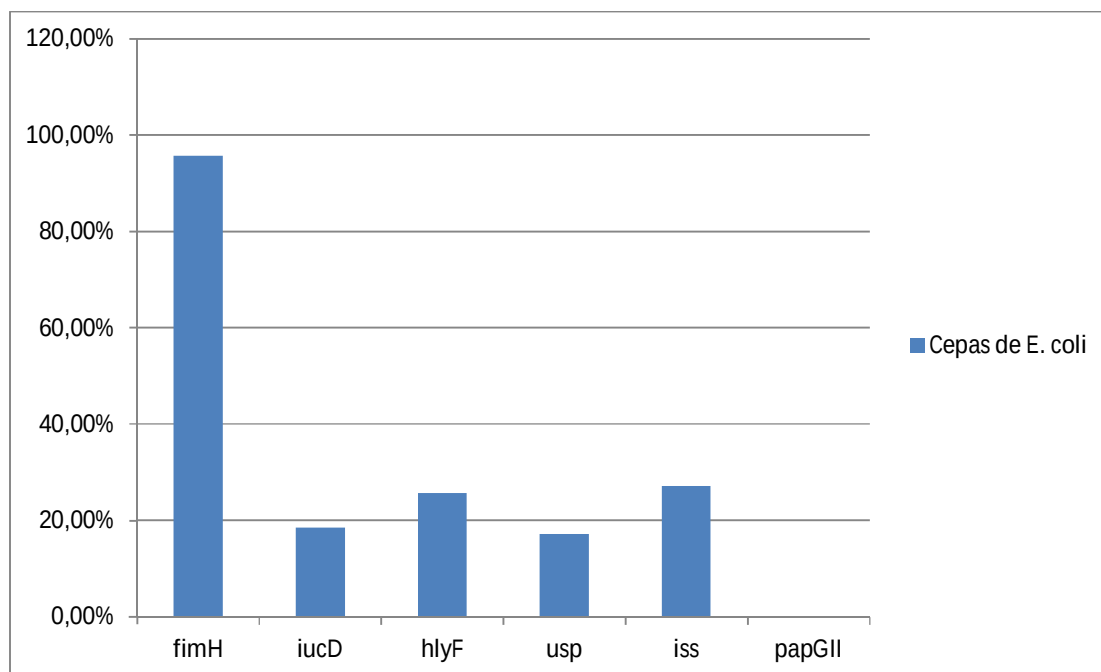


Figura 12 – Representação da prevalência de genes de virulência de cepas de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra.

Tabela 3 – Associação de genes codificadores dos fatores de virulência identificados por PCR em cepas de *E. coli* provenientes de conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas com piometra.

Origem	Número de associações	Número de amostras	Genótipo
Conteúdo intra uterino (n=25)	1 gene	16	<i>fimH</i>
	2 genes	6	<i>hlyF iss</i> <i>fimH hlyF</i> <i>fimH usp</i>
	3 genes	1	<i>fimH hlyF iss</i>
	5 genes	1	<i>fimH iucD hlyF usp iss</i>
Boca (n=26)	1 gene	14	<i>fimH</i>
	2 genes	5	<i>fimH iss</i> <i>fimH usp</i>
	3 genes	4	<i>fimH iucD iss</i> <i>fimH iucD hlyF</i> <i>fimH hlyF iss</i>
	4 genes	2	<i>fimH iucD hlyF iss</i>
Fezes (n=19)	1 gene	7	<i>fimH</i>
	2 genes	1	<i>fimH iss</i>
	3 genes	3	<i>fimH hlyF iss</i> <i>fimH iucD iss</i>
	4 genes	5	<i>fimH hlyF usp iss</i> <i>fimH iucD hlyF iss</i>
	5 genes	2	<i>fimH iucD hlyF usp iss</i>

De acordo com a origem, o gene *fimH* foi encontrado em 23 (92%) das cepas de *E. coli* isoladas do conteúdo intra uterino, em 26 (100%) das isoladas da boca e 18 (94,7%) das isoladas das fezes; o gene *iucD* foi encontrado em 1 (4%) das cepas de *E. coli* isoladas do conteúdo intra uterino, em 5 (19,2%) das isoladas da boca e 7 (36,8%) das isoladas das fezes; o gene *hlyF* foi encontrado em 4 (16%) das cepas de *E. coli* isoladas do conteúdo intra uterino, em 5 (19,2%) das isoladas da boca e 9 (47,3%) das isoladas das fezes; o gene *usp* foi encontrado em 5 (20%) das cepas de *E. coli* isoladas do conteúdo intra uterino, em 4 (15,3%) das isoladas

da boca e 3 (15,7%) das isoladas das fezes; o gene *iss* foi encontrado em 3 (12%) das cepas de *E. coli* isoladas do conteúdo intra uterino, em 5 (19,2%) das isoladas da boca e 11 (57,8%) das isoladas das fezes (Tabela 4).

Tabela 4 – Prevalência dos genes codificadores dos fatores de virulência identificados por PCR em cepas de *E. coli* provenientes do conteúdo intra-uterino, da boca e das fezes de 6 cadelas com piometra.

Gene	Conteúdo intra uterino (n=25)	Boca (n=26)	Fezes (n=19)
<i>fimH</i>	23 (92,0%)	26 (100,0%)	18 (94,7%)
<i>iucD</i>	1 (4,0%)	5 (19,2%)	7 (36,8%)
<i>hlyA</i>	4 (16,0%)	5 (19,2%)	9 (34,6%)
<i>usp</i>	5 (20,0%)	4 (15,3%)	3 (11,5%)
<i>iss</i>	3 (12,0%)	5 (19,2%)	11 (42,3%)
<i>papGII</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

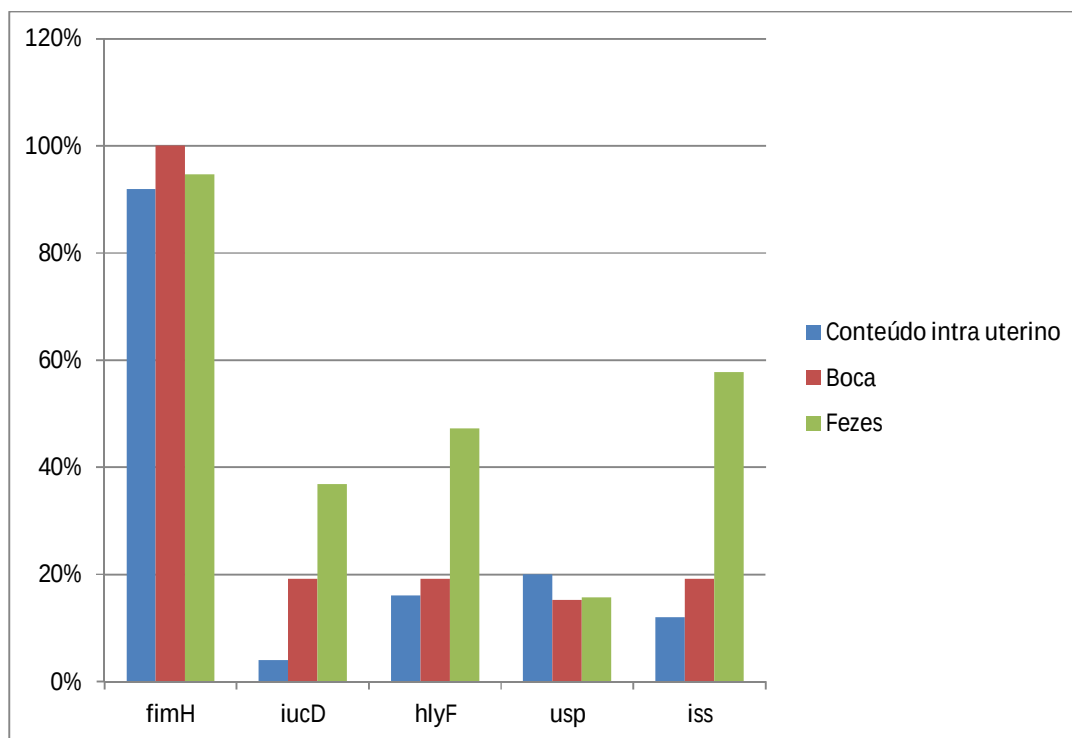


Figura 13 – Representação da prevalência de genes de virulência de cepas de *E. coli* isoladas de conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas com piometra.

5.4 – Pesquisa de cepas semelhantes provenientes de conteúdo intra uterino e boca

Os resultados obtidos com as técnicas de REP, ERIC e BOX-PCR, revelaram uma grande diversidade genética entre as bactérias isoladas provenientes de animais diferentes, porém as bactérias do mesmo animal, isoladas da boca e do conteúdo intra uterino, mostraram-se com grande similaridade.

A amplificação com os oligonucleotídeos REP 1R-I/REP 2-I (Figura 14) possibilitou a amplificação de até nove bandas de DNA, dependendo do isolado, com tamanho de aproximadamente 100 a 1500 pb; a de ERIC 1R/ERIC 2 (Figura 15) permitiu a visualização de até nove bandas com o tamanho de aproximadamente 100 a 2072 pb e a de BOX A1R (Figura 16) permitiu a visualização de até oito bandas também com o mesmo tamanho.

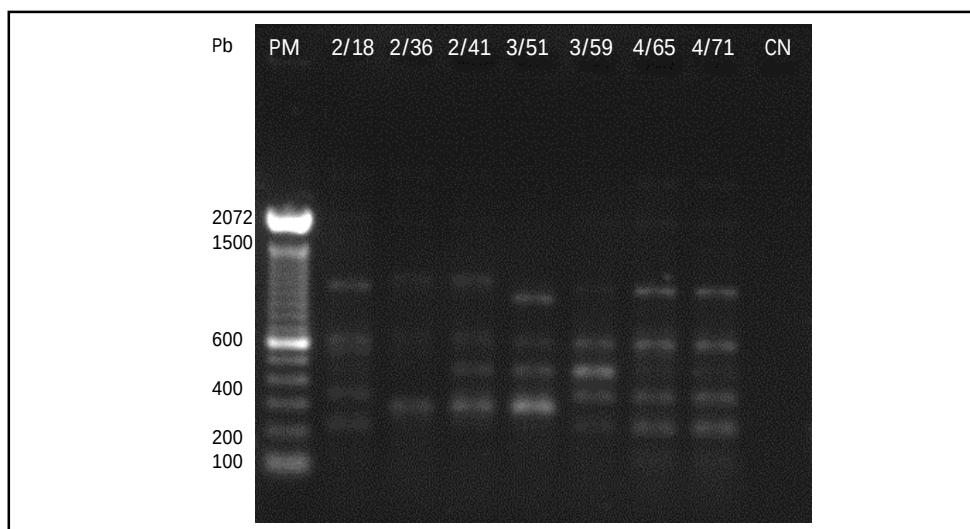


Figura 14 – Padrão de amplificação utilizando-se os primers Rep1R-I e Rep2-I (REP-PCR). PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). CN: Controle negativo (mix de reação sem DNA).

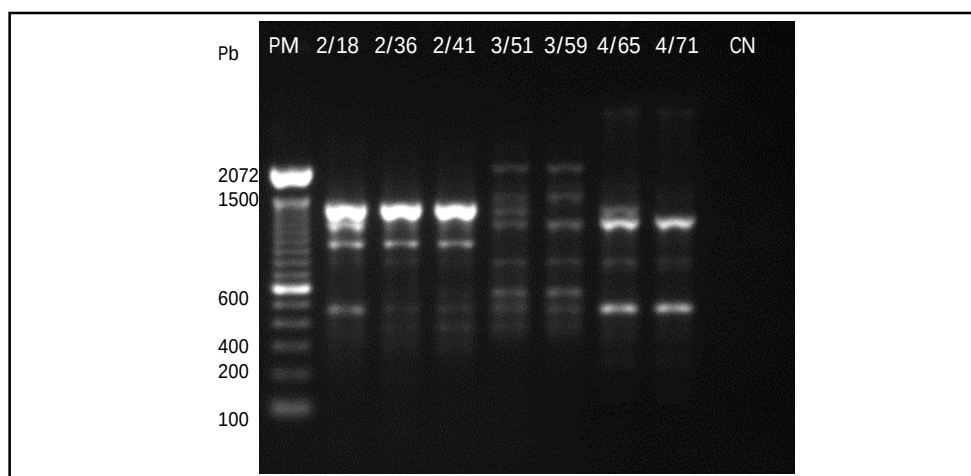


Figura 15 – Padrão de amplificação utilizando-se os primers ERIC1R e ERIC2 (ERIC-PCR). PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). CN: Controle negativo (mix de reação sem DNA).

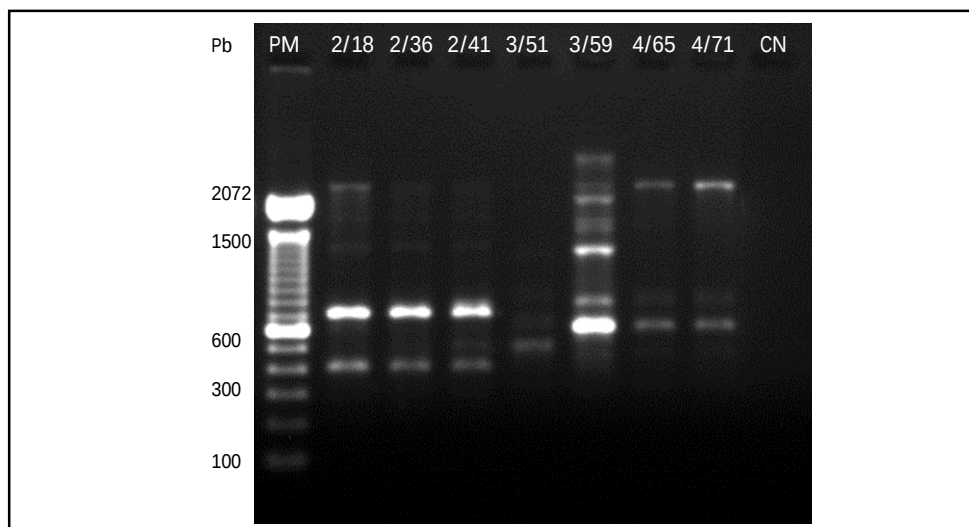


Figura 16 – Padrão de amplificação utilizando-se os primers BOX A1R (BOX-PCR). PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). CN: Controle negativo (mix de reação sem DNA).

Os resultados de distância genética entre os isolados de *E. coli* foi obtido pelo método de Tamura-Nei (1993), pelo padrão de bandejamento da REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, podendo ser visualizados nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

Na Tabela 5 observa-se que ocorreu nenhuma distância genética entre as cepas 4/65 com a 4/71, isoladas do animal 4, mostrando que ambas apresentam 100% de similaridade. O animal 2 apresentou pouca distância genética entre as cepas 2/36 e 2/41, sendo que a cepa 2/18 apresentou uma maior distância, indicando maior similaridade entre as duas primeiras. Entre o animal 3, as cepas 3/51 e 3/59 apresentaram maior distância genética, indicando aproximadamente 60% de similaridade.

Na Tabela 6 onde visualizam-se os resultados para ERIC, observa-se pequena distância genética entre as cepas 4/65 e 4/71, porém desmascarando a técnica de REP, onde estas apresentaram 100% de similaridade. Entre as cepas 2/36 e 2/41 não houve distância genética, indicando 100% de similaridade, o que não se observou pela primeira técnica. Entretanto, nesta, também pode se observar maior distância genética da cepa 2/18 em relação às outras isoladas do mesmo animal. Já as cepas provenientes do animal 3 mostraram-se com certa distância

genética, porém menor que na técnica de REP-PCR, demonstrando aproximadamente, 90% de similaridade.

Na tabela 7, visualizando-se os resultados da BOX, observa-se nenhuma distância genética entre as cepas 4/65 e 4/71, concordando com a técnica de REP que também indicou estas cepas com 100% de similaridade. Entre as cepas 2/36 e 2/41 não houve distância genética, indicando 100% de similaridade, o que também se observou para ERIC. Além disso, nesta, pode se observar certa distância genética da cepa 2/18 em relação às outras isoladas do mesmo animal, porém com menor distância quando comparada com as outras duas técnicas. Já as cepas provenientes do animal 3 mostraram distância genética similar à observada pela REP-PCR.

Tabela 5 – Distância Genética entre os isolados de *E. coli* obtido pelo método de Tamura-Nei (1993), pelo padrão de bandejamento da REP-PCR.

Animal/cepa	Isolados de <i>Escherichia coli</i>						
	2/18	2/36	2/41	3/51	3/59	4/65	4/71
2/18	-						
2/36	0.545						
2/41	0.636	0.091					
3/51	0.727	0.364	0.273				
3/59	0.455	0.636	0.545	0.455			
4/65	0.455	0.636	0.727	0.636	0.182		
4/71	0.455	0.636	0.727	0.636	0.182	0.000	-

Tabela 6 – Distância Genética entre os isolados de *E. coli* obtido pelo método de Tamura-Nei (1993), pelo padrão de bandejamento da ERIC-PCR.

Isolados de <i>Escherichia coli</i>							
Animal/cepa	2/18	2/36	2/41	3/51	3/59	4/65	4/71
2/18	-						
2/36	0.375						
2/41	0.375	0.000					
3/51	0.625	0.500	0.500				
3/59	0.750	0.625	0.625	0.125			
4/65	0.125	0.500	0.500	0.500	0.625		
4/71	0.250	0.625	0.625	0.625	0.500	0.125	-

Tabela 7 – Distância Genética entre os isolados de *E. coli* obtido pelo método de Tamura-Nei (1993), pelo padrão de bandejamento da BOX-PCR.

Isolados de <i>Escherichia coli</i>							
Animal/cepa	2/18	2/36	2/41	3/51	3/59	4/65	4/71
2/18	-						
2/36	0.111						
2/41	0.111	0.000					
3/51	0.667	0.556	0.556				
3/59	0.667	0.778	0.778	0.444			
4/65	0.556	0.667	0.667	0.556	0.333		
4/71	0.556	0.667	0.667	0.556	0.333	0.000	-

Nas Figuras 17 a 19 observa-se a quantidade de grupos e subgrupos formados devido à diversidade genética das bactérias, respectivamente, para o REP, ERIC e BOX.

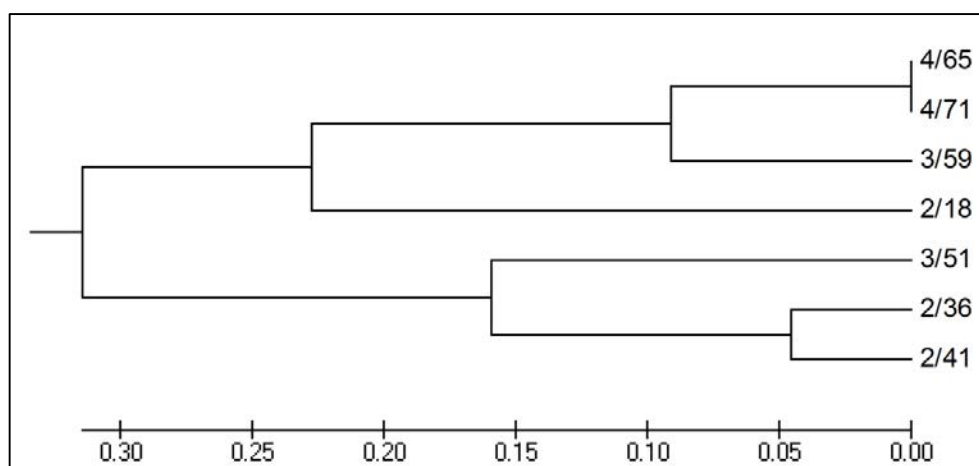


Figura 17 – Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando as distâncias genéticas obtidas com a REP-PCR.

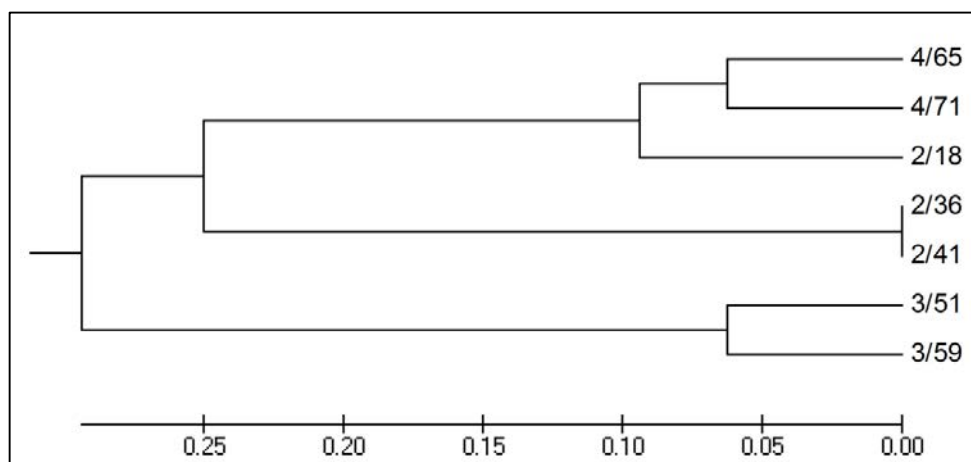


Figura 18 – Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando as distâncias genéticas obtidas com a ERIC-PCR.

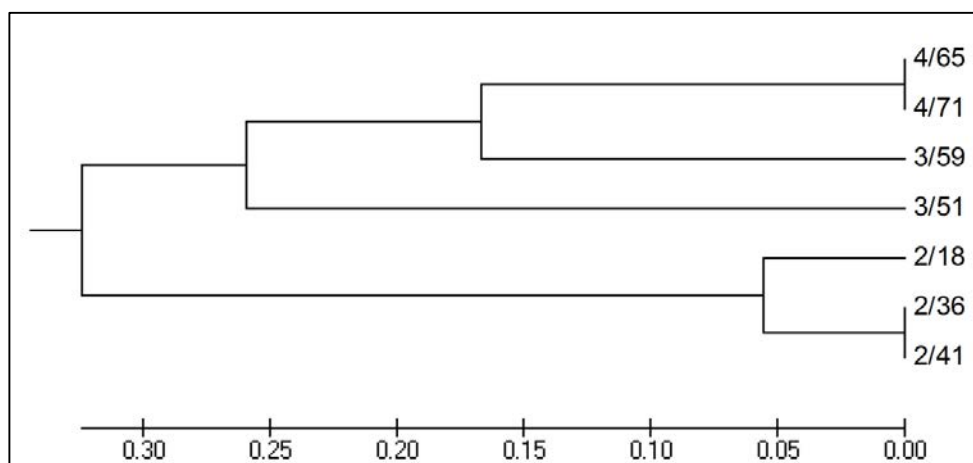


Figura 19 – Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando as distâncias genéticas obtidas com a BOX-PCR.

5.5 – Antibiógrama

Quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, foram avaliadas 70 cepas de *E. coli* isoladas a partir de conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas com piometra frente a 12 agentes antimicrobianos.

A cefalotina, a ampicilina, a tetraciclina e a nitrofurantoina apresentaram um alto percentual de amostras resistentes com 67,1%, 65,7%, 61,4% e 58,5%, respectivamente. Entre os antimicrobianos com maior efetividade *in vitro* estão a ceftriaxona (98,5%), o norfloxacino (94,2%), o ciprofloxacino (92,8%), a tobramicina (82,8%), a gentamicina (80,0%) e a ceftioxima (72,8%) (Tabela 8).

Tabela 8 – Frequências de sensibilidade e resistência de cepas de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra.

Antimicrobianos	Sensibilidade		Resistência	
	n	%	n	%
Norfloxacino	66	94,2	4	5,7
Cefoxitina	51	72,8	19	27,1
Tobramicina	58	82,8	12	17,1
Ciprofloxacino	65	92,8	5	7,1
Gentamicina	56	80	14	20
Ceftriaxona	69	98,5	1	1,4
Tetraciclina	27	38,5	43	61,4
Amicacina	38	54,2	32	45,7
Nitrofurantoina	29	41,4	41	58,5
Ampicilina	24	34,2	46	65,7
Ácido Nalidíxico	42	60	28	40
Cefalotina	23	32,8	47	67,1

n – número de cepas

Dentre as 25 cepas de *E. coli* isoladas do conteúdo intra uterino, observou-se maior resistência aos antimicrobianos cefalotina (68,0%) e ampicilina (56,0%). Já os antimicrobianos com maior sensibilidade foram norfloxacino, ceftriaxona e tobramicina (100%).

Dentre as 26 cepas isoladas da boca, observou-se maior resistência aos antimicrobianos ampicilina (84,6%), tetraciclina (84,6%), cefalotina (65,3%) e nitrofurantoina (61,5%). A maior sensibilidade foi observada nos antimicrobianos ceftriaxona (100%), ciprofloxacino (96,2%) e norfloxacino (84,7%).

Já entre as 19 cepas isoladas das fezes, observou-se maior resistência aos antimicrobianos nitrofurantoina (78,9%), cefalotina (68,4%) e tetraciclina (63,1%). As maiores sensibilidades foram observadas nos antimicrobianos norfloxacino (100%), ceftriaxona (94,8%) e ciprofloxacino (89,5%). Estes dados demonstrando a resistência das cepas de acordo com a sua origem estão sumarizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas de conteúdo intra uterino, boca e fezes de 6 cadelas com piometra.

Antimicrobianos	Conteúdo intra uterino (n=25)	Boca (n=26)	Fezes (n=19)
Norfloxacino	0 (0,0%)	4 (15,3%)	0 (0,0%)
Cefoxitina	6 (24,0%)	6 (23,0%)	7 (36,8%)
Tobramicina	0 (0,0%)	6 (23,0%)	6 (31,5%)
Ciprofloxacino	2 (8,0%)	1 (3,8%)	2 (10,5%)
Gentamicina	3 (12,0%)	6 (23,0%)	5 (26,3%)
Ceftriaxona	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (5,2%)
Tetraciclina	9 (36,0%)	22 (84,6%)	12 (63,1%)
Amicacina	11 (44,0%)	10 (38,4%)	11 (57,8%)
Nitrofurantoina	11 (44,0%)	16 (61,5%)	15 (78,9%)
Ampicilina	14 (56,0%)	22 (84,6%)	10 (52,6%)
Ácido Nalidíxico	9 (36,0%)	11 (42,3%)	8 (42,1%)
Cefalotina	17 (68%)	17 (65,3%)	13 (68,4%)

Das 70 cepas analisadas em relação as 12 drogas antimicrobianas testadas, 12 cepas do conteúdo intra uterino (48,0%), 22 cepas isoladas da boca (84,6%) e 14 cepas isoladas de fezes (73,6%) apresentaram multirresistência a 2 ou mais classes de drogas antimicrobianas (Tabela 10). A Tabela 11 apresenta um grupo de cepas de *E. coli* isoladas do conteúdo intra uterino e da boca da mesma cadela exibindo uma similaridade de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos.

Tabela 10 – Caracterização da presença de determinantes de virulência, expressos na quantidade de genes e da presença dos fenótipos de resistência dos isolados conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas com piometra.

Amostra	Origem	Número de genes	Fenótipos de resistência
1*/1**	Útero	0	***CFL, NIT
1/2	Útero	2	AMP, NAL, CFO, CFL
1/3	Boca	1	Nenhuma resistência
1/5	Útero	2	CFO, CFL
2/8	Fezes	3	NIT
2/9	Boca	1	AMP, TET, CFL, NIT
2/10	Útero	1	AMP, NAL, AMI, TET, CFL, NIT
1/11	Boca	1	AMP, CFL
2/13	Útero	1	AMP, NAL, AMI, CFL, NIT
2/14	Útero	1	AMP, NAL, AMI, CFL, NIT
2/15	Útero	1	CFO, CFL, NIT
3/17	Útero	1	Nenhuma resistência
2/18	Útero	1	AMP, NAL, AMI, TET, CFL, NIT
1/19	Fezes	5	CFL
1/20	Fezes	5	Nenhuma resistência
1/21	Fezes	4	AMI, CFL, TOB
3/22	Fezes	1	AMP, TET, NIT
1/23	Fezes	3	AMP, AMI, CFO, GEN, TET, CFL, NIT, TOB
1/24	Fezes	4	AMP, NAL AMI, CFO, TET, CFL, NIT, TOB
1/25	Boca	2	AMP, NAL, AMI, CFO, TET, CFL
1/26	Boca	1	NAL AMI, CFO, NIT, TOB
1/27	Boca	1	AMI, CFL, TOB
4/28	Útero	2	CFL

3/29	Boca	1	AMP, AMI, TET, CFL
4/30	Boca	2	AMP, GEN, TET, CFL, NOR, NIT, TOB
5/31	Útero	1	CFL
5/32	Boca	4	AMP, TET, CFL, NIT
5/33	Boca	4	NAL, AMI, TET
2/34	Fezes	4	AMP, NAL, AMI, TET, CFL, NIT
2/35	Fezes	4	AMI, TET, CFL, NIT
2/36	Boca	1	AMP, NAL, AMI, TET, NIT
2/37	Boca	1	AMP, AMI, TET, CFL
4/38	Boca	1	AMP, TET, CFL
2/39	Fezes	4	NAL
2/40	Boca	1	AMP, NAL, AMI, GEN, TET, NIT
2/41	Boca	1	AMP, NAL, TET, CFL, NIT
2/42	Fezes	3	AMI, CFL, NIT
5/43	Útero	1	AMP
5/44	Boca	3	AMP, NAL, GEN, TET, CFL, NIT, TOB
5/45	Útero	1	CFL
5/46	Útero	1	AMP, NAL, AMI, CFO, GEN
5/47	Boca	3	AMP, CFO, GEN, TET, CFL, NOR, NIT, TOB
5/48	Boca	3	AMP, NAL, TET, CFL, NIT
3/49	Boca	1	AMP, GEN, TET, CFL, NOR, NIT, TOB
3/50	Boca	1	AMP, NAL, AMI, CFO, TET, CFL, NOR, NIT, TOB
3/51	Boca	1	AMP, TET, NIT
3/52	Boca	1	AMP, TET, NIT
3/53	Fezes	1	TET, CFL, NIT
3/54	Fezes	1	AMP, TET, CFL, NIT
3/55	Fezes	1	TET, NIT

3/56	Fezes	1	AMP, NAL, AMI, CFO, TET, NIT
3/57	Útero	1	CFL
3/58	Útero	1	Nenhuma resistência
3/59	Útero	1	TET, NIT
3/60	Útero	1	AMP, NAL, AMI, TET
4/65	Boca	2	AMP, TET
4/66	Boca	2	AMP, NAL, TET, CFL
4/67	Boca	2	AMP, TET, NIT
4/68	Útero	2	Nenhuma resistência
4/69	Útero	5	AMP, NAL, TET, CFL
4/70	Útero	2	AMP, AMI, TET, CFL
4/71	Útero	2	AMP, TET
6/81	Útero	1	AMP, AMI, TET, CFL, NIT, CIP
6/84	Útero	1	AMP, NAL, AMI, CFO, GEN, CFL, NIT, CIP
6/85	Útero	3	AMP, AMI, GEN, CFL, NIT
6/86	Boca	3	AMP, AMI, CFO, GEN, TET, CFL, NOR, NIT, CIP
6/97	Fezes	1	AMP, NAL, AMI, CFO, GEN, TET, CFL, NIT, TOB
6/98	Fezes	2	AMP, NAL, AMI, CFO, GEN, CFL, NIT
6/99	Fezes	0	AMP, NAL, AMI, CFO, GEN, TET, CRO, CFL, NIT, CIP, TOB
6/100	Fezes	1	NAL, AMI, CFO, GEN, TET, CRO, CFL, NOR, NIT, CIP, TOB

*número da cadela; **número do isolado; ***NAL: ácido nalidíxico, AMI: amicacina, NOR: norfloxacin, CFO: cefoxitina, TOB: tobramicina, NIT: nitrofurantoina, AMP: ampicilina, CFL: cefalotina, CRO: ceftriaxona, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina.

Tabela 11 – Comparação de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos em cepas de *Escherichia coli* isoladas do conteúdo intra uterino (UT) e da boca de cadela com piometra.

Animal/isolado	Origem	Fatores de virulência	Resistência antimicrobiana
2*/18**	UT	<i>fim</i>	AMP,NAL,AMI, TET,CFL,NIT
2/36	Boca	<i>fim</i>	AMP,NAL,AMI,TET,NIT
2/41	Boca	<i>fim</i>	AMP,NAL,TET,CFL,NIT
3/59	UT	<i>fim</i>	TET,NIT
3/51	Boca	<i>fim</i>	AMP,TET,NIT
4/71	UT	<i>fim,usp</i>	AMP,TET
4/65	Boca	<i>fim,usp</i>	AMP,TET

6 – DISCUSSÃO

A piometra pode ocorrer em todas as raças de caninos e acomete todas as idades. Porém, animais com mais de 6 anos apresentam esta enfermidade com maior frequência (ENGEVALL et al., 2001; COGGAN et al., 2008; HAGMAN, 2012; JITPEAN, et al., 2012). Coggan (2005) relatou em sua pesquisa a maior frequência de piometra em cadelas sem raça definida, o que também foi observado no presente estudo (Figura 3). Isso se deve, provavelmente, ao fato de cães de raça indeterminada constituir a maior parcela da população canina. Alguns autores, entretanto, relatam que a variação da incidência de piometra entre diferentes espécies pode ser devido a predisposição genética (ENGEVALL, et al., 2001; RIVERA et al., 2009).

A presente pesquisa também mostrou maior ocorrência de piometra em cadelas com mais de 6 anos de idade, o que concorda com a literatura anteriormente citada. Deve-se ressaltar que animais com essa idade passaram por repetidas ações da progesterona, hormônio predominante na fase do diestro, durante o ciclo reprodutivo. Assim, apresentam maior susceptibilidade à piometra, visto que alterações hormonais favorecem a multiplicação bacteriana e diminuem a atividade leucocitária (FELDMAN; NELSON, 1996; SUGIURA et al., 2004).

Normalmente, cadelas não apresentam bactérias no útero (OLSON; MATHER, 1978). Porém, neste tipo de afecção uterina a bactéria mais comumente envolvida é a *E. coli* (CHEN, et al., 2003; COOGAN et al., 2008). As frequências de isolamento de cepas desta bactéria em cadelas acometidas por piometra são, em geral, altas: 96% (SANTOS FILHO, 2008); 90% (FRANSSON et al., 1997); 85% (SANDHOLM, VASENIUS; KIVISTÖ, 1975); e 79% (COOGAN et al., 2008). No presente estudo (Figura 5), a bactéria mais frequentemente encontrada foi a *E. coli*, corroborando com os dados da literatura. A habilidade da *E. coli* em aderir em sítios receptores específicos no endométrio estimulado por progesterona explica a maior prevalência de *E. coli* nas piometras (FELDMAN; NELSON, 1996; GROOTERS, 1994).

Outras espécies bacterianas também são encontradas, como *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus* spp (OLIVEIRA et al., 1988); *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Citrobacter diversus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* e *Corynebacterium jeikeium* (COGGAN et al, 2008). Tais bactérias são comumente observadas na flora intestinal normal dos animais, o que reforça a hipótese da ocorrência de migração fecal-uterina nos casos de piometra (JOHNSON et al., 2001; WADAS et al., 1996; HANGMAN; KÜHN, 2002). Na presente pesquisa, as bactérias também isoladas de conteúdo intra-uterino (Figura 5) foram *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Edwardsiella* spp. Pereira et al. (2009) relataram em sua pesquisa, grande ocorrência destes micro-organismos em fezes de cães saudáveis. Deve-se ressaltar que bactérias residentes no intestino dos animais (Figura 7) ou até mesmo as isoladas do conteúdo intra uterino foram encontradas na boca (Figura 6) devido ao fato das cadelas terem o hábito de lambem a região do períneo. Isso demonstra mais um risco de contaminação para humanos que mantêm maior proximidade com seus animais de estimação.

Frente à patogenia das infecções causadas por linhagens de *E. coli*, a adesão das bactérias às células do hospedeiro é o primeiro passo para que ocorra a interação parasita e hospedeiro e, conseqüentemente, o estabelecimento da infecção. As *E. coli* patogênicas extra intestinais possuem fatores de aderência específicos que lhes permitem colonizar diferentes sítios anatômicos (JOHNSON et al., 2001; KAPER, et al., 2004). Uma das adesinas, responsáveis por esta adesão das bactérias, é a Fimbria do Tipo 1. O gene *fimH*, principal gene do grupamento fim (*fimF*, *fimG* e *fimH*), é um gene precursor de fímbrias do tipo 1 (WOOD et al., 2006).

Santos Filho (2008) detectou a presença da sequência *fimH* em todas as amostras de conteúdo intra uterino e urina estudadas, dado semelhante ao obtido por Chen et al. (2003) em cadelas com piometra e por Johnson et al. (2003) em urina de cadelas com infecção do trato urinário. No presente estudo, o gene *fimH* foi detectado na maioria dos isolados provenientes de conteúdo intra uterino (92,0%), da boca (100,0%) e das fezes (94,7%).

A aquisição de ferro é outro fator que contribui para a virulência das *E. coli*, sendo os sistemas sideróforos um dos diversos mecanismos de sequestro de ferro

(SAYLERS & WHITT, 2002). A aerobactina, um sideróforo, é codificada pelo gene *iuc* (DE LORENZO & MARTINEZ, 1988). Coggan et al. (2008) identificaram 33,8% das cepas de piometra apresentando este gene o que difere do presente trabalho onde apenas 4,0% (1 cepa) proveniente da piometra possuía este gene (Tabela 4). Porém, uma frequência próxima à descrita por Coggan et al. (2008) foi identificada entre os isolados das fezes das cadelas com piometra no presente trabalho (36,8%) (Tabela 4).

Linhagens de *E.coli* envolvidas em infecção do trato urinário (ITU) e piometra geralmente expressam genes para citotoxinas, entre elas a hemolisina (gene *hly*) que é uma toxina formadora de poros que lisa não somente eritrócitos, mas também leucócitos, células endoteliais e células do epitélio renal (GARCIA; LE BOUGUENEC, 1996; USEIN et al., 2001). Wilson et al. (1988) citam em seu estudo que cepas de *E. coli* isoladas de cães e gatos com infecção do trato urinário têm alta prevalência do gene *hly*. Low et al. (1988), comparando genes *pap* e *hly* de cães e humanos com infecção do trato urinário, observaram que todos os isolados tinham o DNA similar, concluindo que algumas cepas de *E. coli* podem infectar tanto humanos como cães. Neste estudo o gene *hly* foi detectado em 16,0% das cepas provenientes do útero o que difere dos resultados de Chen et al. (2003) com isolados de piometra 52,0%, Coggan et al. (2008) com 34,4% e também dos resultados de Siqueira et al. (2009) com 34,6% para piometra. Por outro lado os resultados obtidos com cepas provenientes de fezes (34,6%) estão próximos aqueles descritos por Yuri et al. (1998) e Chen et al. (2003) para fezes de cachorros, 31,0% e 25,0% respectivamente (Tabela 4).

A ocorrência de uma proteína uropatogenica especifica (*usp*) foi descrita por Kurazono et al. (2000, 2003) e foi identificada em uma ilha de patogenicidade frequentemente encontrada em linhagens uropatogênicas. Esta proteína aumenta significativamente a infectividade da *E. coli* e provavelmente age como uma bactericina (KURAZONO et al., 2000).

Segundo Siqueira et al. (2009) a distribuição de *usp* em linhagens de *E.coli* provenientes de ITU e piometra foram respectivamente 33,3% e 69,2% enquanto que entre as amostras fecais este gene não foi detectado. No presente estudo o

gene *usp* foi identificado em 20,0% das cepas provenientes do útero enquanto que entre as cepas de origem fecal a frequência foi de 11,5% (Tabela 4).

O gene *iss* (increased serum survival) é uma proteína de membrana que confere resistência a atividade bactericida do soro, interferindo com a atividade complemento do soro (JOHNSON et al., 2001), sendo pouco conhecida a atividade exata deste gene.

No presente estudo, foram verificadas frequências próximas entre as *E. coli* provenientes do útero (12,%) e aquelas provenientes de boca (19,2%) mas muito diferente daquela encontrada para as cepas fecais (42,3%), o que pode sugerir a contaminação da boca da cadela por cepas de *E. coli* pelo hábito de lamber a região da vagina (Tabela 4).

Neste estudo 97,2% das cepas apresentaram fatores de virulência o que coincide com as altas frequências descritas por Chen et al. (2003), Von Sydow et al. (2006), Coggan et al. (2008) e Siqueira et al. (2009). A presença de isolados com múltiplos fatores de virulência entre as cepas de origem fecal (57,8%) (Tabela 3) é consistente com indicações que o trato intestinal em animais e humanos possuem cepas de *E.coli* uropatogênicas (YURI et al., 1998; JOHNSON et al., 2001), atuando como um reservatório de células patogênicas de *E.coli* extra intestinal (JOHNSON et al., 2001).

Desde a introdução dos antibióticos na medicina, tem-se observado um desenvolvimento crescente de resistência bacteriana (GUARDABASSI et al., 2004). Essa resistência envolve a seleção de bactérias resistentes pelo uso abusivo de antibióticos tanto na medicina humana como na medicina veterinária, envolvendo ainda a troca de material genético entre estas bactérias provenientes de humanos e animais (VAN DEN BOGAARD; STOBBERING, 2000; GUARDABASSI et al., 2004).

A resistência a agentes antimicrobianos em cepas de *E. coli* isoladas de piometra tem sido verificada por vários autores. Sendo as maiores resistências observadas, em geral, para cefalotina e ampicilina (COGGAN et al., 2008; LARA et al., 2008). Grande sensibilidade à norfloxacin, enrofloxacin, gentamicina e amicacina tem sido relatada para cepas de *E. coli* isoladas de diversas infecções de cães (OLUOCH et al., 2001). Assim como, em relação aos isolados de conteúdos intra uterinos de cadelas com piometra, que apresentaram elevadas sensibilidades a

norfloxacin (94,0%), polymyxin B (82,8%), sulfazotrin (76,8%), chloramphenicol (75,5%), enrofloxacin (75,5%), gentamicin (70,2%) and amikacin (55,6%) (COGGAN et al., 2008). Siqueira et al. (2008) also reported high indices of sensitivity for some of these antibiotics such as norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin in isolates of pyometra.

Villarreal et al. (2002) observed good sensitivity to gentamicin, fluoroquinolones and ampicillins for lineages of *E. coli* isolated from dogs with infection of the urinary tract. While Sanchez et al. (2002) found high resistances to sulfonamides, tetracyclines, cephalosporins and gentamicin in *E. coli* also isolated from the urinary tract. Von Sydow et al. (2006) observed 100% sensitivity of strains of *E. coli* isolated from feces of stray dogs to the antimicrobial norfloxacin, 87,2% sensitivity to enrofloxacin and 73,6% to gentamicin. Já Lara et al. (2008), reported 100% resistance to ampicillin, cefalexin, ciprofloxacin, gentamicin and norfloxacin of strains isolated from pyometra. In this study, the antimicrobials that presented greater resistance to strains of *E. coli* isolated from intra uterine content, mouth and feces of bitches with pyometra were cefazolin (67,1%), ampicillin (65,7%), tetracycline (61,4%) and nitrofurantoin (58,5%), and those that presented greater sensitivity were ceftriaxone (98,5%), norfloxacin (94,2%), ciprofloxacin (92,8%), tobramycin (82,8%), gentamicin (80,0%), cefoxitin (72,8%) and nalidixic acid (60,0%) (Table 9).

In veterinary clinics where the samples were collected, the ceftiofur is the antimicrobial of choice for uterine diseases and post-operative of ovariohysterectomy, showing, through the data obtained, still efficient in these cases.

The frequencies of antimicrobial susceptibility of the strains isolated from different sources (intra uterine content, mouth and feces) presented some differences. The strains of *E. coli* isolated from intra uterine content presented greater resistance to the antimicrobials cefazolin (68,0%) and ampicillin (56,0%) and greater sensitivity to norfloxacin, ceftriaxone and tobramycin (100%); those from the mouth presented greater resistance to ampicillin (84,6%), tetracycline (84,6%), cefazolin (65,3%) and nitrofurantoin (61,5%) and greater sensitivity to ceftriaxone (100%), ciprofloxacin (96,2%) and norfloxacin (84,7%); those from the feces, presented greater

resistência a nitrofurantoina (78,9%), cefalotina (68,4%) e tetraciclina (63,1%) e maiores sensibilidades ao norfloxacino (100%), ceftriaxona (94,8%) e ciprofloxacino (89,5%) (Tabela 9). Estas diferenças podem ter origem no processo de penetração dos antibióticos nos diferentes tecidos. O antimicrobiano deve alcançar concentrações suficientes no local de infecção para eliminar ou inibir o agente patogênico, para então ser eficaz em um processo infeccioso (TAVARES, 1996). De acordo com Diniz (2000), para que o antimicrobiano consiga alcançar tais concentrações no local de infecção, o mesmo deve estar na sua forma livre, não ligado a proteínas, pois somente assim estará disponível para atravessar as paredes dos vasos capilares, interagir com o agente patogênico e então exercer o efeito terapêutico. O processo de difusão passiva quase sempre é o processo pelo qual os fármacos penetram em tecidos infectados. A taxa de penetração é proporcional à concentração de fármaco livre no plasma ou no líquido extracelular. Desta forma, os fármacos que se ligam extensamente a proteínas podem não penetrar nos tecidos infectados com a mesma amplitude e eficiência que os fármacos com menor grau de ligação (CHAMBERS; SANDE, 1996).

Outros fatores podem influenciar na distribuição tecidual e eficácia dos agentes antimicrobianos além da ligação a proteínas plasmáticas (WODNUTT et al., 1995; SHYU, 1998). Estes fatores estão relacionados tanto ao tecido infectado, envolvendo presença de enzimas bacterianas, circulação sanguínea local modificada e pH ácido ou alcalino e ao ambiente anaeróbico, quanto às características físico-químicas do fármaco (BERGERON, 1986). Quanto este último estão relacionados o coeficiente de difusão, a lipossolubilidade influenciada pelo pH tecidual, a transporte ativo do fármaco responsável pelo efluxo do tecido, e a via de administração (WISE, 1983; BERGERON, 1986; WISE et al., 1986; MEULEMANS et al., 1989; LIMBERG et al., 1990).

A via de administração dos antibióticos, juntamente com suas propriedades físico-químicas, definem a velocidade de penetração tissular dos mesmos. Pode ainda influenciar a biodisponibilidade do antibiótico administrado, uma vez que este pode sofrer processos de degradação ou inativação durante a absorção, reduzindo as quantidades disponíveis na biofase (WISE et al., 1986). A solubilidade de antimicrobiano é um fator importante na sua penetração tecidual. Alta

lipossolubilidade confere ao fármaco maior penetração quando comparada à hidrossolubilidade (BERGAN, 1981; BERGERON, 1986). A hidrossolubilidade/lipossolubilidade depende de dois fenômenos: grau de dissociação do fármaco (pKa) e coeficiente de partição. Apenas a forma não-ionizada do fármaco é capaz de penetrar nos tecidos, uma vez que é mais lipossolúvel. A maioria dos antibióticos é constituída por ácidos ou bases orgânicas de baixa massa molecular. Dependendo do pKa do antibiótico e do pH do sangue, obtém-se maior ou menor penetração tecidual. Os antibióticos β -lactâmicos, por exemplo, geralmente são ácidos fracos e no pH do soro (pH 7,4) terão uma relação da forma não-ionizada de aproximadamente 1:10.000, apresentando, portanto, alta penetração no líquido intersticial (WISE et al., 1986). A avaliação das características de solubilidade dos antibióticos pode ser de grande importância na escolha da terapia adequada para o tratamento de determinadas infecções, tipo infecções do trato urinário (HEINEN et al., 2001). Quanto ao coeficiente de difusão, os antibióticos, geralmente, penetram nos tecidos por difusão passiva, seguindo um gradiente de concentração de acordo com sua solubilidade na sua camada lipídica. Essa transferência é diretamente proporcional à magnitude do gradiente de concentração através da membrana e do coeficiente de partição óleo/água do fármaco. Quanto maior o coeficiente de partição, maior a concentração do fármaco na membrana sendo mais rápido o processo de difusão (BENET et al., 1996).

Frente ao local de infecção, as alterações teciduais como a lesão tecidual, a modificação do pH no local infectado, entre outras, ou oriundas da inflamação provocada pela presença do micro-organismos infectante, tais como aumento da permeabilidade capilar no local infectado, o aumento da temperatura local ou corporal, a formação de edema e o aumento no aporte sanguíneo, entre outros, podem modificar a penetração de agentes antimicrobianos no sítio de infecção (NIX et al., 1991; BERGERON, 1986). Uma perfeita circulação local permite melhor penetração e ação do fármaco. Bactérias ou produtos resultantes destas podem alterar o suprimento vascular, como as endotoxinas, que podem interromper a circulação local e prevenir o estabelecimento de concentrações efetivas (HEINEN et al., 2001).

Alguns autores sugerem que a geometria do compartimento é um aspecto importante na penetração de antibióticos em tecidos, considerando a existência de uma relação entre a área superficial da rede vascular por onde o antibiótico difunde e o volume do fluido no compartimento ou tecido suprido por essa rede (AS/VF). Nos tecidos com alta AS/V, os níveis de concentração dos antibióticos são atingidos mais rapidamente, sendo estes níveis considerados altos (RYAN et al., 1986; MÜLLER et al., 1999). Frente a isso, deve-se ressaltar que nesta pesquisa todos os animais estudados vinham recebendo antibioticoterapia previamente à coleta das amostras. Porém, a ausência de crescimento bacteriano em 32,1% das amostras de conteúdo intra uterino não está relacionada com a ação antimicrobiana dos fármacos utilizados, já que seus níveis de concentração uterina são insatisfatórios, pela presença de pus (SMITH, 2006).

Um aspecto importante deste trabalho foi a detecção de um elevado número de cepas multirresistentes (Tabela 10) provenientes do útero (48,0%), das fezes (73,6%) e da boca (84,6%) o que representa um grande risco a saúde pública. A tabela 8 sugere ainda similaridade das cepas provenientes da piometra e da boca, demonstrando a hipótese de contaminação da boca das cadelas pelo hábito de lamber a região da vagina e do ânus.

A análise da diversidade genética entre os microrganismos selecionados realizada mediante emprego da técnica REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, mostrou grande similaridade entre as cepas de *E. coli* provenientes do mesmo animal e grande diferença entre as cepas de animais distintos. Entretanto, não se pode afirmar que no mesmo animal, estas cepas são idênticas, já que pelo menos uma das três técnicas utilizadas mostrou alguma distância genética entre elas. Tal fato pode ser explicado pela alta capacidade de adaptação da bactéria *E. coli* em ambientes desfavoráveis para seu desenvolvimento, como a boca, ocorrendo pequenas mutações em seu genoma.

Métodos de tipagem têm sido relatados como metodologias bastantes consistentes para caracterizar cepas de *E. coli* (GUAN et al., 2002). A técnica de ERIC-PCR tem sido utilizada por vários autores como alternativa aos métodos de tipagem molecular convencionais para caracterizar enterobactérias, discriminando cepas não-patogênicas e patogênicas (SILVEIRA et al., 2002). Mohapatra et al.

(2007), objetivando diferenciar *E. coli* isoladas de fezes humanas, de animais domésticos e selvagens, utilizaram técnicas ERIC e BOX-PCR para realizar a caracterização molecular destes isolados, produzindo perfis de alta qualidade, ressaltando que, além da capacidade de discriminação dos métodos de caracterização molecular utilizados, estes mostraram-se rápidos e práticos para determinação e identificação dos isolados de *E. coli* analisados.

Santos Filho (2008) encontrou em sua pesquisa com cadelas diagnosticadas com piometra, que 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, porém não foi feita análise de diversidade genética como no presente estudo, que mostrou esta similaridade entre as cepas isoladas do conteúdo intra uterino e boca do mesmo animal.

A proximidade dos animais de companhia, como cães e gatos, com os seres humanos bem como a crescente interatividade entre eles envolvendo carícias e beijos aumenta a possibilidade de transmissão de micro-organismos entre estas diferentes espécies (GUARDABASSI et al., 2004). A similaridade entre cepas de *E. coli* isoladas de humanos e de cães tem sido verificada por vários autores (JOHNSON & CLABOTS, 2006; JOHNSON et al., 2008). Assim, cães e gatos podem ter um papel importante na transmissão de cepas virulentas de *E. coli* tanto para outros animais como para humanos, o que representa um motivo de grande preocupação.

7 – CONCLUSÃO

- 1 – Houve predominância de isolamento de *E. coli* entre as bactérias recuperadas de conteúdo intra uterino, boca e fezes de cadelas diagnosticadas com piometra;
- 2 – As cepas de *E. coli* isoladas apresentaram um elevado número de fatores de virulência que são característicos de cepas uropatogênicas;
- 3 – O gene relacionado à fímbria do Tipo I, *fimH*, foi o mais prevalente fator de virulência encontrado nas cepas isoladas dos três materiais coletados;
- 4 – As cepas de *E.coli* isoladas apresentaram um elevado grau de resistência a vários agentes antimicrobianos;
- 5 – Foi encontrado um elevado número de cepas apresentando multirresistência a dois ou mais agentes antimicrobianos;
- 6 – O íntimo contato entre humanos e animais de estimação, representado principalmente por beijos e carícias, aumenta a possibilidade de transmissão de micro-organismos portadores de genes condicionadores de virulência e de resistência a antimicrobianos interespecies;
- 7 – Foram encontradas cepas de *E.coli* na boca das cadelas com piometra apresentando grande similaridade com as cepas do conteúdo intra uterino;

8 – REFERÊNCIAS

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

ANGULO, F.J., JOHNSON, K., TAUXE, R.V., COHEN, M.H. Significance and sources of antimicrobial – resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Microbiol. D. Res.**, v. 6, p. 77-83, 2000.

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.

BARAK, Y.; SAVORAI, O.; MAVASHEV, S.; BENI, A. Animal-assisted therapy for elderly schizophrenic patients. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 9, p. 439-422, 2001.

BARKER, S.B. Therapeutic aspects of the human-companion animal interaction. **Psychiatrics Times**. Mineapolis, v. XVI, 1999.

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

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

BECKER, M. O poder curativo dos bichos: como aproveitar a incrível capacidade dos bichos de manter as pessoas felizes e saudáveis. Rio de Janeiro: Bertrande Brasil, p. 322, 2003.

BENET, L. Z.; KROETZ, D. L.; SHEINER, L. B. Farmacocinética: A dinâmica da absorção, distribuição e eliminação de fármacos. In: HARDMAN, L. et al. (Ed.) *Goodman e Gilman – As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 1, p. 2-20, 1996.

BERGAN, H.; Pharmacokinetics of tissue penetration of antibiotics. *Review of infectious diseases*, v. 3, n.1, p. 45-66, 1981.

BERGERON, M. G. Tissue Penetration of Antibiotics. *Clinical Biochemistry*, v. 19, p.90-100, 1986.

BERNARD, P.; DEMARET, A. Why have pets? Presente and permanent reasons. [artigo científico]. 1996. Disponível em: <<http://www.sosanimal.com.br/clinica/informativo/exibInformativo/?codigo=89>> Acesso em: 15 de março de 2012.

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

BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.*, 30, 285-298, 1999.

BIGLIARI E.; PARMIGIANI E.; CAVIRANI S.; LUPPI A., BONATI L. & CORRADI A. Ultrasonography and cystic hyperplasia- pyometra complex in the bitch. **Reproduction in Domestic Animal**. 136-140 p. 2004.

BINNS, M. M. MAYDEN, 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. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

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

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

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

BUSSOTI, E.; LEÃO, E.R.; CHIMENTÃO, D.M.N.; SILVA, C.P.R. Assistência individualizada: —posso trazer meu cachorro?II. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v.39, n.2, p. 21-27, 2005.

CALIMAN, Marly Cristina Wanderley. Estudo de Vigilância Bacteriológica: Isolamento, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos domésticos na região de Ribeirão Preto. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2010.

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

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

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

CEMIGNANI, G. Setor cresce desde 1995 e movimenta US 750 milhões. O Estado de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <http://www.sosanimal.com.br/clinica/informativo/exibInformativo/?codigo=89> Acesso em 15 de março de 2013.

CHAMBERS, H. F.; SANDE, M. A. Quimioterapia nas doenças microbianas: considerações gerais. In: HARDMAN, L. et al. (Ed.) *Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 43, p. 757-776, 1996.

CHANSIRIPORNCHAI, N.; RAMASOOTTA, P.; SASIPREYAJAN, J.; SVENSON, S.B. Differentiation of avian *Escherichia coli* (APEC) isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Veterinary Microbiology**, v.80, n.1, p.75-80, 2001.

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

CHIEPPA, Francesco. A relação homem-animal. Uccelli, p.40-42, 2002. Disponível em: <<http://www.ao.com.br/pet.htm>> Acesso em: 15 de março de 2013.

CHRISTIANSEN, I. J. **Reprodução no cão e no gato**. Ed. Manole. São Paulo. 79-83 p., 1998.

CLARENCE, M. F. Doenças do sistema reprodutivo. **Manual Merck de veterinária**. 7ed. São Paulo Roca. 822-825p. 1997.

CLARRIDGE, J. E.; MUSER, D.M.; FAINSTEIN, V.; WALLACE JR., R.J. Extraintestinal human infection caused by *Edwardsiella tarda*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, n.5, p.511-514, 1980.

COHEN, M.L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, p. 762-767, 2000.

COOGAN, J. A. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino e histopatológico de útero de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas de *E. coli* e o potencial risco à saúde humana. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2005

COGGAN, J. A., MELVILLE, P. A., OLIVEIRA, C. M., FAUSTINO, M., MORENO, A. M., BENITES, N. R. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:477-483, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2007.

CZECZULIN, J.R.; WHITTAM, T.S.; HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. **Infec. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DAVID, B. H.; ZHI-DONG, J.; HERBERT L. D. Illness in Travelers from the United States to Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 69, n. 5, p. 506-508, 2003.

DE LORENZO, V.; MARTINEZ, J.L. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 7, 621-629, 1988.

DIAS, R. A.; GARCIA, R.C.; SILVA, D.F.; AMAKU, M.; NETO, J.F.S.; FERREIRA, F. Estimativas de populações canina e felina domiciliadas em zona urbana do Estado de São Paulo. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 4, n. 38, p. 565-570, 2004.

DÍAZ-MEJÍA, J. J.; AMABILE-CUEVAS, C. A.; ROSAS, I.; SOUZA, V. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins. **Microbiology**, v.154, 94–102, 2008.

DINIZ, A. *Avaliação farmacocinética da piperacilina em músculo de ratos infectados com E. coli*. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Dissertação de Mestrado, 2000.

DOYLE, M.P. Foodborne bacterial pathogens. In: HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A. et al. **Bergeys manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Maryland: Williams & Wilkins, 1994.

DRESCHER, G., COSTA, M. M., MACIEL, M. N., MATTIELLO, S. P., PICCINI, C. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados causadores de mastite em ovelhas do Município de Xanxerê, SC. In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 2006, Gramado. Anais do XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária. Gramado: **SOVERGS**, 2006.

DUCHAUD, E., RUSNIOK, C., FRANGEUL, L. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. **National Biotechnology**, v. 21, n.11, p.1307-1311, 2003.

EGENVALL, A., HAGMAN, R., BONNETT, B. N., HEDHAMMAR, A., OLSON, P., LAGERSTEDT, A. S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *J Vet Intern Med* 15, 530–538, 2001.

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.

FARACO, C. B.; SEMINOTTI, N. A relação homem-animal e a prática veterinária. **Revista CFMV Conselho Federal de Medicina Veterinária**, ano X, n. 32, p. 57-61, maio/jun./jul./ag., 2004.

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

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1344 p. 2003.

FIENI F. Patología de los ovarios y el útero. In: Wanke M.M & Gobello C. (Eds). **Reproducción en caninos y felinos domésticos**. Buenos Aires: Intermédica, p.75-89, 2006.

FRANSSON, B.; LAGERSTEDT, A. S.; HELLMÉN, 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; SCHIMID, J et al. Feline uropathogenic *Escherichia coli* from Great Britain and New Zealand have dissimilar virulence factor genotypes. *Veterinary Microbiology*, v. 106, p. 79-86, 2005.

FUCHS, H. O animal em casa – um estudo no sentido de desvelar o significado psicológico do animal de estimação. 185p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

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

GARCIA, M.I, LE BOUGUENEC, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bulletin of Institute Pasteur*, v. 94, p. 201-236, 1996.

GOBELLO, C.; CASTEX, G.; KLIMA, L.; RODRIGUEZ, R.; CORRADA, Y.A. study of two protocol combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. **Theriogenology** n.8897, 1-8p, 2003.

GOBELLO C. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: a review. **Theriogenology**. 66: p. 1560-1567, 2006. GROOTERS, A. M. Diseases of the ovaries and uterus. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. *Saunders Manual of Small animal practice*. [S.I.]: W.B. Saunders Company, 1467p, 1994.

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.

GROOTERS, A. M. Diseases of the ovaries and uterus. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Saunders Manual of Small Animal Practice**. [S.1.]: W. B. Saunders Company, 1467 p. 1994.

GUAN, S.; XU, R.; CHEN, S.; ODUMERU, J.; GYLES, C. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animals and human sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.2690-2698, 2002.

GUARDABASSIL, SCHWARTZ, S., LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54,p. 321-332, 2004.

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.

HAGMAN R. New aspects of canine pyometra – studies on epidemiology and pathogenesis. 55f. Uppsala, Suécia. Tese (Doutorado em Clínica de Pequenos Animais). Programa de Pós-graduação do Department of Small Animal Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, 2004.

HAGMAN R., KINDAHL H. & LAGERSTEDT A-S. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F2a metabolite levels. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 47: p. 55-68, 2006.

HAGMAN, R. Clinical and Molecular Characteristics of Pyometra in Female Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. V.47, p.323-325, 2012.

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

HART, C. A.; BATT, R. M.; SAUNDERS, J. R. Diarrhea caused by *Escherichia coli*. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 13, p. 21-131, 1993.

HEINEN, Juliana; FREDDO, Rodrigo; DALLA COSTA, Teresa. Penetração tecidual de antibióticos. *Caderno de Farmácia*, v. 17, n.1, p. 9-18, 2001.

HIDALGO, C.G.; COHEN, A.S.; MÉNDEZ, J.V. *Reproducción de Animales Domésticos*. Editorial Limusa, Balderas, 1986.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 787p., 1994.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-834, 1991.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBURG, E. A. **Microbiología Médica**. 13 ed. [S.1.]: Editora Guanabara Koogan S.A., 568p. 1982.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBURG, E. A. **Microbiología médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

JEFFCOATE, I. Fisiología y endocrinología de la reproducción en la perra in : Simpson, G. M.; England G.C.M & Harvey M.J. (Eds). **Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales**. Reino Unido : BSAVA,. p. 1-14.1999.

JITPEAN, S., HAGMAN, R., STROM HOLST, B., HOGGLUND, O. V., PETTERSSON, A., EGENVALL, A. Breed Variations in the Incidence of Pyometra and Mammary Tumours in Swedish Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. V.47, p.347-350, 2012.

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, 737 p., 1994.

JOHNSON, J. R., O'BRYAN, T.T., LOW, D.A., LING, G., DELAVARI, P., FASCHING, C., RUSSO, T.A, CARLINO, U., STELL, A.L. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* allele III. **Infect. Immun.** 68 (6): 3327-36, 2000.

JOHNSON, J. R.; DELAVARI, P.; STELL, A. L. et al. Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. *Journal of Infectious Disease*, v.183, p.154-159, 2001.

JOHNSON, J. R.; KASTER, N.; KUSKOWSKI, M. A., et al. Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.337-345, 2003.

JOHNSON, J.R., RUSSO, T. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". **J. Lab. Clin. Med.**, v.139, n.3, p. 155-162, 2002.

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. *Clinical Infectious Disease*, v. 43, p. 101-108, 2006.

JOHNSON, J.R; OWENS, K; GAJEWSKI, A. et al. *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. *Journal of Infectious Disease*, v. 197, p. 218-224, 2008.

JOHNSTON, S. D. **Canine and feline : Theriogenology**, Philadelphia : WB Saunders Company, 592p., 2001.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING N. W.. Patologia Veterinária; 6.^a Edição; capítulo 25; p. 1186-1188. 2007.

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

KESKIMAKI, M.A., MATTILA, L., PELTOLA, H., SUTONEN, A. EPEC, EAC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, v. 40, p.151-156, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, et al. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5th Ed. Lippincott, 1395p, 1997.

KREKELER, N., MAREDA, M. S., BROWNING, G. F., LODGE, K. M., CHARLES, J. A., WRIGHT, P. J. Uropathogenic virulence factor FimH facilitates binding of uropathogenic *Escherichia coli* to canine endometrium. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 35, p. 461–467, 2012.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*, 9th edn. Williams & Wilkins, Baltimore, 984 p., 1994.

KUBITZA, F. **Tilápia**: Tecnologia e planejamento na produção comercial. 1.ed. Jundiaí, 285p., 2000.

KUHNERT, P., BOERLIN, P. E FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food or environment. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 107-117, 2000.

KURAZONO, H., YAMAMOTO, S., NAKANO, M., NAIR, G. B., TERAÍ, A., CHAICUMPA, W., HAYASHI, H. Characterization of a putative virulence island in the crhmosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microb. Pathog*, 28:183-189, 2000.

KURAZONO, H; NAKANO,M; YAMAMOTO,S. et al. Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *E. coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size variation of the pathogenicity island. *Microbiology and Immunology*, v. 47 (10), p. 797-802, 2003.

LANE, M.C., ALTERI, C.J., SMITH, S.N., MOBLEY, H.L.T. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104: 16669-16674, 2007.

LARA, V. M.; DONADELI, F. S. F.; CRUZ, A. B. et al. Multirresistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cadelas com piometra. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, v.60, p.1032-1034, 2008.

LEVY, S.B. The antibiotic Paradox. How the misuse of antibiotics destroy their curative powers. **Pers. Publis.** 2 nd ed., Cambridge, MA, 2002.

LIMBERG, J.; LEBEL, M.; DERENDORF, H. Evaluation of free tissue concentrations of fleroxacin after oral administration. *Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 4, p. 423-424, 1990.

LOMAR, A.V.; DIAMENT, D. Guia de terapia antiinfeciosa, v.1, p.11-44, 1998.

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. *Infec. Immun.*, 56, 2601-2609, 1988

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

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHEL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERYS, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p.3479-3483, 1992.

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.

MAYER, H.B.; WANKE, C.A. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 273-274, 1995.

MEULEMANS, A.; PAYCHA, F.; HANNOUN, P.; VULPILLAT, M. Measurement and clinical and pharmacokinetic implications of diffusion coefficients of antibiotics in tissues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 33, n. 8, p. 1286-1290, 1989.

MOHAPATRA, B. R.; BROERSMA, K.; NORDIN, R.; MAZUMDER, A. Evaluation of Repetitive Extragenic Palindromic-PCR for discrimination of fecal *Escherichia coli* from humans, and different domestic- and wild-animals. **Microbiology and Immunology**, v.51, p.733-740, 2007.

MOYAERT, H.; De GRAEF, E.M.; HAESEBROUKE, F.; DECOSTERE, A. Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. **Research in Veterinary Science** .v. 81, p.1-7, 2006.

MÜLLER, M.; BRUNNER, M.; HOLLENSTEIN, U.; JOUKHADAR, C.; SCHMID, R.; MIWAR, E.; EHRINGER, H.; EICHLER, G. Penetration of ciprofloxacin into the

intestinal space of inflamed foot lesions in non-insulin-dependent Diabetes mellitus patient. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 8, p. 2056-2058, 1999.

MULVEY, Matthew. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, v.4, iss.4, p. 257-271, 2002.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Medical microbiology**. 3rd ed. [S.1.]: Mosby, 719p., 1998.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Patologias do útero. In:-. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, Cap.5, p.43-52. 1997.

NATARO, J.P.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.D.; VIAL, P.A.; SEARS, C.L. T84 células em cultura como um modelo para enteroagregativa *Escherichia coli* patogênese. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 4761-4768, 1996.

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

NAVEEN, Rebecca; MATHAI, Elizabeth. Some virulence characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* in different patient groups. *Indian J Med Res*, 122, 143-147, 2005.

NETA, J. H. Consciência animal. **Revista CFMV Conselho Federal de Medicina Veterinária**, ano X, n. 31, p. 59-65, jan./fev./mar./abril, 2004.

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

NIX, D. E.; GOODWIN, S. D.; PELOQUIN, C. A.; ROTELLA, D. L.; SCHENTAG, J. J. Antibiotic Tissue Penetration and its Relevance: Models of Tissue Penetration and their Meaning. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, n. 10, p. 1947-1952, 1991.

NOGA, E.J. **Fish Disease**. 4 ed. Missouri, Mosby-Year Book, 367 p., 1995.

NOAKES, D. E.; PARKINSON, T.; ENGLAND, G. C. W. **Arthur's veterinary reproduction and obstetrics**. 8.ed. Toronto : WB Saunders Company, 868p. 2001.

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

OLIVA, S. A terapia assistida por animais: o papel do médico veterinário. **Boletim Informativo ANCLIVEPA-SP**, São Paulo, n. 35, 2004.

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

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

OLSON, P. N. S.; MATHER, E. C. Canine vaginal and uterine bacterial flora. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.172, n.6, p. 708-711, 1978.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: EDUEM, 1998.

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

PELCZAR JUNIOR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia, conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: **Makron Books do Brasil**, v.2, p.111-125, 1997.

PEREIRA, C. S.; BARROS, P. R.; SILVA, P. M.; RODRIGUES, D. P. Patógenos isolados do trato gastrointestinal de cães saudáveis no Rio de Janeiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.4, p.1000-1001, 2009.

RADOTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Diseases caused by *Escherichia coli*. In: RADOTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.;

HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary medicine**: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9th ed. London: W. B. Saunders, 2000. P. 779-809.

RILEY, L. W. Molecular Epidemiology of Infections Diseases - Principles and Practice, **ASM Press**, Washington, DC, 2004.

RIVERA, P., MELIN, M., BIAGI, T., FALL, T., HAGGSTROM, J., LINDBLAD-TOH, K., VON EULER, H. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res* 69, 8770–8774, 2009.

ROBERTS, R.J. *Patologia de los peces*. Madrid: Mundi-Prensa, 366p., 1981.

ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E.L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 17, p. 467-475, 2002.

ROCHA, S. *Cinoterapia*: a terapia assistida por cães ajuda crianças, adolescentes e idosos a superarem seus limites. Disponível em: <http://www.acesa.com/viver/arquivo/vida_saudavel/2005/06/15-cinoterapia>. Acesso em: 15 mar., 2013.

ROSS, S.J.; OSBORNE, C.A.; LULICH, J.P., et al. Canine and feline nephrolithiasis. Epidemiology, detection, and management. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 29: 231-250, 1999.

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, n. 5, p. 1753-1754, May, 2000.

RYAN, D. M.; CARS, O.; HOFFSTEDT, B. The use of antibiotic serum levels to predict concentrations in tissues. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 8, p. 381-388, 1986.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839); 487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3ed. Londres: CSHL Press, p.1448, 2001.

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

SANTOS FILHO, J. C. B. 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. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Paulista, 2008.

SANCHEZ, S.; STEVENSON, M.A.A.; HUDSON, C.R. et al. Characterization of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, p.3586-3595, 2002.

SANDERS, W. E.; SANDES, C. C. Pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical Microbiology Reviews**, Apr. 10: 220-241, 1997.

SAYLERS, A.A.; WHITT, D.D. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. ASM Press, Washington. 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.

SERPELL, J. A. Childhood pet keeping and humane attitudes in young adulthood. *Animal Welfare*, v. 1, n. 2, p. 321-337, 1993.

SHILLE,V. M. Fisiologia reprodutiva e endocrinologia da fêmea e do macho. In: ETTINGER,S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3 edição, São Paulo: Manole, v.4 ,cap. 98, p.1857-1871, 1992.

SHYU, M. N. Effect of Protein Binding on Drug Penetration into Blister Fluid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 32, n. 1, p. 128-130, 1998.

SILVEIRA, W.D., FERREIRA, A., LANCELLOTTI, M., BARBOSA, I. A. G. C. D., LEITE, D. S., CASTRO, A. F. P., BROCCHI, M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p.323-328, 2002.

SIMJEE, S.; WHITE, D.G.; McDERMOTT, P.F.; WAGNER, D.D.; ZERVOS, M.J.; DONABEDIAN, S.M.; ENGLISH, L.L.; HAYES, J.R.; WALKER, R.D. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p. 4659-4665, 2002.

SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO, M. G.; SALERNO, T.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, M. D.; PRESTES, N. C.; SILVA, A. V. Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piometra e de fezes de cão. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.5, p.1263-1266, 2008.

SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO, M. G.; LEITE, D. S.; TIBA, M. R.; MOURA, C.; PRESTES, N. C.; SALERNO, T.; SILVA, A. V. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Res. Vet. Sci.**, v. 86, p. 206-210, 2009.

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- 63, 2007.

SNYDER, J. A., et al. "Coordinate Expression of Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli*" - **Infection and Immunity**, Vol. 73, No. 11, p. 7588-7596, 2005.

SOUZA, C.P. The strategies of *Escherichia coli* pathotypes and health surveillance. **Brazilian Journal of Health Surveillance**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 65-70, 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.

SUMMERS, A.O. Generally overlooked Fundamentals of bacteria genetics and ecology. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. S85-S92, 2002

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

SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parcimony, version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.24, p.1596-1599, 2007.

TAMURA K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526, 1993.

TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p. 816, 2001.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 493-499, 2001.

THEA, D.M.; ST LOUIS, M.E.; ATIDO, U.; KANJINGA. K.; KEMBO, B.; MATONDO, M.; TSHIAMALA, T.; KAMENGA, C.; DAVACHI, F.; BROWN, C. A prospective study of diarrhea and HIV-1 infection among 429 Zairian infants. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 1696-1702, 1993.

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

TONIOLLO, G. H.; FARIA, D. Jr.; LEGA, E.; BATISTA, C. M.; NUNES, N. Piômetra na espécie felina – Relato de um caso em *Panthera onca* Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. v.37, n.2 São Paulo, 2000.

USEIN, C.R; DAMIAN, M; TATU-CHITOIU, D et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 5 (3), p. 303-310, 2001.

VAN DEN BOGAARD, A.E.J.M.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 14, p. 327-335, 2000.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. **Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.** Nucleic Acids Research. v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction. Methods Mol. Cell. Biol. 5, 25–40, 1994.

VILLARROEL, E.; NAVARRO, P.; RAMOS, R. et al. J. *Escherichia coli* identificadas em pacientes com infecciones urinarias: sensibilidade antimicrobiana. Rev. Soc. Venez. Microbiol., v.22, p.1-6, 2002.

VON SYDOW, A.C.M.D.G.; COOGAN, J.A.; MORENO, A.M.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. Arq. Inst. Biol., 73, 401-407, 2006.

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

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.

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.

WANKE, M. M.; GOBELLO C. Ciclo estral canino. In: WANKE M. M. e GOBELLO. (Eds). **Reproducción en caninos y felinos domésticos**. Buenos Aires : Intermédica editorial, 309p. 2006.

WEBER, S., COSTA, M. M., SILVA, M. S. E., MABONI, F., FERRONATO, A. I., DRESCHER, G., VARGAS, A. C., SCHRANK, Silveira, I. Caracterização molecular e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos e ambientais de *E. coli* In: XXV Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, SãoPedro. Anais da XXV Reunião de Genética de Microrganismos. São Pedro: **XXVREGEM**, p.102-102, 2006.

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

WEISS, R. R.; CALOMENO, M. A.; SOUSA, R. S.; BRIERSDORF, S. M.; CALOMENO, R. A.; MURADÁS, P. Avaliação Histopatológica, Hormonal e Bacteriológica da Piometra na Cadela. *Archives of Veterinary Science* v. 9, n. 2, p. 81-87, 2004.

WISE, R. Protein Binding of β -lactams: the effects on activity and pharmacology particularly tissue penetration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 12, n. 1, p. 1-18, 1983.

WISE, R.; LISTER, D.; McNULTY, C. A.; GRIGGS, D.; ANDREWS, J. M. The comparative pharmacokinetics and tissue penetration of four quinilones including intravenously administered enoxacin. *Infectious Diseases*, v. 14, suppl. 3, p. 196-202, 1986.

WILES, T.H.; KULESUS, R.R.; MULVEY, M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, p. 11-19, 2008.

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

WILSON, R.A.; KEEFE, T.J.; DAVIS, M.A.; BROWING, M.T.; ONDRUSEK, K. (1988). Strains of *Escherichia coli* associated with urogenital disease in dogs and cats. **Am. J. Vet. Res.**, 49, 743-746.

WOOD, T.K, BARRIOS, A.F.G, HERZBERG, M, LEE, J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 72: 361-367, 2006.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, March, 2007.

WOODNUTT, G.; BERRY, V.; MIZEN, L. Effect of Protein Binding of Penetration of β -lactams into rabbit peripheral lymph. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, n. 12, p. 2678-2683, 1995.

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