

Caracterização microbiológica e perfil de resistência das bactérias isoladas do útero de cadelas com piometra aberta e fechada

Microbiological characterization and resistance profile of bacteria isolated from the uterus of bitches with open and closed pyometra

Rodrigo Volpato^{1*}, Michelle Silva Araujo¹, Miriam Harumi Tsunemi², Fernando José Paganini Listoni¹, Márcio Garcia Ribeiro¹, Maria Denise Lopes¹

¹FMVZ-UNESP/Botucatu

²IBB-UNESP/Botucatu

Resumo: No Brasil existe uma grande população de cadelas com risco de desenvolver um quadro de piometra pois a castração eletiva não é uma prática comum. A piometra é uma enfermidade da cadela adulta caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudato. Trata-se de uma das enfermidades mais comuns que ocorre no trato genital das fêmeas caninas. A bactéria isolada com maior frequência no útero de cadelas com piometra é a *Escherichia coli*. O objetivo desse trabalho é comparar os grupos piometra de cérvix aberta e fechada caracterizando as bactérias isoladas no útero dessas cadelas, além de realizar o perfil de resistência dessas bactérias frente aos antibióticos mais comumente utilizados na rotina veterinária de pequenos animais.

Palavras chave: bactéria, piometra, cães

Summary: In Brazil there is a large population of dogs at risk of developing pyometra since elective castration is not a common practice. Pyometra is adult bitch disease characterized by inflammation of the uterus with accumulation of exudate. This is one of the most common diseases that occur in the genital tract of female dogs. The most frequently isolated bacteria in the uterus of bitches with pyometra is *Escherichia coli*. The aim of this study is to compare the pyometra group opened and closed cervix characterizing the isolated bacteria into the uterus of these bitches, and perform the resistance profile of bacteria to antibiotics such forward most commonly used in veterinary medicine for small animals.

Keywords: bactéria, piometra, dogs

Introdução

A infertilidade de fêmeas carnívoras pode estar ligada as doenças uterinas. Uma fase proliferativa longa, folículos ovarianos persistentes ou cistos ovarianos resultam em alterações hormonais que juntamente com as infecções bacterianas, representam importante fonte de degeneração uterina (Kempisty *et al.* 2013).

No Brasil existe uma grande população de cadelas com risco de desenvolver um quadro de piometra, pois apenas uma pequena percentagem de cadelas são normalmente submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva, a maioria das castrações é realizada como consequência de alterações clínicas. A situação é diferente em outros países onde a prática da castração é comum e realizada em mais de 85% das cadelas (Hagman *et al.*, 2011).

A piometra é uma enfermidade da cadela adulta caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudato, que ocorre na fase lútea do ciclo estral, de quatro semanas a quatro meses após o estro (Coggan *et al.*, 2004; Smith, 2006). No diestro ocorre uma hipertrofia/hiperplasia do endométrio estimulado pela progesterona e, subsequentemente, uma invasão bacteriana (Weiss *et al.*, 2004). Trata-se de uma das enfermidades mais comuns que ocorre no trato genital das fêmeas caninas (Coggan *et al.*, 2004; Pretzer, 2008).

A piometra pode se apresentar de forma aberta ou fechada, caracterizada pela presença ou ausência de secreção vaginal, respectivamente.

A interação da progesterona e do estrógeno é importante no desenvolvimento da piometra, mas a progressão e a severidade desta enfermidade é complicada com a migração secundária de bactérias, via ascendente (Weiss *et al.*, 2004; Smith, 2006; Sharif *et al.*, 2013).

A bactéria isolada com maior frequência no útero de cadelas com piometra é a *Escherichia coli*, isolada de 57% a 96% das amostras de exsudato uterinos. Ocasionalmente, outras bactérias como *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sp.*, *Streptococcus canis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa* são isoladas do útero de animais doentes (Hagman e Kuhnb, 2002; Coggan *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2004; Bartoskova *et al.*, 2007). A origem destes microorganismos é o próprio intestino e o trato urinário (Coggan *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2004; Bartoskova *et al.*, 2007).

*Correspondencia: rodrigo.volpato@hotmail.com
Tel: (+55) 11- 996739219, (+55) 14-988178385

A taxa de mortalidade da piometra é de 3 a 4 % em países desenvolvidos que apresentam modernas rotinas de tratamento. Um atraso no diagnóstico e/ou tratamento pode conduzir esses animais a sépsis e a um desfecho fatal (Sharif *et al.*, 2013).

O objetivo desse trabalho é caracterizar as bactérias isoladas do conteúdo uterino de cadelas com piometra e estudar o perfil de resistência aos antibióticos mais comumente utilizados na rotina veterinária de pequenos animais, além de fazer um comparativo entre os casos de piometra de cérvix aberta e fechada.

Material e Métodos

A pesquisa em questão atendeu aos requisitos impostos pela Comissão de Ética no uso de animais de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu.

Foram utilizadas 31 cadelas com diagnóstico de piometra atendidas na área de reprodução de pequenos animais. O diagnóstico foi realizado através de histórico clínico, exames físico e complementares: hemograma, uréia, creatinina e avaliação ultrassonografia. Do total de cadelas, 25, apresentavam secreção vaginal purulenta, mucopurulenta ou sanguinolenta e 6 apresentavam piometra de cérvix de fechada.

Após o procedimento cirúrgico uma amostra de 3 mL do conteúdo uterino foi coletada por punção aspirativa. Imediatamente, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus Botucatu.

As amostras foram semeadas em meio de ágar MacConkey e base de ágar sangue composta com 7% de sangue ovino desfibrinado. Em seguida, as amostras foram incubadas em condições de aerobiose à 37°C e observadas às 24, 48 e 72 horas (Koneman, 2001a).

Para as amostras que apresentaram isolamentos positivos, realizou-se análise macroscópica, microscópica (morfotintorial pelo método de Gram) e bioquímica, seguindo as provas taxonômicas segundo Carter (1994).

As amostras coletadas para o antibiograma seguiram a metodologia sugerida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O meio de cultivo

para o antibiograma foi ágar Mueller-Hinton, distribuído em placas de Petri de 14 cm de diâmetro interno.

Foram selecionadas e repicadas 4 ou 5 colônias sob teste para 5 mL de meio de cultivo em caldo. O caldo inoculado foi incubado por 2 a 8 horas à temperatura de 37°C, deixando assim o microrganismo crescer até atingir a turbidez padrão ou ajustando se necessário. Dentro de 15 minutos após o ajustamento da turbidez, foi introduzido um swab estéril e não tóxico no inoculo, para colheita de amostra bacteriana, sendo o material assim obtido distribuído homogêaneamente pela superfície da placa de Petri para posterior colocação dos discos com os antimicrobianos a serem testados.

Os discos para antibiograma SENSIFAR® foram colocados sobre a superfície da placa com o auxílio de uma pinça estéril. A distância mínima entre os discos foi de 24 mm entre seus respectivos centros. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas a 37 °C, sendo que a leitura das placas foi realizada após 24 horas de incubação. A leitura foi realizada com as medidas dos diâmetros das zonas de inibição, as quais foram comparadas com medidas internacionais “National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS”; classificando o resultado como sensível, parcialmente sensível ou resistente (Koneman, 2001b).

Foram utilizados os seguintes antibióticos: a ampicilina (10mcg), amoxicilina associada a ácido clavulânico (30mcg), cefalexina (30mcg), cefalotina (30mcg), doxiciclina (30mcg), enrofloxacin (5mcg), ciprofloxacina (5mcg) e sulfá associada a trimetoprim (25mcg).

As avaliações das culturas, assim como seus antibiogramas, foram analisadas pela correlação de Spearman, do teste exato de Fisher e da concordância Kappa.

Resultados

Para análise das bactérias isoladas foi realizada uma tabela das bactérias isoladas e os resultados negativos. Os resultados estão representados na tabela 1. Com a intenção de analisar diferenças entre as bactérias do grupo piometra aberta e do grupo piometra fechada, foram realizadas tabelas de contingência avaliando os tipos de bactérias do conteúdo uterino e sua sensibilidade frente aos antibióticos testados. Os resultados estão demonstrados nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

Tabela 1 - Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) avaliando as bactérias isoladas do útero: *Escherichia coli* (E. coli), *Enterobacter* sp (Entero), *Streptococcus* sp (Strepto), *Alcaligenes faecalis* (Alcal), *Klebsiella pneumoniae* (Klebs) e *Edwardsiella tarda* (Edward).

	Cultura Útero							Total	p-valor Fisher
	Negat	<i>E. coli</i>	<i>Entero</i>	<i>Strept</i>	<i>Alcal</i>	<i>Klebs</i>	<i>Edward</i>		
P.A.	2	17	4	2	2	1	0	28	
P.F.	1	3	1	1	0	0	1	7	0,465
Total	3	20	5	3	2	1	1	35	

Considerando p-valor < 0,05

Tabela 2 - Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ampicilina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.).

		Ampicilina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	11	3	12	28	0,451
	P.F.	1	2	2	2		
	Total	3	13	5	14		

Considerando p-valor < 0,05

Tabela 3 - Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a amoxicilina associada a ácido clavulânico no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.).

		Amoxicilina + Ác. Clavulânico - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	21	1	4	28	0,398
	P.F.	1	5	1	0		
	Total	3	26	2	4		

Considerando p-valor < 0,05

Tabela 4 - Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalexina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.).

		Cefalexina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	14	6	6	28	0,650
	P.F.	1	2	2	2		
	Total	3	16	8	8		

Considerando p-valor < 0,05

Tabela 5 - Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalotina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.).

		Cefalotina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	4	2	20	28	0,746
	P.F.	1	0	0	6		
	Total	3	4	2	26		

Considerando p-valor < 0,05

Tabela 6 - Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ceftiofur no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.).

		Ceftiofur - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	9	8	9	28	0,764
	P.F.	1	2	3	1		
	Total	3	11	11	10		

Considerando p-valor < 0,05

Tabela 7 - Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a doxiciclina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.).

		Doxiciclina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	18	1	7	28	0,432
	P.F.	1	4	1	1		
	Total	3	22	2	8		

Considerando p-valor < 0,05

Tabela 8 - Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a enrofloxacina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.).

		Enrofloxacina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	14	7	5	28	0,924
	P.F.	1	3	2	1	7	
	Total	3	17	9	6	35	

Considerando p-valor < 0,05

Tabela 9 - Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ciprofloxacina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.).

		Ciprofloxacina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	16	8	2	28	0,715
	P.F.	1	3	3	0	7	
	Total	3	19	11	2	35	

Considerando p-valor < 0,05

Tabela 10 - Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a sulfa associada a trimetoprim no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.).

		Sulfa + Trimetoprim - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	22	1	3	28	0,384
	P.F.	1	4	0	2	7	
	Total	3	26	1	5	35	

Considerando p-valor < 0,05

Discussão e Conclusão

O acúmulo de secreção purulenta no interior do útero, nos casos de piometra, constitui um excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano. Em aproximadamente 80% dos casos de piometra obtém-se resultado positivo para isolamento bacteriano e geralmente são bactérias da microbiota normal da vagina, sendo a mais frequente, *Escherichia coli*, isolada de 57% a 96% das amostras (Dow, 1958; Hagman e Kuhnb, 2002; Coggan *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2004; Bartoskova *et al.*, 2007).

A bactéria isolada com maior frequência neste estudo foi a *E. coli*, isolada em 64,51% das amostras. Esses dados corroboram com a literatura existente (Franson e Ragli, 2003; Weiss *et al.*, 2004; Bartoskova *et al.*, 2007; Verstegen *et al.*, 2008). A *E. coli* adere especificamente a sítios de ligação no endométrio previamente sensibilizados pela progesterona através de genes associados a fatores de virulência uropatogênicos. Esses genes têm sido notificados nos humanos aumentando a patogenicidade da *E. coli* por facilitar sua aderência ao epitélio (Verstegen *et al.*, 2008)

As culturas que apresentaram crescimento bacteriano foram submetidas ao antibiograma, com a intenção de traçar um perfil de resistência aos antibióticos mais comumente utilizados. Não foi observada dife-

rença nos resultados das culturas e dos antibiogramas quando comparamos os grupos piometra aberta e fechada. O relaxamento cervical nas cadelas é associado com a fase de proestro e estro, provavelmente, a contaminação bacteriana do útero ocorre durante essas fases do ciclo estral, não havendo, portanto, diferença entre a piometra aberta e fechada em relação à contaminação bacteriana.

As bactérias foram mais sensíveis aos antibióticos doxiciclina (84,6% de sensibilidade), amoxicilina associada a ácido clavulânico (77% de sensibilidade), sulfa associada a trimetoprim (77% de sensibilidade) e enrofloxacina (66,6% de sensibilidade) e, mais resistentes à cefalotina (77% de resistência) e à ampicilina (53,8% de resistência). Esses resultados se revestem de importância, pois norteiam a terapia antibiótica utilizada no setor de Reprodução de Pequenos Animais da FMVZ- UNESP/Botucatu.

Lara *et al.* (2008), investigaram o perfil de sensibilidade de 538 cadelas ao testarem 15 linhagens de *E. coli* isolada do trato urinário e útero de cadelas com piometra e observaram resistência para ampicilina, cefalexina, gentamicina, fluorquinolonas. Sanchez *et al.* (2002) ao estudarem 21 linhagens de *E. coli* isoladas de urina de cães verificaram resistência para sulfonamidas, tetraciclina, cefalosporinas e gentamicina.

Um grande número de cães é acometido por hemoparasitose e o fato da doxiciclina apresentar uma sensibilidade grande às bactérias isoladas do conteúdo uterino é providencial, pois podemos utilizá-la como terapia de escolha para um tratamento concomitante de piometra e *erlichiose* canina. A utilização de antibióticos deve ser sempre cuidadosa, pois a taxa de resistência aos antibióticos pode estar relacionada ao uso indiscriminado e indevido dos antimicrobianos como subdoses, superdoses e descontinuidade da terapia. Esses atos podem aumentar a pressão seletiva para linhagens bacterianas multirresistentes em cães e gatos.

A presença de linhagens de *E. coli* multirresistentes aos antimicrobianos em animais de companhia é um alerta para os riscos em saúde pública, em virtude da provável transmissão de bactérias dos animais para o homem, em face do estreito contato entre essas espécies (Siqueira *et al.*, 2009).

Bibliografia

- Bartoskova A, Vitasek R, Leva L, Faldyna M (2007). Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with pyometra. *Journal of Small Animal Practice*, 48, 564-568.
- Coggan JA, Oliveira CM, Faustino M, Moreno AM, Von Sydow AC, Melville PA, Benites NR (2004). Microbiological study of intrauterine secretion from bitches with pyometra and research of virulence factors of *Escherichia coli* isolates. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 71, 1-749.
- Dow C (1958). The cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The Veterinary Record*, 70, 1102-1108.
- Fransson BA e Ragle CA (2003). Canine Piometra: An Update on Pathogenesis and Treatment. *Compendium Small Animal/Exotics*, 25 (8), 602-612.
- Hagman R e Kuhn I (2002). *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 84, 143-153.
- Hagman R, Lagerstedt AS, Hedhanmar A, Egenvall A (2011). A breed-matched case-control study of potential risk-factors of canine pyometra. *Theriogenology*, 75, 1251-1257.
- Kempisty B, Bukowska D, Wozna M, Piotrowska H, Jackowska M, Zuraw A, Ciesiolka S, Antosik P, Maryniak H, Ociepa E, Porowski SZ, Brussow KP, Jaskowski JM, Nowicki M (2013). Endometritis and pyometra in bitches: a review. *Veterinarni Medicina*, 58(6), 289-297.
- Konemam EW. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica LTDA, 2001 a, cap. 3, 125-67.
- Konemam EW. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica LTDA, 2001 b, cap. 15, 794-853.
- Lara VM, Donadeli FSF, Cruz AB (2008). Multirresistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cadelas com piometra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 1032-1034.
- Pretzer SD (2008). Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology*, 70, 359-363.
- Sanchez S, Stevenson MAA, Hudson CR (2002). Characterization of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *Journal Clinical Microbiology*, 40, 3586-3595.
- Sharif H, Hagman R, Wang L, Eriksson S (2013). Elevation of serum thymidine kinase 1 in a bacterial infection: Canine piometra. *Theriogenology*, 79, 17-23.
- Siqueira AK, Ribeiro MG, Leite DS, Tiba MR, Moura C, Lopes MD, Prestes NC, Salerno T, Silva AV (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86, 206-210.
- Smith FO (2006). Canine pyometra. *Theriogenology*, 66, 610-612.
- VERSTEGEN J, DHALI WAL K, VERSTEGEN-ONCLIN (2008). Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*, 70, 364-374.
- Weiss RR, Calomeno MA, Sousa RS, Briersdorf SM, Muradás P (2004). Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. *Archives of Veterinary Science*, 9 (2), 81-87.