

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PERFIL DE FATORES DE VIRULÊNCIA DAS *ESCHERICHIA COLI*
ISOLADAS DO ÚTERO DE VACAS HOLANDESAS APÓS O PARTO E SUA
RELAÇÃO COM A MICROBIOTA UTERINA**

LUANA DE CÁSSIA BICUDO

BOTUCATU- SP

Maio 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PERFIL DE FATORES DE VIRULÊNCIA DAS *ESCHERICHIA COLI*
ISOLADAS DO ÚTERO DE VACAS HOLANDESAS APÓS O PARTO E SUA
RELAÇÃO COM A MICROBIOTA UTERINA**

LUANA DE CÁSSIA BICUDO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Botucatu, ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a Titular Eunice Oba

Co-orientador: Prof. Adj. II Márcio Garcia Ribeiro

BOTUCATU- SP

Maio 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Bicudo, Luana de Cássia.

Perfil de fatores de virulência das Escherichia coli isoladas do útero de vacas holandesas após o parto e sua relação com a microbiota uterina / Luana de Cássia Bicudo. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Coorientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50504037

1. Vaca - Doenças. 2. Escherichia coli. 3. Puerpério. 4. Virulência (Microbiologia). 5. Útero - Infecções. 6. Microbiota.

Palavras-chave: Bovino; Escherichia coli; Fatores de virulência; Infecção uterina; Puerpério.

Nome da autora: Luana de Cássia Bicudo

Título: PERFIL DE FATORES DE VIRULÊNCIA DAS *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DO ÚTERO DE VACAS HOLANDESAS APÓS O PARTO E SUA RELAÇÃO COM A MICROBIOTA UTERINA.

Comissão Examinadora:

Prof^a Titular Eunice Oba (Orientadora)

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Adj. Cezinande de Meira

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Titular Gilson Hélio Toniollo

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP- Jaboticabal.

Data da defesa: 05 de maio de 2014

*Dedico aos grandes amores da
minha vida, Sara Débora Jacinto
Bicudo e Sony Dimas Bicudo.*

Agradecimentos

A Deus, que me acompanha e me guia em todos os lugares e momentos da minha vida.

Aos meus pais Sara Débora Jacinto Bicudo e Sony Dimas Bicudo por estarem sempre do meu lado, me apoiarem e me darem liberdade para fazer minhas próprias escolhas. Jamais vou ser capaz de retribuir tudo o que já fizeram e ainda fazem por mim, pois todas as minhas conquistas devo a eles. Vocês são a minha base, meus exemplos, meus amores!

À professora Eunice Oba que me orientou desde a residência e ao longo deste período se tornou uma grande amiga. Obrigada por todas as oportunidades, orientações, conversas profissionais e pessoais e por sempre me impulsionar na vida acadêmica. Admiro sua motivação e determinação incansável na busca de novos desafios e conquistas.

Ao professor Márcio Garcia Ribeiro, pela coorientação, por me auxiliar desde a elaboração do projeto até a versão final, por ter disponibilizado o laboratório de microbiologia, pelos contatos externos permitindo que a realização do PCR fosse possível, pelo conhecimentos e soluções nas horas de dificuldade.

Ao senhor Lair Antônio de Souza e aos médicos veterinários Sérgio Soriano e Alex Sica por permitirem a coleta de material na fazenda Colorado, terem me recebido tão bem e terem me fornecido toda a estrutura necessária para o trabalho. Agradeço juntamente, à toda a equipe de funcionários da fazenda Colorado que muito me ajudaram, de diferentes maneiras. Parablenizo a todos vocês pela organização e excelência no trabalho, sinto-me orgulhosa por ter desenvolvido meu experimento na maior fazenda produtora de leite do Brasil, que de fato é fantástica. A colaboração de vocês foi fundamental, muito obrigada!

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal: Cezinande de Meira, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Frederico Ozanam Papa, João Carlos

Pinheiro Ferreira, Marco Antonio Alvarenga, Maria Denise Lopes e Nereu Carlos Prestes por todo o conhecimento transmitido a mim, em aulas, no ambulatório e até mesmo em conversas despreocupadas pelo corredor. Para mim é uma honra fazer parte deste departamento que admiro desde criança.

Ao Fernando José Paganini Listoni e residentes das Enfermidades Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP Botucatu pela execução dos exames microbiológicos, conhecimentos a respeito de microbiologia que me passam, por terem me recebido abertamente e me instruído no laboratório.

A todos do Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, do Instituto de Biologia da UNICAMP, principalmente ao professor Domingos da Silva Leite, Amanda Siqueira e Mirtis Ferraz por terem se disponibilizado e permitido a realização dos PCR em seu laboratório, me recebendo da melhor forma possível, sem medirem esforços para que tudo desse certo.

A toda equipe do Laboratório Clínico Veterinário da UNESP Botucatu, professores Regina Kiomi Takahira e Raimundo Souza Lopes e residentes, especialmente à Marina Mitie que me ajudaram na execução e esclarecimentos à respeito dos testes hematológicos.

Ao João Pedro de Albuquerque e Henrique Pedro Dias que tanto me ajudaram no transporte de material e amostras da fazenda para os laboratórios.

À toda a minha família por todo apoio e carinho que sempre me dão, especialmente à minha prima Juliana Maschieri Bicudo pelo tempo que fiquei em Campinas e fui tão bem acolhida.

Aos meus amigos que mesmo que grande parte deles esteja longe, se fazem sempre presentes. A torcida e apoio de vocês me estimula cada dia mais.

Às moradoras da República As Patroa, Bruna Silva, Carolina Della Torre, Marina Romano Nogueira e Stephanie Mesquita, que me acolheram desde o primeiro

dia como se já me conhecessem há anos. Vocês tornaram minha estada em Araras muito mais divertida.

Aos estagiários que passaram pela fazenda Colorado durante o período que estive lá, especialmente à Dayane Ferreira, Karen Soler de Oliveira e Karoliny Iorgov, pela ajuda, companhia, almoços cheios de risadas e principalmente pela amizade.

Aos funcionários Edilson de Souza Freire, Edivaldo Torquato Gomes, José Luis de Souza, Maria Cristina Paganini Listoni Rosa, Walter Osvaldo Fabris e Dona Raquel que sempre se disponibilizaram a me ajudar.

Ao professor José Carlos de Figueiredo Pantoja e ao Leandro Rodello pelo auxílio nas análises dos dados.

À seção de pós-graduação da FMVZ- UNESP Botucatu José Roberto de Lalla Júnior, Carlos Pazini Junior, Ellen Casseiro Guilhen, Gláucia Cristina Corrêa de Oliveira, Maria Aparecida Dias Almeida Manoel, Maria Cristiane Martin Gameiro, Seila Cristina Cassineli Vieira pelos esclarecimentos, trâmites de documentação e ajudas diversas.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 2011/15852-7).

“O que interessa mesmo não são as noites em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre. Em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.”

William Shakespeare

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1- <i>Primers</i> testados para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), temperatura de anelamento (TA) e tamanho de amplificação na determinação dos fatores de virulência em <i>E. coli</i> | 29 |
| TABELA 2- <i>Primers</i> testados para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), temperatura de anelamento (TA) e tamanho de amplificação dos pares de base, na determinação dos grupos filogenéticos das <i>E.coli</i> | 31 |
| TABELA 3 – Caracterização do isolamento bacteriano, em cultura pura ou associada, (n=75) 24 horas (Momento 1) e 14 dias (Momento 2) pós-parto, do útero de vacas holandesas sem complicações puerperais. Araras - SP, 2013..... | 33 |
| TABELA 4 - Distribuição percentual (%) no Teste de Sensibilidade Antimicrobiana <i>in vitro</i> (total=69), de bactérias isoladas do útero de vacas holandesas 24 horas após o parto. Araras – SP 2013..... | 38 |
| TABELA 5 - Distribuição percentual (%) no Teste de Sensibilidade Antimicrobiana <i>in vitro</i> (total=68), de bactérias isoladas do útero de vacas holandesas 14 dias após o parto. Araras - SP, 2013..... | 39 |
| TABELA 6 – Avaliação ginecológica em vacas holandesas 24 horas (Momento 1) e 14 dias (Momento 2) pós-parto. Araras - SP, 2013..... | 41 |
| TABELA 7 – Relação da presença ou ausência de <i>E. coli</i> no útero de vacas holandesas 24 horas após o parto, com a avaliação ginecológica em 24 horas e 14 dias (Momentos 1 e 2) do puerpério. Araras - SP, 2013..... | 45 |
| TABELA 8 – Avaliação ginecológica 14 dias após o parto (Momento 2), em vacas holandesas com ou sem isolamento bacteriano uterino de <i>E. coli</i> ou <i>Trueperella pyogenes</i> . Araras - SP, 2013..... | 46 |
| TABELA 9 – Valores hematológicos em vacas holandesas 24 horas e 14 dias após o parto em puerpério fisiológico. Araras - SP, 2013..... | 48 |
| TABELA 10 - Caracterização da reatividade dos neutrófilos sanguíneos em prova do <i>Nitroblue Tetrazolium</i> (NBT), estimulados ou não por endotoxinas em vacas holandesas às 24 horas (Momento 1) e 14 dias (Momento 2) pós-parto. Araras - SP, 2013..... | 51 |
| TABELA 11 - Frequência dos fatores de virulência das <i>E. coli</i> isoladas do útero de vacas holandesas nas 24 horas (Momento 1, n=35) e 14 dias (Momento 2, n=24) pós-parto. Araras - SP, 2013..... | 53 |

| | |
|---|----|
| TABELA 12 - Frequência dos fatores de virulência das <i>E. coli</i> isoladas do útero de vacas holandesas 24 horas pós-parto (Momento 1) agrupadas de acordo com a presença (n=6) ou ausência (n=29) de <i>Trueperella pyogenes</i> 14 dias pós-parto (Momento 2) e das <i>E. coli</i> isoladas consecutivamente em ambos os Momentos (n=11). Araras - SP, 2013..... | 58 |
| TABELA 13 – Frequência da distribuição em Grupos Filogenéticos (CLERMONT et al., 2000) das <i>E. coli</i> isoladas do útero de vacas holandesas 24 horas pós-parto (Momento 1, n=35) e 14 dias pós-parto (Momento 2, n=24). Araras - SP, 2013..... | 59 |
| TABELA 14 – Frequência da distribuição em Grupos Filogenéticos (CLERMONT et al.; 2000) das <i>E. coli</i> isoladas do útero de vacas no Momento 1, agrupadas de acordo com a presença (n=6) ou não (n=29) de <i>Trueperella pyogenes</i> no Momento 2 e das <i>E. coli</i> isoladas consecutivamente em ambos os Momentos (n=11). Araras - SP, 2013..... | 61 |
| TABELA 15 - Distribuição percentual das causas de exclusão do experimento das vacas holandesas (n=25) entre 24 horas e 14 dias pós-parto, devido à intercorrências clínicas puerperal e/ou antibioticoterapia. Araras - SP, 2013..... | 79 |
| TABELA 16 – Relação do isolamento de <i>E. coli</i> do útero de vacas holandesas 24 horas do período pós-parto (Momento 1), com o isolamento bacteriano uterino 14 dias pós-parto (Momento 2). Araras - SP, 2013..... | 80 |
| TABELA 17 – Espectro de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do útero de vacas HPB, 24 horas pós-parto (Momento 1). Araras - SP, 2013..... | 81 |
| TABELA 18 – Espectro de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do útero de vacas HPB, 14 dias após o parto (Momento 2). Araras - SP, 2013..... | 84 |
| TABELA 19 - Valores hematológicos de referência em bovinos no Laboratório Clínico Veterinário, da FMVZ - UNESP câmpus Botucatu – SP..... | 86 |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Representação esquemática do delineamento experimental, em vacas Holandesas (HPB) após o parto..... 22
- FIGURA 2** – Distribuição percentual dos isolamentos bacterianos uterinos em vacas HPB, 24 horas pós-parto (Momento 1) e que resultaram em isolamento de *Trueperella pyogenes* (n=9), 14 dias pós-parto (Momento 2). Araras – SP, 2013.... 36

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Lista de tabelas..... | viii |
| Lista de figuras..... | x |
| Resumo..... | xiii |
| Abstract..... | xv |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 2 |
| 2.1 Puerpério..... | 2 |
| 2.2 Mecanismos de defesa no período puerperal..... | 5 |
| 2.3 Contaminação bacteriana do útero pós-parto..... | 9 |
| 2.4 Infecção uterina pós-parto..... | 11 |
| 2.5 Fatores de virulência..... | 14 |
| 2.5.1 Adesinas..... | 15 |
| 2.5.2 Toxinas..... | 16 |
| 2.5.3 Intimina (eae)..... | 17 |
| 2.5.4 Proteína específica uropatogênica (usp)..... | 17 |
| 2.5.5 KPS..... | 18 |
| 2.5.6 Aerobactina (aer)..... | 18 |
| 3. OBJETIVOS..... | 19 |
| 3.1 Geral..... | 19 |
| 3.2 Específicos..... | 19 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 4.1 Locais de experimentação..... | 20 |
| 4.1.1 Fazenda Colorado..... | 20 |
| 4.1.2 Laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas, da FMVZ - UNESP câmpus Botucatu – SP..... | 20 |
| 4.1.3 Laboratório Clínico Veterinário FMVZ - UNESP câmpus Botucatu – SP..... | 20 |
| 4.1.4 Laboratório Clínico Veterinário Araras, Araras – SP..... | 20 |
| 4.1.5 Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas – SP..... | 20 |
| 4.2 Animais e delineamento experimentais..... | 20 |
| 4.2.1 Momento 1: (M1 – 24 horas pós-parto)..... | 21 |
| 4.2.2 Momento 2: (M2 - 14 dias pós-parto)..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3 Metodologia..... | 23 |
| 4.3.1 Exames físico, ginecológico e ultrassonográfico..... | 23 |
| 4.3.2 Coleta de secreção uterina..... | 24 |
| 4.3.3 Citologia uterina..... | 24 |
| 4.3.4 Cultivo microbiológico..... | 25 |
| 4.3.5 Teste de sensibilidade microbiana “ <i>in vitro</i> ” (antibiograma)..... | 26 |
| 4.3.6 Avaliação da função neutrofílica (NBT) e hemograma..... | 26 |
| 4.3.7 Determinação dos fatores de virulência nas cepas de <i>E. coli</i> | 27 |
| 4.3.7.1 Estocagem de isolados de <i>E. coli</i> | 27 |
| 4.3.7.2 Extração de DNA..... | 27 |
| 4.3.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 28 |
| 4.3.7.4 Cepas controle..... | 30 |
| 4.3.7.5 Determinação dos Grupos Filogenéticos das <i>E. coli</i> | 30 |
| 4.3.8 Análise estatística..... | 31 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 32 |
| 5.1 Cultivo microbiológico..... | 32 |
| 5.2 Teste de sensibilidade microbiana “ <i>in vitro</i> ” (antibiograma)..... | 37 |
| 5.3 Avaliação clínico-ginecológica..... | 40 |
| 5.3.1 Tônus uterino..... | 42 |
| 5.3.2 Avaliação ultrassonográfica..... | 42 |
| 5.3.3 Aspecto e odor da secreção uterina..... | 43 |
| 5.3.4 Citologia uterina..... | 44 |
| 5.4 Hemograma..... | 47 |
| 5.5 Teste do NBT..... | 51 |
| 5.6 Fatores de virulência da <i>E. coli</i> | 52 |
| 5.6.1 Agrupamento filogenético da <i>E. coli</i> | 59 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 62 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 64 |
| 8. ANEXO 1..... | 79 |
| 9. ARTIGO CIENTÍFICO..... | 87 |

RESUMO

BICUDO, LUANA DE CÁSSIA. Perfil de fatores de virulência das *Escherichia coli* isoladas do útero de vacas holandesas após o parto e sua relação com a microbiota uterina. Botucatu, 2014. 117p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal; Área de Reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A contaminação bacteriana do útero após o parto é um evento quase unânime em vacas, em que a *Escherichia coli* (*E. coli*) é o principal micro-organismo encontrado. Apesar disto, a ativação de mecanismos de defesa local e sistêmica eliminam gradualmente os contaminantes ao longo do puerpério fisiológico. Porém, algumas bactérias possuem fatores de virulência, que facilitam sua instalação e permanência no tecido hospedeiro, propiciando o desenvolvimento de infecções uterinas. Embora o mecanismo não esteja completamente elucidado, certifica-se que a presença de *E. coli* nos primeiros dias pós-parto favorece o crescimento de *Trueperella pyogenes* num período mais tardio, bactéria frequentemente associada à infecção uterina. Com isto, objetivou-se estabelecer a dinâmica e perfil da microbiota uterina relacionando os fatores de virulência das *E. coli* isoladas do útero das vacas, 24 horas após a parição, com a presença bacteriana no ambiente uterino na segunda semana pós-parto. O estudo foi conduzido em 75 vacas holandesas preto e branca (HPB) com parto e puerpério isento de complicações. Decorridas 24 horas do parto (Momento 1) foi realizada avaliação ginecológica através da palpação retal, observada a coloração da mucosa vaginal e aferição da temperatura retal. Destes animais foram coletadas, em condições de assepsia, amostras da secreção loquial visando-se o cultivo microbiológico, antibiograma e a citologia uterina. O período pós-parto foi monitorado quanto às intercorrências e alterações da esfera reprodutiva e produtiva. No 14^o dia pós-parto (Momento 2), foram realizados os mesmos procedimentos, além da ultrassonografia transretal. Amostras de sangue foram coletadas, em ambos os momentos, para a caracterização da capacidade fagocítica dos neutrófilos

pelo teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT) estimulado (ES) e não estimulado (NE) e realização de hemograma. Nas *E. coli* isoladas foram investigados diferentes genes associados a fatores de virulência (FV) através da técnica de PCR. Foi observada rápida involução uterina, caracterizada por diâmetro do corno uterino à ultrassonografia de $5,8 \pm 1,0$ cm na segunda semana pós-parto. Os parâmetros hematológicos obtidos foram caracterizados por leucocitose com monocitose e neutrofilia em ambos os momentos, porém com baixa atividade fagocítica dos neutrófilos ao teste do NBT (ES e NE), além de hipoproteinemia no primeiro dia pós-parto. Constatou-se uma dinâmica da microbiota uterina caracterizada por prevalência de *E. coli* no Momento 1 e de *Streptococcus* α -hemolítico no Momento 2. O Florfenicol e Ciprofloxacino foram os antimicrobianos com melhor espectro de sensibilidade (>70%) em ambos os momentos. Nas cepas de *E. coli* isoladas (n=59) foram detectados sete dos 16 genes de FV estudados, *fimH*, *iucD/era*, *hlyA* e *kps* foram os mais frequentes, sendo ainda encontrados, *vt1*, *vt2* e *usp*, entretanto a maioria das cepas (91,2%) era comensal, pertencendo principalmente ao grupo filogenético A (57,9%). Houve associação em 66,7% (6/9) dos isolamentos de *Trueperella pyogenes* no Momento 2, com o crescimento de *E. coli* no Momento 1, no entanto não foi possível estabelecer uma clara relação com os FV detectados.

Palavras-chave: infecção uterina, *Escherichia coli*, puerpério, bovino.

ABSTRACT

BICUDO, LUANA DE CÁSSIA. Profile of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from the uterus of Holstein cows after calving and their relationship with the uterine microbiota. Botucatu, 2014. 117p. Dissertation (Master degree) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, campus of Botucatu, São Paulo State University.

Bacterial contamination of the uterus after delivery is almost an unanimous event in cows, in which the *Escherichia coli* (*E. coli*) is the main micro-organism found. Despite this, the activation of local and systemic defense mechanisms gradually eliminate contaminants throughout the physiological puerperium. However, some bacteria possess virulence factors that facilitate its installation and remain in the host tissue, leading to the development of uterine infections. Although the mechanism is not fully elucidated, it is certified that, the presence of *E. coli* in the first days postpartum favors the growth of *Trueperella pyogenes* in a later period, bacteria often associated with uterine infection. Thus, aimed to establish the dynamics and profile of uterine microbiota relating the virulence factors of *E. coli* isolated from the uterus of cows 24 hours after calving, with the bacterial presence in the uterine environment in the second postnatal week. The study was conducted on 75 Holstein cows with normal delivery and postpartum without complications. After 24 hours of parturition (Moment 1), gynecological evaluation was performed by rectal palpation, observed staining of the vaginal mucosa and measurement of rectal temperature. Samples of secretion loquial were collected aseptically of these animals, aiming the microbiological culture, antibiogram and uterine cytology. The postpartum period was uneventful and monitored for changes in the reproductive and productive sphere. On the 14th day postpartum (Time 2), the same procedures were performed, apart from transrectal ultrasonography. Blood samples were collected at both moments, to characterize the phagocytic ability of neutrophils by the nitroblue tetrazolium test (NBT) stimulated (S) and unstimulated (US) and hemogram. In *E. coli* isolates were investigated different genes associated with virulence factors (VF) by PCR. Rapid uterine involution, characterized by diameter of the uterus on ultrasound of 5.8 ± 1.0

cm in the second postnatal week was observed. The hematological parameters obtained were characterized by leukocytosis with neutrophilia and monocytosis in both instances, but low phagocytic activity of neutrophils to the NBT test (S and US). and hypoproteinemia in the first day postpartum. It was observed a dynamic uterine microbiota postpartum characterized by prevalence of *E. coli* at Moment 1 and α - hemolytic Streptococcus in the Moment 2. Florfenicol and Ciprofloxacin were the antimicrobials with best spectral sensitivity (> 70 %) at both time points. In *E. coli* strains isolated (n = 59) were detected seven of the 16 FV genes studied , *fimH* , *IUCD / aer*, *hlyA* and *kps* were the most frequent , being found yet, *vt1* , *vt2* and *usp* , however most strains (91,2%) were commensal, mainly belonging to the phylogenetic group A (57,9%). Association was found in 66.7 % (6 /9) of *Trueperella pyogenes* isolates of the Moment 2 with the growth of *E. coli* at Moment 1, however it has not been possible to establish a clear relationship with the FV detected.

Keywords: uterine infection, *Escherichia coli*, postpartum, bovine.

1. INTRODUÇÃO

As infecções uterinas (IU) não específicas afetam de 10 a 40% de vacas leiteiras no pós-parto e podem ser a causa das principais perdas econômicas (SEALS et al., 2002) devido à prejuízos reprodutivos e produtivos, pelo aumento no período de serviço e até mesmo infertilidade, pela queda na produção e descarte de leite por resíduos de antibióticos utilizados nos tratamentos desses animais (LEWIS, 1997; SHELDON et al., 2008; GANI et al., 2008; LEBLANC et al., 2011).

Apesar da contaminação do útero por bactérias ocorrer na maioria das vacas após o parto, nem todas desenvolvem infecção, isto se deve à ativação de mecanismos de defesas local e sistêmica que se opõem ao crescimento bacteriano, permitindo que o útero retorne às condições anteriores à gestação.

Ao longo do puerpério fisiológico, ocorrem alteração e diminuição da microbiota uterina até sua completa ausência. Entretanto, algumas bactérias possuem características peculiares, os fatores de virulência, que propiciam sua permanência nos tecidos do hospedeiro. A *Escherichia coli* (*E.coli*), além de ser a bactéria mais frequentemente isolada do útero no pós-parto é uma das mais virulentas em ambientes extra-intestinais.

A variação dos fatores de virulência encontrados nas *E. coli* isoladas do útero de vacas em diferentes estudos (RESENDE et al., 2007; SILVA et al., 2009; BICALHO et al., 2010; BICALHO et al., 2012) demonstra a diversidade genética e complexidade desta espécie bacteriana, não havendo um consenso no que diz respeito à prevalência e relevância de cada um dos fatores de virulência no ambiente uterino.

Além da *E. coli*, a *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) é um dos importantes patógenos encontrados no útero após o parto. A prevalência de *Streptococcus* α -hemolítico e *Staphilococcus* coagulase negativa também é elevada, no entanto, estes agentes são considerados oportunistas (WERNER et al., 2012).

Deste modo, torna-se relevante o estudo da dinâmica da microbiota uterina pós-parto para ampliação do conhecimento da fisiologia do puerpério e melhor compreender os fatores que se relacionam com o estabelecimento de alterações reprodutivas, causa de severas perdas nos sistemas de produção animal, que podem comprometer a segurança alimentar mundial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Puerpério

Puerpério são modificações fisiológicas que ocorrem no útero na fase imediatamente após o parto, quando este órgão se recupera das transformações que sofreu durante a gestação, preparando-se para uma nova prenhez. O puerpério é dividido didaticamente em delivramento e puerpério propriamente dito (ALVARENGA, 2006).

Em condições fisiológicas a fase de delivramento, que compreende a expulsão dos envoltórios fetais, ocorre em um tempo variado dentro de 12 horas após o nascimento do produto. Quando os envoltórios fetais não são eliminados dentro deste intervalo de tempo, caracteriza-se a retenção de placenta (BICUDO, 2002). Em estudo realizado por Hussain et al. (1990) a retenção dos envoltórios fetais resultou em maior número de isolados bacterianos e maior número de dias para se completar a involução uterina.

O puerpério propriamente dito é caracterizado pela involução uterina, quando o útero retorna às condições anteriores à gestação. No bovino esta fase tem duração média de 30 a 60 dias em raças taurinas e 100 a 120 dias em zebuínas (ALVARENGA, 2006). Nesta fase ocorre uma rápida diminuição do tamanho uterino caracterizada por um processo de involução das fibras musculares hipertrofiadas do miométrio, mobilização dos mecanismos de defesa uterina, incluindo muco, células fagocíticas e anticorpos e reparação das estruturas endometriais (BICUDO, 2002; AZAWI, 2008).

Imediatamente após o parto ocorrem fortes e repetidas contrações miométriais que têm como função expulsar os fluidos e debrís teciduais do interior do útero, comprimir a vascularização uterina ajudando a minimizar a possibilidade de hemorragia e reduzir o tamanho do útero (SENGER, 2003).

Através da palpação transretal pode-se avaliar a involução uterina, porém deve-se levar em conta que esta é uma técnica subjetiva (SHELDON et al., 2006), já a utilização da ultrassonografia transretal permite uma mensuração dos cornos uterinos e cérvix de maneira objetiva (SHELDON et al., 2006).

Duas mensurações podem ser utilizadas para avaliar o tamanho do útero. Uma delas é o diâmetro uterino total, a aproximadamente 10 cm da bifurcação uterina realiza-se a mensuração de serosa a serosa. A outra é realizada de submucosa a submucosa, para se obter o diâmetro do lúmen uterino. A diferença entre as duas mensurações estima a espessura do miométrio (MELENDEZ et al., 2004). Nos casos de IU, ultrassonograficamente visibiliza-se o espessamento da parede uterina e a presença de fluido intra-uterino de ecogenicidade aumentada (RISCO et al., 2007).

Ainda durante esta fase, ocorre de maneira continuada a eliminação de lóquio, que é a secreção resultante da apoptose das células da superfície endometrial e da necrose do tecido caruncular, mesclada ao exsudato inflamatório. A eliminação do lóquio ocorre até o 14º dia pós-parto e desaparece totalmente após o 30º dia. Nos primeiros 2 ou 3 dias possui coloração sanguínea tornando-se mais claro posteriormente (ALVARENGA, 2006). Devido às contrações miométriais e redução do processo inflamatório que ocorrem durante 7 a 10 dias após o parto há uma diminuição do volume loquial no interior do útero. Em vacas leiteiras pode ocorrer eliminação de até 2000 mL de lóquio no segundo até o terceiro dia pós-parto (SENGER, 2003).

Por meio de vaginoscopia pode-se constatar a presença e aspecto das secreções uterinas (CORDEIRO et al., 1989) e através de palpação vaginal, além de

avaliar a parede vaginal e abertura da cérvix pode-se coletar amostras da secreção para avaliação do aspecto e odor (SHELDON et al., 2006).

Em caso de infecção uterina o animal apresenta maior volume de secreção e alteração de seu aspecto, variando de mucopurulento, purulento à serossanguinolento (CHAPWANYA, 2008; WERNER et al., 2012). Apesar disto, a ausência de secreções no canal vaginal nem sempre reflete a ausência de inflamação uterina (SHELDON et al., 2006). Nos casos de endometrite subclínica e piometra em que a cérvix encontra-se fechada não é visibilizada descarga vaginal de qualquer natureza (CHAPWANYA, 2008). O odor fétido na secreção vaginal indica presença e permite estimar a quantidade de bactérias no útero (SHELDON et al., 2006).

Segundo Noakes (1991) a regeneração do endométrio se inicia por alterações degenerativas da superfície caruncular 2 dias após o parto e no 5º dia as carúnculas ficam cobertas por uma camada necrótica de 1 a 2 mm de espessura. Do 5º ao 10º dia ocorre descamação de tecido necrótico o qual se torna liquefeito e contribui para a eliminação do lóquio. Por volta dos 15 dias há início de reepitelização das carúnculas desnudas, que se completada em torno do 25º dia. A completa restauração da estrutura endometrial, inclusive das glândulas uterinas, acontece provavelmente em 50 a 60 dias.

Pela avaliação histológica em fragmento obtido por meio de biopsia endometrial, pode-se prever a respeito da fertilidade do animal, apesar desta técnica ser demorada e onerosa, não sendo clinicamente acessível na maioria das situações (SHELDON et al., 2006).

Para classificação dos achados histopatológicos são utilizados os seguintes critérios: infiltração de células inflamatórias no endométrio, alterações fibróticas e dilatações glandulares. Para avaliar o grau do infiltrado inflamatório, a quantidade das células do exsudato é dividida em discreto, moderado ou acentuado. E de acordo com sua distribuição é classificado em focal ou difuso. As fibroses, associadas ou não à presença de células inflamatórias são classificadas em discretas, moderadas

ou acentuadas de acordo com a proliferação fibroblástica e produção de colágeno, principalmente ao redor de glândulas. As dilatações de glândulas são classificadas segundo o diâmetro em discretas, moderadas e acentuadas e em focais ou difusas segundo sua distribuição (CORDEIRO et al., 1989).

2.2 Mecanismos de defesa no período puerperal

O sistema de defesa local no período puerperal envolve a rápida involução uterina, fechamento da cérvix, eliminação do conteúdo uterino e mobilização dos mecanismos naturais incluindo muco, células fagocitárias e anticorpos (AZAWI, 2008).

Deve-se levar em consideração que a capacidade fagocitária dos polimorfonucleares é influenciada por alterações metabólicas que ocorrem neste período (GALVÃO, 2012) e, adicionalmente, a defesa local, modificações sistêmicas representadas por alterações nos parâmetros hematológicos (SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006) e ativação da defesa humoral, contribuem para o reestabelecimento das condições de normalidade da função uterina (DHALIWAL et al., 2001).

Não há um consenso para os valores do hemograma para vacas no pós-parto, porém, é relatado que o estresse que ocorre com o parto estimula a secreção de cortisol pelo córtex adrenal, levando ao aumento de neutrófilos e diminuição do percentual de linfócitos e de eosinófilos circulantes em vacas (MERRILL & SMITH, 1954; SINGH et al., 2008). Ferreira et al. (2009) encontraram número de leucócitos dentro dos valores de referência 24 horas após o parto em 11 vacas da raça Girolanda. Hussain e Daniel (1992) observaram que em vacas após parto normal, o número total de leucócitos, o número absoluto de linfócitos e neutrófilos sanguíneos diminuíram drasticamente após o primeiro dia pós-parto e, em torno do 10º dia, ocorreu um aumento gradual destes valores até o 32º dia do puerpério. Singh et al. (2008) justificam a leucopenia durante a primeira semana pós-parto pela migração de neutrófilos em direção à luz do útero.

Nos casos de metrite pós-parto pode ocorrer tanto acentuada diminuição do número de neutrófilos na corrente sanguínea (CAI et al., 1994 apud HAMMON et al., 2006; RISCO, et al., 2007) quanto elevação do número total de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos (HUSSAIN & DANIEL, 1992) em comparação a vacas com puerpério normal.

Como principal mecanismo local, as células polimorfonucleares (PMN) constituem a primeira linha de defesa contra microorganismos contaminantes da vagina e lúmen uterino, cuja atividade fagocitária depende da opsonização de bactérias por anticorpos humorais (DHALIWAL et al., 2001; GALVÃO, 2012). Outros componentes celulares, incluindo linfócitos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos, são também mobilizados e ativados no útero durante o período pós-parto (SINGH et al., 2008).

Células endometriais expressam receptores *toll-like 4* (TLR4), que reconhece lipopolissacarídeos de *E. coli* e outras bactérias Gram negativo, as causas mais comuns de endometrite bovina. Ativação de TLR4 desencadeia a produção de fator de necrose tumoral e outras citocinas pró-inflamatórias (SINGH et al., 2008). Em estudo realizado por Dhaliwal et al. (2001), demonstrou-se que a infusão uterina de imunomoduladores como lipopolissacarídeos (LPS) de *E.coli* em vacas saudáveis e com endometrite estimula a migração de leucócitos para o lúmen uterino.

Uma diminuição da expressão das citocinas pró-inflamatórias pode levar a uma baixa quimiotaxia e ativação de neutrófilos e monócitos que prejudica a depuração de bactérias e predispõe o desenvolvimento de endometrites em vacas (GALVÃO et al., 2011).

É possível avaliar a presença de neutrófilos no útero através da citologia uterina. Existem dois métodos de avaliação da citologia em microscópio binocular. Uma delas é determinada, segundo Kasimanickam et al. (2004) pelo percentual de polimorfonucleares contando, no mínimo 100 células em aumento de 400 vezes. Já no método proposto por Cordeiro et al. (1989), realiza-se a contagem do número

médio de neutrófilos em 10 campos microscópicos, nas regiões de maior concentração celular ao aumento de 400 vezes.

Nos casos de IU encontra-se um aumento na contagem destas células (RISCO et al., 2007). Este exame é de grande valia para o diagnóstico da endometrite subclínica, por estar mais associado ao atraso na involução uterina e na recuperação endometrial do que com infecção bacteriana. Desta forma, animais que apresentam mais de 18% de PMN à citologia uterina na quarta semana pós-parto são considerados positivos para esta afecção (BARÁNSKI et al., 2012).

O período de periparto é também caracterizado por aumento da secreção da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), molécula pró-inflamatória que estimula a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e isto pode aumentar a produção de leucotrieno B4. Citocinas pró-inflamatórias e leucotrieno B4 aumentam a fagocitose e a função linfocitária (ZERBE et al., 2003; LEWIS, 2003; LEWIS, 2004; SINGH et al., 2008).

A função neutrofílica pode ser avaliada por diferentes métodos, dentre eles: migração aleatória, quimiotaxia, ingestão, atividade de mieloperoxidase (iodação), produção de superóxido (redução do citocromo C), citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (CAI et al., 1994; HAMMON et al., 2006) e além destes, o teste do *Nitroblue Tetrazolium* (NBT), que é um método não-específico de estimulação da membrana do neutrófilo e tem aplicação no estudo da função neutrofílica particularmente em pacientes septicêmicos (GORDON et al., 1975).

Park et al. (1968), descreveram uma técnica de coloração de sangue periférico utilizando o corante NBT, que é amarelo, solúvel em água, que capta elétrons liberados durante o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Sua forma reduzida é denominada formazana, partícula azul escura que se deposita no citoplasma do neutrófilo. Assim, o teste do NBT pode ser utilizado para verificar a liberação de elétrons que ocorre na fase de digestão por metabolismo oxidativo dos neutrófilos, avaliando, portanto, a etapa de digestão pelos neutrófilos (FORTE et al., 1999).

Com este teste classificam-se os neutrófilos como “NBT positivo” e “NBT negativo”. A proporção ou número absoluto de neutrófilo “NBT positivo” é substancialmente maior em pacientes com algum tipo de infecção bacteriana, devido à estimulação por lipopolissacarídeos. Em contrapartida, estes índices permaneceram normais ou próximos do normal em doenças não bacterianas, nas quais devido à hipertermia ou leucocitose tendem a ser confundidas com infecção bacteriana. Portanto, o teste de NBT foi apresentado como um método auxiliar simples de diagnóstico para se diferenciar infecção bacteriana de doenças não bacterianas (PARK et al., 1968; FORTE et al., 1999).

Assume-se que o número absoluto ou proporção de neutrófilos “NBT positivo” está diretamente relacionado ao grau de atividade fagocitária de leucócitos *in vivo*. Valores muito baixos neste teste são observados em controles normais, assim como em alguns pacientes após o tratamento com antibiótico sistêmico (PARK et al., 1968).

A fim de se diferenciar resultados falso-negativos, devido à disfunção do sistema de fagocitose, de verdadeiros negativos, devido à ausência de bactérias na circulação sanguínea, Park e Good (1970) desenvolveram o teste de NBT estimulado, utilizando 10g de endotoxina (Difco®) em 0,05 mL de solução salina tamponada com fosfato (pH 7,2). No teste estimulado, aproximadamente metade dos neutrófilos torna-se positivo em amostras humanas de controle normal.

A avaliação neutrofílica também pode ser realizada em neutrófilos do fluido uterino. A ocorrência de altos índices de fagocitose destes neutrófilos nos primeiros 8 a 10 dias pós-parto é indicativa da atividade e eficiência dos mecanismos de defesa uterina para combater a infecção bacteriana (HUSSAIN & DANIEL, 1992).

No periparto, vacas com acentuado balanço energético negativo e vacas na quarta ou mais lactação apresentam maior deficiência da função neutrofílica, além disto, Zerbe et al. (2001) relataram que o contato prolongado entre os fragmentos bacterianos ou produtos solúveis de *E. coli* e *T. pyogenes* com polimorfonucleares bovinos resultou em depressão funcional das células, acelerando a morte de

neutrófilos *in vitro* (GILBERT et al., 1993; HAMMON et al., 2006; GALVÃO et al., 2012).

As classes principais de imunoglobulinas (IgM, IgA e IgG), quer por difusão passiva ou por produção local, desempenham um papel protetor importante no útero, agindo como opsoninas para aumentar a fagocitose, estimulando a cascata do complemento ou bloqueando a aderência de agentes patogênicos na superfície mucosa (SINGH et al., 2008).

A concentração de anticorpos no trato reprodutivo é estimulada após a exposição a antígenos locais e a resposta depende de vários tipos de imunoglobulinas, IgG predomina no útero e IgA na vagina. Apenas uma fração da quantidade total de IgG encontrada no lúmen uterino é sintetizada no endométrio, grande parte advém via hematogêna da irrigação uterina (DHALIWAL et al., 2001).

A alteração na função de neutrófilos, o balanço energético negativo pela menor ingestão de matéria seca e produção leiteira nos primeiros cem dias de lactação e ação de progesterona são fatores que levam à diminuição da imunidade e por isto predispõem o desenvolvimento de infecções uterinas no período puerperal (LEWIS, 1997; SUBANDRIO et al., 2000; LEWIS, 2003; LEWIS, 2004; HAMMON & GOFF, 2006; BELL & ROBERTS, 2007).

2.3 Contaminação bacteriana do útero pós-parto

Após o parto, o útero de 90% das vacas de leite fica contaminado por bactéria (KIRK & OVERTON, 2011) e embora o trato reprodutivo contendo lóquio seja um ambiente ideal para o crescimento bacteriano, os mecanismos de defesa que ocorrem durante o puerpério fisiológico eliminam gradualmente estes contaminantes nas primeiras 6 semanas pós-parto (SHELDON & DOBSON, 2004; AZAWI, 2008).

Williams et al. (2005) identificaram as bactérias mais frequentemente isoladas do útero de vacas e as classificaram em três grupos de acordo com patogenicidade e possibilidade de causar IU. *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Prevotella melaninogenicus*, *Escherichia coli* e *Fusobacterium necrophorum* são bactérias

patogênicas ao útero associadas ao aumento da inflamação, lesões endometriais e doença clínica mais severa. Já *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Peptostreptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* não-hemolítico são potencialmente patogênicos no útero de vacas, frequentemente isolados mas não comumente associados à lesões uterinas. *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus* spp., *Providencia stuartii*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase negative, *Streptococcus* α -hemolítico, *Streptococcus acidominimus*, *Aspergillus* spp. são considerados contaminantes oportunistas que eventualmente são isolados do útero, porém, não estão associados à endometrite.

Em diferentes estudos, no cultivo de secreção endometrial no pós-parto ocorre a prevalência de crescimento de *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e anaeróbicos Gram negativo (MATEUS et al., 2002; ROCHA et al., 2004; GAMBARINI et al., 2005; HAMMON & GOFF, 2006; RISCO et al., 2007).

O microorganismo *Actinomyces pyogenes*, desde 1997 foi denominado *Arcanobacterium pyogenes*. Em 2011, com base em estudos filogenéticos (gene 16S rRNA), na composição de fosfolípidios e na presença de menaquinona (vitamina K₂), foi proposto novo gênero e *Arcanobacterium pyogenes* foi renomeado de *Trueperella pyogenes* (YASSIN et al., 2011).

Segundo Biberstein e Hirsh (2009), *T. pyogenes* é um bastonete Gram positivo, anaeróbico facultativo, de 0,5 μ m, não encapsulado e sem grânulo metacromáticos, parede celular constituinte de lisina, ramnose e glicose. Possui exotoxina hemolítica que lisa hemácias *in vitro*. É encontrado em mucosas e pele de animais suscetíveis. Em bovinos, a *T. pyogenes* está envolvida na maioria das infecções purulentas de origem traumática ou oportunista. Seu cultivo é feito em ágar sangue e frequentemente é encontrada em associação com outras bactérias. Também pode ser causa esporádica de abortamento, com incidência de 1,5 a 3%. O abortamento ocorre no terço final da gestação, resultando normalmente em metrite purulenta e retenção de placenta (ROPPEL & CAMPERO, 1998).

A *E. coli* é um bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo que fermenta glicose, seu cultivo é realizado em ágar MacConkey. É uma bactéria que compõe a flora normal do trato gastrointestinal e é um importante patógeno para os animais. As diferenças de grau de patogenicidade entre as diversas linhagens de *E. coli* são devido à presença de plasmídeos individuais e ao repertório de profagos integrados no genoma associados às diferentes linhagens. A tipificação das linhagens é realizada com base nas diferenças entre três antígenos estruturais: O, H e K. Os antígenos O (antígenos somáticos ou de parede celular) são encontrados na porção polissacarídica do LPS. Os antígenos H são associados com flagelos e os antígenos K são associados com a cápsula (HARVEY et al., 2008; HIRSH, 2009).

2.4 Infecção uterina pós-parto

A contaminação bacteriana do útero no pós-parto por si só não causa a infecção uterina. A instalação da infecção é resultado do desequilíbrio entre a contaminação e os mecanismos de defesa uterina (FOLDI et al., 2006) permitindo a persistência de bactérias patogênicas, que se aderem ao endométrio, colonizam ou penetram o epitélio e/ou liberam toxinas bacterianas (LEWIS, 1997; SHELDON et al., 2006; RISCO et al., 2007; AZAWI, 2008). Isto resulta no prolongamento do período de involução uterina, do período puerperal e atraso no estabelecimento da subsequente gestação (HUSSAIN, 1989; SENGER, 2003).

As doenças uterinas que ocorrem no pós-parto são uma das principais causas de infertilidade, queda no desempenho reprodutivo e redução na produção de leite em vacas (RISCO et al., 2007; GANI et al., 2008; SHELDON et al., 2008). A infertilidade associada à IU é causada pelo dano do endotélio e desregulação da atividade cíclica ovariana (SHELDON et al., 2008).

As IU puerperais são mais freqüentes em vacas leiteiras do que em vacas de corte (RISCO et al., 2007). Embora a IU geralmente não leve à morte, é frequente o descarte de vacas que apresentam baixo desempenho reprodutivo devido a esta infecção. Além disto, pode haver grandes perdas na produção de leite e necessidade

de se descartar a produção em função da contaminação do produto pelos antibióticos utilizados no tratamento (LEWIS, 1997).

Vacas com parto distócico, retenção de placenta, partos gemelares ou natimortos e vários outros distúrbios metabólicos são mais propensas que outras a desenvolverem metrite (LEWIS, 1997).

As doenças uterinas no pós-parto de vacas possuem diferentes classificações de acordo com sua apresentação clínica e achados citológicos, de maneira geral, utiliza-se o termo infecção uterina para se evitar imprecisões. Sheldon et al. (2006) propuseram a classificação de metrite puerperal, endometrite clínica e subclínica e piometra, para serem adotados e facilitar o diagnóstico destas diferentes afecções.

Metrite puerperal é definida como aumento do útero e conteúdo uterino aquoso de coloração vermelha-amarronzada de odor fétido, associado à alterações sistêmicas como apatia, queda na produção de leite, sinais de toxemia e hipertermia dentro de 21 dias pós-parto (SHELDON et al., 2006).

Metrite clínica é o aumento do útero com conteúdo purulento observado na vagina, sem sinais clínicos sistêmicos dentro de 21 dias pós-parto (SHELDON et al., 2006). A endometrite clínica é a presença de conteúdo uterino purulento detectável na vagina a partir de 21 dias pós-parto ou conteúdo uterino mucopurulento detectável na vagina após 26 dias pós-parto, sem a presença de sinais clínicos sistêmicos. Endometrite subclínica é definida por citologia uterina coletada de 21 a 33 dias pós-parto com a presença de mais de 18% de neutrófilos ou mais de 10% de neutrófilos do 34^o ao 47^o dia na ausência da endometrite clínica. Piometra é definida pelo acúmulo de material purulento intra-uterino na presença de um corpo lúteo persistente e cérvix fechada (SHELDON et al., 2006).

Clinicamente pode ser observada diarreia aquosa, fétida de coloração marrom-avermelhada, hipertermia, desidratação, apatia, inapetência e redução na produção leiteira na metrite puerperal aguda e na metrite clínica. Nos casos de endometrite clínica, endometrite subclínica e piometra o animal pode não apresentar qualquer alterações no exame físico (CHAPWANYA, 2008).

A incidência de metrite clínica é de 10 a 20%, de endometrite ou de descarga vaginal purulenta de aproximadamente 15% e de endometrite subclínica mais de 15% (LEBLANC et al., 2011).

A coleta de material para exame microbiológico do conteúdo uterino pode ser realizado por *swab* (CORDEIRO et al., 1989) ou lavado uterino (GALINDO et al., 2003). A realização do exame bacteriológico contribui não só para o conhecimento da flora bacteriana como também serve de orientação terapêutica através do antibiograma (CORDEIRO et al., 1989).

São relatadas diferentes espécies e frequências de bactérias relacionadas às IU em vacas, porém há o consenso de que *E. coli*, *T. pyogenes* e anaeróbicos Gram negativos são os principais microorganismos responsáveis pelo desenvolvimento desta afecção (RUDER et al., 1981; HUSSAIN et al., 1990; HUSZENICZA et al., 1999; GALVÃO et al., 2009; SILVA et al., 2009).

A *E. coli* é a bactéria mais comumente encontrada no útero no período pós-parto, abrindo caminho para infecção por *T. pyogenes* (DOHMEN et al., 2000; WILLIAMS et al., 2008). Há uma relação positiva entre a presença de *E. coli* no útero de vacas nos primeiros dias pós-parto e a prevalência de *Trueperella pyogenes* e bactérias anaeróbicas Gram negativo a partir da 2ª semana pós-parto, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento das IU. Portanto, a contaminação bacteriana no útero logo após o parto favorece o estabelecimento de IU por *Trueperella pyogenes* e bactérias anaeróbicas Gram negativo no pós-parto tardio (DOHMEN et al., 2000; DHALIWAL et al., 2001; WILLIAMS et al., 2008).

Embora *E. coli* seja constituinte da flora intestinal normal de várias espécies, algumas cepas podem ser causadoras de diversas doenças intestinais e extra-intestinais (CLERMONT et al., 2000). As infecções uterinas com *E. coli* afetam a fertilidade de várias maneiras, incluindo o eixo neuroendócrino e os ovários, além do próprio útero. Os lipopolissacarídeos (LPS) da *E. coli* são capazes de passar do lúmen uterino para a circulação periférica, quando há uma inflamação do endométrio, podendo originar doenças sistêmicas. A presença de *E. coli* ou LPS no estroma ou

células epiteliais aumenta a expressão de cyclooxygenase-2 e estimula a produção de prostaglandina E2 e prostaglandina F2 α (DHALIWAL et al., 2001; WILLIAMS et al., 2008).

2.5 Fatores de virulência

As cepas de *E. coli* podem ser agrupadas em quatro grupos filogenéticos : A, B1, B2 e D. Cepas com virulência extra-intestinal são pertencentes principalmente ao grupo B2 e, em menor escala, ao grupo D, enquanto a maioria das cepas comensais pertencem ao grupo A e B1 (CLERMONT et al., 2000).

Clermont et al. (2000) desenvolveram um método de Reação em Cadeia da polimerase (PCR) utilizando os genes *chuaA* e *yjaA* e fragmento de DNA TSPE4.C2 para rápida determinação de grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* com uma acurácia de 99%. Cada combinação de amplificação dos genes *chuaA* e *yjaA* e fragmento de DNA TSPE4.C2 permite a determinação do grupo filogenético da cepa.

A *E. coli* possui características especiais chamadas de fatores de virulência, que são produtos bacterianos que a torna capaz de superar os mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro, se adaptar, colonizar e invadir um ambiente novo e eliminar a concorrência com outras espécies bacterianas (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002; KAU et al., 2005, BIEN et al., 2012). Em geral, quanto mais fatores de virulência uma estirpe expressa maior é a gravidade da infecção capaz de provocar. O teste de fator de virulência é uma ferramenta útil para epidemiologia e pesquisa, mas ainda não definiu papel clínico (JOHNSON, 1991).

A infecção do trato urinário é a forma mais comum de infecção extraintestinal por *E. coli* e por isto elas são chamadas de uropatogênicas (JOHNSON, 1991). Estudos na patogênese de *E. coli* neste tipo de infecção trouxeram numerosos conhecimentos a respeito de mecanismos pelo quais estas bactérias se aderem, crescem e persistem em associação ao tecido hospedeiro (KAU et al., 2005), servindo de reservatório para infecções recorrentes e complicações graves (BIEN et al., 2012).

As *E. coli* uropatogênicas expressam uma multiplicidade de fatores de virulência incluindo: adesinas, toxinas, intimina, proteína específica uropatogênica, cápsula K e sistema de captação de ferro (JOHNSON, 1991; LANDRAUD et al., 2000; NAKANO et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2001; MULVEY, 2002; BIEN et al., 2012).

2.5.1 Adesinas

A expressão de adesinas permite que as bactérias se liguem e invadam as células e tecidos do hospedeiro. Algumas delas também são relacionadas à formação de biofilme e ação anti-célula hospedeira. São genes codificadores de adesinas: *fimH*, *sfa*, *pap*, *k99* e *afa* (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002; EMODY et al., 2003; JOHNSON et al., 2003; BIEN et al., 2012).

FimH é uma adesina do pilus tipo 1 envolvida na aderência, invasão e formação de biofilme em vários alvos, incluindo células de hospedeiros mamíferos. É um agente causador de apoptose no epitélio vesical (JONES et al., 1995; EMODY et al., 2003; BIEN et al., 2012) e está associada à cistite, sepse, meningite (MULVEY, 2002) e metrite em vacas (BICALHO et al., 2010; BICALHO et al., 2012).

Fímbria ou pilus S (*sfa*) é composta por subunidades e *sfaS* é a subunidade que media interações bacterianas com o trato urinário (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002). Está associada a infecções do trato urinário ascendentes, sepse e meningite (MULVEY, 2002).

Fímbria P (*papG* com alelos I,II e III e *papC*) além de estar relacionada a adesão e invasão tecidual também atua na indução de citocinas. É associada à pielonefrite (MULVEY, 2002; JOHNSON et al., 2003). Em infecções do trato urinário de cães e gatos a frequência de *pap* foi de 43% (FÉRIA et al., 2001) e de 64% em humanos com cistite (YAMAMOTO et al., 2001).

K99 é um componente pilus que facilita a aderência de *E. coli* enterotoxigênicas no epitélio intestinal, este gene é associado à diarreia neonatal em leitões, cordeiros e bezerros (RUNNELS et al., 1980; KYOGASHIMA et al., 1989; QUINN et al., 2005).

Adesina afimbrial (afa) se distingue de outras adesinas fimbriais por se apresentar como uma malha fina ou um revestimento capsular filamentososo que não é visível em microscopia eletrônica (JOHNSON, 1991). Está associada à infecções urinárias, intestinais e sepse (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002; BÉTIS et al., 2003). Estudo realizado por Bétis et al. (2003) demonstrou que cepas portadoras deste gene exercem efeito pró-inflamatório *in vitro* em células epiteliais do intestino. *Afa* foi encontrada em apenas 1% de *E. coli* isoladas em infecções do trato urinário em cães e gatos (JOHNSON, 1991; FÉRIA et al., 2001).

2.5.2 Toxinas

A liberação de uma série de toxinas proporciona à *E. coli* uropatogênicas meios de gerar um extenso dano tecidual, desativar células do sistema imune e liberar nutrientes do hospedeiro, facilitando a disseminação bacteriana (BIEN et al., 2012). São genes codificadores de toxinas: *cnf1*, *hlyA* e *vt*.

O fator necrozante citotóxico tipo 1 (*cnf1*) é uma toxina produzida por cepas de *E. coli* uropatogênicas que interfere no recrutamento e diminui a função fagocitária de polimorfonucleares, facilitando o crescimento bacteriano durante uma infecção (HOFMAN et al., 2000; EMODY et al., 2003). É encontrado nos casos de diarreia, septicemia e infecções do trato urinário em animais e em humanos (QUINN et al., 2005). Embora tenha sido detectado em 30% das *E. coli* isoladas de infecção urinária em humanos, independentemente da severidade, aparentemente este fator de virulência não desempenha um papel importante em infecções do trato urinário (LANDRAUD et al., 2000).

A α -hemolisina (*hlyA*) é uma toxina citolítica que lisa eritrócitos para a aquisição de cálcio, mas também é tóxica para várias células hospedeiras, contribui para inflamação e injúria tecidual, traz prejuízos à quimiotaxia de polimorfonucleares e à fagocitose (JOHNSON, 1991; EMODY et al., 2003). É comumente encontrada em cepas de *E. coli* isoladas de pielonefrite e cistite (JOHNSON, 1991), de diarreia e doença edematosa em suínos (QUINN et al., 2005), além de sua presença ser associada à metrite em vacas (BICALHO et al., 2010).

Verotoxina ou toxina *Shiga-like* é semelhante à toxina de Shiga produzida pela *Shigella dysenteriae* (GLOBAL SALM-SURV, 2003; QUINN et al., 2005). *E. coli* produtoras de verotoxinas podem localmente lesar enterócitos, levando à diarreia com diferentes características, desde branda, aquosa e sem sangue até completamente sanguinolenta com cólicas abdominais (QUINN et al., 2005; MINISTRY OF HEALTH OF NEW ZEALAND, 2012). Quando atinge a corrente sanguínea, esta toxina exerce efeito deletério nas células endoteliais, causando lesões vasculares, edema, hemorragias e trombose, podendo afetar até mesmo o sistema nervoso central em suínos (QUINN et al., 2005).

VT é dividida em quatro subgrupos: VT1, VT2, VT2c e VT2e. Cepas enterohemorrágicas em humanos são produtoras de VT1 ou VT2. VT1 é responsável pela produção de toxina que causa sintomas sistêmicos, enquanto VT2e é uma cepa específica que causa doença edematosa em porcos (GLOBAL SALM-SURV, 2003; QUINN et al., 2005).

2.5.3 Intimina (*eae*)

O gene *eae* (intimina) é necessário para que *E. coli* enteropatogênicas se fixem intimamente às células epiteliais intestinais. Embora seu papel no desenvolvimento de diarreia não esteja completamente elucidado, acredita-se que este gene em associação a outros é necessário para que cepas de *E. coli* sejam plenamente virulentas (DONNENBERG et al., 1993).

2.5.4 Proteína específica uropatogênica (*usp*)

Usp é o gene codificador de uma proteína designada proteína específica uropatogênica (NAKANO et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2001). Este gene pode ser considerado como um dos principais determinantes de virulência de *E. coli* uropatogênicas, uma vez que sua presença pode contribuir para o desenvolvimento de infecções do trato urinário (YAMAMOTO et al., 2001; PARK et al., 2009).

Através de estudos, observou-se que o gene *usp* é mais frequentemente associado a *E. coli* uropatogênicas do que *E. coli* fecais de indivíduos saudáveis,

tendo uma alta prevalência nas *E. coli* isoladas de cistite, pielonefrite e até mesmo prostatite em diferentes espécies (YAMAMOTO et al., 2001; PARK et al., 2009).

2.5.5 KPS

Cápsula K contribui com a virulência, pois protege a bactéria da fagocitose e da ação de anticorpos séricos, tanto por prejudicar a ativação do sistema complemento quanto por ser pouco imunogênico (JOHNSON, 1991; EMODY et al., 2003). A síntese do polissacarídeo capsular e a sua expressão celular são codificadas pelo gene *kps* (ROSENOW et al., 1995).

Este fator de virulência é associado a infecções do trato urinário e, talvez à disfunção renal, em crianças (PARK et al., 2009) e à infecção uterina em vacas (BICALHO et al., 2010).

2.5.6 Aerobactina (aer)

Uma das respostas imunes do organismo hospedeiro frente a uma infecção é a redução da quantidade de ferro disponível ao patógeno, o qual é necessário para o metabolismo de todas as células vivas, incluindo bactérias. Cepas que carregam o sistema de aerobactina (*aer*) possuem uma vantagem de crescimento em ambientes pobres em ferro, uma vez que a *aer* extrai Fe^{3+} a partir de proteínas de ligação de ferro das células hospedeiras (JOHNSON, 1991; EMODY et al., 2003; QUINN et al., 2005). Foi encontrada em 42% de *E. coli* isoladas do útero de vacas no período puerperal, demonstrando que provavelmente este gene traz vantagens para sobrevivência e persistência deste patógeno no útero (SILVA et al., 2009).

3. OBJETIVOS:

Constituem-se os objetivos do presente trabalho realizado em vacas Holandesas (HPB) sem complicações puerperais:

3.1 Geral:

Estudar a dinâmica e o perfil da microbiota uterina presente no útero 24 horas e 14 dias pós-parto, no sentido de ampliar o conhecimento sobre a inter-relação entre as bactérias e reflexos nas características clínicas deste período.

3.2 Específicos:

- a- Estudar a prevalência e o perfil de sensibilidade antimicrobiana, de bactérias isoladas no útero, 24 horas e 14 dias pós-parto.
- b- Relacionar a presença das bactérias no útero com as características clínicas de tonicidade e dimensões uterinas; aspecto e odor da secreção uterina e hemograma, monitorados 24 horas e 14 dias pós-parto.
- c- Determinar os fatores de virulência das *E. coli* isoladas do útero, 24 horas e 14 dias pós-parto.
- d- Classificar as *E. coli* isoladas do útero 24 horas e 14 dias pós-parto em grupos filogenéticos representativos de patogenicidade.
- e- Estabelecer relação entre a presença de *E. coli* e seus fatores de virulência 24 horas após o parto e o crescimento bacteriano 14 dias pós-parto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de experimentação:

O presente trabalho foi realizado utilizando-se de animais pertencentes à propriedade rural destinada à produção comercial de leite Tipo A e Laboratórios da UNESP, UNICAMP e da iniciativa privada:

4.1.1 Fazenda Colorado, localizada no município de Araras – SP, onde foram realizadas as observações clínicas e coletadas as amostras de material biológico.

4.1.2 Laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas, da FMVZ - UNESP câmpus Botucatu – SP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, onde foram realizados os cultivos microbiológicos, antibiogramas e processamento das cepas de *E. coli* isoladas, para posterior análise de PCR.

4.1.3 Laboratório Clínico Veterinário, da FMVZ - UNESP câmpus Botucatu – SP, sob a responsabilidade da prof^a. Dr^a Regina Kiomi Takahira, local de realização de parte dos hemogramas.

4.1.4 Laboratório Clínico Veterinário Araras, Araras – SP, Laboratório de análises clínicas prestador de serviços veterinários, local de realização de parte dos hemogramas.

4.1.5 Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas – SP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, onde foram realizadas as Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para determinação dos fatores de virulência e tipificação dos grupos filogenéticos das *E. coli* isoladas.

4.2 Animais e delineamento experimentais:

As vacas da Fazenda Colorado, de cujo rebanho originaram-se os animais do experimento, eram submetidas a manejo intensivo de produção de leite tipo A,

regime de ordenhas automatizadas três vezes ao dia e produção média de 40,1Kg/dia. A alimentação consistia de ração balanceada de acordo com o nível de produção segundo recomendação do NRC (National Research Council - USA), obtida a partir de ingredientes produzidos na própria fazenda (silagem de milho, pré-secado de capim Tifton e grãos de milho) e outros adquiridos no mercado (farelo de soja, polpa cítrica, caroço de algodão, minerais e vitaminas), além do fornecimento de sal mineral e água *ad libitum*. Deste rebanho, foram monitorados os partos eutócicos e as duas primeiras semanas do puerpério de cem vacas, em cujo histórico produtivo e reprodutivo não havia registros de complicações.

Devido ao tratamento utilizando-se antibióticos no período entre a primeira coleta e 14 dias após o parto, 25 animais foram excluídos do experimento para que não houvesse interferência do medicamento nos exames realizados no Momento 2, estes animais foram diagnosticados e tratados de acordo com os critérios da fazenda pelas seguintes causas: mastite, infecção uterina, pneumonia, diarreia, deslocamento de abomaso à esquerda e tristeza parasitária como demonstrado na Tabela 15 (Anexo 1).

Fizeram parte deste estudo, 75 vacas da raça Holandesa Preto e Branca (HPB), com histórico produtivo e reprodutivo isento de complicações, idade média de 2,9 anos ($\pm 1,4$), de primeira à sexta ordem de parição, sendo 41 destas primíparas. As partições ocorreram nos meses de setembro e outubro de 2013 e todas as vacas apresentaram parto eutócico com completa eliminação dos envoltórios fetais dentro de um período de até 12 horas e com o puerpério considerado fisiológico, isento de complicações na esfera produtiva ou reprodutiva durante o período experimental de 14 dias.

O delineamento experimental seguiu o esquema apresentado na Figura1, constituído por dois momentos em que os dados experimentais foram obtidos.

4.2.1 Momento1: (M1 – 24 horas pós-parto)

Após 24 horas do parto, realizou-se o exame físico e ginecológico das vacas,

constituído de palpação retal, observação da coloração da mucosa vaginal, aferição da temperatura retal e avaliação do aspecto do conteúdo uterino.

Além disto, foram coletadas amostras de conteúdo uterino para citologia, cultivo microbiológico e teste *in vitro* de sensibilidade microbiana (antibiograma). Amostras de sangue foram obtidas para realização do hemograma e teste de função neutrofílica pelo *Nitroblue Tetrazolium* (NBT).

4.2.2 Momento 2: (M2 - 14 dias pós-parto)

Decorridos quatorze dias da parição, foram realizados exame físico e ginecológico constituído de palpação retal e ultrassonografia transretal do sistema reprodutivo, com ênfase aos achados uterinos, observação da coloração da mucosa vaginal, aferição da temperatura retal e avaliação do aspecto do conteúdo uterino.

Foram, novamente, coletadas amostras da secreção uterina visando à realização da citologia, cultivo microbiológico e antibiograma dos isolados. Amostras de sangue foram obtidas e destinadas à realização do hemograma e teste de função neutrofílica pelo NBT.

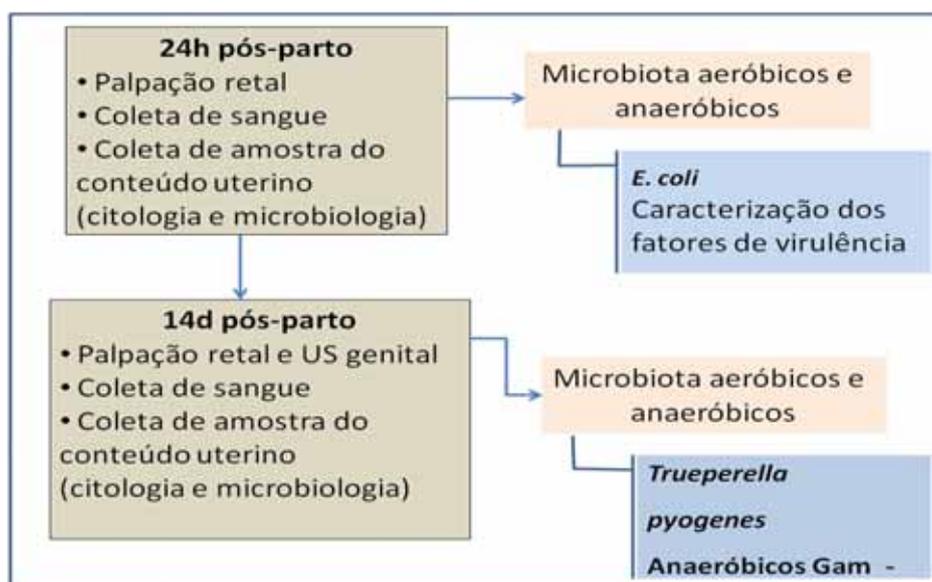


Figura 1- Representação esquemática do delineamento experimental, em vacas Holandesas (HPB) após o parto.

As cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) isoladas em M1 e M2 foram processadas, estocadas e posteriormente investigados diferentes fatores de virulência através da técnica de PCR.

4.3 Metodologia

4.3.1 Exames físico, ginecológico e ultrassonográfico

Em ambos os Momentos foi aferida a temperatura dos animais e avaliada a coloração da mucosa vaginal, classificando-a em hipocorada, normocorada ou hiperêmica.

A involução uterina foi monitorada nos dois Momentos experimentais (M1 e M2) pela avaliação do aspecto da secreção uterina coletada e classificado em: mucoso, mucoturvo, mucossanguinolento, mucopurulento, purulento, piossanguinolento e serossanguinolento, pela presença ou ausência de odor fétido e também pela avaliação do tônus uterino por meio da palpação retal. Apenas no Momento 2 realizou-se ultrassonografia uterina por via transretal (MELENDEZ et al., 2004).

À palpação retal estabeleceu-se uma classificação de 1 a 3 para as características de tonicidade do útero na curvatura maior do corno uterino, sendo escore 3 - útero flácido, 2 - útero com tonicidade moderada e 1 - tonicidade alta (MELENDEZ et al., 2004).

Para o exame ultrassonográfico foi utilizado transdutor linear 5 MHz transretal (Aloka[®] 500) avaliando-se as características ultrassonográficas do conteúdo uterino e diâmetro do corno uterino anteriormente gravídico, em duas mensurações à aproximadamente 10 cm da bifurcação uterina (MELENDEZ et al., 2004). A primeira para obtenção do diâmetro total, de serosa a serosa, e a segunda para mensurar a luz uterina. A diferença entre a primeira e a segunda medição resultou na espessura da parede uterina.

4.3.2 Coleta de secreção uterina

Amostras de secreção uterina foram coletadas com método semelhante ao utilizado por Werner et al. (2012). Utilizando-se pipeta de inseminação estéril descartável para éguas (Provar[®]) acoplada a uma seringa de 20 mL e protegida por camisa sanitária plástica, para evitar contaminação pela microbiota presente no canal vaginal. A região perivulvar foi previamente higienizada com água e solução degermante de clorexidine a 2%, seca com papel toalha seguida de antissepsia com álcool 70%. Afastavam-se os lábios vulvares e com a mão enluvada introduzia-se a pipeta no canal vaginal até a abertura da cérvix, onde a camisa sanitária era rompida e a pipeta introduzida no canal cervical.

Devidamente posicionada a pipeta no interior do útero, retirava-se a mão do canal vaginal e realizavam-se massagens uterinas via retal ao mesmo tempo em que se aspirava o conteúdo através da seringa. Obtendo-se uma quantidade significativa da secreção uterina, todo o conjunto era retirado do trato genital.

4.3.3 Citologia uterina

Para a realização da citologia, amostras da secreção aspirada do lúmen uterino (Momentos 1 e 2) foram depositadas em lâminas de vidro para microscópio, previamente limpa e desengordurada e espalhadas através da técnica de *squash*. Estas lâminas foram secas, fixadas e coradas com a técnica de coloração Panótico rápido e posteriormente analisadas.

Utilizando-se um aumento de 400 vezes em microscopia óptica realizou-se a média do número de neutrófilos em 10 campos microscópicos, conforme os critérios propostos por Cordeiro et al. (1989) seguindo a interpretação: Negativo (predomínio absoluto de células epiteliais, presença de 0 a 10 leucócitos em 10 campos microscópicos, independente da fase do ciclo estral); + (11 a 30 leucócitos em 10 campos microscópicos); ++ (31 a 50 leucócitos em 10 campos microscópicos); +++ (acima de 50 leucócitos em 10 campos microscópicos).

4.3.4 Cultivo microbiológico

Amostras do conteúdo uterino obtidas de modo asséptico, como supracitado, foram destinadas ao exame microbiológico através da imersão de *swab* estéril sendo em seguida mantido em meio de Stuart e sob refrigeração (4-8°C) até a realização do exame.

Todas as amostras de secreção uterina (Momentos 1 e 2) foram semeadas em meio de ágar sangue contendo sangue ovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey sendo mantidas, respectivamente, por 96 e 48 horas, em condições de aerobiose a 37°C (TRABULSI et al., 1999; QUINN et al., 1994, 2005).

Visando a identificação de linhagens de *E. coli*, as colônias fermentadoras ou não de lactose em ágar MacConkey, foram submetidas às provas bioquímicas (de caracterização fenotípica) para identificação de enterobactérias utilizando meios de cultura sólidos e semi-sólidos distribuídos em tubos, para constatação de fermentação da glicose, a produção de gás, L-TD (L-triptofano-desaminase), H₂S, urease, citrato de Simmons, lisina, motilidade e indol (QUINN et al., 2005).

A caracterização de isolados de *Trueperella pyogenes* foi investigada na presença de colônias diminutas, com 1 a 2 mm de diâmetro, β-hemolíticas, convexas, translúcidas, com 48 horas de incubação no meio de ágar sangue. Na coloração de Gram estes microrganismos se notabilizam pelo aspecto pleomórfico, dispostos em arranjo de “paliçada” ou “letras chinesas”. Ademais, o microorganismo produz reação negativa na prova de catalase e positiva no *Camp Test* frente a linhagens ATCC de *Staphylococcus aureus*.

Simultaneamente, as amostras de secreção uterina foram semeadas em ágar sangue e cultivadas em condições estritas de anaerobiose, mantidas por 5 a 7 dias (QUINN et al., 1994, 2005), utilizando gerador de anaerobiose, conforme as recomendações do fabricante (Difco®).

4.3.5 Teste de sensibilidade microbiana “*in vitro*” (antibiograma)

Todos os microorganismos aeróbicos, de origem bacteriana, isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana *in vitro* pelo método de difusão com discos (CLSI, 2005, 2006). Foram utilizados princípios ativos de antimicrobianos indicados no tratamento das infecções uterinas em vacas: Ampicilina (10 µg), Ciprofloxacino (5µg), Ceftiofur (30µg), Enrofloxacino (5µg), Florfenicol (2µg), Gentamicina (10µg), Penicilina (10UI), Sulfametoxazole/trimetoprim (25µg), Tetraciclina (30µg).

4.3.6 Avaliação da função neutrofílica (NBT) e hemograma

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção coccígea com o uso de agulhas 25 x 0,7mm (PrecisionGlide, BD) acondicionando-se em frascos a vácuo de 10mL sem anticoagulante (Vacuum II, Labnew) e de 5mL com anticoagulante EDTA 15% (Vacuum II, Labnew). As colheitas foram realizadas 24 horas (Momento 1) e 14 dias (Momento 2) após o parto.

Imediatamente após a colheita, 500µL de sangue total foram retirados do frasco sem anticoagulante e transferidos para um tubo plástico com capacidade de 1,5mL previamente preparado com 2µL de heparina sódica (5000 UI/mL) para a realização do teste da redução do NBT segundo Park e Good (1970), modificado por Ciarlini et al. (1999). Alíquotas de 25µL do *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), previamente diluído (1mg em 1mL de água destilada), foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5mL e congelados a 20°C negativos, sendo descongelados momentos antes da realização do teste. Os procedimentos para a execução dos testes não excederam o tempo de duas horas após a coleta de sangue.

Para a prova não estimulada (NBT-NE), 50µL de sangue foram transferidos para o tubo contendo 25µL de NBT. Para o teste estimulado (NBT-ES), 2,5µL de extrato de bactérias (Stimulant, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foram acrescentados e homogenizado ao tubo contendo os 25µL do NBT anteriormente à adição de 25µL

de sangue. Após a homogeneização, os tubos permaneceram em repouso durante 15 minutos em banho-maria a 37°C e por mais 15 minutos à temperatura ambiente (PEIXOTO et al., 2002). Toda a reação foi realizada em condição de penumbra, uma vez que se trata de um reagente fotossensível. Esfregaços sangüíneos foram confeccionados em duplicata para cada uma das provas, corados com Panótico rápido e posteriormente examinados ao microscópio óptico com aumento de 1.000 vezes, sob imersão.

A porcentagem de neutrófilos reduzidos ou reativos foi estabelecida através da contagem de 200 células, considerando-se como positivas aquelas que apresentaram em seu citoplasma a coloração enegrecida característica do NBT reduzido, conhecida como formazana.

Os hemogramas foram realizados em todos os animais nos Momentos 1 e 2 segundo a recomendação de Jain (1986).

4.3.7 Determinação dos fatores de virulência nas cepas de *E. coli*

4.3.7.1 Estocagem de isolados de *E. coli*

As linhagens de *E. coli* isoladas nos Momentos 1 e 2 do estudo foram estocadas em temperatura ambiente (25°C) no meio de Ligninières. Após o término da coleta de material e isolamento de todas as amostras de *E. coli*, as cepas foram repicadas para placas em meio Müller Hinton, lacradas e enviadas à temperatura ambiente para o laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, SP, a fim de se realizar a caracterização molecular dos genes codificadores de fatores de virulência do microorganismo, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase.

4.3.7.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada, segundo Blanco et al. (1997), através da fervura, na qual amostras das cepas de *E. coli* foram re-suspendidas em 200µL de

água miliQ esterilizada, utilizando-se microtubos livres de Rnases e DNases e incubadas em banho Maria (100°C) por 10 minutos. Em seguida foram centrifugadas a 9.676,8xg por 2 minutos (Centrifuga Sorvall[®], MC12). O sobrenadante foi coletado e refrigerado.

4.3.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Primers específicos foram utilizados para amplificar os genes codificadores dos fatores de virulência. As sequências dos *primers*, tamanho dos produtos amplificados e temperatura de anelamento utilizados estão descritos na Tabela 1 (adaptado SIQUEIRA et al., 2009).

A amplificação do DNA bacteriano por PCR foi realizada em um total de 15 µL, contendo 1,0 µL de DNA (30ng/µL) de cada um dos primers, 0,12 µL de desoxinucleoside Trifosfato (0,2 mM cada) e 0,15 µL (1,0 U) Taq DNA polimerase, 1,2 µL (25 mM) de MgCl₂ e 1,5 µL de solução tampão (PCR buffer).

Os procedimentos de ampliação pelo PCR, realizados em termocicladores (GeneAmp[®], PCR System 9700 PE Applied Biosystems) programado para desnaturação inicial à 94°C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento em temperatura específica, extensão à 72°C por dois minutos, seguido de outro ciclo à 72°C por 7 minutos.

Cinco microlitros de solução tampão (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xylecianol e 25% ficol) foram adicionados para cada mistura de reação e 8µL de solução final foram analisadas em eletroforese em gel de 1,2% de agarose em tampão de Tris acetato (2M Tampão Tris; 0,04M Ácido acético; 0,01M EDTA; pH 8,0). As “corridas” foram realizadas em cubas de eletroforese (Horizon[®] 11-14 ou 58, Life Technologies TM, Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus) por 50 minutos (100 mV, 200 mA). O gel foi corado com brometo de etídio (1,5 µg/mL) por 15 minutos e observado em transiluminador ultravioleta.

TABELA 1- *Primers* testados para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), temperatura de anelamento (TA) e tamanho de amplificação na determinação dos fatores de virulência em *E. coli*.

| Gene | Seqüência do Primer (5'-3') | TA (°C)* | Tamanho de amplificação (pb)** |
|------------------------|--|-----------------|---------------------------------------|
| <i>cnf1</i> | 1: GAA CTT ATT AAG GAT AGT 2: CAT TAT TTA TAA CGC TG | 63 | 533 |
| <i>hlyA</i> | 1: AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T 2: ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A | 63 | 1.177 |
| <i>papC</i> | 1: GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G 2: ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A | 60 | 328 |
| <i>papG I</i> | 1: CAA CCT GCT CTC AAT CTT TAC TG 2: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT | 63 | 692 |
| <i>papG II</i> | 1: GGA ATG TGG TGA TTA CTC AAA GG 2: TCC AGA GAC TGT TCA AGA AGG AC | 63 | 562 |
| <i>papG III</i> | 1: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT 2: TCC AGA GAC TGT GCA GAA GGA C | 63 | 421 |
| <i>fimH</i> | 1: TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG 2: GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA | 63 | 508 |
| <i>afaB/C</i> | 1: GCT GGG CAG CAA ACT GAT AAC TCT C 2: CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCC G | 76 | 750 |
| <i>sfaD/E</i> | 1: CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A 2: CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C | 63 | 410 |
| <i>iucD/aer</i> | 1: TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T 2: AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G | 63 | 602 |
| <i>usp</i> | 1: ATG CTA CTG TTT CCG GGT AGT GTG T 2: CAT CAT GTA GTC GGG GCG TAA CAA T | 66 | 1.000 |
| <i>vt1</i> | 1: AAG TTG CAG CTC TCT TTG AAT A 2: TGC AAA CAA ATT ATC CCC TGA G | 53 | 364 |
| <i>vt2</i> | 1: GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA 2: GTA TCT GCC TGA AGC GTA A | 53 | 515 |
| <i>kpsMTII</i> | 1: GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG 2: CAT CAG ACG ATA AGC ATG AGC A | 63 | 272 |
| <i>eae</i> | 1: GAC CCG GCA CAA GCA TAA GG 2: CCA CCT GCA GCA ACA AGA GC | 63 | 384 |
| <i>k99</i> | 1: CCA GCG CCC GGC AGT AAT GAC TGC 2: CCA CCA TTA GAC GGA GCG CGG | 53 | 450 |

*TA temperatura de anelamento; **pb pares de base

Adaptado de SIQUEIRA et al. (2009)

4.3.7.4 Cepas controle

As cepas FVL2 foram usadas como controle positivo dos genes codificadores dos fatores de virulência *sfa*, *pap*, *hly* e *cnf-1*; FVL16 para *sfa*, *pap*, *hly* e *cnf-1*; FV35 para *afa* e *cnf-1*; FVL8 para *sfa*, *pap*, *papGII*, *iucD*, *hly*, *cnf-1* e *usp*; J96 foram usada para *pap-GI* e *papGIII*; ORN115 para *fimH*, *vt1*, *vt2* e *eae*.

4.3.7.5 Determinação dos Grupos Filogenéticos das *E. coli*

Para a classificação das *E. coli* isoladas do útero nos Momentos 1 e 2 em comensais (grupos filogenéticos A e B1) e patogênicas (grupos filogenéticos B2 e D) foi utilizada a metodologia segundo Clermont et al. (2000).

Após a extração do DNA bacteriano, realizou-se PCR para o gene *chuA*. As cepas positivas, consideradas patogênicas extraintestinais, foram testadas para a presença do gene *yjaA*. As amostras positivas foram classificadas como pertencentes ao grupo B2 e as amostras negativas ao grupo D.

As amostras negativas para o gene *chuA*, consideradas cepas comensais, foram testadas através de PCR quanto ao fragmento de DNA, TSPE4.C2. Amostras positivas foram elencadas no grupo B1, já as negativas, no grupo A.

Primers específicos foram utilizados para amplificar os genes *chuA* e *yjaA* e fragmentos de DNA TSPE4.C2. As sequências de *primers*, tamanho dos produtos amplificados e temperatura de anelamento foram utilizados segundo a Tabela 2.

A amplificação do DNA bacteriano por PCR e a corrida eletroforética foram realizadas segundo a descrição acima, utilizando-se, entretanto gel de agarose a 3%.

TABELA 2- *Primers* testados para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), temperatura de anelamento (TA) e tamanho de amplificação dos pares de base, na determinação dos grupos filogenéticos das *E.coli*.

| Gene | Seqüência do Primer (5'-3') | TA)* (°C) | Tamanho de amplificação (pb)** |
|----------|---------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| chuA | A: 59-GACGAACCAACGGTCAGGAT-39 | 60 | 279 |
| | B: 59-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-39 | | |
| yjaA | A: 59-TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG-39 | 60 | 211 |
| | B: 59-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-39 | | |
| TSPE4.C2 | A: 59-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-39 | 60 | 152 |
| | B: 59-CGCGCCAACAAAGTATTACG-39 | | |

Determinação dos grupos filogenéticos Segundo Clermont et al. (2000).

*TA temperatura de anelamento; **pb pares de base

4.3.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram sumarizados por meio de estatística descritiva (distribuição de frequência, média e desvio padrão) em tabelas e figura. Valores representados por frequência foram analisados pelo teste Qui-quadrado.

Os valores foram testados para a condição de normalidade e homogeneidade de variâncias, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Aqueles que obedeceram à premissa de normalidade em sua distribuição foram comparados por análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey) ou teste T.

Os valores que não obedeceram à premissa de normalidade em sua distribuição foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, não paramétrico.

As análises foram realizadas com o pacote estatístico STATGRAPHICS Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc, USA), empregando-se nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo microbiológico

O resultado da cultura bacteriana da secreção uterina coletada 24 horas (Momento 1) e 14 dias pós-parto (Momento 2) está representado na Tabela 3. Do material de secreção uterina obteve-se 84% de crescimento bacteriano positivo no Momento 1 e 81,3% de cultivo bacteriano positivo no Momento 2. Este resultado é próximo aos relatados por outros autores para o mesmo período puerperal em vacas (ELLIOT et al., 1968; GRIFFIN et al., 1974; SHELDON et al., 2002; WILLIAMS et al.) como demonstrado por Sheldon e Dobson (2004).

Porém, também na literatura, são encontrados percentuais bem inferiores para cultura negativa de amostras coletadas do útero de vacas aos 10 dias após o parto, 4,1% (WERNER et al., 2012) e 4,9% (SENS & HEUWIESER, 2013). Embora tenha sido em período um pouco mais tardio, no presente estudo observou-se 18,7% de culturas negativas no 14^o dia pós-parto, este dado pode refletir menor contaminação bacteriana do útero no momento do parto e após o parto, devido às condições de higiene ambiental ou, por hipótese, à adequada condição imune dos animais, reflexo de um cuidadoso manejo adotado na Fazenda Colorado.

Embora a prevalência do crescimento bacteriano varie entre os estudos (ROCHA et al., 2004; WERNER et al., 2012; SENS & HEUWIESER, 2013), as espécies bacterianas e suas prevalências encontradas no presente trabalho assemelham-se a alguns dados da literatura para períodos equivalentes aos estudados (HUSZENICZA et al., 1999; ROCHA et al., 2004; WILLIAMS et al., 2005; SENS & HEUWIESER, 2013).

TABELA 3 – Caracterização do isolamento bacteriano, em cultura pura ou associada, (n=75) 24 horas (Momento 1) e 14 dias (Momento 2) pós-parto, do útero de vacas holandesas sem complicações puerperais. Araras - SP, 2013.

| ISOLAMENTO | Pós-parto % (n) | |
|---|------------------------------|----------------------------|
| | 24 horas | 14 Dias |
| <i>Escherichia coli</i> | 29,3 (22) | 25,3 (19) |
| <i>Streptococcus</i> α-hemolítico | 8,0 (6) ^b | 29,3 (22) ^a |
| <i>Trueperella pyogenes</i> | - | 8,0 (6) |
| <i>Pasteurella</i> spp | 8,0 (6) ^a | 2,7 (2) ^b |
| <i>Peptostreptococcus</i> spp | 4,0 (3) | 1,3 (1) |
| <i>Mannheimia haemolítica</i> | 2,7 (2) | - |
| <i>Hafnia alvei</i> | 2,7 (2) | - |
| <i>Streptococcus</i> β-hemolítico | 2,7 (2) | - |
| Outros em cultura pura | 8,0 (6) [*] | 5,3 (4) ^{**} |
| Sub Total (puros) | 65,3 (49) | 72 (54) |
| <i>E. coli</i> + <i>Clostridium</i> spp | 5,3 (4) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Streptococcus</i> α | 4,0 (3) | 2,7 (2) |
| <i>E. coli</i> + <i>Proteus</i> spp | 2,7 (2) | 1,3 (1) |
| <i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1,3 (1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Alcaligenes faecalis</i> | 1,3 (1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Enterobacter cloacae</i> | 1,3 (1) | - |
| <i>T. pyogenes</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. | - | 1,3 (1) |
| <i>T. pyogenes</i> + <i>Streptococcus</i> α | - | 1,3 (1) |
| <i>E. coli</i> + <i>Alcaligenes faecalis</i> + <i>Streptococcus</i> α | 1,3 (1) | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Clostridium</i> spp | 1,3 (1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>T. pyogenes</i> + <i>Streptococcus</i> α | - | 1,3 (1) |
| <i>E. coli</i> + <i>Enterobacter aerogenes</i> + <i>Streptococcus</i> α | - | 1,3 (1) |
| Sub Total (associados) | 18,7 (14)^a | 9,3 (7)^b |
| Negativo | 16,0 (12) | 18,7 (14) |
| Total | 100 (75) | 100 (75) |

**Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettigeri*, *Staphylococcus* spp, *Clostridium* spp., *Enterobacter cloacae*.

** *Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus* β hemolítico, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*.

Letras diferentes maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas P<0,05 (Qui-quadrado).

No Momento 1, a bactéria mais frequentemente isolada foi a *E. coli*, presente em 46,5% dos cultivos bacterianos, pura (29,3%) ou associada à outras bactérias (17,2%) *Clostridium spp*, *Streptococcus α-hemolítico*, *Klebsiella oxytoca*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus spp*. Estes dados são próximos aos encontrados por Dohmen et al. (2000) e por Bicalho et al. (2010) que obtiveram cerca de 33% de culturas positivas para *E. coli* em *swab* uterino de vacas na primeira semana pós-parto e reforçam que esta é a bactéria mais prevalente neste período (ROCHA et al., 2004; WILLIAMS et al., 2005).

A segunda bactéria mais frequente neste período (M1) foi *Streptococcus α-hemolítico* (13,3%) em cultura pura ou associada à *E. coli* e *Alcaligenes faecalis*. Um total de 8% de *Pasteurella spp* foi isolado no primeiro dia pós-parto, bactéria que é considerada potencialmente patogênica ao útero de vacas (WILLIAMS et al., 2005).

No Momento 2, o perfil e prevalência do crescimento bacteriano foram próximos àqueles observados por Werner et al. (2012) que afirmam que *E. coli*, *T. pyogenes* e *Streptococcus α-hemolítico* são os microorganismos mais relevantes encontrados no lúmen uterino no 10^o dia pós-parto.

Werner et al. (2012) observaram ainda em cultura pura, 2,6%, 15,1% e 21% de *T. pyogenes*, *E. coli* e *Streptococcus α-hemolítico*, respectivamente, enquanto no presente trabalho estas frequências foram de 8% , 25,3% e 29,3%. Já as frequências de *T. pyogenes* associado à *E.coli* e de *E. coli* associada à *Streptococcus α-hemolítico* ou *Streptococcus* coagulase negativa segundo Werner et al. (2012), foi de 3,3% e 13,2% respectivamente, enquanto no presente experimento estas frequências foram de 1,3% e 5,3%.

Neste momento (M2) a bactéria mais frequente (35,9%) foi *Streptococcus α-hemolítico* puro ou associado à *E. coli*, *T. pyogenes* ou *Enterobacter aerogenes*. Sua frequência no útero pós-parto é comumente relatada, porém esta é considerada como uma bactéria oportunista (ROCHA et al., 2004; WILLIAMS et al., 2005; WERNER et al., 2012; SENS & HEUWIESER, 2013).

O isolamento de *T. pyogenes* representou 12% dos cultivos microbianos, próximo aos 7% encontrados por Sens & Heuwieser (2013) aos 10 dias pós-parto, sendo 8% em cultura pura e o restante associado à *E.coli*, *Staphylococcus spp* ou *Streptococcus-α* hemolítico. A baixa prevalência desta bactéria pode estar associada ao fato de tratar-se de animais sem complicações puerperais, uma vez que a *T. pyogenes* é considerada patogênica ao útero (WILLIAMS et al., 2005) e encontrada em maior frequência nos casos de infecção uterina do que em vacas saudáveis (HUSZENICZA et al., 1999).

Obteve-se 32% de cultivos uterinos positivos para *E. coli* aos 14 dias pós-parto (M2), próximo ao relatado por Sens e Heuwieser (2013) de 25% aos 10 dias pós-parto. Das *E. coli* isoladas 25,3% se apresentaram em cultura pura e 6,6% em associação com outras bactérias: *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus -α* hemolítico, *Staphylococcus spp*, *Proteus spp* e *Enterobacter cloacae*. Este resultado demonstra a importância da *E. coli* mesmo num período pós-parto mais tardio.

Assim como no estudo realizado por Hussain et al. (1990) a bactéria anaeróbica mais frequentemente isolada foi *Clostridium spp.* e nenhum *Fusobacterium necrophorum* foi detectado, apesar do isolamento desta bactéria ser relatado como comum no útero pós-parto, sendo mais frequente nos casos de infecção uterina do que em vacas sem complicações no puerpério (MATEUS et al., 2002; DRILLICH, 2006).

A distribuição percentual do isolamento de *Trueperella pyogenes* do útero aos 14 dias pós-parto em relação ao isolamento bacteriano uterino anteriormente realizado, 24 horas pós-parto, está representado na Figura 2.

A presença de *E. coli* pura ou associada, principalmente ao *Clostridium spp* nas primeiras 24 horas pós-parto favoreceu o crescimento de *T. pyogenes* no 14^o dia pós-parto, uma vez que, do total de isolamentos de *T. pyogenes* (Momento 2), 66,7% ocorreu quando a *E. coli* estava presente no primeiro dia pós-parto e 50% destas *E. coli* foram isoladas em cultura associada ao *Clostridium spp*. Estes resultados indicam que *E. coli* é um agente primário da contaminação uterina e

sua ação patogênica e consumo de oxigênio nas primeiras horas pós-parto pode favorecer a subsequente contaminação do ambiente uterino de vacas por patógenos oportunistas anaeróbicos estritos ou facultativos como *Trueperella pyogenes* e *Clostridium spp.*

Resultado semelhante foi obtido em estudo realizado por Dohmen et al. (2000) no qual 88% do isolamento de *T. pyogenes* no 14^o dia pós-parto foi precedido pelo isolamento de *E. coli* no primeiro dia pós-parto. Segundo estes autores, há uma relação positiva com a presença de *E. coli* no primeiro dia pós-parto e a presença de *T. pyogenes* 14 dias pós-parto.

A presença de *Peptostreptococcus spp* e *Alcaligenes faecalis* (22,2%) no Momento 1 também resultaram em crescimento de *T. pyogenes* no Momento 2. Apenas uma amostra negativa no Momento 1 resultou no isolamento desta bactéria no Momento 2, representando 11,1%.

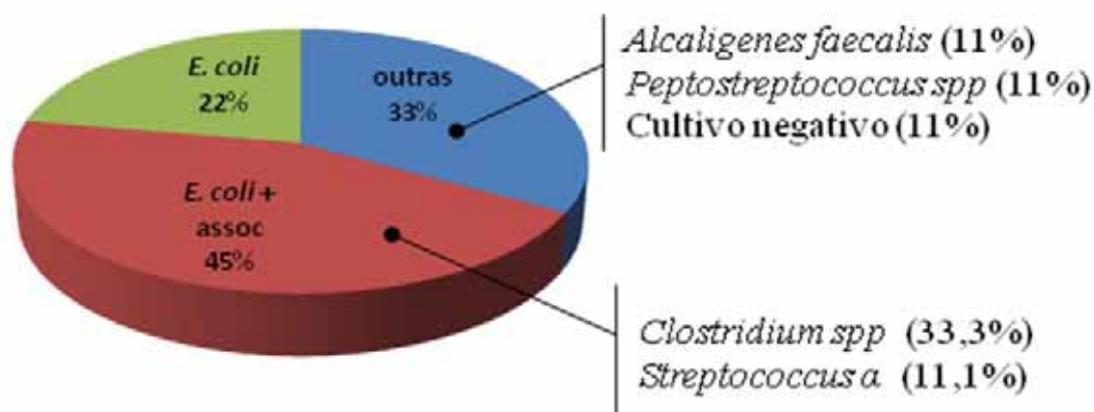


FIGURA 2 – Distribuição percentual dos isolamentos bacterianos uterinos em vacas HPB, 24 horas pós-parto (Momento 1) e que resultaram em isolamento de *Trueperella pyogenes* (n=9), 14 dias pós-parto (Momento 2). Araras – SP, 2013.

O paralelismo entre o crescimento de *E. coli* em cultura pura ou associada à outras bactérias 24 horas pós-parto e o crescimento bacteriano 14 dias pós-parto está representado na Tabela 16 (Anexo 1), onde destacam-se o crescimento de *Streptococcus* α -hemolítico, *Trueperella pyogenes* e *Escherichia coli*.

5.2 Teste de sensibilidade microbiana “*in vitro*” (antibiograma)

As Tabelas 4 e 5 representam a eficácia de nove antibióticos ao teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das bactérias isoladas do útero 24 horas e 14 dias pós-parto, respectivamente. O resultado do antibiograma de acordo com a sensibilidade das bactérias nos Momentos 1 e 2 encontram-se nas Tabelas 17 e 18 (Anexo 1), respectivamente.

Uma gama de medicamentos tem sido utilizada via tópica ou sistêmica para tratamento de IU pós-parto, não havendo um consenso sobre a eficácia do tratamento entre diferentes autores (RISCO et al., 2007). Os antibióticos testados *in vitro* são indicados para o tratamento das infecções uterinas via parenteral ou intra-uterina (BICUDO, 2002 ; RISCO et al., 2007; GANI et al., 2008; GALVÃO et al., 2009; MARTINS et al., 2011; MALINOWSKI, 2011; PALHANO et al., 2011).

As drogas que apresentaram maior eficácia (sensibilidade microbiana maior que 70%) para bactérias isoladas do útero 24 horas pós-parto foram Ciprofloxacino, Florfenicol e Sulfa com Trimetoprim (Sulfazotrim). A Penicilina foi a droga menos eficaz, com resistência bacteriana de 71% para as bactérias isoladas do útero neste período.

No Momento 1, as cepas de *E. coli* apresentaram sensibilidade maior que 80% ao Ciprofloxacino, Florfenicol e Sulfazotrim, já em trabalho realizado por Malinowski et al. (2011), as cepas de *E. coli* isoladas de útero com infecção foram mais sensíveis a Gentamicina (88%) e Ceftiofur (73,1%). As cepas de *Streptococcus* α -hemolítico apresentaram alta sensibilidade a Ampicilina, Ceftiofur e Florfenicol e uma resistência de 90% à Tetraciclina, droga amplamente utilizada no tratamento das infecções uterinas puerperais (Tabela 17, Anexo 1).

TABELA 4 - Distribuição percentual (%) no Teste de Sensibilidade Antimicrobiana *in vitro* (total=69), de bactérias isoladas do útero de vacas holandesas 24 horas após o parto. Araras – SP 2013.

| ANTIBIÓTICO | EFICÁCIA | | |
|----------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Sensível % (n) | Parcialmente Sensível % (n) | Resistente % (n) |
| Ampicilina | 50,7 (35) ^a | 29,0 (20) ^b | 20,3 (14) ^b |
| Ceftiofur | 58,0 (40) ^a | 30,4 (21) ^b | 11,6 (8) ^c |
| Ciprofloxacino | 73,9 (51) ^a | 18,8 (13) ^b | 7,2 (5) ^c |
| Enrofloxacino | 58,0 (40) ^a | 30,4 (21) ^b | 11,6 (8) ^c |
| Florfenicol | 76,8 (53) ^a | 7,2 (5) ^c | 15,9 (11) ^b |
| Gentamicina | 36,2 (25) | 36,2 (25) | 27,5 (19) |
| Penicilina | 24,6 (17) ^b | 4,3 (3) ^c | 71,0 (49) ^a |
| Sulfazotrim | 76,8 (53) ^a | 0 ^c | 23,2 (16) ^b |
| Tetraciclina | 50,7 (35) ^a | 10,1 (7) ^b | 39,1 (27) ^a |

Letras diferentes maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas P<0,05 (Qui-quadrado).

Aos 14 dias pós-parto, Ciprofloxacino e Florfenicol foram os antibióticos que apresentaram maior eficácia (sensibilidade microbiana maior que 70%) contra as bactérias isoladas neste período. Ampicilina e Ceftiofur tiveram eficácia moderada, com sensibilidade microbiana maior que 60% e menor que 70%. Neste momento, nenhuma das drogas testadas apresentou resistência bacteriana maior que 70%, porém, a Tetraciclina foi a droga menos eficaz, com resistência bacteriana de 58,8%, resultado próximo ao encontrado por Malinowski et al. (2011) que obtiveram resistência bacteriana de 63,7% à Oxitetraciclina.

Alta eficácia *in vitro* do Ciprofloxacino também foi observada por Gani et al. (2008) em amostras coletadas do útero de vacas repetidoras de cio e vacas com fertilidade normal. No mesmo estudo, ainda observaram que quase todos os tipos de

bactérias isolados apresentaram de moderada a alta sensibilidade à Oxitetraciclina, diferentemente do presente trabalho. Esta diversidade pode ser justificada pela frequência da utilização do fármaco adotada pelas propriedades rurais, uma vez que o uso massivo de uma classe de antibiótico pode levar à resistência bacteriana.

Palhano et al. (2001) também encontraram alta eficácia *in vitro* do Florfenicol, em que 90,4% das bactérias isoladas do útero de vacas com infecção uterina foram sensíveis a este fármaco.

TABELA 5 - Distribuição percentual (%) no Teste de Sensibilidade Antimicrobiana *in vitro* (total=68), de bactérias isoladas do útero de vacas holandesas 14 dias após o parto. Araras - SP, 2013.

| ANTIBIÓTICO | EFICÁCIA | | |
|----------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Sensível % (n) | Parcialmente Sensível % (n) | Resistente % (n) |
| Ampicilina | 63,2 (43) ^a | 14,7 (10) ^b | 22,1 (15) ^b |
| Ceftiofur | 64,7 (44) ^a | 22,1 (15) ^b | 13,2 (9) ^b |
| Ciprofloxacino | 70,6 (48) ^a | 16,2 (11) ^b | 13,2 (9) ^b |
| Enrofloxacino | 52,9 (36) ^a | 26,5 (18) ^b | 20,6 (14) ^b |
| Florfenicol | 76,5 (52) ^a | 8,8 (6) ^b | 14,7 (10) ^b |
| Gentamicina | 54,4 (37) ^a | 11,8 (8) ^c | 33,8 (23) ^b |
| Penicilina | 48,5 (33) ^a | 5,9 (4) ^b | 45,6 (31) ^a |
| Sulfazotrim | 58,8 (40) ^a | 2,9 (2) ^c | 38,2 (26) ^b |
| Tetraciclina | 35,3 (24) ^b | 5,9 (4) ^c | 58,8 (40) ^a |

Letras diferentes maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas P<0,05 (Qui-quadrado).

No Momento 2, as cepas de *E. coli* isoladas (Tabela 18, Anexo1) apresentaram sensibilidade maior que 80% ao Ciprofloxacino, Florfenicol e

Sulfazotrim e resistência de 100% à Penicilina. As cepas de *Streptococcus* α -hemolítico apresentaram sensibilidade maior que 80% ao Ceftiofur e Penicilina, sendo 96,2% resistentes à Tetraciclina. Já as cepas de *T. pyogenes* se mostraram altamente sensíveis (>80%) com o uso de Ampicilina, Ceftiofur, Gentamicina e Penicilina, concordando com resultados obtidos por Malinowski et al. (2011) em que *T. pyogenes* foi altamente sensível (95,8%) ao Ceftiofur. Este resultado demonstra que apesar da *T. pyogenes* ser considerado patogênico quando presente no útero (WILLIAMS et al., 2005) este microorganismo é sensível à maioria dos antibióticos utilizados no combate das infecções uterinas.

Em ambos os momentos a Penicilina não mostrou alta eficácia. No Momento 1 as bactérias isoladas do útero foram altamente resistentes a esta droga, o que se justifica pela presença de microorganismos produtores de penicilinase (RISCO et al., 2007) e pela alta prevalência de *E. coli* que é naturalmente resistente a este antibiótico.

A oxitetraciclina comumente é recomendada para terapia intra-uterina para infecções puerperais, porém a resistência a este antimicrobiano foi relativamente alta, principalmente no Momento 2 do experimento. Risco et al. (2007) e Malinowski et al. (2011) relatam alta resistência da *T. pyogenes* e *E. coli* a este medicamento. No presente estudo não se constatou uma alta resistência destas bactérias frente à Tetraciclina, sendo *Streptococcus* α -hemolítico o agente que apresentou maior resistência ao fármaco (Tabela 18, Anexo 1).

5.3 Avaliação clínico-ginecológica

A média da temperatura retal de 38,8°C ($\pm 0,4$) tanto no Momento 1 quanto no Momento 2 foi muito semelhantes às aquelas encontradas por Saut et al. (2011) de 38,7°C ($\pm 0,8$) no dia do parto e 38,1°C ($\pm 0,7$) após 14 dias, por Martinez et al. (2012) que obtiveram média de 38,6°C na temperatura retal em vacas sadias nos primeiros 12 dias de lactação e por Benzaquen et al. (2007) que observaram temperatura retal estabilizada em 38,6°C ($\pm 0,01$ °C) no período de 3 a 13 dias pós-parto em vacas que não apresentaram infecção uterina neste período.

Em vacas considera-se hipertermia temperatura retal acima de 39,5°C (CERRI et al., 2009). Apenas 8% (6/75) dos animais apresentou hipertermia (39,8°C ±0,2) no Momento 1. O mesmo número de animais e média de temperatura, foi observado no Momento 2, embora apenas uma destas vacas tenha mantido temperatura acima do valor de referência em ambos os momentos, sem causa evidente.

Na Tabela 6 estão representados os resultados encontrados à avaliação ginecológica em vacas 24 horas e 14 dias pós-parto.

TABELA 6 – Avaliação ginecológica em vacas holandesas 24 horas (Momento 1) e 14 dias (Momento 2) pós-parto. Araras - SP, 2013.

| Avaliação | Pós-parto | |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 24 horas | 14 Dias |
| Tonicidade uterina | | |
| 1 | 22,7% (17/75) ^{Bb} | 38,7% (29/75) ^{Aa} |
| 2 | 41,3% (31/75) ^A | 38,7% (29/75) ^A |
| 3 | 36,0% (27/75) ^{Aa} | 22,7% (17/75) ^{Bb} |
| Diâmetro total (cm) | - | 5,8 (±1,0) |
| Espessura de parede (cm) | - | 1,9 (±0,5) |
| Coloração de Mucosa Vaginal | | |
| Hipocorada | - | - |
| Normocorada | 40% (30/75) ^{Bb} | 98,7% (74/75) ^{Aa} |
| Hiperêmica | 60% (45/75) ^{Aa} | 1,3% (1/75) ^{Bb} |
| Aspecto da secreção uterina | | |
| Mucoso | 13,3% (10/75) ^B | 6,7% (5/75) ^B |
| Mucoturvo | - | 8,0% (6/75) ^B |
| Mucossanguinolento | 72,0% (54/75) ^{Aa} | 41,3% (31/75) ^{Ab} |
| Mucopurulento | 10,7% (8/75) ^{Bb} | 29,3% (22/75) ^{Aa} |
| Purulento | - | 1,3% (1/75) ^C |
| Pioossanguinolento | 2,7% (2/75) ^{Cb} | 12,0% (9/75) ^{Ba} |
| Serossanguinolento | 1,3% (1/75) ^C | 1,3% (1/75) ^C |
| Odor fétido | 0% ^b | 20,0% (15/75) ^a |
| Citologia (Neutrófilos/campo)♦ | 93,3 (±37,7) | 92,7 (±37,3) |

Tonicidade 1= alta; Tonicidade 2= moderada, Tonicidade 3= flácida (Adapt. Melendez et al., 2004).
Letras diferentes maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas P<0,05 (Qui-quadrado).

♦ P>0,05 (Mann Whitney test)

5.3.1 Tônus uterino

No Momento 1, cerca de 77,3% dos animais apresentavam tonicidade uterina 2 ou 3 à palpação retal, caracterizando este momento com um tonicidade uterina de moderada à flácida, enquanto que no Momento 2, a tonicidade uterina avaliada por palpação retal caracterizou-se por ser de moderada à alta, representada por 77,4% dos animais, devido à involução uterina.

5.3.2 Avaliação ultrassonográfica

O diâmetro uterino total obtido pelo uso de ultrassonografia no Momento 2, foi em média de 5,8 cm enquanto que a espessura da parede uterina foi de 1,9 cm (Tabela 6). Valor equivalente é citado por Lopes (2007) que obteve média de diâmetro do corno uterino anteriormente gravídico de 5,9 cm ao 15º dias pós-parto em vacas Girolanda através de palpação retal. Valores superiores foram encontrados por Sheldon et al. (2003) verificando uma média de 7,0 cm de diâmetro do corno uterino aos 15 dias pós-parto apud Lopes (2007) e valores inferiores foram obtidos por Saut et al. (2011) de 2,38 cm ($\pm 6,9$) para o diâmetro do corno anteriormente gravídico ao 14 dias pós-parto.

Melendez et al. (2004) avaliaram vacas da raça Holandesa que apresentaram retenção de placenta e metrite puerperal aguda que foram tratadas com Cefotiofur intramuscular, nestes animais, aos 12 dias pós-parto, o diâmetro do corno uterino foi de 5,65 cm ($\pm 2,4$) em primíparas e de 4,75 cm ($\pm 2,3$) em múltíparas e a espessura da parede uterina foi de 2,52 cm ($\pm 2,0$) em primíparas e 2,10 ($\pm 1,9$) em múltíparas. Conforme o esperado, os valores de espessura de parede uterina encontrados por Melendez et al. (2004) foram superiores aos encontrados no presente trabalho, uma vez que nos casos de infecção uterina ocorre um espessamento da parede do útero devido ao edema (RISCO et al., 2007), além disto, infecções provocam atraso na involução uterina (MATEUS, 2002).

No Momento 1 a maioria dos animais (60%) apresentou coloração de mucosa vaginal hiperêmica, provavelmente devido à proximidade do parto, quando o

aparelho reprodutor fica altamente vascularizado. Enquanto que no Momento 2 praticamente todos os animais apresentaram mucosa vaginal normocorada (98,7%). Achados não muito diferentes dos encontrados por Saut et al. (2011) em que cerca de 83% dos animais apresentaram mucosa vaginal normocorada enquanto cerca de 3% apresentaram mucosa hiperêmica aos 14 dias pós-parto.

5.3.3 Aspecto e odor da secreção uterina

Aspecto mucoso a mucossanguinolento é esperado no período pós-parto estudado (WERNER et al., 2012). No Momento 1 do experimento, 14,7% dos animais apresentaram alteração no aspecto da secreção loquial coletada do útero (Tabela 6). A porcentagem de animais que apresentavam secreção uterina mucosa (6,7%) aos 14 dias pós-parto é semelhante àquela encontrada por Saut et al. (2011), de 10%, assim como a porcentagem de animais que apresentavam secreção uterina de aspecto mucossanguinolento, 41,3% no presente estudo e 47% relatado por Saut et al. (2011) no mesmo período.

Saut et al. (2011) relatam valores bem superiores na porcentagem de animais com secreção purulenta (41%), porém ao realizarem avaliações posteriores afirmaram que esta contaminação bacteriana foi eliminada espontaneamente ao longo do período puerperal. Sheldon et al. (2000) também encontraram proporção bem mais elevada de vacas que apresentavam secreção vaginal purulenta entre 14 e 20 dias pós-parto, num puerpério considerado sem alterações.

No presente estudo, observou-se que 20% dos animais apresentaram secreção uterina com odor fétido ao 14º dia pós-parto (Tabela 6), resultado semelhante foi encontrado por Saut et al. (2011) em vacas mestiças leiteiras no 14º dia pós-parto em que cerca de 16% dos animais apresentou secreção vaginal com odor fétido, 4% odor muito fétido e 80% não apresentou odor. Neste estudo observou-se que 43 dias pós-parto estes animais apresentavam secreção de aspecto mucoso límpido sem odor ou ausência de secreção, sugerindo que ocorreu uma recuperação espontânea da infecção.

Não foi observada nítida relação entre a citologia uterina e aspecto da secreção uterina, uma vez que em todas as amostras obteve-se alto número de neutrófilos/campo independentemente do aspecto da secreção.

5.3.4 Citologia uterina

Como critério de análise da citologia uterina utilizou-se o método da média de neutrófilos por campo microscópico (CORDEIRO et al., 1989). Deste modo, em ambos os Momentos, os animais foram classificados como (+++) para citologia uterina, representado por número médio superior a 50 neutrófilos/campo microscópico.

A literatura que trata de avaliação da citologia uterina em vacas no período puerperal é escassa; não havendo padrões definidos para a comparação dos valores encontrados, uma vez que este exame é geralmente realizado em momentos mais tardios do puerpério a fim de se diagnosticar IU no pós-parto (WESTERMANN et al., 2010; GALVÃO et al., 2011; LEBLANC et al., 2011; MACHADO et al., 2011; SENS & HEUWIESER, 2013).

Porém, pelo fato dos neutrófilos constituírem a primeira linha de defesa uterina contra microorganismos contaminantes, por meio da fagocitose, (DHALIWAL et al., 2001; GALVÃO, 2012), o elevado número desse tipo celular encontrado em ambos os Momentos avaliados é esperado (RISCO et al., 2007), indicando a ocorrência de quimiotaxia de neutrófilos para a luz uterina e presença da defesa celular fisiológica neste período do puerpério.

Visando-se constatar a existência de relação entre o tipo de bactéria e evidências clínicas estabeleceu-se o agrupamento demonstrado nas tabelas 7 e 8.

Na Tabela 7 estão representadas as avaliações ginecológicas nos Momentos 1 e 2 agrupadas de acordo com o crescimento bacteriano no pós-parto. Nela, são comparados os resultados dos exames realizados em ambos os momentos em animais que tiveram (presente, n=35) ou não (ausente, n=40) *E.coli* 24 horas após o parto.

A presença da *E. coli* no Momento 1 não teve influência sobre os parâmetros ginecológicos avaliados. Entretanto, baseando-se na classificação de Werner et al. (2012) em que a alteração da secreção uterina pós-parto é representada pelos aspectos mucopurulento, purulento, piossanguinolento e serossanguinolento, foi observado que nas vacas em que se isolaram outras bactérias que não *E. coli* no Momento 1, 22,5% apresentaram alteração no aspecto do lóquio enquanto que naquelas em que a *E. coli* foi isolada no M1, apenas 5,8% tinham alteração do aspecto da secreção loquial.

TABELA 7 – Relação da presença ou ausência de *E. coli* no útero de vacas holandesas 24 horas após o parto, com a avaliação ginecológica em 24 horas e 14 dias (Momentos 1 e 2) do puerpério. Araras - SP, 2013.

| AVALIAÇÃO | <i>E. coli</i> (24 horas Pós-parto) | | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Presente | | Ausente | |
| | 24 horas | 14 Dias | 24 horas | 14 Dias |
| Tonicidade uterina | | | | |
| 1 | 20,0% (7/35) ^{Bb} | 37,1% (13/35) ^{ab} | 25,0% (10/40) ^{ab} | 40,0% (16/40) ^{Aa} |
| 2 | 45,7% (16/35) ^A | 37,1% (13/35) | 37,5% (15/40) | 40,0% (16/40) ^A |
| 3 | 34,3% (12/35) ^{Aab} | 25,7% (9/35) ^{ab} | 37,5% (15/40) ^a | 20,0% (8/40) ^{Bb} |
| Diâmetro total (cm) ♣ | - | 5,8 (±1,1) | - | 5,8 (±0,9) |
| Espessura de parede (cm) ♣ | - | 1,9 (±0,5) | - | 1,9 (±0,5) |
| Coloração de Mucosa Vaginal | | | | |
| Hipocorada | - | - | - | - |
| Normocorada | 42,9% (15/35) ^b | 100% (35/35) ^a | 37,5% (15/40) ^{Bb} | 97,5% (39/40) ^{Aa} |
| Hiperêmica | 57,1% (20/35) ^a | - | 62,5% (25/40) ^{Aa} | 2,5% (1/40) ^{Bb} |
| Aspecto da secreção uterina | | | | |
| Mucoso | 11,4% (4/35) ^{Bab} | 2,9% (1/35) ^{Bb} | 15,0% (6/40) ^{Ba} | 10,0% (4/40) ^{BCa} |
| Mucoturvo | - | 8,6% (3/35) ^B | - | 7,5% (3/40) ^{CD} |
| Mucossanguinolento | 82,9% (29/35) ^{Aa} | 45,7% (16/35) ^{Ab} | 62,5% (25/40) ^{Aa} | 37,5% (15/40) ^{Ab} |
| Mucopurulento | 2,9% (1/35) ^{Bb} | 28,6% (10/35) ^{Aa} | 17,5% (7/40) ^{Ba} | 30,0% (12/40) ^{Aa} |
| Purulento | - | 2,9% (1/35) ^B | - | - |
| Piossanguinolento | - | 11,4% (4/35) ^{Ba} | 5,0% (2/40) ^{Ca} | 12,5% (5/40) ^{Ba} |
| Serossanguinolento | 2,9% (1/35) ^B | - | - | 2,5% (1/40) ^D |
| Odor fétido | - | 20,0% (7/35) | - | 20,0% (8/40) |
| Citologia (Neut./campo) ♦ | 92,8 (±34,0) | 83,4 (±41,5) | 99,0 (±43,2) | 92,0 (±31,5) |

Tonicidade 1= alta; Tonicidade 2= moderada, Tonicidade 3= flácida (Adapt. Melendez et al., 2004)

Letras diferentes maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas P<0,05 (Qui-quadrado).

♣ P>0,05 (T test)

A Tabela 8 representa o resultado da avaliação ginecológica realizada aos 14 dias após o parto, daqueles animais que apresentaram crescimento bacteriano de *E. coli*, *T. pyogenes* e outras bactérias. Observou-se que os únicos parâmetros que sofreram influência do tipo de bactéria foram o aspecto e odor da secreção uterina, que nos casos da *E. coli* e *T. pyogenes* os animais apresentaram maior frequência de aspecto alterado sendo 50,1% e 55,6% respectivamente, enquanto que, quando houve crescimento das demais bactérias esta alteração foi detectada em 37,2% dos animais.

TABELA 8 – Avaliação ginecológica 14 dias após o parto (Momento 2), em vacas holandesas com ou sem isolamento bacteriano uterino de *E. coli* ou *Trueperella pyogenes*. Araras - SP, 2013.

| Avaliação | 14 Dias Pós-parto | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>T. pyogenes</i> | Outras |
| Tonicidade uterina | | | |
| 1 | 25,0% (6/24) | 33,3% (3/9) ^b | 46,5% (20/43) ^{Aa} |
| 2 | 45,8% (11/24) ^a | 44,5% (4/9) ^b | 32,6% (14/43) ^{ABa} |
| 3 | 29,2% (7/24) ^a | 22,2% (2/9) ^b | 20,9% (9/43) ^{Ba} |
| Diâmetro total (cm) ♦ | 5,8 (±1,0) | 6,2 (±1,1) | 5,8 (±1,0) |
| Espessura de parede (cm) ♦ | 1,8 (±0,6) | 1,7 (±0,9) | 1,8 (±0,5) |
| Coloração de Mucosa Vaginal | | | |
| Hipocorada | - | - | - |
| Normocorada | 95,8% (23/24) ^{Ab} | 100% (9/9) ^a | 100% (43/43) ^a |
| Hiperêmica | 4,2% (1/24) ^B | - | - |
| Aspecto da secreção uterina | | | |
| Mucoso | 4,2% (1/24) ^B | - | 9,3% (4/43) ^B |
| Mucoturvo | - | 11,1% (1/9) ^b | 11,6% (5/43) ^{Ba} |
| Mucossanguinolento | 45,8% (11/24) ^{Aa} | 33,3% (3/9) ^b | 41,9% (18/43) ^{Aa} |
| Mucopurulento | 25,0% (6/24) ^{Ab} | 44,5% (4/9) ^b | 27,9% (12/43) ^{Aa} |
| Purulento | 4,2% (1/24) ^B | - | - |
| Piossanguinolento | 16,7% (4/24) ^B | 11,1% (1/9) | 9,3% (4/43) ^B |
| Serossanguinolento | 4,2% (1/24) ^B | - | - |
| Odor fétido | 33,3% (8/24) ^a | 33,3% (3/9) ^a | 9,3% (4/43) ^b |
| Citologia (Neutrófilos/campo) | 97,9 (±46,3) | 78,9 (±26,6) | 84,4 (±31,1) |

Tonicidade 1= alta; Tonicidade 2= moderada, Tonicidade 3= flácida (Adapt. Melendez et al., 2004). Letras diferentes maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas P<0,05 (Qui-quadrado).

♦ P>0,05 (Tukey's Multiple Comparison Test)

Naquelas vacas em que se isolaram *E. coli* e *T. pyogenes*, no Momento 2, também foram observadas maiores frequências de secreção uterina com odor fétido, de 33,3% em ambos os casos, enquanto que quando o isolamento bacteriano da secreção uterina foi de outras bactérias, obteve-se a frequência de 9,3% de odor fétido no conteúdo uterino. Para os demais parâmetros não se observou nítida influência do tipo de bactéria presente.

A característica da secreção uterina relacionada à bactéria presente foi semelhante às apresentadas por Williams et al. (2005) que associaram presença de secreção mucopurulenta ou purulenta ao isolamento de *T. pyogenes*, *F. necrophorum* e *Proteus spp.*, enquanto *T. pyogenes*, *E. coli* e *M. haemolytica* foram associados ao odor fétido quando a avaliação foi realizada em vacas com 21 ou 28 dias de parição.

Embora realizado dos 21 aos 27 dias após o parto, Westermanna et al. (2010) encontraram correlação positiva com a presença de *T. pyogenes* e citologia uterina com elevado número de polimorfonucleares. No presente estudo não se confirmou estes achados para os animais que resultaram em cultura positiva para *T. pyogenes*, sendo os três grupos semelhantes para esta avaliação.

5.4 Hemograma

Na Tabela 9 estão demonstrados os valores encontrados no hemograma das vacas 24 horas e 14 dias após o parto.

Em ambos os momentos os animais apresentaram a maioria dos parâmetros hematológicos dentro dos padrões estabelecidos por Jain (1996) e utilizados como valores de referência no Laboratório Clínico Veterinário, da FMVZ - UNESP câmpus Botucatu – SP (Tabela 19, Anexo 1).

Levando-se em conta os valores de referência para bovinos de proteína plasmática total de 7,0 a 8,5 g/dL, leucócitos de 4 a 12 ($\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados de 600 a 4.000 (/mm³), linfócitos de 2.500 a 7.500 (/mm³) e monócitos 25 a 840 (/mm³), as vacas apresentaram discreta hipoproteinemia no Momento 1 e

aumento do número de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos em ambos os Momentos após o parto.

TABELA 9 – Valores hematológicos em vacas holandesas 24 horas e 14 dias após o parto em puerpério fisiológico. Araras - SP, 2013.

| Variáveis Do Hemograma | Momento Pós-parto | |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 24 horas | 14 Dias |
| Hemácia (/mm ³) | 6.446.029,4 ±1.213.941,6 | 5.982.352,94 ±848.948,63 |
| Hemoglobina (g/dL)* | 10,3 ±1,5 | 9,2 ±1,1 |
| HT (%)* | 32,6 ±5,1 | 29,0 ±2,9 |
| VCM (fL)* | 51,3 ±6,6 | 49,3 ±5,7 |
| CHCM (%) | 31,5 ±2,4 | 31,6 ±3,0 |
| PT (g/dL)* | 6,4 ±0,6 | 7,3 ±0,6 |
| Plaqueta (/mm ³)* | 344.566,7 ±157.970,2 | 427.252,78 ±157.208,21 |
| Fibrinogênio (mg/dL)* | 555 ±146,7 | 389,2 ±172,7 |
| Leucócitos (/mm ³) | 17.370,6 ±5.817,9 | 16.814,3 ±6.746,0 |
| Mielócito (/mm ³) | 0 | 0 |
| Metamielócito (/mm ³) | 0 | 0 |
| Neutrófilos (/mm ³) | 7.232,2 ±3572,9 | 5.958,3 ±2959,9 |
| Bastonete (/mm ³) | 28,9 ±77,7 | 8,8 ±36,1 |
| Segmentado (/mm ³)* | 7.203,7 ±3574,5 | 5.949,5 ±2957,9 |
| Linfócito (/mm ³) | 8.511,6 ±4059,3 | 9.783,9 ±6723,1 |
| Eosinófilo (/mm ³)* | 280,6 ±293,3 | 162,7 ±222,9 |
| Basófilo (/mm ³) | 10,3 ±37,0 | 8 ±39,4 |
| Monócito (/mm ³)* | 1.355,9 ±1617,0 | 901,4 ±646,7 |

HT= hematócrito, PT= Proteína Plasmática Total.

* P<0,05 (Mann Whitney test)

Na avaliação hematológica um dia após o parto, obteve-se valores semelhantes àqueles encontrados por Ferreira et al. (2009) hematócrito 33% (± 5,6), hemácias 6,2 hemácias/ mm³(± 0,60), 53,4 fL (± 4,16), VCM 53,4 fL (± 4,16), CHCM 33,3 g% (± 0,42) e plaquetas 362.286/ mm³ (± 167.305) neste período.

Valores superiores de proteína plasmática total 8,3 g/dL (\pm 0,66) e de fibrinogênio 2.188 mg/dL (\pm 4.000) foram observados por Ferreira et al. (2009) 24 horas após o parto.

Os valores do leucograma encontrados na literatura nas primeiras 24 horas e entre 8 a 16 dias pós-parto são muito variados.

O número total de leucócitos observado em amostras de sangue colhidas 24 horas após o parto foi semelhante àqueles encontrados na literatura, que variaram entre 9.000 e 18.977 leucócitos/mm³, já aos 14 dias pós-parto, este valor foi superior aos encontrados por diferentes autores entre 8 e 16 dias pós-parto, variando entre 6.000 a 12.106 leucócitos/mm³ (HUSSAIN & DANIEL, 1989; KIM et al., 2005; SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006; FERREIRA et al., 2009).

Os valores de neutrófilos encontrados nas primeiras 24 horas são equivalentes aqueles descritos na literatura para este período, em que o número total de neutrófilos oscila entre 4.000 e 8.453 neutrófilos/mm³ (GUILDROY et al., 1976; HUSSAIN & DANIEL, 1989; KIM et al., 2005; SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006; FERREIRA et al., 2009), sendo o número total de neutrófilos bastonetes entre 14 a 532 neutrófilos bastonetes/mm³ e número total de neutrófilos segmentados entre 3.991 a 7.920 neutrófilos segmentado/mm³ neste período (SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006; FERREIRA et al., 2009).

Na literatura, no período compreendido entre 8 a 16 dias pós-parto, encontram-se valores para total de neutrófilos entre 2.500 a 5.105 neutrófilos/mm³ (GUILDROY et al., 1976; HUSSAIN & DANIEL, 1989; KIM et al., 2005; SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006). A partir do 4º dia pós-parto encontram-se valores para o número absoluto de neutrófilos bastonetes entre 0 e 88 /mm³ e para neutrófilos segmentados de 3.171 a 4.289 /mm³ (SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006). No presente trabalho foram obtidos valores superiores aos citados em literatura para total de neutrófilos e neutrófilos segmentados no 14º dia pós-parto.

Os valores de linfócitos obtidos em amostras colhidas 24 horas após o parto foram semelhantes aos encontrados por outros autores, que variaram entre 3.500 e

10.004 linfócitos/mm³, já aos 14 dias pós-parto encontrou-se número superior de linfócitos àqueles relatados anteriormente, de 3.200 a 7.865 linfócitos/mm³ no período de 8 a 16 dias pós-parto (HUSSAIN & DANIEL, 1989; KIM et al., 2005; SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006; FERREIRA et al., 2009).

No primeiro dia pós-parto o número total de eosinófilos observado vai ao encontro daqueles relatados por outros autores que obtiveram valores entre 138 e 506 eosinófilos/mm³, já aos 14 dias, os valores de eosinófilos foram superiores aos encontrados entre 120 a 500 eosinófilos/mm³ entre 8 a 16 dias pós-parto (HUSSAIN & DANIEL, 1989; KIM et al., 2005; SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006; FERREIRA et al., 2009). O aumento do número de eosinófilos no Momento 2 também foi descrito por Saut e Birgel Junior (2006) e Hussain e Daniel (1989) cujos relatos referem-se a aumento do número absoluto de eosinófilos ao longo do puerpério.

O número absoluto de basófilos no Momento 2 foi inferior a aqueles encontrados na literatura, que variam entre 19 e 99 células/mm³ no período puerperal (SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006).

O número absoluto de monócitos observados nos Momentos 1 e 2 foram bem superiores aos valores relatados entre o primeiro e 16 dias pós-parto, que oscilam entre 21 e 300 monócitos/mm³ (HUSSAIN & DANIEL, 1989; KIM et al., 2005, SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006; FERREIRA et al., 2009).

Devido à peculiaridade do comportamento do leucograma durante o periparto, Saut e Birgel Junior (2006) estabeleceram valores diferenciados de referência para vacas na primeira semana após a parição, uma vez que o parto exerce influência sobre o número total dos leucócitos, caracterizado por eosinopenia e principalmente por leucocitose devido à linfocitose e neutrofilia. Estas alterações são justificadas pelo aumento da secreção de hormônios do córtex adrenal no final da gestação, durante a parição ou na indução fisiológica do parto.

Segundo estes autores os valores de referência na primeira semana de puerpério são 12.247 (± 5.058) a 18.977 (± 5.644) leucócitos/mm³; 4.376 (± 4.139) a 8.453 (± 2.956) neutrófilos/mm³, 88 (± 174) a 532 (± 547) neutrófilos bastonete/mm³;

4.289 (± 4.039) a 7.920 (± 2.689) neutrófilos segmentados/mm³; 225 (± 298) a 334 (± 387) eosinófilos/mm³; 23 (± 45) e 50 (± 128) basófilos/mm³; 7.595 (± 3.127) a 10.004 (± 4.901) linfócitos/mm³; 21 (± 85) a 121 (± 178) monócitos/mm³. No presente estudo o leucograma das vacas HPB, obtidos 24 horas e 14 dias após o parto encontra-se dentro dos limites propostos por Saut e Birgel Junior (2006) exceto para neutrófilos bastonetes e basófilos que foram inferiores e para monócitos que foram superiores.

5.5 Teste do NBT

Os resultados obtidos nos testes do *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) estimulado e não estimulado nos Momento 1 e 2, assim como a avaliação de citologia uterina estão exibidos na Tabela 10.

TABELA 10 - Caracterização da reatividade dos neutrófilos sanguíneos em prova do *Nitroblue Tetrazolium* (NBT), estimulados ou não por endotoxinas em vacas holandesas às 24 horas (Momento 1) e 14 dias (Momento 2) pós-parto. Araras - SP, 2013.

| Pós-Parto | Neutrófilo Reativo ao NBT | | | |
|-----------------|---------------------------|-------------------|------------|-------------------|
| | Não Estimulado | | Estimulado | |
| | Absoluto | % | Absoluto | % |
| 24 horas | 339,9 | 4,7 ($\pm 7,3$) | 506,3 | 7,0 ($\pm 6,3$) |
| 14 dias | 413,5 | 5,9 ($\pm 5,4$) | 532,7 | 7,6 ($\pm 5,0$) |

P>0,05 (Mann Whitney test)

Não foi possível perceber relação entre a percentagem de neutrófilos reativos ao teste de NBT e a citologia uterina em nenhum dos dois Momentos. O percentual de neutrófilos reativos ao NBT tanto no teste estimulado quanto no teste não estimulado são muito semelhantes em ambos os momentos, assim como o número médio de neutrófilo/campo na avaliação citológica da secreção uterina.

Os resultados obtidos nos testes do NBT estimulado e não estimulado foram inferiores aos relatados na literatura. Segundo Park e Good (1970), no teste

estimulado, aproximadamente metade dos neutrófilos torna-se positivo em amostras humanas de controle normal, no presente estudo obteve-se valores de 7% ($\pm 6,3$) e 7,6% ($\pm 5,0$) nos Momentos 1 e 2, respectivamente. Valores superiores para o teste do NBT não estimulado foram obtidos por Ferreira et al. (2009) com média de 32% ($\pm 0,17\%$) de neutrófilos sanguíneos reativos em 11 vacas da raça Girolanda, 24 horas após o parto, enquanto no presente estudo observou-se 4,7% ($\pm 7,3$) de neutrófilos reativos neste período. A divergência de resultados encontrados pode ser justificada por pequenas modificações da técnica entre os diferentes estudos.

A deficiência na função de neutrófilos no período puerperal em vacas leiteiras é relatada (GILBERT et al., 1993) devido ao balanço energético negativo que ocorre neste período e à presença de *E. coli* no lúmen uterino (ZERBE et al., 2001).

Embora a percentagem de neutrófilos reativos tenha sido baixa, indicando uma redução na função dos neutrófilos, ocorreu leucocitose devido à neutrofilia em ambos os momentos, resultado que corrobora com Guildry et al. (1976) que observaram uma diminuição da função neutrofílica durante as primeiras duas semanas pós-parto que foi compensada pelo aumento de neutrófilos circulantes neste período.

5.6 Fatores de virulência da *E. coli*

Os genes testados para os fatores de virulência (*fimH*, *hlyA*, *sfa*, *cnf1*, *kps*, *papGI*, *papG II*, *papG III*, *papC*, *eae*, *iucD/aer*, *afa*, *vt1*, *vt2*, *k99* e *usp*) nas cepas de *E. coli* isoladas do útero das vacas 24 horas (Momento 1, n=35) e 14 dias pós-parto (Momento 2, n=24) e suas frequências, detectadas pela técnica de PCR, estão descritos na Tabela 11, assim como a frequência dos genes *chuA*, TSP e *yjaA* para a classificação das cepas em diferentes grupos filogenéticos.

Dos 16 genes testados para fatores de virulência, 7 foram detectados: *fimH*, *hlyA*, *kps*, *iucD/aer*, *vt1*, *vt2* e *usp*. Exceto para *vt1*, *vt2* e *usp*, a presença destes fatores em *E. coli* isoladas do útero de vacas foi relatada por Silva et al. (2009) que

verificaram *hlyA* e *iucD*, Bicalho et al. (2010) que detectaram *fimH*, *kps* e *hlyA* e Resende et al. (2007), que encontraram hemolisina e aerobactina.

TABELA 11 - Frequência dos fatores de virulência das *E. coli* isoladas do útero de vacas holandesas nas 24 horas (Momento 1, n=35) e 14 dias (Momento 2, n=24) pós-parto. Araras - SP, 2013.

| Fator de Virulência | <i>E. coli</i> no Pós-parto | |
|---------------------|-----------------------------|---------------|
| | 24 horas | 14 Dias |
| <i>fimH</i> | 91,4% (32/35) | 79,2% (19/24) |
| <i>hlyA</i> | 17,1% (6/35) | 12,5% (3/24) |
| <i>sfa</i> | - | - |
| <i>cnf1</i> | - | - |
| <i>kps</i> | 20,0% (7/35) | 4,2% (1/24) |
| <i>papG I</i> | - | - |
| <i>papG II</i> | - | - |
| <i>papG III</i> | - | - |
| <i>papC</i> | - | - |
| <i>eae</i> | - | - |
| <i>iucD/aer</i> | 25,7% (9/35) | 25,0% (6/24) |
| <i>afa</i> | - | - |
| <i>vt1</i> | 2,9% (1/35) | - |
| <i>vt2</i> | 2,9% (1/35) | 4,2% (1/24) |
| <i>k99</i> | - | - |
| <i>usp</i> | 8,6% (3/35) | 4,2% (1/24) |
| <i>chuaA</i> | 14,3% (5/35) | 8,3% (2/24) |
| TSPE4 | 31,4% (11/35) | 33,3% (8/24) |
| <i>yjaA</i> | - | 8,3% (2/24) |

P>0,05 (Qui-quadrado).

Assim como no estudo realizado por Resende et al. (2007) os genes codificadores de fatores de virulência *pap*, *sfa* e *afa* não foram constatados. Além destes nenhuma cepa testada apresentou os genes para *eae* e *K99*, sugerindo que estes fatores de virulência não apresentam relevância para a presença da *E. coli* no útero de vacas com puerpério fisiológico.

O gene *fimH*, envolvido na aderência e invasão da bactéria no tecido hospedeiro (EMODY, et al., 2003; BIEN et al., 2012) foi o mais prevalente tanto nas cepas de *E. coli* no Momento 1 (91,4%) quanto no Momento 2 (79,2%) corroborando com os resultados encontrados por Bicalho et al. (2010) de 87%. A alta frequência deste gene, é indicativo da importância do fator de virulência *fimH* na fixação da *E. coli* no endométrio.

Já Bicalho et al. (2012) encontraram frequências bem inferiores de *fimH* em *E. coli* isoladas do útero de vacas em dois períodos, 21% entre 1 e 3 dias do pós-parto e em torno de 27% entre 8 e 10 dias do pós-parto. Os autores deste estudo associaram a presença deste gene nos 3 primeiros dias do pós-parto, ao desenvolvimento de infecção uterina num período mais tardio, uma vez que vacas que apresentaram *E. coli* positiva para *fimH* neste período, tiveram risco 4,7 vezes maior de desenvolverem metrite.

Deste modo, pode-se dizer que a presença do gene *fimH* em *E. coli* nos primeiros dias pós-parto é mais relevante do que quando encontrado num período mais avançado do puerpério (91,4% em M1 vs 79,2% em M2).

O gene *iucD/aer* foi o segundo mais frequente tanto no Momento 1 (25,7%) quanto no Momento 2 (25,0%). Silva et al. (2009) e Resende et al. (2007) também encontraram uma alta prevalência de aerobactina em *E. coli* do útero de vacas, 42% e 28,5%, respectivamente. Em cadelas com piometra, 17,3% das *E. coli* isoladas do útero continham este gene (SIQUEIRA et al., 2009). Por meio destes dados, sugere-se que o gene *iucD* pode trazer benefícios para a presença da *E. coli* no ambiente uterino, visto que permite o crescimento bacteriano em ambientes com baixa concentração de ferro (JOHNSON, 1991; EMODY et al., 2003; QUINN et al., 2005).

O gene *kps*, que codifica o polissacarídeo capsular (ROSENOW et al., 1995) foi frequente, caracterizando um perfil de alta virulência das bactérias isoladas, uma vez que a cápsula K tem a propriedade de proteger a bactéria da ação de células fagocitárias e anticorpos (JOHNSON, 1991; EMODY, et al., 2003), além disto, Bicalho et al. (2010) relatam que a presença deste gene é associada ao desenvolvimento de infecção uterina, principalmente quando a *E. coli* também é portadora o gene *fimH*.

A α -hemolisina desempenha papel importante promovendo lise celular e prejuízo da quimiotaxia de neutrófilos (JOHNSON, 1991; EMODY et al., 2003), apesar disto, não se sabe ao certo qual seu papel no desenvolvimento da infecção uterina. Siqueira et al. (2009) encontraram a frequência de 34,6% do gene *hlyA* em *E. coli* do útero de cadelas com piometra. Bicalho et al. (2010) relatam haver associação entre a presença deste gene nas *E. coli* e metrite em vacas, especialmente quando associado ao gene *fimH*. Já Silva et al. (2009) não observaram esta relação em estudo realizado com vacas saudáveis e com infecção uterina.

Resende et al. (2007) encontraram uma frequência muito superior de hemolisina (69,8%) em *E. coli* isoladas do útero de vacas saudáveis. Esta diferença pode ser devido à diferença na técnica utilizada, uma vez que a detecção de hemolisina foi realizada pela observação de halo hemolítico por estes autores, enquanto que no presente estudo, utilizou-se a técnica de PCR para a detecção do gene *hlyA*, sendo específico para a α -hemolisina.

Apesar da presença da proteína específica uropatogênica (*usp*) ser considerada uma das principais determinantes de virulência para o trato urinário (YAMAMOTO et al., 2001; PARK et al., 2009), o gene carreador desta proteína foi detectado em 69,9% em *E. coli* isoladas do útero cadelas com piometra (SIQUEIRA et al., 2009). Embora a frequência deste gene tenha sido bem inferior no presente trabalho, pode-se cogitar que esta proteína também desempenhe algum papel no que se diz respeito à colonização do aparelho reprodutivo pela *E. coli*.

As *E. coli* produtoras de verotoxinas, geralmente estão associadas à diarreia (GLOBAL SALM-SURV, 2003; QUINN et al., 2005). Muito embora o significado clínico da presença no útero de *E. coli* portadoras desse gene necessite ainda ser elucidado, é o primeiro relato da detecção desse gene em material oriundo do útero de vacas no período puerperal, sendo detectado o *vt1* no Momento 2 e *vt2* em ambos os Momentos. As *E. coli* produtoras de VT1 são caracterizadas por causar sinais sistêmicos evidentes quando suas toxinas atingem a corrente sanguínea (QUINN et al., 2005) e por hipótese podem estar relacionadas aos casos de metrite puerperal aguda. Deve-se salientar que o presente estudo foi conduzido em vacas com puerpério fisiológico e não se constatou efeito sistêmico nos animais portadores de cepas carreadoras deste gene até o 14^o dia pós-parto, entretanto, houve a manifestação de um grave quadro de infecção uterina por um dos animais, após este período.

Diferentemente do que ocorreu no presente estudo, Silva et al. (2009) detectaram o gene *eaeA* em *E. coli* do útero de vacas, embora não tenham observado relação deste gene com o desenvolvimento de infecção uterina. Bicalho et al. (2010) associaram os fatores virulência de *E. coli*: *astA*, *cdt*, *ibeA* à metrite e endometrite em vacas, porém a ocorrência destes genes não foi testada no presente estudo.

Em alguns estudos, é apontada a associação de alguns fatores de virulência entre si. Yamamoto et al. (1995) observaram que em pacientes humanos com cistite, 88% das cepas positivas para *afa* também carregavam o gene *aer*. No presente estudo, esta associação não foi detectada, uma vez que nenhuma das *E. coli* avaliadas carregava o gene *afa*. Outra associação foi encontrada por Landraud et al. (2000) entre o gene *cnf1* e produtos dos genes *pap/sfa*. É possível que estes genes atuem em associação, dado que nenhum deles foi detectado nas *E. coli* do presente estudo.

No Momento 1 apenas 5,7% (n=2) das cepas de *E. coli* não apresentaram nenhum dos fatores de virulência testados já no Momento 2, 12,5% (n=3) das amostras foram negativas. Além disto, a frequência dos fatores de virulência foi maior nas *E. coli* obtidas 24 horas pós-parto do que nas de 14 dias. Considerando-se que

quanto mais fatores de virulência uma cepa bacteriana expressa, maior é a sua capacidade de gerar infecção (JOHNSON, 1991), sugere-se que além de ocorrer uma diminuição da prevalência de *E. coli* no útero, estas se tornam menos virulentas ao longo do puerpério.

O papel da *E. coli* na patogênese da infecção uterina puerperal da vaca não está completamente elucidado, porém, é proposto que *E. coli* favoreça a persistência de *Trueperella pyogenes*, bactéria frequentemente relacionada à este tipo de infecção (DOHMEN, et al., 2000; WILLIAMS et al., 2008; SILVA et al., 2009). A fim de se detectar fatores de virulência da *E. coli* que favoreçam o crescimento de *T. pyogenes*, agrupou-se estas bactérias segundo a Tabela 12.

Na Tabela 12 é demonstrado o perfil de fatores de virulência das *E.coli* isoladas no Momento 1 que resultaram no crescimento de *T. pyogenes* no Momento 2 (n=6) em comparação às *E.coli* isoladas no Momento 1 que resultaram em outras bactérias que não *T. pyogenes* no Momento 2 (n=29), assim como o perfil de fatores de virulência das *E.coli* que foram isoladas consecutivamente nos Momentos 1 e 2 (n=11).

Em todos os casos o gene *fimH* foi o mais frequente. Encontrado em 100% nas *E.coli* que resultaram em *T. pyogenes* no 14^o dia pós-parto, em 89,7% nas *E. coli* que resultaram em crescimento bacteriano que não *T. pyogenes* ou cultura negativa no Momento 2 e em 91% nas *E. coli* que mantiveram consecutivamente presentes em ambos os Momentos.

Foram encontradas frequências de 33,3% para *kps* e de 16,7% para *hlyA* nas *E. coli* isoladas no Momento 1 que resultaram no crescimento de *T. pyogenes* no Momento 2 e de 18,2% para *kps* e 9,1% para *hlyA* nas *E. coli* que resultaram no crescimento de outras bactérias no Momento 2.

Um percentual de 27,3% (3/11) das *E.coli* isoladas nos Momentos 1 e 2, consecutivamente, eram idênticas, apresentando os mesmos fatores de virulência. Embora exista a possibilidade da introdução de segmentos de DNA contendo fatores de virulência, mediados por plasmídeos, que possam modificar o perfil genético das

populações bacterianas (JOHNSON & NOLAN, 2009), a diferença entre número de fatores de virulência detectado nos Momentos 1 e 2 é evidência da dinâmica de alteração da flora bacteriana que ocorre ao longo do período pós-parto, ainda que se trate da mesma espécie de bactéria.

TABELA 12 - Frequência dos fatores de virulência das *E. coli* isoladas do útero de vacas holandesas 24 horas pós-parto (Momento 1) agrupadas de acordo com a presença (n=6) ou ausência (n=29) de *Trueperella pyogenes* 14 dias pós-parto (Momento 2) e das *E. coli* isoladas consecutivamente em ambos os Momentos (n=11). Araras - SP, 2013.

| Fator de Virulência | <i>T. pyogenes</i> 14 Dias Pós-parto | | <i>E. coli</i> no Pós-parto | |
|---------------------|--------------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | Presente | Ausente | 24 horas | 14 Dias |
| <i>fimH</i> | 100% (6/6) | 89,7% (26/29) | 91,0% (10/11) | 91,0% (10/11) |
| <i>hlyA</i> | 16,7% (1/6) | 17,2% (5/29) | 9,1% (1/11) | 9,1% (1/11) |
| <i>sfa</i> | - | - | - | - |
| <i>cnf1</i> | - | - | - | - |
| <i>kps</i> | 33,3% (2/6) | 17,2% (5/29) | 18,2% (2/11) | - |
| <i>papGI</i> | - | - | - | - |
| <i>Pap GII</i> | - | - | - | - |
| <i>Pap G III</i> | - | - | - | - |
| <i>Pap C</i> | - | - | - | - |
| <i>eae</i> | - | - | - | - |
| <i>iucD/aer</i> | 33,3% (2/6) | 24,1% (7/29) | 36,4% (4/11) | 36,4% (4/11) |
| <i>afa</i> | - | - | - | - |
| <i>vt1</i> | - | 3,4% (1/29) | - | - |
| <i>vt2</i> | - | 3,4% (1/29) | - | - |
| <i>K99</i> | - | - | - | - |
| <i>usp</i> | 16,7% (1/6) | 6,9% (2/29) | - | - |
| <i>chuaA</i> | 16,7% (1/6) | 13,8% (4/29) | 9,1% (1/11) | - |
| TSPE4 | 16,7% (1/6) | 34,5% (10/29) | 18,2% (2/11) | 36,4% (4/11) |
| <i>yjaA</i> | - | - | - | - |

P>0,05 (Qui-quadrado).

5.6.1 Agrupamento filogenético da *E. coli*

Na Tabela 13 estão apresentadas as frequências das *E. coli* distribuídas de acordo com o grupo filogenético, determinado pela técnica de PCR através dos genes *chuaA*, *yjaA* e fragmento de DNA TSPE4.C2 (CLERMONT et al., 2000) nos Momentos 1 e 2.

Em ambos os Momentos a grande maioria das *E. coli* isoladas do útero eram comensais, 85,7% no Momento 1 e 91,6% no Momento 2, sendo o grupo A o mais frequente em ambos os momentos. Embora Silva et al. (2009) tenham realizado estudo com vacas leiteiras com puerpério normal e metrite clínica, assim como no presente trabalho, observaram que a maioria das *E.coli* isoladas do útero eram comensais, no entanto, a distribuição das bactérias entre os quatro grupos filogenéticos foi diferente, sendo mais prevalente o grupo B1 (58%), seguido do grupo A (31%).

TABELA 13 – Frequência da distribuição em Grupos Filogenéticos (CLERMONT et al., 2000) das *E. coli* isoladas do útero de vacas holandesas 24 horas pós-parto (Momento 1, n=35) e 14 dias pós-parto (Momento 2, n=24). Araras - SP, 2013.

| Grupo Filogenético | <i>E. coli</i> | |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 24 horas | 14 Dias |
| A (comensal) | 54,3% (19/35) ^A | 58,3% (14/24) ^A |
| B1 (comensal) | 31,4% (11/35) ^B | 33,3% (8/24) ^A |
| B2 (patogênica) | 0 ^{Cb} | 8,3% (2/24) ^{Ba} |
| D (patogênica) | 14,3% (5/35) ^{Da} | 0 ^{Cb} |

Letras diferentes maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas P<0,05 (Qui-quadrado).

No mesmo estudo realizado por Silva et al. (2009), 11% das *E. coli* isoladas do útero de vacas eram patogênicas pertencentes ao grupo D, resultado semelhante ao

obtido no Momento 1, porém estes autores não detectaram nenhuma cepa pertencente ao grupo B2, o que ocorreu no Momento 2 do presente estudo.

Segundo Sabaté et al. (2006) as *E. coli* pertencentes ao grupo B2 não são comumente encontradas na flora intestinal, pois são muito virulentas. Porém, quando presentes elas podem servir como reservatório para infecção do trato urinário. Além disto, Moreno et al. (2005) apontam que *E. coli* causadoras de bacteremia, que tiveram origem no trato urinário, são predominantemente pertencentes a este grupo e possuem vários fatores de virulência.

No Momento 2 foram detectadas duas cepas (8,3%) pertencentes ao grupo B2, demonstrando que mesmo no puerpério fisiológico, o útero pode estar contaminado por bactérias altamente patogênicas, assim deduz-se que o desenvolvimento da infecção uterina é dependente do *status* imunológico do animal, representado pelos mecanismos de defesa local e sistêmica impedindo a longevidade da bactéria, mesmo que patogênica, no ambiente uterino. Além disto, deve ser considerado o papel de portador/reservatório desses patógenos, desempenhado por esses animais sem uma clara manifestação clínica.

Os resultados foram agrupados na Tabela 14, segundo a classificação filogenética, com o objetivo de se estabelecer relação entre patogenicidade da *E. coli* no Momento 1 e crescimento de *T. pyogenes* no Momento 2, e também a relação quanto a mesma classificação, das *E. coli* que foram isoladas consecutivamente nos Momentos 1 e 2.

Observou-se que 83,4% das cepas de *E.coli* isoladas no Momento 1 que resultaram em crescimento de *T. pyogenes* no Momento 2 eram comensais, sendo o grupo A mais frequente (66,7%) entre estas, característica semelhante foi encontrada nas *E.coli* isoladas no Momento 1 que resultaram em crescimento de outras bactérias que não *T. pyogenes* no Momento 2, destas, 85,7% eram comensais sendo, 50% pertencentes ao grupo A.

TABELA 14 – Frequência da distribuição em Grupos Filogenéticos (CLERMONT et al.; 2000) das *E. coli* isoladas do útero de vacas no Momento 1, agrupadas de acordo com a presença (n=6) ou não (n=29) de *Trueperella pyogenes* no Momento 2 e das *E. coli* isoladas consecutivamente em ambos os Momentos (n=11). Araras - SP, 2013.

| Grupo Filogenético | <i>T. pyogenes</i> no Momento 2 | | <i>E. coli</i> nos Momentos | |
|--------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------|
| | Presente | Ausente | 1 | 2 |
| A (comensal) | 66,7% (4/6) ^b | 51,7% (15/29) ^{Aa} | 72,7% (8/11) ^A | 63,6% (7/11) |
| B1 (comensal) | 16,7% (1/6) ^b | 34,5% (10/29) ^{Ba} | 18,2% (2/11) ^B | 36,4% (4/11) |
| B2 (patogênica) | 0 | 0 ^C | 0 ^B | 0 |
| D (patogênica) | 16,7% (1/6) | 13,8% (4/29) ^D | 9,1% (1/11) ^B | 0 |

Letras diferentes maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas P<0,05 (Qui-quadrado).

Tanto o grupo de *E. coli* que resultaram em crescimento de *T. pyogenes* quanto o que resultaram em outras bactérias no 14º dia pós-parto apresentaram cepas patogênicas pertencentes ao grupo D e nenhuma cepa pertencente ao grupo B2.

Das cepas de *E. coli* isoladas no Momento 1 que resultaram em isolamento de *E. coli* no Momento 2 consecutivamente, observou-se que 90,9% eram comensais, sendo 72,7% do grupo A. Já no Momento 2, todas (100%) as cepas eram comensais, demonstrando que as *E. coli* patogênicas presentes no útero 24 horas não persistiram até o 14º dia do puerpério.

6. CONCLUSÕES

- 6.1 Na segunda semana pós-parto, há rápida involução uterina, evidenciada pela redução do diâmetro do corno anteriormente gravídico à ultrassonografia, aumento da tonicidade miometrial, maior incidência de secreção típica de processo reparativo e normalização na coloração da mucosa vaginal. O hemograma é caracterizado por discreta hipoproteinemia 24 horas pós-parto e por leucocitose com monocitose, linfocitose e neutrofilia no 1º e 14º dia do puerpério, porém os neutrófilos apresentam baixa atividade fagocítica ao teste do NBT estimulado e não estimulado.
- 6.2 Não há relação da presença da *E. coli* no primeiro dia com as características ginecológicas na segunda semana pós-parto. Entretanto, a presença de *E. coli* ou *Trueperella pyogenes* no 14º dia do pós-parto leva à maior frequência de alterações no aspecto e odor da secreção uterina, sem que haja interferência nas dimensões de parede uterina e diâmetro do corno anteriormente gravídico.
- 6.3 Ao Teste de sensibilidade microbiana “*in vitro*” o Florfenicol e o Ciprofloxacino são os que apresentam melhor eficácia contra o crescimento das bactérias isoladas 24 horas e 14 dias após o parto. A Penicilina é o antibiótico de menor eficácia contra as bactérias isoladas 24 horas pós-parto, devido à grande frequência de isolamento de *E. coli* neste momento.
- 6.4 Existe dinâmica da microbiota uterina no pós-parto de vacas holandesas que se caracteriza por:
- a- Grande frequência do isolamento de *E. coli* em ambos os momentos estudados, com prevalência de *E. coli* 24 horas e de *Streptococcus* α -hemolítico aos 14 dias.
 - b- Associação dos isolamentos de *Trueperella pyogenes* no 14º com o crescimento de *E. coli* 24 horas pós-parto, sem evidente relação com a prevalência dos genes dos fatores de virulência detectados.

- c- Heterogeneidade genotípica para os fatores de virulência dos isolamentos de *E. coli* consecutivamente às 24 horas e 14 dias pós-parto, evidência de que a dinâmica de depuração/recontaminação do ambiente uterino ao longo do período puerperal, ocorre ainda que a mesma espécie de bactéria seja isolada.
- 6.5 Os genes associados a fatores de virulência mais frequentes nas cepas de *E. coli* isoladas até duas semanas após o parto são *fimH*, *iucD/aer*, *hlyA* e *kps* sendo ainda encontrados *vt1*, *vt2* e *usp*.
- 6.6 Houve a detecção dos genes para os fatores *vt1* 14 dias após o parto, *vt2* e *usp* em ambos os Momentos, constituindo-se a primeira vez que esses genes são encontrados em *E. coli* oriunda do útero de vacas no período puerperal.
- 6.7 A maioria das cepas de *E. coli* isoladas do útero de vacas até a segunda semana pós-parto é comensal pertencendo principalmente ao grupo filogenético A. Entretanto, 14 dias após o parto, podem ser detectadas *E. coli* do Grupo B2, consideradas de maior potencial patogênico, demonstrando a importância da microbiota uterina como reservatório de patógenos no rebanho.

7. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, F.C.L., Parto normal, In: Nereu Carlos Prestes & Fernanda da Cruz Landim- Alvarenga **Obstetrícia Veterinária** 1° Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006, p. 82-96.

AZAWI, O.I. Postpartum uterine infection in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.187–208, 2008.

BARÁNSKI, W.; GIELEWSKA, M.P.D.; ZDUN´CZYK, S., JANOWSKI, T. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. **Theriogenology** v.78, p.1939–1947, 2012.

BELL, M.J.; ROBERTS, D.J. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. **Theriogenology**, v.68, p.1074–1079, 2007.

BENZAQUEN, M.E.; RISCO, C.A.; ARCHBALD, L.F.; MELENDEZ, P.; THATCHER, M.J.; THATCHER, W.W. Rectal Temperature, Calving-Related Factors, and the Incidence of Puerperal Metritis in Postpartum Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.6, p.2804-2814, 2007.

BÉTIS, F.; BREST, P.; HOFMAN, V.; GUIGNOT, J.; BERNET-CAMARD, M.F.; ROSSI, B.; SERVIN, A.; HOFMAN, P. The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.71, n.3, p.1068-1074, 2003.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. **Corinebactérias; Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes; Rhodococcus equi**, cap 23, p.119-126, Dwight C. Hirsh & Yuan Chung Zee In- **Microbiologia Veterinária** 2°ed., Rio de Janeiro, Guanabara 2009, p. 446.

BICALHO, R.C.; MACHADO, V.S.; BICALHO, M.L.S.; GILBERT, R.O.; TEIXEIRA, A.G.V.; CAIXETA, L.S.; PEREIRA, R.V.V. Molecular and epidemiological

characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science** v.93, p.5818-5830, 2010.

BICALHO, M.L.S.; MACHADO, V.S.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R.O.; BICALHO R.C. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v.157, p.125–131, 2012.

BICUDO, S.D.; LOPES, M.D. Terapêutica do Sistema Reprodutor. In: Sílvia Franco Andrade **Manual de Terapêutica Veterinária**, 2° Ed., São Paulo, Roca, 2002, p.297-330.

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. **International Journal of Nephrology**, v. 2012, p.1-15, 2012.

BLANCO, M; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUÑOA, F.; JUÁREZ, A.; BLANCO, J. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Research in Microbiology**, v.148,p.745-55, 1997.

BRAUN, V.; KILLMANN, H. Bacterial solutions to the iron-supply problem. **Trends in Biochemical Sciences**, v.24, n.3, p.104-109, 1999.

CAI, T.Q.; WESTON, P.G.; LUND, L.A.; BRODIE, B.; MCKENNA, D.J.; WAGNER, W.C. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, n.7, p.934-943, 1994.

CERRI, R.L.A.; RUTIGLIANO, H.M.; LIMA, F.S.; ARAÚJO, D.B.; SANTOS, J.E.P. Effect of source of supplemental selenium on uterine health and embryo quality in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v.71, p.1127–1137, 2009.

CHAPWANYA, A. Uterine disease in dairy cows: Classification, diagnosis and key roles for veterinarians, **Irish Veterinary Journal** v. 61, n.3, p. 183- 186, 2008.

CIARLINI P.C.; BARROS C.M.Q.; LOPES M.D.; KOHAYAGAWA A.; KRAUSE A.; LAPOSY C.B. Leucograma, fibrinogênio e capacidade bactericida dos neutrófilos de éguas susceptíveis e resistentes à endometrites. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.21, p.123-126, 1999.

CLERMONT, O.; STÉPHANE BONACORSI S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.10, p. 4555-4558, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. CLSI–NCCLS, approved standard M100–S15. Wayne, PA, USA, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved standard. 8.ed. CLSI–NCCLS (document M2-A9). Wayne: USA: 2006.

CORDEIRO, J.L.F.; BARROS, S.S.; NEVES, J.P. Avaliação histopatológica do endométrio de vacas leiteiras com catarro genital, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.13, n. 1, p. 7-13, 1989.

CORDEIRO, J.L.F.; NEVES, J.P.; FAN, L.C.R.; ALBUQUERQUE, A.J.D.; BADKE, M.R.T.; SILVA, J.H.S. Citologia cérvico-uterina para o diagnóstico de catarros genitais na vaca, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.13, n. 1, p. 53-68, 1989.

DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; WOLDEHIWET, Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. **Animal Reproduction Science**, v.67, p135–152, 2001.

DOHMEN, M.J.W.; JOOP, K.; STURK, A.; BOLS, P.E.J.; LOHUIS, J.A.C.M. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. **Theriogenology**, v.54, p.1019-1032, 2000.

DONNENBERG, M.S.; TZIPORI, S.; MCKEE, M.L.; O'BRIEN, A.D.; ALROY, J.; KAPER, J.B. The Role of the eae Gene of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Intimate Attachment In Vitro and in a Porcine Model. **Journal of Clinical Investigation**, v.92, n.3, p.1418-1424, 1993.

DRILLICH, M. An update on uterine infections in dairy cattle. **Slovenian veterinary research**, v.43, n.1, p.11-15, 2006.

EMÖDY, L.; KERÉNYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.22, p.29-33, 2003.

FÉRIA C.; MACHADO J.; CORREIA, J.D.; GONÇALVES, J.; GAASTRA, W. Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v.82, n.1, p.:81-89, 2001.

FERREIRA, M.R.A.; ASSIS, T.S.; SILVA, N.C.M., MOREIRA, C.N. EFEITOS DO PERÍODO PUERPERAL SOBRE O HEMOGRAMA E TESTE DE NBT EM VACAS GIROLANDO. **Ciência Animal Brasileira**, supl.1, p.209-213, 2009.

FOLDI, J.; KULCSÁR, M.; PÉCSI, A.; HUYGHE, B.; SA, C.; LOHUIS, J.A.C.M. ; COX, P.; HUSZENICZA, G.Y. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.265–281, 2006.

FORTE, W. C. N.; GONZALES, C. C. L.; CARIGNANI, S.; MIMICA, I. Avaliação de neutrófilos na desnutrição moderada. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.45, n.2, p.147-151, 1999.

GALINDO, A.S.D.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; KUNZ, T.L.; DA SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A. Avaliação microbiológica e citológica do útero de vacas repetidoras de cio. **Ars Veterinaria**, v.19, n.2, p.179-187, 2003.

GALVÃO, K.N.; FELIPPE, M.J.B.; BRITTIN, S.B.; SPER, R.; FRAGA, M.; GALVÃO, J.S.; CAIXETA, L.; GUARD, C.L.; RICCI, A.; GILBERT, R.O. Evaluation of cytokine expression by blood monocytes of lactating Holstein cows with or without postpartum uterine disease. **Theriogenology**, v.77, p.356–372, 2012.

GALVÃO, K.N.; GRECO, L.F.; VILELA, J.M.; SÁ FILHO, M.F.; SANTOS, J.E.P. Effect of intrauterine infusion of Ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1532–1542, 2009.

GALVÃO, K.N.; SANTOS, N.R.; GALVÃO, J.S.; GILBERT, R.O. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. **Theriogenology**, v.76, p.290–299, 2011.

GAMBARINI, M.L.; CARVALHÊDO, A.S.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; MESQUITA, A.J.; FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T.; SEELENT, G.J.N. Infusão uterina com biguanida polimérica sobre a colonização bacteriana do útero de vacas com infecção puerperal após retenção de envoltórios fetais. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, p.145-149, 2005.

GANI, M. O.; AMIN, M. M.; ALAM, M. G. S.; KAYESH, M. E. H.; KARIM, M. R.; SAMAD, M. A.; ISLAM M. R. Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v.6, p. 79–86, 2008.

GILBERT, R.O. Uterine disease in the postpartum period. In: **Proceedings of the 15th International Congress on animal reproduction**, p. 66–73, 2004.

GILBERT, R.O.; GROHN, Y.T.; MILLER, P.M.; HOFFMAN, D.J. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.36, n.1, p.75-82, 1993.

GLOBAL SALM-SURV. PCR for identification of Escherichia coli toxins VT1, VT2 and EAE. **Laboratory Protocols** - Level 4 Training Course, 2ª edição, set. 2003.

Disponível em: http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/e.%20coli%20o157_4_pdf.pdf.

Acesso em: 1 abr. 2014.

GORDON, P.A.; STUART, J.; LEE, T.R.; BREEZE, G.R.; PUGH, R.N.H. The cytocentrifuge NBT test. **Journal of Clinical Pathology**, v.28, p.674-679, 1975.

GUIDRY, A.J.; PAAPE, M.J.; PEARSON, R.E. Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. **American Journal of Veterinary Research**, v.37, n.10, p.195-200, 1976.

HAMMON, D.S.; EVJEN, I.M.; DHIMAN, T.R.; GOFF, J.P.; WALTERS, J.L. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.113, p. 21–29, 2006.

HAMMON, D. S.; GOFF J. P. Immune Function and Energy Status in Holstein Cows with Uterine Infections. **Mid-South Ruminant Nutrition Conference**, 2006.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C.; FISHER, B.D. **Bacilos Gram Negativos Gastrintestinais**, cap12 p.111-128, In- **Microbiologia Ilustrada** 2ed, Porto Alegre, Artmed 2008, 436p.

HIRSH, D.C. *Escherichia*. In: DWIGHT C HIRSH & YUAN CHUNG ZEE (2°ed.) **Microbiologia Veterinária**, Rio de Janeiro- RJ, Guanabara, 2009, p.63-68.

HOFMAN, P.; LE NEGRATE, G.; MOGRABI, B.; HOFMAN, V.; BREST, P.; ALLIANASCHMID, A.; FLATAU, G.; BOQUET, P.; ROSSI, B. Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v.68, n.4, p.522-528, 2000.

HUSSAIN, A.M. Bovine uterine defense mechanisms: a review. **Zentralbl Veterinarmed B**. v.36, n.9, p.641-51, 1989.

HUSSAIN, A.M.; DANIEL, R.C.W. Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows following normal and abnormal parturition. **Theriogenology**, v.37, p.1253-1267, 1992.

HUSSAIN, A.M.; DANIEL, R.C.W.; O'BOYLE, D. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. **Theriogenology**, v.34, n.2, p.291-302, 1990.

HUSZENICZA, G.; FODOR, M., GACS, M., KULCSAR, M., DOHMEN, M.J.W.; VAMOS, M.; PORKDAB, L.; KEGL, T.; BARTYIK, J.; LOHUIS, J.A.C.M.; JANOSI, S.; SZITA, G. Uterine Bacteriology, Resumption of Cyclic Ovarian Activity and Fertility in Postpartum Cows kept in Large-Scale Dairy Herds. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.237-245, 1999.

JAIN N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4th ed. Lea and Febiger, Philadelphia. 1986.1221p.

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

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

JOHNSON, T.; NOLAN, L.K. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.73, n.4, p.750-774, 2009.

JONES, C.H.; JEROME, S.P.; ROTH, R.; HEUSER, J.; NICHOLS, A.V.; ABRAHAM, S.N.; HULTGREN, S.J. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.2081-2085, 1995.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A., GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON W. H. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. **Canadian Veterinary Journal**, v.46, p.255–259, 2005.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T.F.; FOSTER, R.A.; GARTLEY, C.J.; LESLIE, K.E.; WALTON J.S.; JOHNSON, W.H. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometrites in postpartum dairy cows, **Theriogenology**, v. 62, p.9–23, 2004.

KAU, A.L.; HUNSTAD, D.A.; HULTGREN, S.J. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, n.1, p.54-59, 2005.

KIM, I.H.; NA, K.J.; YANG, M.P. Immune Responses during the Peripartum Period in Dairy Cows with Postpartum Endometritis. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, n.6, p.757-764, 2005.

KIRK, J.; OVERTON, M. **Post Calving Uterine Infections**, UC Davis Veterinary Medicine Extension. Disponível em http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-DA/INF-DA_UterineInfections.html , acesso em: 20/08/2011.

KYOGASHIMA, M.; GINSBURG, V.; KRIVAN, H.C. *Escherichia coli* K99 binds to N-glycolylsialoparagloboside and N-glycolyl-GM3 found in piglet small intestine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.270, n.1, p.391-397, 1989.

LACAZ, C.S., PORTO, E. HEISS-VACCARI, E.M., MELO, N.T. **Guia para identificação de Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**. 1ed., São Paulo, Salvier, 1998, 445p.

LANDRAUD, L.; GAUTHIER, M.; FOSSE, T.; BOQUET, P. Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, n.3, p.213-216, 2000.

LEBLANC, S.J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance:A review. **The Veterinary Journal** v.176, p.102–114, 2008.

LEBLANC, S.J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v.76, p.1610–1618, 2011.

LEWIS, G.S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.281–294, 2004.

LEWIS, G.S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1:117, p.1-8, 2003.

LEWIS, G.S. Symposium: health problems of the postpartum cow uterine health and disorders. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.984-994, 1997.

LOPES, D.T. **Efeitos da utilização de prostaglandina F_{2α} durante o puerpério precoce sobre a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras**, 2007. 60 p. Tese de Mestrado em Ciência Animal- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

MACHADO, V.S.; KNAUER, W.A.; BICALHO, M.L.S.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R.O.; BICALHO, R.C. A novel diagnostic technique to determine uterine health of Holstein cows at 35 days postpartum. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1349-1357, 2011.

MALINOWSKI, E.; LASSA, H.; MARKIEWICZ, H.; KAPTUR, M.; NADOLNY, M.; WIESŁAW NIEWITECKI, W.; ZIETARA, J. Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* from the uteri of cows with metritis/endometrites. **The Veterinary Journal**, v.187, p. 234–238, 2011.

MARTINEZ, N.; RISCO, C.A.; LIMA, F.S.; BISNOTTO, R.S.; GRECO, L.F.; RIBEIRO, E.S.; MUNSELL, F.; GALVÃO, K.; SANTOS, J.E.P. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.7158–7172, 2012.

MARTINS, T.M.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; BORGES, A.M. Abordagem diagnóstica e de tratamento da infecção uterina em vacas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.293-298, 2011.

MATEUS, L.; DA COSTA, L.L.; BERNARDO, F.; SILVA, J.R. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.1, p.31-35, 2002.

MELLENDEZ, P.; MCHALE J.; BARTOLOME J.; ARCHBALD L. F.; DONOVAN G. A. Uterine Involution and Fertility of Holstein Cows Subsequent to Early Postpartum PGF_{2α} Treatment for Acute Puerperal Metritis. **Journal Dairy Science**, v.87, p. 3238–3246, 2004.

MERRILL, W.G.; SMITH, V.R. A Comparison of Some Cellular and Chemical Constituents of Blood at Time of Parturition and after Administration of Adrenocorticotrophin. **Journal of Dairy Science**, v.37, n.5, p.546-551, 1954.

MINISTRY OF HEALTH OF NEW ZEALAND. Verotoxin- or Shiga toxin- producing *Escherichia coli* (VTEC/STEC). **Communicable Disease Control Manual**, mai, 2012. Disponível em: www.health.govt.nz/system/files/documents/publications/cd-manual-vtec-stec-may2012.pdf. Acesso em: 1 abr. 2014.

MORENO, E.; PLANELLS, I.; PRATS, G.; PLANES, A.M.; MORENO, G.; ANDREU, A. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.53, p.93–99, 2005.

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

NAKANO, M.; YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; OGAWA, O.; MAKINO, S.I.; HAYASHI, H.; NAIR, G.B.; KURAZONO, H. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. **FEMS Microbiology Letters**, v.205, n.1, p.71-76, 2001.

NIEWITECKI, W.; ZIETARA, J. Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* from the uteri of cows with metritis/endometrites. **The Veterinary Journal**, v.187, p.234–238, 2011.

NOAKES, D.E. In- **Fertilidade e obstetrícia em bovinos**, 1º Ed., São Paulo, Varela, 1991. 139 p.

PALHANO, H.B.; SCHERER, P.O.; FIGUEIREDO, M.A.; JESUS, V.L.T. Uso do florfenicol (Nuflor) para tratamento parenteral de infecções uterinas inespecíficas, de fêmeas bovinas, no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n.4, p. 543-549, 2001.

PARK, B.H.; FIKRIG, S.M.; SMITHWICK, E.M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic acid. **Lancet**, v.292, p.532–534, 1968.

PARK B.H.; GOOD R.A. N.B.T. test stimulated. **Lancet**, v.19, p.616, 1970.

PARK, H.K.; JUNG, Y.J.; CHAE, H.C.; SHIN, Y.J.; WOO, S.Y.; PARK, H.S.; LEE, S.J. Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (kps, usp and ireA) and enteroaggregative genes (aggR and aap) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v.43, n.1, p.51-57, 2009.

PEIXOTO, A.P.C.; COSTA, J.N.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R.K.; SAITO, M.E. Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca - Influência dos fatores etários. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.3, n.1, p.16-20, 2002.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994, 648p.

QUINN. P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 512p.

RESENDE, D.; SANTO, E.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. Prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from the genital tract of healthy cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.564-568, 2007.

RISCO, C. A.; YOUNGQUIST R. S.; SHORE, M. D. **Postpartum Uterine Infections** cap 44, p. 339-344, Robert S. Youngquist & Walter R. Threlfall In: **Current Therapy in Large Animal Theriogenology** 2nd Ed., St. Louis, Missouri, Elsevier 2007, p. 1061.

ROCHA, A.A.; GAMBARINI, M.L.; ANDRADE, M.A.; FILHO, B.D. O; GOMES, F.A. Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas Girolando. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, p.215-220, 2004.

ROPPEL, M.K.; CAMPERO, C.M. Accion de Actinomyces pyogenes en el tracto reproductor bovino. *Revista Therios*, v.27, p.14-20,1998.

ROSENOW, C.; ROBERTS, I.S.; JANN, K. Isolation from recombinant *Escherichia coli* and characterization of CMP-Kdo synthetase, involved in the expression of the capsular K5 polysaccharide (K-CKS). **FEMS Microbiology Letters**, v.125, p. 159–164, 1995.

RUDER, C.A.; SASSER, R.G.; WILLIAMS, R.J.; ELY, J.K.; BULL, R.C.; BUTLER, J.E. Uterine infections in the postpartum cow II. Possible synergistic effect of fusobacterium necrophorum. **Theriogenology**, v.15, n. 6, p.573-580, 1981.

RUNNELS, P.L.; MOON, H.W.; SCHNEIDER, R.A. Development of resistance with host age to adhesion os K99+ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.28, n.1, p.298-300, 1980.

SABATÉ, M.; MORENO, E.; PÉREZ, T.; ANDREU, A.; PRATS, G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.9, p.800-806, 2006.

SAUT, J.P.E.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.5, p. 588-597, 2006.

SEALS, R.C.; MATAMOROS, I.; LEWIS, G.S. Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-PGF₂α concentrations in Holstein cows and their susceptibility to endometritis. **Journal of Animal Science**, v. 80, p.1068–1073, 2002.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**, United States of America: Cadmus Professional Communications, 2003. 345p.

SENS, A.; HEUWIESER, W. Presence of *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, α -hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometrites. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.10, p.1-8, 2013.

SHELDON, G.S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 281–294, 2004.

SHELDON, I.M.; DOBSON H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal Reproduction Science**. v. 82–83, p. 295–306, 2004.

SHELDON, I.M.; LEWIS, G.S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R.O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v.65, p.1516–1530, 2006.

SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; DOBSON,H. The influence of ovarian activity and uterine involution determined by ultrasonography on subsequent reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v.54, p.409-419, 2000.

SHELDON, I.M.; WILLIAMS, E.J.; MILLER, A.N.A.; NASH, D.M.; HERATH, S. Uterine diseases in cattle after parturition. **The Veterinary Journal**, v.176, n.1, p.115-121, 2008.

SILVA, E.; LEITÃO, S.; TENREIRO, T.; POMBA, C.; NUNES, T.; LOPES DA COSTA, L.; MATEUS, L. Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.12, p.6000-60010, 2009.

SINGH, J.; MURRAY, R.D.; MSHELIA, G.; WOLDEHIWET, Z. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. **The Veterinary Journal**,v.175, p.301–309, 2008.

SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO, M.G.; LEITE, D.S.; TIBA, M.R.; MOURA, C.; LOPES, M.D.; 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. **Research in veterinary science**, v.86, p.206–210, 2009.

STATGRAPHICS. Computer program Centurion version XVI (StatPoint Technologies Inc, warrenton, Virginia, USA).

SUBANDRIO, A.L.; SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E. Peripheral and intrauterine neutrophil function in the cow: the Influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones. **Theriogenology**, v.53, p.1591-1608, 2000.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.

WERNER, A.; SUTHAR, V.; PLÖNTZKE, J.; HEUWIESER, W. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.7105-7114, 2012.

WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; PFEIFFER, D.U.; ENGLAND, G.C.W.; NOAKES, D.E.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. **Theriogenology**, v.63, n.1, p.102-117, 2005.

WILLIAMS, E. J.; HERATH, S.; ENGLAND, G. C. W.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Effect of Escherichia coli infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell. **Animal**, 2:8, p. 1153–1157, 2008.

YAMAMOTO, S.; NAKANO, M.; TERAJ, A.; YURI, K.; NAKATA, K.; NAIR, G.B.; KURAZONO, H.; OGAWA, O. The presence of the virulence island containing the usp gene in uropathogenic Escherichia coli is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. **The Journal of Urology**, v.165, n.4, p.1347-1351, 2001.

YAMAMOTO, S.; TSUKAMOTO, T.; TERAJ, A.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Distribution of Virulence Factors in Escherichia coli Isolated from Urine of Cystitis Patients. **Microbiology and Immunology**, v.39, n.6, p.401-404, 1995.

YASSIN, A.F.; HUPFER, H.; SIERING, C.; SCHUMANN, P. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et

al. 1982 emend. Lehen et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.1265-1274, 2011.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. **Compêndio de Micologia Médica**. Medsi, Rio de Janeiro, 1998. 434p.

ZERBE, H.; OÛADNIK, C.; LEIBOLD, W.; SCHUBERTH, H.J. Influence of *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine puerperal uteri on phenotypic and functional properties of neutrophils. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.351-365, 2001.

ZERBE, H.; SCHUBERTH, H.J.; ENGELKE, F.; FRANK, J.; KLUG, E.; LEIBOLD, W. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. **Theriogenology**, v. 60, p.209-223, 2003.

ANEXO 1

TABELA 15 - Distribuição percentual das causas de exclusão do experimento das vacas holandesas (n=25) entre 24 horas e 14 dias pós-parto, devido à intercorrências clínicas puerperal e/ou antibioticoterapia. Araras - SP, 2013.

| Causa de Exclusão | % Animais (n/total) |
|--------------------------|----------------------------|
| Deslocamento de abomaso | 4,0 (1/25) |
| Diarréia | 12,0 (3/25) |
| Infecção uterina | 28,0 (7/25) |
| Mastite | 28,0 (7/25) |
| Pneumonia | 24,0 (6/25) |
| Tristeza parasitária | 4,0 (1/25) |

TABELA 16 – Relação do isolamento de *E. coli* do útero de vacas holandesas 24 horas do período pós-parto (Momento 1), com o isolamento bacteriano uterino 14 dias pós-parto (Momento 2). Araras - SP, 2013.

| PARALELISMO DO CRESCIMENTO BACTERIANO | | |
|---|--|---|
| 24 horas Pós-parto | 14 Dias Pós-parto | |
| <i>E. coli</i> | Negativo (n=3) | - |
| <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> (n=8) | - |
| <i>E. coli</i> | <i>Trueperella pyogenes</i> (n=2) | - |
| <i>E. coli</i> | <i>Peptostreptococcus spp</i> (1) | - |
| <i>E. coli</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> (n=1) | - |
| <i>E. coli</i> | <i>Alcaligenes faecalis</i> (n=1) | - |
| <i>E. coli</i> | <i>Streptococcus α</i> (=4) | - |
| <i>E. coli</i> | <i>Staphylococcus β</i> (n=1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Alcaligenes faecalis</i> | Negativo (n=1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Alcaligenes faecalis</i> + <i>Streptococcus α</i> | Negativo (n=1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Proteus vulgaris</i> | Negativo (n=1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Streptococcus α</i> | <i>Streptococcus α</i> (n=2) | <i>Trueperella pyogenes</i> (n=1) |
| <i>E. coli</i> + <i>Clostridium spp</i> | <i>Staphylococcus spp</i> + <i>T. pyogenes</i> (n=1) | <i>E. coli</i> + <i>Streptococcus α</i> + <i>T. pyogene</i> (n=1) |
| <i>E. coli</i> + <i>Clostridium perfringens</i> | <i>Streptococcus α</i> + <i>T. pyogenes</i> (n=1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Clostridium perfringens</i> | <i>Streptococcus α</i> (n=1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>E. coli</i> | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus vulgaris</i> (n=1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>Streptococcus α</i> (n=1) | - |

TABELA 17 – Espectro de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do útero de vacas HPB, 24 horas pós-parto (Momento 1). Araras - SP, 2013.

| Antibiótico/ Sensibilidade | Bactéria isolada | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------|
| | <i>Alcaligenes faecalis</i> | <i>E. coli</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>Hafnia alvei</i> | <i>Klebsiella oxytoca</i> | |
| Ampicilina | S | 33,3% (1/3) | 42,9% (15/35) | - | - | - |
| | PS | 33,3% (1/3) | 42,9% (15/35) | - | 100% (2/2) | - |
| | R | 33,3% (1/3) | 14,3% (5/35) | 100% (2/2) | - | 100% (1/1) |
| Ceftiofur | S | 66,7% (2/3) | 54,3% (19/35) | - | 50% (1/2) | - |
| | PS | - | 34,3% (12/35) | 50% (1/2) | 50% (1/2) | - |
| | R | 33,3% (1/3) | 11,4% (4/35) | 50% (1/2) | - | 100% (1/1) |
| Ciprofloxacino | S | 66,7% (2/3) | 82,9% (29/35) | 100% (2/2) | 100% (2/2) | - |
| | PS | 33,3% (1/3) | 17,1% (6/35) | - | - | 100% (1/1) |
| | R | - | - | - | - | - |
| Enrofloxacino | S | 100% (3/3) | 65,7% (23/35) | 100% (2/2) | 50% (1/2) | - |
| | PS | - | 25,7% (9/35) | - | 50% (1/2) | 100% (1/1) |
| | R | - | 8,6% (3/35) | - | - | - |
| Florfenicol | S | 66,7% (2/3) | 82,9% (29/34) | 50% (1/2) | 100% (2/2) | 100% (1/1) |
| | PS | - | 11,4% (4/34) | - | - | - |
| | R | 33,3% (1/3) | 5,7% (2/35) | 50% (1/2) | - | - |
| Gentamicina | S | 100% (3/3) | 25,7% (9/35) | - | 100% (2/2) | - |
| | PS | - | 57,1% (20/35) | - | - | 100% (1/1) |
| | R | - | 17,1% (6/35) | 100% (2/2) | - | - |
| Penicilina | S | - | - | - | 50% (1/2) | - |
| | PS | - | - | - | - | - |
| | R | 100% (3/3) | 100% (35/35) | 100% (2/2) | 50% (1/2) | 100% (1/1) |
| Sulfazotrim | S | 33,3% (1/3) | 94,3% (33/35) | 50% (1/2) | 100% (2/2) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | - | - | - |
| | R | 66,7% (2/3) | 5,7% (2/35) | 50% (1/2) | - | - |
| Tetraciclina | S | 33,3% (1/3) | 62,9% (22/35) | 50% (1/2) | 100% (2/2) | 100% (1/1) |
| | PS | 33,3% (1/3) | 14,3% (5/35) | - | - | - |
| | R | 33,3% (1/3) | 22,9% (8/35) | 50% (1/2) | - | - |

S= sensível; **PS**= parcialmente sensível; **R**= resistente

TABELA 17 – (continuação 1) – Espectro de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do útero de vacas HPB, 24 horas pós-parto (Momento 1). Araras - SP, 2013.

| Antibiótico/ Sensibilidade | | Bactéria isolada | | | | |
|-------------------------------|----|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Mannheimia haemolytica</i> | <i>Pasteurella aerogenes</i> | <i>Pasteurella multocida</i> | <i>Peptostreptococcus spp</i> |
| Ampicilina | S | - | 100% (2/2) | 100% (1/1) | 100% (5/5) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | - | - | - |
| | R | 100% (2/2) | - | - | - | - |
| Ceftiofur | S | - | 50% (1/2) | - | 80% (4/5) | 100% (1/1) |
| | PS | 50% (1/2) | 50% (1/2) | 100% (1/1) | 20% (1/5) | - |
| | R | 50% (1/2) | - | - | - | - |
| Ciprofloxacino | S | 50% (1/2) | 50% (1/2) | 100% (1/1) | 100% (5/5) | 100% (1/1) |
| | PS | - | 50% (1/2) | - | - | - |
| | R | 50% (1/2) | - | - | - | - |
| Enrofloxacino | S | - | - | 100% (1/1) | 60% (3/5) | 100% (1/1) |
| | PS | 50% (1/2) | 100% (2/2) | - | 40% (2/5) | - |
| | R | 50% (1/2) | - | - | - | - |
| Florfenicol | S | 100% (2/2) | 100% (2/2) | - | 80% (4/5) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | - | 20% (1/5) | - |
| | R | - | - | 100% (1/1) | - | - |
| Gentamicina | S | 50% (1/2) | 50% (1/2) | 100% (1/1) | 40% (2/5) | 100% (1/1) |
| | PS | - | 50% (1/2) | - | 20% (1/5) | - |
| | R | 50% (1/2) | - | - | 40% (2/5) | - |
| Penicilina | S | - | 50% (1/2) | - | 100% (5/5) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | - | - | - |
| | R | 100% (2/2) | 50% (1/2) | 100% (1/1) | - | - |
| Sulfazotrim | S | 100% (2/2) | 100% (2/2) | - | 100% (5/5) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | - | - | - |
| | R | - | - | 100% (1/1) | - | - |
| Tetraciclina | S | 100% (2/2) | 100% (2/2) | - | 40% (2/5) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | 100% (1/1) | - | - |
| | R | - | - | - | 60% (3/5) | - |

S= sensível; PS= parcialmente sensível; R= resistente

TABELA 17 – (continuação 2) – Espectro de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do útero de vacas HPB, 24 horas pós-parto (Momento 1). Araras - SP, 2013.

| Antibiótico/ Sensibilidade | Bactéria isolada | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|------------|
| | <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Providencia rettigeri</i> | <i>Staphylococcus spp</i> | <i>Streptococcus α</i> | <i>Streptococcus β</i> | |
| Ampicilina | S | - | - | - | 100% (1/1) | 80% (8/10) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | - | - | 20% (2/10) | - |
| | R | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - | - | - |
| Ceftiofur | S | - | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | 90% (9/10) | 100% (1/1) |
| | PS | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | - | 10% (1/10) | - |
| | R | - | - | - | - | - | - |
| Ciprofloxacino | S | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | - | 50% (5/10) | - |
| | PS | - | 100% (1/1) | - | - | 20% (2/10) | 100% (1/1) |
| | R | - | - | - | 100% (1/1) | 30% (3/10) | - |
| Enrofloxacino | S | - | - | 100% (1/1) | - | 50% (5/10) | - |
| | PS | - | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | 20% (2/10) | 100% (1/1) |
| | R | 100% (1/1) | - | - | - | 30% (3/10) | - |
| Florfenicol | S | - | - | 100% (1/1) | - | 80% (8/10) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | - | - | - | - |
| | R | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | 20% (2/10) | - |
| Gentamicina | S | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - | - | 30% (3/10) | - |
| | PS | - | - | 100% (1/1) | - | 10% (1/10) | - |
| | R | - | - | - | 100% (1/1) | 60% (6/10) | 100% (1/1) |
| Penicilina | S | - | 2,9% (1/1) | - | - | 70% (7/10) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | - | 100% (1/1) | 20% (2/10) | - |
| | R | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - | 10% (1/10) | - |
| Sulfazotrim | S | - | - | 100% (1/1) | - | 30% (3/10) | 100% (1/1) |
| | PS | - | - | - | - | - | - |
| | R | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | 70% (7/10) | - |
| Tetraciclina | S | - | - | - | - | 10% (1/10) | - |
| | PS | - | - | - | - | - | - |
| | R | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 90% (9/10) | 100% (1/1) |

S= sensível; PS= parcialmente sensível; R= resistente

TABELA 18 – Espectro de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do útero de vacas HPB, 14 dias após o parto (Momento 2). Araras - SP, 2013.

| Antibiótico/ Sensibilidade | Bactéria isolada | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------|
| | <i>Alcaligenes faecalis</i> | <i>E. coli</i> | <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>Pasteurella multocida</i> | |
| Ampicilina | S | 100% (1/1) | 37,5% (9/24) | - | 100% (1/1) | 100% (2/2) |
| | PS | - | 33,3% (8/24) | - | - | - |
| | R | - | 29,2% (7/24) | 100% (1/1) | - | - |
| Ceftiofur | S | - | 37,5% (9/24) | - | - | 100% (2/2) |
| | PS | - | 41,7% (10/24) | - | 100% (1/1) | - |
| | R | 100% (1/1) | 20,8% (5/24) | 100% (1/1) | - | - |
| Ciprofloxacino | S | 100% (1/1) | 83,3% (20/24) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (2/2) |
| | PS | - | 8,3% (2/24) | - | - | - |
| | R | - | 8,3% (2/24) | - | - | - |
| Enrofloxacino | S | 100% (1/1) | 54,2% (13/24) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (2/2) |
| | PS | - | 37,5% (9/24) | - | - | - |
| | R | - | 8,3% (2/24) | - | - | - |
| Florfenicol | S | - | 87,5% (21/24) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (2/2) |
| | PS | - | 4,2% (1/24) | - | - | - |
| | R | 100% (1/1) | 8,3% (2/24) | - | - | - |
| Gentamicina | S | 100% (1/1) | 45,8% (11/24) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (2/2) |
| | PS | - | 29,2% (7/24) | - | - | - |
| | R | - | 25,0% (6/24) | - | - | - |
| Penicilina | S | - | - | - | - | 50% (1/2) |
| | PS | - | - | - | - | 50% (1/2) |
| | R | 100% (1/1) | 100% (24/24) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - |
| Sulfazotrim | S | 100% (1/1) | 95,8% (23/24) | - | - | - |
| | PS | - | 4,2% (1/24) | - | - | - |
| | R | - | - | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (2/2) |
| Tetraciclina | S | 100% (1/1) | 54,2% (13/24) | - | - | 100% (2/2) |
| | PS | - | 12,5% (3/24) | - | 100% (1/1) | - |
| | R | - | 33,3% (8/24) | 100% (1/1) | - | - |

S= sensível; **PS**= parcialmente sensível; **R**= resistente

TABELA 18 – (continuação 1) Espectro de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do útero de vacas HPB, 14 dias após o parto (Momento 2). Araras - SP, 2013.

| Antibiótico/ Sensibilidade | Bactéria isolada | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------|
| | <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Staphylococcus β</i> | <i>Staphylococcus spp</i> | <i>Streptococcus α</i> | <i>Trueperella pyogenes</i> | |
| Ampicilina | S | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | - | 76,9% (20/26) | 100% (9/9) |
| | PS | - | - | - | - | 7,7% (2/26) | - |
| | R | - | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | 15,4% (4/26) | - |
| Ceftiofur | S | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | - | 84,6% (22/26) | 100% (9/9) |
| | PS | - | 100% (1/1) | - | - | 11,5% (3/26) | - |
| | R | - | - | - | 100% (1/1) | 3,9% (1/26) | - |
| Ciprofloxacino | S | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 46,1% (12/26) | 77,8% (7/9) |
| | PS | - | - | - | - | 30,8% (8/26) | 11,1% (1/9) |
| | R | - | - | - | - | 23,1% (6/26) | 11,1% (1/9) |
| Enrofloxacino | S | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 34,6% (9/26) | 66,7% (6/9) |
| | PS | - | - | - | - | 26,9% (7/26) | 22,2% (2/9) |
| | R | - | 100% (1/1) | - | - | 38,5% (10/26) | 11,1% (1/9) |
| Florfenicol | S | - | - | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 73,1% (19/26) | 77,8 (7/9) |
| | PS | - | - | - | - | 11,5% (3/26) | 22,2% (2/9) |
| | R | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - | - | 15,4% (4/26) | - |
| Gentamicina | S | - | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 100% (1/1) | 34,6% (9/26) | 88,9% (8/9) |
| | PS | - | - | - | - | 3,9% (1/26) | - |
| | R | 100% (1/1) | - | - | - | 61,5% (16/26) | 11,1% (1/9) |
| Penicilina | S | - | - | 100% (1/1) | - | 84,6% (22/26) | 100% (9/9) |
| | PS | - | - | - | - | 11,5% (3/26) | - |
| | R | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | 3,9% (1/26) | - |
| Sulfazotrim | S | - | - | 100% (1/1) | - | 38,5% (10/26) | 44,4% (4/9) |
| | PS | - | - | - | - | 3,8% (1/26) | - |
| | R | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | 57,7% (15/26) | 55,6% (5/9) |
| Tetraciclina | S | - | - | 100% (1/1) | - | 3,8% (1/26) | 66,7% (6/9) |
| | PS | - | - | - | - | - | - |
| | R | 100% (1/1) | 100% (1/1) | - | 100% (1/1) | 96,2% (25/26) | 33,3% (3/9) |

S= sensível; **PS**= parcialmente sensível; **R**= resistente

TABELA 19 - Valores hematológicos de referência em bovinos no Laboratório Clínico Veterinário, da FMVZ - UNESP câmpus Botucatu – SP

| Variável Hematológica | Valores de Referência |
|---|------------------------------|
| Hemácia ($10^6/\text{mm}^3$) | 5,0-10,0 |
| Hemoglobina (g/dL) | 8-15 |
| HT (%) | 24-46 |
| VCM (fL) | 40-60 |
| CHCM (%) | 30-36 |
| PT (g/dL) | 7,0-8,5 |
| Plaqueta ($10^3/\text{mm}^3$) | 200-730 |
| Fibrinogênio (mg/dL) | 300-700 |
| Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$) | 4,0-12,0 |
| Bastonete ($/\text{mm}^3$) | 0-120 |
| Mielócito | - |
| Metamielócito | 0 |
| Segmentado ($/\text{mm}^3$) | 600-4.000 |
| Linfócito ($/\text{mm}^3$) | 2.500-7.500 |
| Eosinófilo ($/\text{mm}^3$) | 0-2.400 |
| Basófilo ($/\text{mm}^3$) | 0-200 |
| Monócito ($/\text{mm}^3$) | 25-840 |

JAIN (1996)

9. ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO AO *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY* (ISSN: 1365-2672)

Author Guidelines

Journal of Applied Microbiology publishes high quality research and review papers on novel aspects of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, systematics, water and biodeterioration. Papers reporting work on all microorganisms, including viruses, are welcomed providing they demonstrate new findings of significance to the field as a whole.

In 2009, *Journal of Applied Microbiology* updated its Aims and Scope and will now publish only the top 25% of research. Click here to read the Editorial announcing the new Aims and Scope.

CONTACTS AND QUICK LINKS

Author submission checklist

Contact the Editorial Office

Contact the Production Editor

Submit your manuscript now to *Journal of Applied Microbiology*

Click here to download the Colour Work Agreement Form

Guidelines for Electronic Graphics

ARTICLE TYPES

Original Articles

Original Articles comprise most of the Journal and should have as their aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership and as far as possible should present novel results of a substantial programme of research.

Review Articles

Review Articles will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

Letters to the Editor

The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper in the Journal. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

EDITORIAL PROCESS

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Editorial Office who checks compliance with the guidelines to authors. The manuscript is assigned to a handling Editor by the Chief Editor, and goes through a rapid screening process at which stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript. Revised manuscripts are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the handling Editor for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript.

Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

EDITORIAL POLICY

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley Blackwell's publication ethics policies, which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the Committee on Publication Ethics.

Authorship

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria, and all those who do satisfy this criteria must be included in the list of authors when the paper is submitted to the Journal. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

Conflict of interest disclosure

Journal of Applied Microbiology requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in

their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Chief Editor, in the manuscript (in the Conflict of Interest section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the ARRIVE guidelines before submission of a manuscript.

Potential threat to security

The Journal expects that all authors will conform to the National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB) guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

Antibiotic antimicrobial testing and microbial resistance

A number of methods like disc diffusion, Etest, agar dilution, broth microdilution and broth macrodilution, are suitable for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing. However, the test used must be performed in accordance with an internationally accepted procedure; for example tests published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Further guidance and interpretation of MIC 50 and MIC 90 values as well as guidance for the interpretation of multiresistance can be found in Schwarz *et al.* J. Antimicrobial Chemother 2010; 65: 601-604.

Data availability

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

- Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript text, e.g. "E. coli (GenBank accession no. EUXXXXXX.X)". Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information.
- Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

OnlineOpen

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Referrals to the Open Access Journal *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition*

This journal works together with two of Wiley's open access journals, *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by one of these two journals. *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* are Wiley open access journals and article publication fees apply. For more information, please go to www.microbiologyopen.com/info and www.foodscience-nutrition.com/info.

SUBMISSION

Authors should submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. The main text of a manuscript must be submitted as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. All original files that you upload will be available for the Editorial Office to access.

Cover letter

The cover letter should contain answers to the following two questions, which will help the Editors in determining whether your manuscript should be sent for full peer review (~50 words per answer):

1. How does this work fit the Aims and Scope of the Journal?

2. In what way is this work novel?

The cover letter should also disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

Suggesting reviewers

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify 'non-preferred' reviewers or institutions that they would rather were not approached. Authors should give justification for choosing non-preferred reviewers or institutions in their cover letter. Authors are advised that handling Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the author submission checklist to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

- **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available here).
- **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;
- **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;

- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- **CONFLICT OF INTEREST:** If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.
- **REFERENCES;**
- **SUPPORTING INFORMATION (if applicable):** Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>

Review Article manuscripts must normally not exceed 32 pages (A4) including references, figures and tables. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only. The headings in Review Articles are of the author's choice, but the manuscript should begin with a short SUMMARY of 150-200 words.

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones *et al.* (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

Tables

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of table style, click here.

Figures

Figures may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the main manuscript file following the text and tables. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of figure style, click here.

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Colour figures

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for colour in print and online, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from here and should be sent to the provided address on acceptance.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (**g**). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please click here for some examples of common abbreviations used in the Journal.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please click here for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found here. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

Early View

Journal of Applied Microbiology is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address

given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

Virulence factors profile in *Escherichia coli* isolated from the uterus of cows 24 hours and 14 days postpartum

L.C. Bicudo^{1*}, E. Oba¹, S.D. Bicudo¹, D.S. Leite², A.K. Siqueira², M. Ferraz², J.C.F. Pantoja³, F.J.P. Listoni³, M.G. Ribeiro³

¹ Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

² Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas, SP, Brazil

³ Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

*Luana de Cássia Bicudo, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, FMVZ, UNESP, Code 18618-970, POBox 560, Botucatu, State of Sao Paulo, Brazil. E-mail:luanabicudo@bol.com.br

Abstract

Escherichia coli is the most common microorganism in the uterus of cows in the first days postpartum, contributing to pathogenic action of other bacterium, like *Trueperella pyogenes*, in the latter period of the puerperium. This study aimed to establish the relationship between the virulence factors of *E. coli* isolated from the uterus of cows with growth of *Trueperella pyogenes*. The study was conducted on 75 Holstein cows with normal delivery and postpartum free from complications. Samples of uterine contents were collected for microbiological culture 24 hours postpartum (Moment 1) and 14 days postpartum (Moment 2). A total of 59 strains of *E. coli* were obtained on culture of uterine secretion. Among these, 35 strains were obtained at Moment 1 and 24 isolates at Moment 2 in which 16 genes associated with virulence factors (VF) were investigated assessed by polymerase chain reaction. The frequencies obtained for *fimH*, *iucD/aer*, *kps*, *hlyA*, *usp*, *vt1*, and *vt2* were 91,4%, 25,7%, 20,0%, 17,1%, 8,6%, 2,9% and 2,9% at Moment 1 and 79,2%, 25,0%, 4,2%, 12,5%, 4,2%, 0% and 4,2% at Moment 2. The genes *sfa*, *cnf1*, *pap* (GI, GII, GIII and C), *eae*, *afa* and *k99* were not detected in any strains. Most strains were classified as belonging to the phylogenetic group A in both Moments. Here, we observed the presence of *E. coli* at Moment 1 with *T. pyogenes* at Moment 2 in same animals in 66.7% (n=6/9). The pathogenic *E. coli* contamination in the uterus of cows in postpartum early days favors *T. pyogenes* action in a latter period, however was not possible to establish a relationship with the VF detected.

Keywords: uterine infection, *Escherichia coli*, endometritis, postpartum, bovine.

Introduction

Uterine infections (UI) affect 10-40% of dairy cows postpartum and represent a major causes of economic losses (SEALS *et al.*, 2002) due to reproductive failure and productive losses by increase the period of service, as well as cause of infertility, the drop in milk production, and cost with therapy (LEWIS, 1997; SHELDON *et al.*, 2008; GANI *et al.*, 2008; LEBLANC *et al.*, 2011).

After delivery, the uterus of 90% of milk cows is contaminated by bacteria (KIRK & OVERTON, 2011), and although the reproductive tract containing lochia is an ideal environment for bacterial growth, the defense mechanisms that occur during physiological puerperium gradually eliminate these microorganisms in the first six weeks postpartum (SHELDON & DOBSON, 2004; AZAWI, 2008).

E. coli is probably the most common bacterium found in the bovine uterus in the postpartum period (HUSSAIN *et al.*, 1990; HUSZENICZA *et al.*, 1999; ROCHA *et al.*, 2004; GALVÃO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009).

Virulence factors are peculiar characteristics of *E. coli* that makes it able to overcome the defense mechanisms of the host immune system, adapt, colonize, invade a new environment and eliminate competition with other bacterial species (JOHNSON, 1991; MULVEY, 2002; KAU *et al.*, 2005; BIEN *et al.*, 2012). Virulent *E. coli*, particularly uropathogenic strains, express a multiplicity of virulence factors including: adhesins, toxins, intimin, uropathogenic specific protein, K capsule and iron uptake system (JOHNSON, 1991; LANDRAUD *et al.*, 2000; NAKANO *et al.*, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2001; MULVEY, 2002; BIEN *et al.*, 2012). In general, the expression of different virulence factors is associated with a greater severity of infections that *E. coli* is able to cause in humans and animals (JOHNSON, 1991).

Although the mechanism of bovine UI is still not fully understood, *E. coli* apparently causes a primary contamination of uterus, and favors the growth and subsequent infection by *T. pyogenes* and other bacterium (HUSZENICZA *et al.*, 1999; DOHMEN *et al.*, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009). Here, we investigated the relationship between the virulence factors of *E. coli* isolated from the uterus of cows at 24 hours and 14 days postpartum with growth of *Trueperella pyogenes*.

Material and methods

Animals

Seventy-five Holstein cows black and white with a mean age of 2.9 years (\pm 1.4) were used, at first to sixth parity order and 41 primiparous. All subject to intensive management of type A milk production, under the automated milking three times daily, and monthly average production of 40.1 kg/day. The feed consisted of balanced ration according to the production level as recommended by the NRC (National Research Council - USA), mineral and water *ad libitum*. All cows had normal delivery with complete elimination of fetal membranes within a period of 12 hours, and the puerperium considered physiological, free from complications in the productive or reproductive sphere during the experimental period of 14 days.

Collection of uterine secretion

Samples of uterine contents for microbiological culture 24 hours postpartum (Moment 1) and 14 days postpartum (Moment 2) were aseptically collected. Uterine secretion samples were collected according to Werner *et al.* (2012), with some modifications. Were used disposable sterile insemination pipettes for mares (Provar[®]) coupled to a 20 mL syringes and protected by sanitary plastic sleeve to avoid contamination by microorganisms present in the vaginal canal. The perivulvar region was previously cleaned with water and chlorhexidine solution (2%), dried with paper towel followed by disinfection with 70% alcohol. Latter, were moved away the labia with a gloved hand and introduced the pipette into the vaginal canal to the entrance of the cervix, where sanitary plastic sleeve was ruptured and pipette inserted into the cervical canal. Pipettes were properly positioned in the uterus, the hand exits from the vaginal canal, and uterine massage was carried out rectally at the same time that the contents aspirated by syringe. After a significant amount of the uterine secretion was obtained, the entire equipment was removed from the genital tract.

Microbiological diagnosis

Samples of uterine contents were kept and transported in Stuart medium under refrigeration (4-8°C) until the microbiological diagnosis procedures. Specimens were cultured simultaneously onto defibrinated sheep blood agar (5%) and MacConkey agar, maintained, respectively, by 96 and 48 hours. Plates were incubated in aerobic conditions at 37°C, and evaluated daily. A pool of approximately ten colonies of lactose-fermenting isolates obtained on MacConkey agar was confirmed as *E. coli* using conventional phenotypic test (QUINN *et al.*, 2011). Simultaneously, samples of uterine secretions were cultured onto defibrinated sheep blood agar (5%) under strict anaerobic conditions, maintained by 5-7 days (QUINN *et al.*, 2011), using an commercial anaerobic generator, according to the manufacturer's recommendations (AnaeroGen™ - 2.5L, Oxoid, Hampshire, England).

The strains of *E. coli* isolated in Moments 1 and 2 were stored at room temperature (25°C) in the Liginieres medium for later detection of genes of virulence factors through Polymerase Chain Reaction (PCR).

PCR

DNA extraction was performed by boiling according to Blanco *et al.* (1997) in which samples of *E. coli* strains were re-suspended in 200µL of sterile Milli Q water using free DNases and RNases microtubes and incubated in a water bath (100°C) for 10 minutes. Samples were then centrifuged at 9676.8 xg for 2 minutes (Sorvall®, MC12) then the supernatant was collected and refrigerated.

Specific primers were used to amplify the genes encoding virulence adhesin of type 1 pili (*fimH*), S fimbriae (*sfa*), fimbriae P (*papGI*, *papGII*, *papGIII* and *papC*), K99 pilus (*k99*), afimbrial adhesin (*afa*), cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf-1*), α-hemolysin (*hlyA*), verotoxin (*vt1* and *vt2*), intimin (*eae*), uropathogenic specific protein (*usp*), K capsule (*kps*), and aerobactin (*aer*). The sequences of the primers, size of amplified products and annealing temperature used are described in Table 1, according Siqueira *et al.* (2009), with some modifications.

TABLE 1 - Primers tested for Polymerase Chain Reaction (PCR), annealing temperature (AT) and size of amplification in the determination of virulence factors in *E. coli* strains isolated from uterus of cows. Brazil, 2013.

| Gene | Sequence of primer (5'-3') | AT (°C)* | Size of amplification (bp)** |
|-----------------|--|----------|------------------------------|
| <i>cnf1</i> | 1: GAA CTT ATT AAG GAT AGT 2: CAT TAT TTA TAA CGC TG | 63 | 533 |
| <i>hlyA</i> | 1: AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T 2: ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A | 63 | 1.177 |
| <i>papC</i> | 1: GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G 2: ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A | 60 | 328 |
| <i>papG I</i> | 1: CAA CCT GCT CTC AAT CTT TAC TG 2: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT | 63 | 692 |
| <i>papG II</i> | 1: GGA ATG TGG TGA TTA CTC AAA GG 2: TCC AGA GAC TGT TCA AGA AGG AC | 63 | 562 |
| <i>papG III</i> | 1: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT 2: TCC AGA GAC TGT GCA GAA GGA C | 63 | 421 |
| <i>fimH</i> | 1: TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG 2: GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA | 63 | 508 |
| <i>afaB/C</i> | 1: GCT GGG CAG CAA ACT GAT AAC TCT C 2: CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCC G | 76 | 750 |
| <i>sfaD/E</i> | 1: CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A 2: CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C | 63 | 410 |
| <i>iucD/aer</i> | 1: TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T 2: AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G | 63 | 602 |
| <i>usp</i> | 1: ATG CTA CTG TTT CCG GGT AGT GTG T 2: CAT CAT GTA GTC GGG GCG TAA CAA T | 66 | 1.000 |
| <i>vt1</i> | 1: AAG TTG CAG CTC TCT TTG AAT A 2: TGC AAA CAA ATT ATC CCC TGA G | 53 | 364 |
| <i>vt2</i> | 1: GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA 2: GTA TCT GCC TGA AGC GTA A | 53 | 515 |
| <i>kpsMTII</i> | 1: GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG 2: CAT CAG ACG ATA AGC ATG AGC A | 63 | 272 |
| <i>eae</i> | 1: GAC CCG GCA CAA GCA TAA GG 2: CCA CCT GCA GCA ACA AGA GC | 63 | 384 |
| <i>k99</i> | 1: CCA GCG CCC GGC AGT AAT GAC TGC 2: CCA CCA TTA GAC GGA GCG CGG | 53 | 450 |

*AT annealing temperature; **bp base pairs

Adapted from SIQUEIRA *et al.* (2009)

The FVL2 strains were used as positive control of genes encoding virulence *sfa*, *pap*, *hly* and *cnf-1* factors; FVL16 for *sfa*, *pap*, *hly* and *cnf-1*; FV35 for *afa*, *cnf-1*; FVL8 for *sfa*, *pap*, *papGII*, *aer*, *hly*, *cnf-1* and *usp*; J96 were used for *pap-GI* and *papGIII*; ORN115 for *fimH*, *vt1*, *vt2* and *eae*.

The amplification of bacterial DNA by PCR was performed in a total of 15 μ l containing 1.0 μ l of DNA (30ng/ μ L) of each primer, 0.12 μ l of desoxynucleoside triphosphate (0.2 mM each), 0.15 μ l (1.0 U) Taq DNA polymerase, 1.2 μ l (25 mM) of MgCl₂ and 1.5 μ l of buffer solution (PCR buffer). PCR procedures were performed in thermal cyclers (GeneAmp[®] PCR System 9700 PE Applied Biosystems) programmed for the initial 94°C denaturation for 10 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at a specific temperature, extension at 72°C for 2 minutes, followed by another cycle at 72°C for 7 minutes. Latter, 5 μ l of buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylecyanol and 25% ficoll) were added to each reaction mixture and 8 μ L to final solution were analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gel in Tris acetate buffer (2M Tris, 0.04 M unethical acid, 0.01 M EDTA, pH8, 0). Electrophoretic assays were held in tanks (Horizon[®] 11-14 or 58, TM Life Technologies, Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus) with 100mV for 50 minutes (100 mV, 200 mA). The material was stained with ethidium bromide (1.5 mg/ml) for 15 minutes, and observed under ultraviolet transilluminator.

The classification of *E. coli* isolated from the uterus at Moments 1 and 2 in commensal (phylogenetic groups A and B1) and pathogenic (phylogenetic groups B2 and D) was based on Clermont *et al.* (2000). After extraction of bacterial DNA, PCR was performed for *chuA* gene. The positive strains were tested for the presence of *yjaA* gene. Positive samples were classified as belonging to group B2 and negative samples to group D. Negative samples for *chuaA* gene were tested by PCR for DNA fragment TspE4.C2. Positive samples were listed in group B1 and negative in group A. Specific primers were used to amplify *chuA* and *yjaA* genes and DNA fragment TSPE4.C2. The sequences of primers and size of amplified products annealing temperature were employed as shown in Table 2.

The amplification of bacterial DNA by PCR and electrophoresis were performed according to the description above, using, however, 3% agarose gel.

TABLE 2 - Primers tested for Polymerase Chain Reaction (PCR), annealing temperature (AT) size and amplification of base pairs, in determining the phylogenetic groups of *E. coli* strains isolated from uterus of cows. Brazil, 2013.

| Gene | Sequence of primer (5'-3') | AT (°C)* | Size of amplification (bp)** |
|-----------------|--|----------|------------------------------|
| <i>chuA</i> | A: 59-GACGAACCAACGGTCAGGAT-39 B: 59-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-39 | 60 | 279 |
| <i>yjaA</i> | A: 59-TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG-39 B: 59-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-39 | 60 | 211 |
| TSPE4.C2 | A: 59-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-39 B: 59-CGCGCCAACAAAGTATTACG-39 | 60 | 152 |

Determination of phylogenetic groups according Clermont *et al.* (2000).

* AT annealing temperature; **bp base pairs

Statistical analysis

Data were summarized using descriptive statistics of frequency distribution, in tables. Values represented by frequency were analyzed by Chi-square test. Analyses were performed with the statistical package STATGRAPHICS Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc, USA), using a significance level of 5%.

Results

The results of complexity of micro-organisms isolated in pure culture and associated of the uterine secretions collected 24 hours (Moment 1) and 14 days postpartum (Moment 2) is shown in Table 3. It was obtained 84.0% of positive bacterial isolation in Moment 1 and 81.3% of positive cultures at the Moment 2. In Moment 1, *E. coli* was the most frequent micro-organism, representing 29.3% of the isolates in pure culture and 17.2% associated with other bacteria such as *Clostridium* spp., α -hemolytic *Streptococcus*, *Klebsiella oxytoca*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* and *Proteus* spp. In Moment 2, the most frequent micro-organisms were α -hemolytic *Streptococcus* and *E. coli* isolated in 29.3% and 25.3% in pure cultures, respectively, and some associations between *E. coli*, *T. pyogenes* or *Enterobacter aerogenes*. *T. pyogenes* represented 12% of the positive cultures.

TABLE 3 – Occurrence of bacterial isolation in pure culture or in association, (n = 75) 24 hours (Moment 1) and 14 days (Moment 2) postpartum, from the uterus of dairy cows without puerperal complications. Brazil, 2013.

| ISOLATION | Postpartum % (n) | |
|---|------------------------------|----------------------------|
| | 24 hours | 14 days |
| <i>Escherichia coli</i> | 29,3 (22) | 25,3 (19) |
| α -hemolytic <i>Streptococcus</i> | 8,0 (6) ^b | 29,3 (22) ^a |
| <i>Trueperella pyogenes</i> | - | 8,0 (6) |
| <i>Pasteurella</i> spp | 8,0 (6) ^a | 2,7 (2) ^b |
| <i>Peptostreptococcus</i> spp | 4,0 (3) | 1,3 (1) |
| <i>Mannheimia haemolitica</i> | 2,7 (2) | - |
| <i>Hafnia alvei</i> | 2,7 (2) | - |
| β -hemolytic <i>Streptococcus</i> | 2,7 (2) | - |
| Miscellaneous in pure culture | 8,0 (6)* | 5,3 (4)** |
| Subtotal (pure) | 65,3 (49) | 72 (54) |
| <i>E. coli</i> + <i>Clostridium</i> spp. | 5,3 (4) | - |
| <i>E. coli</i> + α -hemolytic <i>Streptococcus</i> | 4,0 (3) | 2,7 (2) |
| <i>E. coli</i> + <i>Proteus</i> spp. | 2,7 (2) | 1,3 (1) |
| <i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1,3 (1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Alcaligenes faecalis</i> | 1,3 (1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>Enterobacter cloacae</i> | 1,3 (1) | - |
| <i>T. pyogenes</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. | - | 1,3 (1) |
| <i>T. pyogenes</i> + α -hemolytic <i>Streptococcus</i> | - | 1,3 (1) |
| <i>E. coli</i> + <i>Alcaligenes faecalis</i> + α -hemolytic <i>Streptococcus</i> | 1,3 (1) | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Clostridium</i> spp | 1,3 (1) | - |
| <i>E. coli</i> + <i>T. pyogenes</i> + α -hemolytic <i>Streptococcus</i> | - | 1,3 (1) |
| <i>E. coli</i> + <i>Enterobacter aerogenes</i> + α -hemolytic <i>Streptococcus</i> | - | 1,3 (1) |
| Subtotal (associated) | 18,7 (14)^a | 9,3 (7)^b |
| Negative | 16,0 (12) | 18,7 (14) |
| Total | 100 (75) | 100 (75) |

**Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettgeri*, *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Enterobacter cloacae*.

** *Alcaligenes faecalis*, hemolytic *Staphylococcus*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*.

Different letters in uppercase in column and lowercase in lines P <0.05 (chi-square).

A total of 59 strains of *E. coli* were obtained on culture of uterine secretion. From these, 35 strains were isolated at Moment 1 and 24 strains at Moment 2. Association was found in 66.7% (6/9) of *T. pyogenes* isolates of the Moment 2, with the growth of *E. coli* at Moment 1 in the same animal.

Occurrence of genes for virulence factors of *E. coli* strains isolated in the uterus 24 hours and 14 days post-calving and the frequency of *chuA*, TspE4.C2., and *yjaA* genes for the phylogenetic group classification are shown in Table 4.

fimH was the most frequent gene identified in *E. coli* strains both at Moment 1 and Moment 2, followed by *iucD/aer* gene, that was the second most frequent VF in both instances.

At Moment 1, only 5.7% (n= 2) of *E. coli* strains did not show any of the virulence factors investigated, while at Moment 2, 12.5% (n= 3) samples were negative for VF.

TABLE 4 - Frequency of virulence factors of *E. coli* isolated from the uterus of dairy cows in 24 hours (n=35) and 14 days (n=24) postpartum. Moments 1 and 2 of the postpartum period. Brazil, 2013.

| Virulence factors | <i>E. coli</i> postpartum | |
|-------------------|---------------------------|---------------|
| | 24 hours | 14 days |
| <i>fimH</i> | 91,4% (32/35) | 79,2% (19/24) |
| <i>hlyA</i> | 17,1% (6/35) | 12,5% (3/24) |
| <i>kps</i> | 20,0% (7/35) | 4,2% (1/24) |
| <i>iucD/aer</i> | 25,7% (9/35) | 25,0% (6/24) |
| <i>vt1</i> | 2,9% (1/35) | - |
| <i>vt2</i> | 2,9% (1/35) | 4,2% (1/24) |
| <i>usp</i> | 8,6% (3/35) | 4,2% (1/24) |
| <i>chuA</i> | 14,3% (5/35) | 8,3% (2/24) |
| TSPE4 | 31,4% (11/35) | 33,3% (8/24) |
| <i>yjaA</i> | - | 8,3% (2/24) |

P>0.05 (Chi-square)

Table 5 shows the virulence factors profile of *E. coli* isolated from uterus in Moment 1 that resulted in growth of *T. pyogenes* at Moment 2 (n= 6) compared to *E. coli* isolated at Moment 1 that resulted in other bacteria at Moment 2 (n= 29), as well as the profile of the virulence factors of *E.coli* that were isolated consecutively at Moments 1 and 2 (n= 11).

Only 27.3% (3/11) of *E. coli* isolated at Moments 1 and 2 consecutively were genetically similar, showing the same virulence factors in both moments.

TABLE 5 - Frequency of virulence factors of *E. coli* isolated from the uterus of dairy cows grouped 24 hours postpartum (Moment 1) according to the presence (n = 6) or absence (n = 29) of *Trueperella pyogenes* at 14 days postpartum (Moment 2) and *E. coli* isolated consecutively at both Moments (n = 11). Brazil, 2013.

| Virulence factors | <i>T. pyogenes</i> 14 days postpartum | | <i>E. coli</i> postpartum | |
|-------------------|---------------------------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | Present | Absent | 24h | 14 days |
| <i>fimH</i> | 100% (6/6) | 89,7% (26/29) | 91,0% (10/11) | 91,0% (10/11) |
| <i>hlyA</i> | 16,7% (1/6) | 17,2% (5/29) | 9,1% (1/11) | 9,1% (1/11) |
| <i>kps</i> | 33,3% (2/6) | 17,2% (5/29) | 18,2% (2/11) | - |
| <i>iucD/aer</i> | 33,3% (2/6) | 24,1% (7/29) | 36,4% (4/11) | 36,4% (4/11) |
| <i>vt1</i> | - | 3,4% (1/29) | - | - |
| <i>vt2</i> | - | 3,4% (1/29) | - | - |
| <i>usp</i> | 16,7% (1/6) | 6,9% (2/29) | - | - |
| <i>chuaA</i> | 16,7% (1/6) | 13,8% (4/29) | 9,1% (1/11) | - |
| TSPE4 | 16,7% (1/6) | 34,5% (10/29) | 18,2% (2/11) | 36,4% (4/11) |

P>0.05 (Chi-square)

Table 6 presents the frequencies of phylogenetic group of *E. coli*, determined by PCR using *chuaA* and *yjaA* genes and TSPE4.C2 DNA fragment in Moments 1 and 2. In both instances the great majority of isolates were classified as commensal, 85.7% at Moment 1 and 91.6% at Moment 2, and the phylogenetic group A, the most frequent in both moments.

TABLE 6 - Frequency distribution of phylogenetic groups* of *E. coli* isolated from the uterus of dairy cows 24 hours postpartum (Moment 1, n = 34) and 14 days postpartum (Moment 2, n = 23). Brazil, 2013.

| Phylogenetic Groups | <i>E. coli</i> | |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 24h | 14 days |
| A (commensal) | 54,3% (19/35) ^A | 58,3% (14/24) ^A |
| B1 (commensal) | 31,4% (11/35) ^B | 33,3% (8/24) ^A |
| B2 (pathogenic) | 0 ^{Cb} | 8,3% (2/24) ^{Ba} |
| D (pathogenic) | 14,3% (5/35) ^{Da} | 0 ^{Cb} |

Different letters in uppercase in column and lowercase in lines P <0.05 (chi-square)

*Classification based on CLERMONT *et al.* (2000).

The relationship between pathogenic *E. coli* at Moment 1 and growth of *T. pyogenes* at Moment 2 are showed in Table 7, as well as phylogenetic classification of *E. coli* isolated consecutively in both Moments.

TABLE 7 - Frequency distribution of phylogenetic groups* of *E. coli* isolated from the uterus of cows at Moment 1, grouped according to the presence (n = 6) or not (n = 28) of *Trueperella pyogenes* at Moment 2 and *E. coli* isolated consecutively at both Moments (n = 10). Brazil, 2013.

| Phylogenetic Groups | <i>T. pyogenes</i> at Moment 2 | | <i>E. coli</i> at Moments | |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------|
| | Present | Abscent | 1 | 2 |
| A (commensal) | 66,7% (4/6) ^b | 51,7% (15/29) ^{Aa} | 72,7% (8/11) ^A | 63,6% (7/11) |
| B1 (commensal) | 16,7% (1/6) ^b | 34,5% (10/29) ^{Ba} | 18,2% (2/11) ^B | 36,4% (4/11) |
| B2 (pathogenic) | 0 | 0 ^C | 0 ^B | 0 |
| D (pathogenic) | 16,7% (1/6) | 13,8% (4/29) ^D | 9,1% (1/11) ^B | 0 |

Different letters in uppercase in column and lowercase in lines P <0.05 (chi-square).

*Classification based on CLERMONT *et al.* (2000).

It was found that 83.4% of the strains of *E. coli* isolated in Moment 1, which resulted in growth of *T. pyogenes* in Moment 2 were commensal, being the group A, the most frequent among them. Similar feature was found in *E. coli* isolated at Moment 1 that resulted in growth of other bacteria that not *T. pyogenes* at Moment 2, 85.7% were commensal, 50% belonging to group A.

In *E. coli* strains isolated in the Moment 1 that resulted in isolation of *E. coli* at Moment 2, it was found that 90.9% were commensal, while at Moment 2 all (100%) were commensal strains, indicating that the pathogenic *E. coli* present in the uterus 24 hours did not persisted until the 14th day after delivery.

Discussion

A complexity of microorganisms from bacterial origin was identified in uterus secretion of our cows. Different studies have also reported the presence of miscellaneous agents in uterine secretion of cows in the postpartum period, besides the high prevalence of *E. coli*, *Trueperella pyogenes*, streptococci and anaerobic bacteria. Interestingly, this same pathogens are the main agents involved in bovine uterine infections as well (HUSSAIN *et al.*, 1990; HUSZENICZA *et al.*, 1999; ROCHA *et al.*, 2004; GALVÃO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009), indicating the necessity of some debilitating animal condition to expression of pathogenic opportunist behavior of this microorganisms in uterine environment.

In the present study, was found up 80% of positive bacterial isolation from bovine uterine secretion in both moments. This result resemble similar studies developed in the same period with puerperal cows (ELLIOT *et al.*, 1968; GRIFFIN *et al.*, 1974; SHELDON *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*) as shown by Sheldon and Dobson (2004).

High frequency of *E. coli* was found in uterus of our cows sampled in the first week postpartum. Similar results were obtained by Dohmen *et al.* (2000) in Netherlands and Bicalho *et al.* (2010) in EUA from uterine swabs of cows at same period, reinforcing that *E. coli* is apparently the most common pathogenic bacteria present early days postpartum of cows (ROCHA *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2005).

The presence of *E. coli* in enteric microflora and proximity of rectum to external genital organs of cows favor the uterus contamination by these enterobacteria.

The prevalence of bacterial isolation at Moment 2 was similar to those observed by Werner *et al.* (2012) who assert that *E. coli*, *T. pyogenes* and α -hemolytic *Streptococcus* are the most important microorganisms found in the uterine lumen on day 10 postpartum. The high frequency of α -hemolytic *Streptococcus* in the uterus of cows during the postpartum period is commonly reported, although is considered an opportunistic pathogen (ROCHA *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2005; WERNER *et al.*, 2012; SENS & HEUWIESER, 2013).

Sens and Heuwieser (2013) isolated 7% of *T. pyogenes* from bovine uterus secretions sampled at 10 days postpartum. In the present study, *T. pyogenes* represented 12% of uterine isolations. The low occurrence of *T. pyogenes* in these studies probably may be occurred because cows sampled presented postpartum without complications, besides recognized pathogenicity of *T. pyogenes* to the bovine uterus (WILLIAMS *et al.*, 2005). Indeed, this bacterium is more frequently isolated from uterine infections compared to healthy cows (HUSZENICZA *et al.*, 1999).

Likewise of our study, Dohmen *et al.* (2000) observed that 88% of the isolation of *T. pyogenes* at 14 days postpartum was preceded by the isolation of *E. coli* on the first day postpartum. These findings indicate a positive relationship between *E. coli* isolation in the first day of postpartum and the presence of *T. pyogenes* 14 days postpartum. Despite this peculiar profile of uterine contamination, it has not been possible to establish a clear association with the FV of *E. coli* detected in both periods postpartum of cows.

Among 16 genes related to VF of *E. coli* investigated in sampled cows were detected *fimH*, *iucD/aer*, *hlyA*, *kps*, *vt1*, *vt2* and *usp*. In contrast, *cnf1*, *papC*, *papG*, *sfa*, *eae*, and *k99* genes were not identified. In a similar study, Resende *et al.* (2007) also not found *pap*, *sfa* and *afa* genes involving *E. coli* from uterus of cows in Brazil, suggesting that these genes probably have low influence in pathogenicity of *E. coli* in the uterus of cows with physiological puerperium.

fimH gene is involved in adhesion and invasion of *E. coli* to the epithelial cells of animals and humans (EMODY, *et al.*, 2003; BIEN *et al.*, 2012). The high prevalence of *fimH* encountered in *E. coli* of our cows agree with results described by Bicalho *et al.* (2010) in cows with metritis from EUA, indicating that this gene has an essential role as a virulence factor in setting the *E. coli* in the endometrium of cows.

Bicalho *et al.* (2012) detected much lower frequencies of *fimH* in *E. coli* isolated from the uterus of cows, 21% of isolates between 1 and 3 days postpartum, and around 27% between 8 and 10 days postpartum. In the same study, the presence of *fimH* gene at the first three days after birth was associated with the development of uterine infection at a later time, because cows infected by *E. coli fimH*-positive in this period had 4.7 times higher risk to develop metritis.

Iron is essential for *E. coli* metabolism, since this ion is used to DNA synthesis, electron transport, peroxidase metabolism, and oxygen transport. Growth under iron-restricted conditions is an *E. coli* mechanism that competes with host of iron. Aerobactin is considered the most effective iron chelation system employed by *E. coli*, mainly in extra-intestinal infections. *iucABCD* gene (iron uptake chelate) encode the enzymes required for genesis of aerobactin (EMODY *et al.*, 2003).

Around 25% of *E. coli* strains obtained from our cows harbored *iucD/aer* in both moments of study. Silva *et al.* (2009) and Resende *et al.* (2007) in Brazil also found a high prevalence of aerobactin in *E. coli* from the uterus of cows, 42% and 28.5%,_respectively. In bitches with pyometra, 17.3% of *E. coli* isolated from the uterus contained this gene as well (SIQUEIRA *et al.*, 2009). These data suggest that the gene *iucD* can be an important VF of *E. coli* in the bovine uterine environment, allowing bacterial growth in extra-intestinal environments with low iron concentration (JOHNSON, 1991; EMODY *et al.*, 2003; QUINN *et al.*, 2005).

kps gene, which encodes capsular polysaccharide (ROSENOW *et al.*, 1995), is recognized also as a virulence factor of *E. coli* to bovine uterus infection because the K capsule protects the bacteria to the action of phagocytic cells and antibodies (JOHNSON, 1991; EMODY *et al.*, 2003). Among *E. coli* isolated in our cows, the distribution of *kps* gene at 24 hours and 14 days postpartum was, respectively, 20% and 4.2%. Furthermore, Bicalho *et al.* (2010) reported the presence of *kps* gene

associated with development of bovine uterine infection, especially when *E. coli* carrier simultaneously *fimH* gene. Curiously, in present study, all *E. coli* isolates that harbor *kps* gene were associated with *fimH*, except one obtained at Moment 1, suggesting that capsule is an important VF to *E. coli* strains involved in uterus contamination.

E. coli strains related to extra-intestinal infections in animals usually expressed genes for cytotoxins, particularly haemolysin and cytotoxic necrotizing factor. The α -hemolysin is a pore-forming cytotoxin that lyses erythrocytes, leucocytes, renal, and endothelial mammals cells. This VF enables host cell lyses, mainly from immune system, as well as iron acquisition, favoring the *E. coli* infection (JOHNSON, 1991; EMODY *et al.*, 2003). Nevertheless, its role in the development of bovine uterine infection remains unclear. In the present study, *hly* gene was detected in *E. coli* strains from bovine uterus at 24 hours and 14 days postpartum in 17.1% and 12.5%, respectively. A relationship between the presence of the *hlyA* gene and metritis in bovine cows was proposed especially when associated with the *fimH* gene (BICALHO *et al.*, 2010). However, Silva *et al.* (2009) did not show this relationship in a study with healthy and uterine infections carrier cows. In contrast, higher frequency of hemolysin (69.8%) in *E. coli* isolated from the uterus of healthy cows was described in Brazil (RESENDE *et al.*, 2007). Despite strong differences founded by some studies with detection of *hly* gene in *E. coli* strains isolated from bovine uterus, the expression of hemolysis is an additional mechanism of pathogenicity of this microorganism that develop extra-intestinal infections, including in uterus (EMODY *et al.*, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 2009).

In last decade, uropathogenic specific protein (*usp*) has been considered to be a major determinant for virulence of *E. coli* strains from the urinary tract infections of humans (YAMAMOTO *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2009). *usp* enhanced the infectivity of *E. coli* and possible act as a bacteriocin, particularly in UPEC strains (KURAZONO *et al.*, 2003). Among domestic animals, the gene encoding this protein was detected in 69.9% of *E. coli* isolated from uterus of bitches with pyometra in Brazil (SIQUEIRA *et al.*, 2009). The presence of *usp* was lower in cows sampled. However, a few studies have reported the occurrence of *usp* gene in *E. coli* strains from bovine

uterus. Thus, future similar studies should include *usp* investigation to confirm the real impact of this gene as a VF of *E. coli* in bovine uterus infections.

E. coli O157:H7 serotype is considered an emergent human disease worldwide. The major virulent factor of EHEC is attributed to verocytotoxin (VT) or Shiga-like toxin (Stx). *E. coli* producing verocytotoxin are usually associated with diarrhea (GLOBAL SALM-SURV, 2003; QUINN *et al.*, 2011). Although the clinical significance of *vt* gene of *E. coli* in the uterus is unclear, to the best of our knowledge, the present study report by first time its detection from the uterus of cows in the postpartum period. *E. coli* producing VT1 commonly cause systemic signs when their toxins reach the bloodstream (QUINN *et al.*, 2005), and hypothetically may be related with acute puerperal bovine metritis as well. The present study involved cows with physiological puerperium, and there were no systemic signs in animals infected by *E. coli* harboring *vt* gene until 14th day postpartum, despite the manifestation of a severe uterine infection have occurred exclusively in an animal after this period. Nevertheless, the presence of VT-positive strains isolated from uterus secretion reinforce that cows may be reservoirs of verotoxigenic *E. coli* for humans.

EHEC strains contain LEE pathogenicity island responsible by encodes *eae* gene (intimin), produced also by EPEC group. None of our *E. coli* isolates expressed *eae*. In contrast, Silva *et al.* (2009) also in Brazil reported the *eae* gene in *E. coli* from cow uterus, although this gene was not observed involved in uterine infections.

Bicalho *et al.* (2010) in EUA associated other virulence factors of *E. coli* (*astA*, *cdt* and *ibeA*) with bovine metritis and endometritis, although these VF were not investigated in the present study. Yamamoto *et al.* (1995) observed in human patients with cystitis that 88% of *afa*-positive *E. coli* strains also carried the *aer* gene. In our study, this association has not been detected, since none of the *E. coli* evaluated had *afa* gene. Another association was found by Landraud *et al.* (2000) that proposed association between the *cnf-1* and *pap/sfa* genes in human nosocomial tract infections caused by *E. coli*. It is suggested that these genes act in combination and have low influence in pathogenicity of *E. coli* in the bovine uterus in postpartum period, since none of them were detected in this study.

The phylogenetic distribution of our *E. coli* isolates identified at Moment 1 resembles those found by Silva *et al.* (2009), since 11% of *E. coli* isolated from the uterus of cows were pathogenic belonging to group D. In contrast, these authors did not detect any *E. coli* strain belonging to group B2, different which occurred at Moment 2 of our cows. Sabaté *et al.* (2006) described that *E. coli* belonging to the group B2 are not commonly found in the intestinal microflora because they are highly virulent. However, when present it can serve as a reservoir of pathogenic strains for urinary tract infection. Furthermore, Brown *et al.* (2005) reported that *E. coli* causing bacteremia, disseminated from the urinary tract are predominantly belonging to pathogenic group and possesses several virulence factors.

In present study, two (8.3%) strains belonging to group B2 were detected at Moment 2, indicating that even at physiological puerperium, the bovine uterus may be contaminated by pathogenic bacteria. Apparently, the development of bovine uterine infection is dependent on the immune status of animals, represented by the mechanisms of local and systemic defense preventing the longevity of the commensal and pathogenic bacteria in the uterine environment. Moreover, it must be considered that cows act as reservoir of pathogenic bacteria because some of these animals have no clinical manifestation.

The identification of *T. pyogenes* on day 14 postpartum preceded by *E. coli* contamination indicates that *E. coli* is a primary agent of uterine contamination and its pathogenic action and consumption of oxygen at first days postpartum may favor subsequent colonization of bovine uterus environment by opportunistic facultative or anaerobic pathogens such as *Trueperella pyogenes*, although this association was not clearly associated with the VF investigated in *E. coli* strains.

Genotypic heterogeneity of the virulence factors of *E. coli* isolates was characterized consecutively at both moments in present study. The most frequent genes associated with virulence of *E. coli* strains until two weeks after parturition were *fimH*, *iucD/aer*, *hlyA*, *kps*, followed by *vt1*, *vt2* and *usp*. There was the detection of *E. coli* harboring *vt1* 14 days after delivery, and *vt2* and *usp* in both Moments. To the best of our knowledge, *vt1*, *vt2* and *usp* were identified by first time from the uterus of cows in the postpartum period. Most strains of *E. coli* isolated from the uterus of cows

until the second week postpartum were phylogenetically considered commensal mainly belonging to group A. However, 14 days after calving, was detected *E. coli* group B2, recognized as major pathogenic group, alerting that uterine microflora may be a reservoir of pathogens in the dairy herd.

Acknowledgement

We are grateful to Mr. Lair Antonio de Souza and veterinarians Sergio Soriano and Alex Sica from Colorado farm for allowing access to experimental animals. The financial support conducted by the Foundation for Research of the State of São Paulo (Process 2011/15852-7).

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- AZAWI, O.I. (2008) Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci* **105**, 187–208.
- BICALHO, R. C.; MACHADO, V. S.; BICALHO, M. L. S.; GILBERT R. O.; TEIXEIRA, A. G. V.; CAIXETA, L. S.; PEREIRA, R. V. V. (2010) Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *J Dairy Sci* **93**, 5818-5830.
- BICALHO, M.L.S.; MACHADO, V.S.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R.O.; BICALHO R.C. (2012) Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Vet Microbiol* **157**, 125–131.
- BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. (2012) Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol* **2012**, 1-15.

- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUÑOZA, F.; JUÁREZ, A.; BLANCO, J. (1997) Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Res Microbiol* **148**, 745-55.
- DOHMEN, M.J.W.; JOOP, K.; STURK, A.; BOLS, P.E.J.; LOHUIS, J.A.C.M. (2000) Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology* **54**, 1019-1032.
- EMÖDY, L.; KERÉNYI, M.; NAGY, G. (2003) Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* **22**, 29-33.
- GALVÃO, K.N.; GRECO, L.F.; VILELA, J.M.; SÁ FILHO, M.F.; SANTOS, J.E.P. (2009) Effect of intrauterine infusion of Ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci* **92**, 1532–1542.
- GANI, M. O.; AMIN, M. M.; ALAM, M. G. S.; KAYESH, M. E. H.; KARIM, M. R.; SAMAD, M. A.; ISLAM M. R. (2008) Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. *Bangl J Vet Med* **6**, 79–86.
- GLOBAL SALM-SURV. PCR for identification of *Escherichia coli* toxins VT1, VT2 and EAE. (2014) *Laboratory Protocols - Level 4 Training Course*, 2ª edição, set. 2003. Accessed on February, 2014: http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/e.%20coli%20o157_4_pdf.pdf

- HUSSAIN, A.M.; DANIEL, R.C.W.; O'BOYLE, D. (1990) Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology* **34**, 291-302.
- HUSZENICZA, G.; FODOR, M., GACS, M., KULCSAR, M., DOHMEN, M.J.W.; VAMOS, M.; PORKDAB, L.; KEGL, T.; BARTYIK, J.; LOHUIS, J.A.C.M.; JANOSI, S.; SZITA, G. (1999) Uterine Bacteriology, Resumption of Cyclic Ovarian Activity and Fertility in Postpartum Cows kept in Large-Scale Dairy Herds. *Reprod Domest Anim* **34**, 237-245.
- JOHNSON, J. R. (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection *Clin Microbiol Rev* **4**, 80-128.
- KAU, A.L.; HUNSTAD, D.A.; HULTGREN, S.J. (2005) Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Curr Opin Microbiol* **8**, 54-59.
- KIRK, J.; OVERTON, M. (2011) Post Calving Uterine Infections, *UC Davis Veterinary Medicine Extension*. Accessed on February, 2014: http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-DA/INF-DA_UterineInfections.html.
- KURAZONO, H.; NAKANO, M.; YAMAMOTO, S.; OGAWA, O.; YURI, K.; NAKATA, K.; KIMURA, M.; MAKINO, S.; NAIR, G.B. (2003) Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island. *Microbiol Immunol* **47**, 797–802.
- LANDRAUD, L.; GAUTHIER, M.; FOSSE, T.; BOQUET, P. (2000) Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett Appl Microbiol* **30**, 213-216.

- LEBLANC, S.J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. (2011) Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology* **76**, 1610–1618.
- LEWIS, G.S. (1997) Symposium: health problems of the postpartum cow uterine health and disorders. *J Dairy Sci* **80**, 984-994.
- MULVEY, M.A. (2002) Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**, 257–271.
- MORENO, E.; PLANELLS, I.; PRATS, G.; PLANES, A.M.; MORENO, G.; ANDREU, A. (2005) Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **53**, 93–99.
- NAKANO, M.; YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; OGAWA, O.; MAKINO, S.I.; HAYASHI, H.; NAIR, G.B.; KURAZONO, H. (2001) Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 71-76.
- PARK, H.K.; JUNG, Y.J.; CHAE, H.C.; SHIN, Y.J.; WOO, S.Y.; PARK, H.S.; LEE, S.J. (2009) Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (kps, usp and ireA) and enteroaggregative genes (aggR and aap) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. *Scand J Urol Nephrol* **43**, 51-57.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. (2011) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2.ed. UK: Wiley-Blackwell, 928p.

- RESENDE, D.; SANTO, E.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. (2007) Prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from the genital tract of healthy cows. *Arq Bras Med Vet Zootec* **59**, 564-568.
- ROCHA, A.A.; GAMBARINI, M.L.; ANDRADE, M.A.; FILHO, B.D. O; GOMES, F.A. (2004) Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas Girolando. *Ciênc Anim Bras* **5**, 215-220.
- SABATÉ, M.; MORENO, E.; PÉREZ, T.; ANDREU, A.; PRATS, G. (2006) Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* **12**, 800-806.
- SEALS, R.C.; MATAMOROS, I.; LEWIS, G.S. (2002) Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-PGF₂ α concentrations in Holstein cows and their susceptibility to endometritis. *J Anim Sci*, 80, 1068–1073.
- SENS, A.; HEUWIESER, W. (2013) Presence of *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, α -hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometrites. *J Dairy Sci* **96**, 1-8.
- SHELDON, I.M.; DOBSON H. (2004) Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* **82–83**, 295–306.
- SHELDON, I.M.; WILLIAMS, E.J.; MILLER, A.N.A.; NASH, D.M.; HERATH, S. (2008) Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J* **176**, 115-121.
- SILVA, E.; LEITÃO, S.; TENREIRO, T.; POMBA, C.; NUNES, T.; LOPES DA COSTA, L.; MATEUS, L. (2009) Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *J Dairy Sci* **92**, 6000-60010.

- SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO, M.G.; LEITE, D.S.; TIBA, M.R.; MOURA, C.; LOPES, M.D.; PRESTES, N.C.; SALERNO, T.; SILVA, A.V. (2009) Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Res Vet Sci* **86**, 206–210.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (1999) *Microbiologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 586p.
- WERNER, A.; SUTHAR, V.; PLÖNTZKE, J.; HEUWIESER, W. (2012) Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *J Dairy Sci* **95**, 7105-7114.
- WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; PFEIFFER, D.U.; ENGLAND, G.C.W.; NOAKES, D.E.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. (2005) Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* **63**, 102-117.
- WILLIAMS, E. J.; HERATH, S.; ENGLAND, G. C. W.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. (2008) Effect of *Escherichia coli* infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell. *Animal* **2**, 1153–1157.
- YAMAMOTO, S.; NAKANO, M.; TERAJ, A.; YURI, K.; NAKATA, K.; NAIR, G.B.; KURAZONO, H.; OGAWA, O. (2001) The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *J Urol* **165**, 1347-1351.
- YAMAMOTO, S.; TSUKAMOTO, T.; TERAJ, A.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. (1995) Distribution of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Urine of Cystitis Patients. *Microbiol Immunol* **39**, 401-404.