

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Filogrupos e fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* obtidas do conteúdo uterino e de fezes de cadelas com piometra

Rafael Gariglio Clark Xavier

Belo Horizonte
2020

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Filogrupos e fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* obtidas do conteúdo uterino e de fezes de cadelas com piometra

Rafael Gariglio Clark Xavier

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

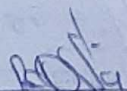
Belo Horizonte
2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

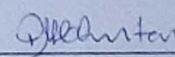
RAFAEL GARIGLIO CLARK XAVIER

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

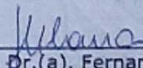
Aprovado(a) em 06 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Dr.(a). Rodrigo Otávio Silveira Silva
Presidente - Orientador(a)



Prof(a). Dr.(a). Patricia Maria Coletto Freitas



Prof(a). Dr.(a). Fernanda Morcatti Coura

X3f Xavier, Rafael Gariglio Clark, 1990.
Filogrupos e fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* obtidas do conteúdo uterino e de fezes de cadelas com piometra / Rafael Gariglio Clark Xavier – 2020.

43p.: il.

Orientador: Rodrigo Otávio Silveira Silva

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Cães- Doenças - Teses - 2- Agentes bacterianos – Teses – 3 – Útero- Teses – I – Silva, Rodrigo Otávio Silveira - II – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária– III – Título.

CDD – 636.08969

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Dedico esse trabalho a todos os professores que tive na vida, a profissão que mais modifica e beneficia a sociedade.

Agradecimentos

Agradeço ao Laboratório de Bacterioses e Pesquisa por permitir a realização deste trabalho/sonho, e proporcionar o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores Francisco e Rodrigo, que além de meus orientadores também são meus exemplos dentro da profissão.

Aos estagiários e meus amigos da pós-graduação Amanda, Carlos, Carolina, Diogo, Jordana, Loren e Ronnie que sempre estiveram dispostos a me ajudar e mantiveram o ambiente do laboratório agradável, tornando essa trajetória mais fácil e proveitosa.

À Hanna, Paloma, e todos residentes e professores de clínica cirúrgica de pequenos animais pela coleta de amostras que possibilitou a execução deste trabalho.

Agradeço também aos animais utilizados, desejo que tenham tido uma boa recuperação.

Aos órgãos de fomento PRPq-UFMG, FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio.

E agradeço imensamente à banca examinadora por ter aceitado o convite de avaliação do trabalho.

*Disciplina é liberdade.
Compaixão é fortaleza.
Ter bondade é ter coragem.*

- Renato Russo.

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos.....	13
3. Revisão de literatura	13
3.1. Piometra em cadelas	13
3.2. <i>Escherichia coli</i>	18
3.2.1. Patotipos.....	18
3.2.2. Fatores de virulência em estirpes de <i>E. coli</i> patogênica extraintestinal (ExPEC)	19
3.2.3. Filogrupos	20
3.3. ExPEC e a microbiota intestinal.....	22
4. Material e métodos.....	23
4.1. Amostragem.....	23
4.2. Isolamento bacteriano.....	24
4.3. Extração de DNA e identificação da espécie	24
4.4. Determinação dos filogrupos dos isolados de <i>E. coli</i>	24
4.5. Detecção dos fatores de virulência dos isolados de <i>E. coli</i>	24
4.6. Análise estatística	26
5. Resultados	27
6. Discussão	32
7. Conclusão	37
8. Referências bibliográficas	38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Número de isolados e frequência (%) de filogrupos de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra.28

Tabela 2: Número de isolados e frequência (%) de fatores de virulência de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra.30

Lista de Figuras

- Figura 1:** Relação entre os filogrupos identificados por MLST em estirpes de *E. coli* da coleção de referência em comparação com *E. fergusonii*.21
- Figura 2:** Frequência das espécies bacterianas isoladas do conteúdo uterino de cadelas com piometra.....27
- Figura 3:** Frequência dos filogrupos B1, B2 e F de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra por *E. coli* ou por outros agentes.....29
- Figura 4:** Frequência de detecção dos genes de virulência *papC*, *papG* e *usp* em isolados de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra por *E. coli* ou por outros agentes.....31
- Figura 5:** Frequência de detecção dos genes de virulência *papC*, *hlyA*, *papG*, *cnf-1*, *usp* e *sfaS* em isolados de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra por *E. coli* ou por outros agentes.....32

Lista de Quadros

Quadro 1: Sinais clínicos mais observados em quadros de piometra em cadelas.	15
Quadro 2: Achados laboratoriais mais frequentes em cadelas com piometra.	16
Quadro 3: Prevalência de espécies bacterianas comumente isoladas do conteúdo uterino de cadelas com piometra.	17
Quadro 4: Genes de virulência pesquisados, concentração ([]) e desenho de cada iniciador, tamanho dos produtos (pb) e referências bibliográficas.	25

Resumo

Diversos agentes bacterianos estão associados com a ocorrência de piometra em cadelas, porém o patotipo de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) é o mais frequente, estando associado a 82 a 100% dos casos. O objetivo do presente estudo foi determinar a frequência dos grupos filogenéticos e fatores de virulência associados a estirpes de *E. coli* isoladas de conteúdo uterino e fezes de 55 cadelas, totalizando 110 amostras clínicas. Um total de 225 estirpes de *E. coli* foram isoladas e divididas em três categorias: 90 (40%) isolados do conteúdo uterino, 75 (33,3%) isolados das fezes de cadelas com piometra por *E. coli* e 60 (26,6%) das fezes de cadelas em que a piometra não foi causada por *E. coli*. No conteúdo uterino, predominaram estirpes de *E. coli* pertencentes ao filogrupo B2 e positivas para os genes de fatores de virulência associados a adesão (*papC*, *papG* e *sfaS*) e produção de toxinas (*hlyA*, *cnf-1* e *usp*). Similarmente, elevadas frequências de estirpes pertencentes ao filogrupo B2 foram identificadas nas fezes de cadelas com piometra por *E. coli*, enquanto cadelas com infecção uterina não provocada por *E. coli* eliminaram mais frequentemente estirpes do filogrupo B1. Os fatores de virulência fímbria tipo P (*papC* e *papG*) e proteína uropatogênica específica (*usp*), previamente associados à piometra em estudos anteriores, foram identificados com frequência superior em fezes de cadelas com piometra por *E. coli* ($p \leq 0,05$). O presente estudo demonstra, portanto, que estirpes ExPEC do filogrupo B2 são comumente encontradas causando piometra em cães. Em adição, a elevada frequência de estirpes do filogrupo B2 e carreadoras dos genes de virulência *papC*, *papG* e *usp* nas fezes de cadelas com piometra associada a *E. coli* sugere que a colonização por essas estirpes possa estar relacionada com um maior risco de piometra por *E. coli* nesses animais.

Palavras-chave: Enterobacteriaceae, útero, cães, microbiota.

Abstract

Several bacterial agents are associated with the occurrence of pyometra in female dogs, but the extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) pathotype is the most common, being associated with 82 to 100% of the cases. The aim of the present study was to determine the frequency of phylogenetic groups and virulence factors associated with isolated *E. coli* strains with uterine content and feces of 55 female dogs, totaling 110 clinical samples. A total of 225 *E. coli* strains were isolated and divided into three categories: 90 (40%) isolated from uterine content, 75 (33.3%) isolates from feces of *E. coli* pyometra bitches and 60 (26.6%) of female feces in which pyometra was not caused by *E. coli*. In the uterine content, predominated strains of *E. coli* belonging to phylogroup B2 and positive for adhesion-associated virulence factor genes (*papC*, *papG* and *sfaS*) and toxin production (*hlyA*, *cnf-1* and *usp*). Similarly, high frequencies of strains belonging to phylogroup B2 were identified in the feces of *E. coli* pyometra female dogs, while female dogs with non-*E. coli* uterine infection more often eliminated strains of phylogroup B1. The fimbria virulence factors type P (*papC* and *papG*) and specific uropathogenic protein (*usp*), previously associated with pyometra in previous studies, were identified with higher frequency in feces of *E. coli* pyometra bitches ($p \leq 0.05$). Therefore, the present study demonstrates that phylogroup B2 ExPEC strains are commonly found to cause pyometra in dogs. In addition, the high frequency of strains of phylogroup B2 and carriers of virulence genes *papC*, *papG* and *usp* in the feces of *E. coli*-associated pyometra dogs suggests that colonization by these strains may be related to a higher risk of pyometra by *E. coli* in these animals.

Keywords: Enterobacteriaceae, uterus, dogs, microbiota.

1. Introdução

A piometra é uma doença comum em cadelas e caracteriza-se por uma infecção bacteriana no útero com manifestações clínicas locais e sistêmicas que podem variar desde descargas vulvares purulentas a peritonite, sepse e disfunção de vários órgãos (Henriques et al., 2014; Müştak et al., 2015; Hagman, 2018). Estudos sugerem que fatores hormonais podem favorecer a ascensão de microrganismos do trato intestinal do hospedeiro, porém a patogênese da piometra ainda é pouco compreendida (Johnson, Stell e Delavari, 2001; Chen et al., 2003; Coggan et al., 2008; Siqueira et al., 2009; Ghanbarpour e Akhtardanesh, 2012; Mateus et al., 2013; Henriques et al., 2014; Müştak et al., 2015; Hagman, 2018).

Entre os agentes etiológicos da piometra, *Escherichia coli* destaca-se como a principal bactéria associada à infecção em cadelas e também em outras espécies, inclusive seres humanos (Munson et al., 2002; McCain et al., 2009; Ikeda, Takahashi e Kurachi, 2013; Henriques et al., 2014; Junginger et al., 2015; Kassé, Fairbrother e Dubuc, 2016; Castillo et al., 2018; Hagman, 2018; Rainey et al., 2018). Isolados patogênicos de *E. coli* são caracterizados em diferentes patotipos, que variam de acordo com a presença de fatores de virulência e conferem a elas o potencial de infectar sítios específicos e causar danos ao hospedeiro (Chen et al., 2003; Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Siqueira et al., 2009; Mateus et al., 2013; Müştak et al., 2015). *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) é o patotipo mais comum em infecções extraintestinais em animais e seres humanos, causando meningites, pielonefrites, cistites e septicemias, além da piometra (Russo e Johnson, 2000; Siqueira et al., 2009). Em cadelas, estudos demonstram que ExPEC é encontrada em 82 a 100% dos casos de infecção uterina (Chen et al., 2003; Hagman, 2018). Nesses casos, as estirpes ExPEC isoladas de conteúdo uterino comumente possuem fatores de virulência como adesinas, toxinas, sideróforos e protectinas (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Mateus et al., 2013; Henriques et al., 2014). Estudos sugerem ainda que tais fatores desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da piometra (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Ghanbarpour e Akhtardanesh, 2012; Mateus et al., 2013; Henriques et al., 2014).

Adicionalmente à pesquisa de genes de virulência, estudos com *E. coli* têm utilizado a classificação dos isolados em filogrupos para entender melhor a dinâmica de colonização e infecção por esse agente (Clermont et al., 2013). Os grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E e F) parecem estar associados a diversos fatores tais como hábitos alimentares de seus hospedeiros, nichos ecológicos específicos e tendência a causar determinadas doenças

(Clermont et al., 2013; Müştak et al., 2015). Nesse sentido, ExPEC isoladas de piometra comumente agrupam-se ao filogrupo B2 e, em menor frequência, ao filogrupo D (Johnson e Stell, 2000; Ghanbarpour e Akhtardanesh, 2012), filogrupos encontrados comumente em infecções extraintestinais (Clermont et al., 2013).

Diversos estudos têm demonstrado a eliminação de ExPEC nas fezes de cães, sugerindo que esses indivíduos possam atuar como reservatórios desse patógeno para seres humanos e animais (Johnson, Stell e Delavari, 2001; Smith, Fratamico e Gunther, 2007). Adicionalmente, têm-se sugerido que infecções do trato urinário causadas por ExPEC em cães originam-se de sua própria microbiota intestinal (Johnson, Stell e Delavari, 2001). Alguns autores têm proposto que mecanismos similares ocorram nos casos de piometra por *E. coli* em cadelas, porém estudos prévios estão restritos principalmente à avaliação do conteúdo uterino de cadelas infectadas e de fezes de cadelas não acometidas pela enfermidade (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Mateus et al., 2013). Não existem estudos, segundo a literatura consultada, comparando estirpes de *E. coli* da microbiota intestinal de cães com piometra causada por esse agente com estirpes isoladas de cães com piometra por outras bactérias.

2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram determinar a frequência dos grupos filogenéticos e fatores de virulência de estirpes de *E. coli* isoladas de conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra.

3. Revisão de literatura

3.1. Piometra em cadelas

Piometra é definida como um acúmulo de exsudato purulento no útero ocorrendo em diversas espécies animais e em seres humanos (Munson et al., 2002; McCain et al., 2009; Ikeda, Takahashi e Kurachi, 2013; Henriques et al., 2014; Junginger et al., 2015; Kassé, Fairbrother e Dubuc, 2016; Castillo et al., 2018; Rainey et al., 2018). Em cadelas, a piometra é a doença reprodutiva mais comum, acometendo até 25% das fêmeas não castradas, e caracteriza-se por uma infecção bacteriana no útero que resulta em sinais clínicos locais e sistêmicos (Chen et al., 2003; Hagman et al., 2012; Fieni, Topie e Gogny, 2014; Hagman, 2018; Rautela et al., 2019).

Estudos sugerem alguns fatores que predisõem a ocorrência da doença, tais como idade superior a oito anos (Hagman et al., 2011; Jitpean et al., 2014). Em adição, algumas raças parecem mais predispostas, tais como Boxer, Chow Chow, Cocker Spaniel, Collie, Golden Retriever, Labrador, Pinscher, Rottweiler, São Bernardo e Schnauzer (Rautela et al., 2019), acometendo até 50% das fêmeas não castradas (Hagman et al., 2012).

Apesar da alta frequência na rotina clínica, a patogênese da piometra continua pouco compreendida. Até o momento, sabe-se que há o envolvimento de fatores hormonais e bacterianos (Agostinho et al., 2014; Hagman, 2018). Autores sugerem que a progesterona, durante a fase lútea do ciclo estral, estimula a proliferação e secreção de glândulas endometriais, a supressão das contrações miometriais e a diminuição da resposta imunológica uterina, o que favoreceria a colonização bacteriana (Fieni, Topie e Gogny, 2014; Prapaiwan et al., 2017; Rautela et al., 2019). Os efeitos hormonais são amplificados ao longo da vida, o que pode justificar a maior incidência em animais mais velhos (Rautela et al., 2019). Estudos indicam ainda que o uso de hormônios esteroides, como o estrogênio, eleva o risco de piometra por aumentar a resposta uterina à progesterona (Hagman, 2018). Mais recentemente, um trabalho de indução experimental de piometra em cães sugeriu que a infecção uterina por *E. coli* alteraria a expressão de receptores para hormônios sexuais no útero das cadelas, amplificando os fatores hormonais que favorecem o crescimento bacteriano (Qian e Hou, 2017).

A cadela acometida pode apresentar variados sinais clínicos (Quadro 1), que surgem normalmente entre 2 a 4 meses após o estro (Agostinho et al., 2014; Fieni, Topie e Gogny, 2014; Müştak et al., 2015; Hagman, 2018). Entre os sinais clínicos, sabe-se que febre ou hipotermia estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de peritonite, enquanto depressão geral moderada a severa e mucosas pálidas estão associadas a um maior tempo de internação pós-operatória (Jitpean et al., 2014). Sabe-se ainda que animais com piometra fechada, quando não há drenagem do exsudato pela cérvix, tem um quadro mais grave e com maior risco de sepse (Jitpean et al., 2016).

Quadro 1: Sinais clínicos mais observados em quadros de piometra em cadelas.

Sinais clínicos	Frequência (%)
Depressão	63-100
Corrimento vaginal	57-88
Síndrome da resposta inflamatória sistêmica	57-61
Poliúria	34-73
Febre	32-50
Taquipnéia	32-40
Polidipsia	28-89
Dor a palpação abdominal	23-80
Taquicardia	23-28
Útero aumentado à palpação	19-40
Mucosas anormais	16-76
Claudicação	16
Desidratação	15-94
Vômito	13-38
Abdômen distendido	5
Hipotermia	3-10
Anorexia	2-15
Diarreia	0-27

*adaptado de Hagman (2018).

Assim, a piometra é considerada uma doença de caráter emergencial e que leva o animal a óbito em 5 a 25% dos casos, sobretudo nas cadelas em que o tratamento é postergado (Agostinho et al., 2014; Fieni, Topie e Gogny, 2014; Jitpean et al., 2014; Müştak et al., 2015). As principais consequências da piometra, e diretamente ligadas ao óbito são a ruptura uterina, nefropatia, peritonite, endotoxemia e sepse (Maddens et al., 2010; Mateus et al., 2013; Henriques et al., 2014; Jitpean et al., 2014; Müştak et al., 2015; Rautela et al., 2019).

O diagnóstico é comumente baseado no histórico, sinais clínicos e exames de imagem, tais como radiografia e ultrassonografia abdominal. Alguns exames complementares, tais como hemograma, leucograma e avaliação da função hepática também auxiliam no diagnóstico (Quadro 2) (Henriques et al., 2014; Jitpean et al., 2014; Hagman, 2018; Rautela et al., 2019). Entre as possíveis alterações nos exames adicionais, a leucopenia destaca-se pela associação com casos de maior gravidade (Jitpean et al., 2014). Mais recentemente autores tem proposto a utilização da proteína C reativa como marcador para casos graves ou para diferenciar casos de

piometra de aumentos de volume não infecciosos no útero (Pretzer et al., 2008; Dabrowski, Kostro e Szczubial, 2013; Enginler et al., 2014; Jitpean et al., 2014-b).

Quadro 2: Achados laboratoriais mais frequentes em cadelas com piometra.

Achados laboratoriais	Frequência (%)
Hipercolesterolemia	74
Aumento de AST	64
Leucocitose	61
Monocitose	60
Neutrofilia	55
Hipoalbuminemia	33
Bacteriúria	25
Aumento de ALT	22
Bilirrubinemia	21
Azotemia	5
Leucopenia	4

*adaptado de Jitpean et al. (2014) e Hagman (2018).

Entre os exames complementares, a cultura microbiológica do conteúdo uterino e o teste de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados permitem a identificação do patógeno causador e auxiliam na escolha da base mais adequada para cada paciente, permitindo um tratamento direcionado e reduzindo o risco de seleção de bactérias multirresistentes (Yoon et al., 2017; Rautela et al., 2019). Porém, esses exames não são comumente solicitados e normalmente a prescrição é empírica. Acredita-se que o tempo necessário para obtenção dos resultados (entre 2 a 8 dias) seja o principal limitante que reduz a solicitação desses exames (Hagman, 2018).

Uma grande variedade de bactérias pode estar envolvida na infecção uterina em cães. Entre os microrganismos mais comuns, destacam-se representantes da família Enterobacteriaceae, principalmente *E. coli* e *Klebsiella* sp., e bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Quadro 3). Interessantemente, os estudos reportam que em até 25% dos quadros de piometra nenhum microrganismo é isolado (Yoon et al., 2017; Hagman, 2018). Entre as hipóteses possíveis para esse fenômeno está a eliminação do patógeno pelo sistema imune do hospedeiro, microrganismos que não crescem normalmente nos meios de cultivo utilizados para diagnóstico de rotina, ou uso de antimicrobianos no pré-operatório (Yoon et al., 2017).

Quadro 3: Prevalência de espécies bacterianas comumente isoladas do conteúdo uterino de cadelas com piometra.

Microrganismo	Prevalência (%)
<i>Escherichia coli</i>	82-100
Sem crescimento microbiano	10-26
<i>Streptococcus</i> sp.	4-23
<i>Staphylococcus</i> sp.	2-15
<i>Klebsiella</i> sp.	2-14
<i>Proteus</i> sp.	1-4
<i>Enterococcus</i> sp.	<1

*adaptado de Chen et al. (2003), Hagman (2018) e Rautela et al. (2019).

A ovariectomia (OH) é o tratamento de escolha nos casos de piometra. Uma vez que a fonte de infecção é removida, o estado geral de saúde do animal tende a se normalizar em até duas semanas (Agostinho et al., 2014; Jitpean et al., 2014; Hagman, 2018). A maior desvantagem desse procedimento é a impossibilidade de reprodução da cadela, fato de grande relevância em casos em que o tutor possui interesse zootécnico no animal (Fieni, Topie e Gogny, 2014). O tratamento exclusivamente farmacológico tem sido empregado em algumas situações, como em reprodutoras jovens ou ainda quando a anestesia e cirurgia são impossíveis no momento (Jitpean et al., 2014; Sperling et al., 2018; Melandri, 2019). Os protocolos baseiam-se na administração concomitante de esteroides com atividade antiprogesterona e comumente antimicrobianos, buscando assim expelir ativamente o conteúdo purulento do útero e combater o crescimento bacteriano (Fieni, Topie e Gogny, 2014; Ros, Holst e Hagman, 2014; Contri et al., 2015). A manutenção da fertilidade é observada em 70% das pacientes tratadas por estes protocolos (Hagman, 2018). Deve-se destacar, porém, que o tratamento exclusivamente medicamentoso não é indicado em cadelas com alguns sinais clínicos tais como febre, hipotermia, insuficiência hepática e/ou renal, ou com suspeita de peritonite. Em adição, tais protocolos podem apresentar ainda diversos efeitos colaterais, incluindo um percentual menor de resolução clínica e uma taxa de recorrência em torno de 29% (Fieni, Topie e Gogny, 2014; Hagman, 2018).

3.2. *Escherichia coli*

E. coli, bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa, é o principal microrganismo envolvido em quadros de piometra em cães e diversas espécies, inclusive em seres humanos (Nataro e Kaper, 1998; Russo e Johnson, 2000; McCain et al., 2009; Ikeda, Takahashi e Kurachi, 2013; Henriques et al., 2014; Kassé, Fairbrother e Dubuc, 2016; Castillo et al., 2018; Rainey et al., 2018). É encontrada, de forma predominante, como parte da microbiota intestinal da maioria dos seres humanos e animais sendo, porém, responsável por quadros infecciosos que levam a elevados custos sociais e econômicos na medicina humana e animal (Chen et al., 2003; Abdallah, Cao e Wei, 2011; Dale e Woodford, 2015). Devido ao contato próximo entre seres humanos e cães, autores enfatizam ainda que há risco de transmissão interespecie dessa bactéria (Coura et al., 2018). Alguns estudos que buscaram avaliar o risco supracitado, fizeram a caracterização e comparação de estirpes de ExPEC isoladas do trato urinário de seres humanos e também do trato urinário e fezes de cães, relatando uma alta similaridade genética desses isolados (Low, 1988; Johnson et al., 2000; Chen et al., 2003).

3.2.1. Patotipos

Isolados de *E. coli* são comumente divididos em três categorias principais compostas por estirpes comensais, estirpes patogênicas intestinais (ou diarreiogênicas) e estirpes patogênicas extraintestinais (Russo e Johnson, 2000; Clermont et al., 2013). Esses grupos se diferem por diversas características, destacando-se a presença de fatores de virulência específicos que levam a classificação em patotipos (Johnson e Steel, 2000; Abdallah, Cao e Wei, 2011; Müştak et al., 2015; Coura et al., 2018). As estirpes de *E. coli* causadoras de doenças intestinais são classificadas em vários patotipos, a saber: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), produtora de toxina shiga (STEC), necrotoxigênica (NTEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e difusamente aderida (DAEC) (Nataro e Kaper, 1998; Russo e Johnson, 2000; Siqueira et al., 2009). Já as estirpes ExPEC são responsáveis por quadros em sítios diversos, tais como meningite neonatal, prostatite, pielonefrite, cistite e piometra canina (Johnson e Steel, 2000; Russo e Johnson, 2000; Abdallah, Cao e Wei, 2011; Dale e Woodford, 2015).

Mesmo não causando doenças entéricas, é sabido que estirpes de ExPEC podem colonizar o trato intestinal (Russo e Johnson, 2000; Dale e Woodford, 2015) e, a partir dele,

ascender ao trato geniturinário causando o quadro de infecção uterina em cadelas (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Agostinho et al., 2014; Dale e Woodford, 2015; Müştak et al., 2015; Hagman, 2018).

3.2.2. Fatores de virulência em estirpes de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC)

Estirpes do patotipo ExPEC possuem genes de virulência específicos que parecem estar envolvidos na capacidade de infecção em sítios diversos de hospedeiros saudáveis (Johnson e Steel, 2000; Siqueira et al., 2009; Henriques et al., 2014). Tais isolados são filogeneticamente e epidemiologicamente distintos das estirpes comumente encontradas como comensais do intestino ou aquelas causadoras de diarreias e outros distúrbios gastrointestinais (Chen et al., 2003; Abdallah, Cao e Wei, 2011; Coura et al., 2018). Estudos com isolados de *E. coli* oriundos de piometra canina demonstram a presença de diferentes genes que codificam diversas adesinas, toxinas, fatores associados à aquisição de ferro e fatores que determinam mecanismos de fuga do sistema imune do hospedeiro (Siqueira et al., 2009; Abdallah, Cao e Wei, 2011; Mateus et al., 2013; Maluta et al., 2014). Alguns autores defendem, inclusive, que o carregamento de certa combinação de genes de virulência possa ser determinante para a severidade da piometra em cadelas (Henriques et al., 2014).

Diversos fatores de virulência já foram descritos em estirpes de *E. coli* do patotipo ExPEC isoladas de vários sítios. Em estirpes oriundas de casos de piometra canina, alguns fatores de virulência destacam-se por uma frequência estatisticamente maior do que em isolados da microbiota intestinal de cães saudáveis tais como, as adesinas fímbria tipo 1 (*fimH*), região central da fímbria tipo 1 (*focG*), fímbria tipo P (*papC* e *papG*) e fímbria tipo S (*sfaS*), toxinas α -hemolisina (*hlyA*), fator necrosante citotóxico tipo 1 (*cnf-1*) e proteína uropatogênica específica (*usp*), sistemas de aquisição de ferro como o sideróforo aerobactina (*iutA*), e também protectinas como o gene de sobrevivência ao soro (*traT*) (Johnson e Steel, 2000; Siqueira et al., 2009; Mateus et al., 2013).

As adesinas são consideradas um dos mais importantes fatores de virulência desse patotipo e exercem um papel fundamental na ocorrência da infecção (Johnson e Steel, 2000; Siqueira et al., 2009; Katouli, 2010; Agostinho et al., 2014; Henriques et al., 2014). De fato, estudos *in vitro* demonstraram que estirpes de *E. coli* oriundas de casos de piometra canina aderem com alta afinidade ao epitélio do trato urinário e reprodutivo (Chen et al., 2003).

Acredita-se que os principais mediadores da adesão nesses casos são a fímbria tipo 1, fímbria tipo P e fímbria tipo S que também poderiam auxiliar na invasão celular e promoção da inflamação (Johnson e Steel, 2000; Chen et al., 2003; Krekeler et al., 2012; Dale e Woodford, 2015).

Além de adesinas, as estirpes de ExPEC isoladas de conteúdo uterino de cadelas com piometra apresentam alta prevalência de genes que codificam algumas toxinas tais como α -hemolisina, fator necrosante citotóxico tipo 1 e proteína uropatogênica específica (Siqueira et al., 2009; Henriques et al., 2014). Essas aumentam a patogenicidade da estirpe causando dano tecidual, aumento da inflamação uterina e destruição de células do sistema imune (Johnson e Steel, 2000; Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Katouli, 2010; Henriques et al., 2014; Dale e Woodford, 2015). Nesse contexto, a α -hemolisina destaca-se por, ao mesmo tempo, comprometer o epitélio uterino e reduzir a secreção de algumas quimiocinas importantes para o estabelecimento da resposta imune (Henriques et al., 2016).

Mecanismos para aquisição de ferro, como o sideróforo aerobactina, são importantes para instauração e manutenção de infecção em órgãos onde a presença desse metal, essencial para a replicação bacteriana, é limitada (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Henriques et al., 2014; Dale e Woodford, 2015). Já as protectinas podem aumentar a virulência da bactéria promovendo a invasão de células endoteliais e evitando o sistema imune do hospedeiro através da modificação de proteínas de superfície, possibilitando assim, a disseminação em diversos órgãos (Kanukollu et al., 1985; Johnson e Steel, 2000).

Em suma, existem diferentes combinações possíveis dos genes de virulência e, por meio de sua determinação, é possível prever se a estirpe é virulenta ou não, aumentando a especificidade do diagnóstico e permitindo estudos relacionados à epidemiologia e patogênese das infecções por *E. coli* (Nataro e Kaper, 1998; Dale e Woodford, 2015).

3.2.3. Filogrupos

Em adição a pesquisa de fatores de virulência e classificação em patotipos, as relações filogenéticas entre estirpes de *E. coli* também tem sido muito utilizada para estudar os padrões de colonização e a epidemiologia das infecções por *E. coli* (Müştak et al., 2015). Diversas metodologias podem ser utilizadas para estudar tais relações de estirpes, sendo que a tipificação de sequências multilocus (MLST) e o sequenciamento completo do genoma (WGS) as técnicas

de alta resolução mais empregadas (Clermont, Gordon e Denamur, 2015). Mais recentemente, uma técnica baseada em reações em cadeia da polimerase (PCR) tem sido muito utilizada pela facilidade de execução, rapidez, baixo custo e boa correspondência com a técnica de MLST (Clermont et al., 2013; Dale e Woodford, 2015). Esta metodologia permite classificar as estirpes de *E. coli* em diferentes filogrupos (A, B1, B2, C, D, E e F) que diferem entre si quanto a características fenotípicas e bioquímicas, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, tamanho do genoma, fonte de isolamento, e frequência e variedade de genes de virulência, guardando, portanto, certa correspondência também com a classificação em patotipos (Figura 1) (Clermont et al., 2013; Müştak et al., 2015).

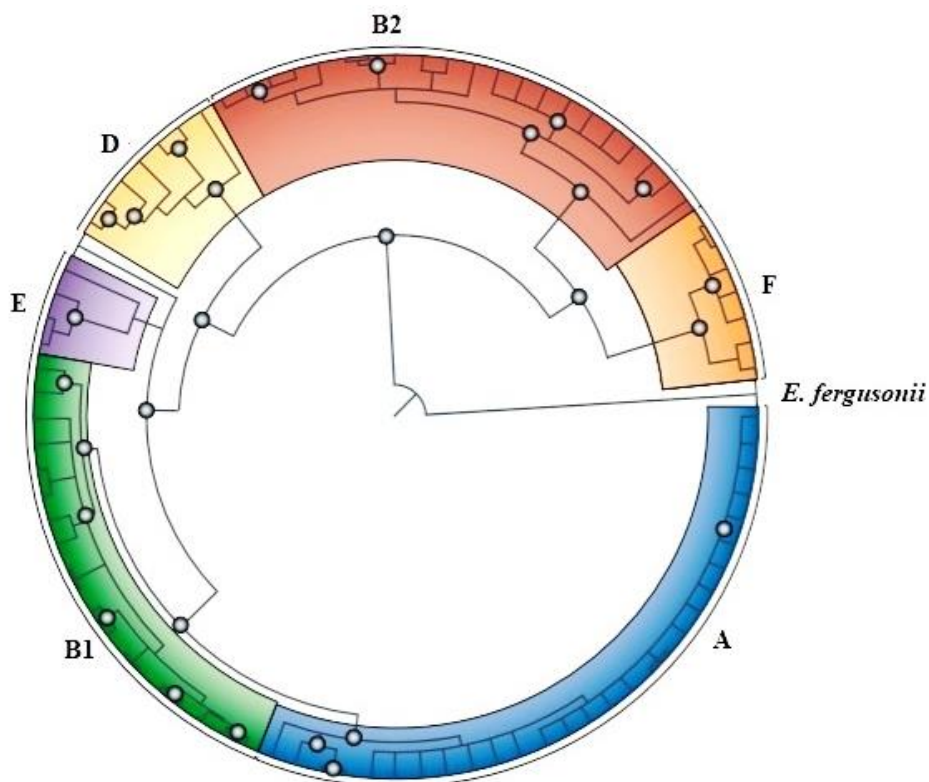


Figura 1: Relação entre os filogrupos identificados por MLST em estirpes de *E. coli* da coleção de referência em comparação com *E. fergusonii*.

*adaptado de Tenaillon et al. (2010).

Os casos de infecções extraintestinais por *E. coli* comumente são causados por isolados dos filogrupos B2, D, E e F (Schmidt et al., 2015). No caso específico de piometra em cadelas,

os filogrupos B2 e D parecem ser os mais frequentes, correspondendo entre 46 a 93% e 0 a 10% dos isolados, respectivamente (Mateus et al., 2013; Liu et al., 2017). Por outro lado, estirpes comensais de *E. coli* em cães são, em sua maioria, classificadas nos grupos filogenéticos B1 e A (Mateus et al., 2013; Müştak et al., 2015; Liu et al., 2017; Coura et al., 2018).

3.3. ExPEC e a microbiota intestinal

O trato intestinal de cães é colonizado por *E. coli* logo após o nascimento e ao longo de sua vida, sendo considerado um possível reservatório tanto de estirpes de *E. coli* que causam infecções entéricas quanto extraintestinais (Siqueira et al., 2009; Coura et al., 2018). Devido a essa observação, acredita-se que tais bactérias envolvidas na piometra canina conseguem ascender do trato intestinal causando a infecção uterina, mas a patogênese da doença é pouco compreendida (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Mateus et al., 2013; Agostinho et al., 2014; Müştak et al., 2015).

Alguns autores hipotetizam que, mesmo se em baixa concentração na microbiota entérica, estirpes ExPEC seriam capazes de colonizar outros sítios do hospedeiro graças a presença de fatores de virulência específicos que garantem vantagem seletiva (Katouli, 2010; Bahadori et al, 2019). Há, porém, outra linha de pensamento que defende que estirpes que causam uma infecção são predominantes quantitativamente na microbiota intestinal, possivelmente até menos patogênicas, mas que poderiam superar as defesas imunológicas do hospedeiro, colonizar outros órgãos e causar a infecção (Johnson et al., 2003; Katouli, 2010; Bahadori et al, 2019).

Até o momento, grande parte dos estudos sobre *E. coli* em casos de piometra focaram exclusivamente na comparação dos isolados do conteúdo uterino de cadelas acometidas com estirpes isoladas da microbiota intestinal de cães saudáveis (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Mateus et al., 2013; Agostinho et al., 2014). Estes estudos demonstraram que, quando comparadas a isolados de fezes de cães saudáveis, as estirpes de *E. coli* isoladas do conteúdo uterino de cadelas com piometra pertencem com maior frequência ao filogrupo B2 e possuem, também com maior frequência, genes de virulência associados a ExPEC tais como codificadores da fímbria tipo I e tipo P, α -hemolisina, fator necrosante citotóxico tipo 1 e proteína uropatogênica específica. Esses achados sugerem que alguns desses fatores de virulência, senão todos, podem desempenhar um papel importante na patogênese da doença. Em adição, os

autores demonstraram que cães saudáveis apresentam sua microbiota intestinal, mesmo que eventualmente, estirpes com essas características, sendo, portanto, considerados possíveis reservatórios de ExPEC para animais e seres humanos (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Mateus et al., 2013; Agostinho et al., 2014).

Apesar de estudos prévios avaliando as características de *E. coli*, os principais mecanismos associados à ocorrência de piometra canina por esse agente e sua relação com a microbiota intestinal do próprio animal ainda não são bem estabelecidos. De fato, de acordo com nosso conhecimento, inexistem trabalhos avaliando se uma colonização intestinal por ExPEC aumenta o risco de ocorrência especificamente de piometra canina. Se confirmada tal hipótese, estudos avaliando quais fatores influenciam no estabelecimento de uma microbiota intestinal com esse patotipo poderão auxiliar na prevenção da ocorrência dessa infecção em cães.

Portanto, estirpes de *E. coli* isoladas do conteúdo uterino de cadelas com piometra são comumente do patotipo ExPEC e do grupo filogenético B2. Apesar de não causar doenças intestinais, as estirpes ExPEC são encontradas eventualmente colonizando o trato intestinal canino, tornando o animal um reservatório desse patógeno. Acredita-se que a colonização intestinal por *E. coli* ExPEC seria um fator de risco para a ocorrência de piometra por esse agente, porém até o momento essa associação não foi confirmada e não são conhecidos os fatores determinantes que favoreceriam a colonização por esse patotipo específico. Deve-se salientar ainda que essa colonização pode ter significado também para a saúde pública já que estirpes de ExPEC de seres humanos e animais apresentam marcante similaridade.

4. Material e métodos

4.1. Amostragem

Uma amostragem não probabilística por conveniência foi realizada entre março de 2018 e março de 2019. Um total de 55 cadelas diagnosticadas com piometra e submetidas a cirurgia OH no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram incluídas no estudo. Imediatamente após a cirurgia, foi realizada a punção aspirativa do conteúdo uterino e, em seguida, um suabe foi introduzido na ampola retal das cadelas amostradas (Johnson et al., 2003). No total, 110 espécimes clínicos foram mantidos resfriados a 4°C até o processamento no Laboratório de Bacteriose e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG.

Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG, protocolo n° 51/2015.

4.2. Isolamento bacteriano

O plaqueamento do conteúdo uterino (aproximadamente 10µL) e suabe retal foram realizados em ágar Mueller Hinton (Kasvi, Itália) suplementado com sangue equino (5%) e em ágar MacConkey (Kasvi, Itália) e incubados a 37°C durante 24hr em aerobiose e anaerobiose. Para cada espécime clínico, até três unidades formadoras de colônias (UFC) sugestivas de *E. coli* (fermentadoras de lactose) foram subcultivadas em ágar Infusão Cérebro-Coração (BHI, Kasvi, Itália) e posteriormente armazenadas a -20°C em caldo BHI (Kasvi, Itália) acrescido de glicerina (15%) a -20°C (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009). Isolados bacterianos não sugestivos de *E. coli* foram avaliados com equipamento de espectrometria de massas (MALDI-ToF, Bruker Daltonics, Alemanha) para determinação da espécie (Sauget et al., 2014).

4.3. Extração de DNA e identificação da espécie

A extração de DNA das estirpes foi realizada pelo método da guanidina (Pitcher, Saunders e Owen, 1989). A verificação da qualidade foi realizada por espectrofotometria (Sambrook et al., 1989) e padronizou-se a concentração a 50ng/µL. Para confirmação da identidade das estirpes de *E. coli*, foi realizada PCR com amplificação do gene espécie-específico *gadA/B* (McDaniels et al., 1996).

4.4. Determinação dos filogrupos dos isolados de *E. coli*

Os isolados de *E. coli* tiveram seus grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E e F) determinados por PCR de acordo com a amplificação ou não de genes alvo (*arpA*, *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TspE4.C2) (Clermont et al., 2013).

4.5. Detecção dos fatores de virulência dos isolados de *E. coli*

Foram pesquisados dez genes codificadores de fatores de virulência típicos de ExPEC, a saber: fímbria tipo I (*fimH*), região central de fímbria tipo I (*focG*), fímbria tipo P (*papC* e *papG*

alelo II e III), fímbria tipo S (*sfaS*), α -hemolisina (*hlyA*), fator necrosante citotóxico tipo 1 (*cnf-1*), proteína uropatogênica específica (*usp*), aerobactina (*iutA*) e sobrevivência sérica (*traT*) (Johnson e Steel, 2000; Siqueira et al., 2009). As reações de PCR do presente estudo foram realizadas com tampão 1X (Green GoTaq Flexi Buffer, Promega, USA), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP e 2U de taq DNA polimerase (GoTaq, Promega, USA). Os genes de virulência pesquisados, concentração e desenho de cada iniciador, tamanho dos produtos e referências bibliográficas estão descritos no quadro 4.

Quadro 4: Genes de virulência pesquisados, concentração ([]) e desenho de cada iniciador, tamanho dos produtos (pb) e referências bibliográficas.

Gene	Iniciador	Sequência de oligonucleotídeos 5'-3'	[]	pb	Referência
<u>PCR espécie-específica</u>					
<i>gadA/B</i>	gadA/B F	CCAAAAGCCAGACAGAGT	0,6 μ M	623	McDaniels et al. (1996).
	gadA/B R	GCACAGCACATCCCCAAAGAG			
<u>PCR para determinação do filogruppo</u>					
<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	1,0 μ M	400	
	ArpA1.r	TCTCCCCATAACCGTACGCTA			
<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	1,0 μ M	288	
	chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>yjaA</i>	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	1,0 μ M	211	Clermont et al. (2013).
	yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG			
TspE4.C2	TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	2,0 μ M	152	
	TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			
<u>PCR para identificação dos fatores e virulência</u>					
<i>fimH</i>	FimH f	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	1,0 μ M	508	

	FimH r	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA			
<i>traT</i>	traT f	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	1,0 μ M	290	Johnson e Steel (2000).
	traT r	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG			
<i>iutA</i>	AerJ f	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	1,0 μ M	300	
	AerJ r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
<i>hlyA</i>	hly1	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1,0 μ M	1177	
	hly2	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA			
<i>papC</i>	PapC f	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	0,5 μ M	200	
	PapC r	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA			
<i>focG</i>	focG f	CAGCACAGGCAGTGGATACGA	1,0 μ M	360	
	focG r	GAATGTGCGCTGCCCATGCT			
<i>papG</i> (II e III)	pG f	CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG	1,0 μ M	1170	
	pG r	ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT			
<i>sfaS</i>	SfaS f	GTGGATACGACGATTACTGTG	0,5 μ M	240	
	SfaS r	CCGCCAGCATTCCCTGTATTC			
<i>cnf-1</i>	cnf1	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	1,0 μ M	498	
	cnf2	TGGAGTTTCCTATGCAGGAG			
<i>usp</i>	uspF	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT	1,0 μ M	1000	Siqueira et al. (2009).
	uspR	CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT			

Após reação de amplificação em termociclador (Life Technologies, EUA), os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) com tampão Tris-borato-EDTA (1X) corado com brometo de etídio (Sigma-Aldrich, EUA) a 1 μ g/ μ L e visualizados com auxílio de equipamento de transiluminação UV (Loccus Biotecnologia, Brasil).

4.6. Análise estatística

Os resultados foram analisados no programa Stata/SE 12.0 (STATA, 2011). Para a análise da associação entre filogrupos, fatores de virulência de *E. coli* e as variáveis categóricas

relacionadas às origens das amostras (conteúdo uterino e fezes de animais positivos e negativos para *E. coli* no conteúdo uterino), foi realizado o teste de qui-quadrado e/ou exato de Fisher. Variáveis com resultados de $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas às características analisadas (Thrusfield e Christley, 2018).

5. Resultados

Estirpes de *E. coli* foram isoladas das fezes de 45 (81,8%) das 55 cadelas amostradas no presente estudo. Trinta animais (54,5%) foram positivos para *E. coli* no conteúdo uterino, 30,6% apresentaram outro patógeno e em 14,5% nenhum microrganismo foi isolado do conteúdo uterino (Figura 2).

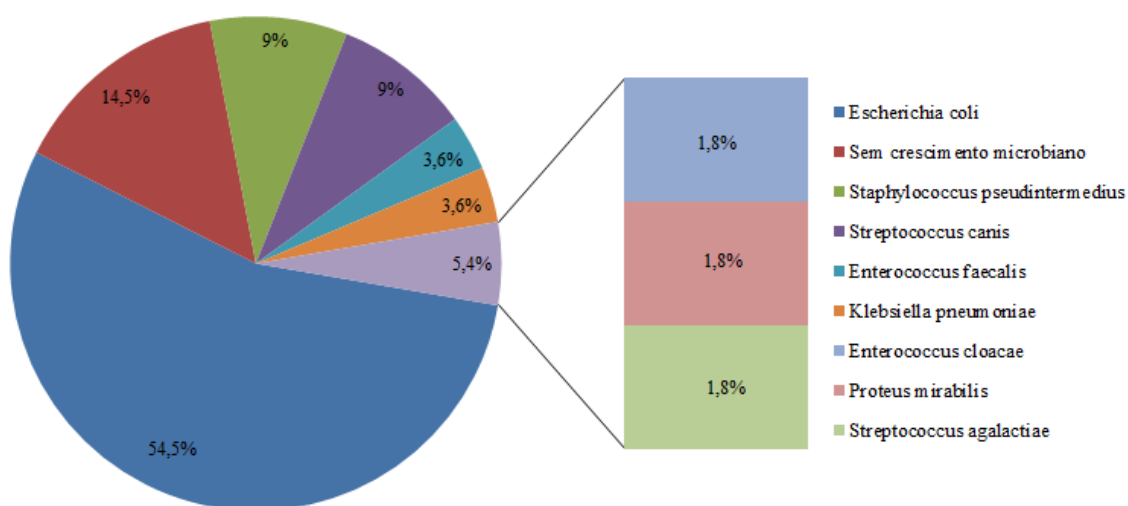


Figura 2: Frequência das espécies bacterianas isoladas do conteúdo uterino de cadelas com piometra.

Considerando que foram coletadas até três UFC por espécime clínico, obteve-se um total de 225 isolados de *E. coli*, sendo 90 (40%) de conteúdo uterino e 135 (59,9%) das fezes. Entre as estirpes de isoladas das fezes, 75 (33,3%) foram obtidas do suabe retal de cadelas positivas para *E. coli* no conteúdo uterino e 60 (26,6%) foram obtidas do suabe retal de cadelas negativas para *E. coli* no conteúdo uterino (positivas para outros microrganismos ou sem crescimento microbiano).

Os filogrupos de *E. coli* mais encontrados nas amostras clínicas (fezes e conteúdo uterino) foram B1 (17,7%) e B2 (64,4%), correspondendo a um total de 82,1% do total de isolados analisados (Tabela 1). Seis (2,6%) estirpes não foram classificadas de acordo com a metodologia proposta por Clermont et al. (2013), todas isoladas da mesma cadela. Dos sete grupos filogenéticos de *E. coli*, apenas o filogrupo D não foi identificado no presente estudo. Deve-se destacar que estirpes B2 predominaram entre os isolados oriundos do conteúdo uterino. Em adição, cadelas que apresentaram piometra por *E. coli* foram mais propensas a apresentar o filogrupo B2 nas fezes, enquanto aquelas que apresentaram piometra por outros agentes bacterianos possuíam uma maior frequência isolados do filogrupo B1 e F em suas fezes (Figura 3).

Tabela 1: Número de isolados e frequência (%) de filogrupos de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra.

Filogrupo	Conteúdo uterino	Suabe retal		Total
		Cadelas com piometra por <i>Escherichia coli</i>	Cadelas com piometra por outro patógeno	
A	0	2 (2,6%)	5 (8,3%)	7 (3,1%)
B1	0	16 (21,3%)*	24 (40,0%)*	40 (17,7%)
B2	81 (90,0%)	46 (61,3%)*	18 (30,0%)*	145 (64,4%)
C	0	1 (1,3%)	0	1 (0,4%)
D	0	0	0	0
E	6 (6,6%)	7 (9,3%)	6 (10,0%)	19 (8,4%)
F	0	0	7 (11,6%)*	7 (3,1%)
Não classificado	3 (3,3%)	3 (4,0%)	0	6 (2,6%)
Total	90	75	60	225

* Valores em destaque indicam diferenças estatísticas ao teste exato de Fisher ($p < 0,05$) ao comparar as amostras de fezes obtidas do suabe retal.

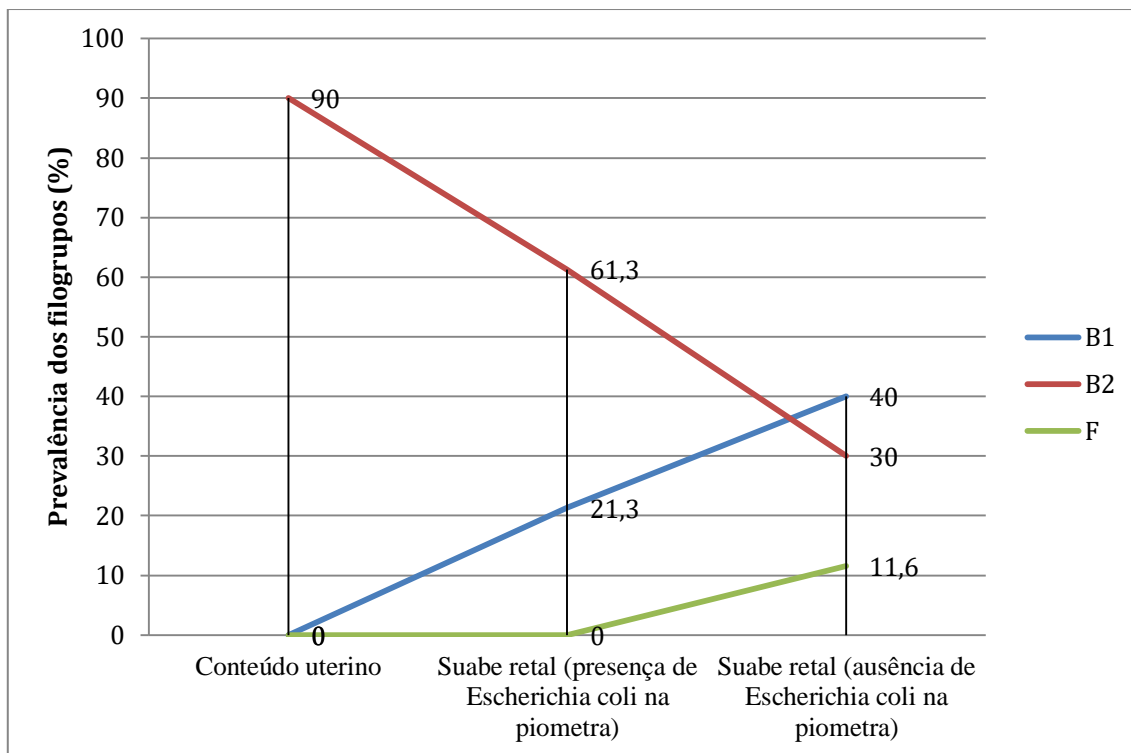


Figura 3: Frequência dos filogrupos B1, B2 e F de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra por *E. coli* ou por outros agentes.

Todos os genes de virulência pesquisados foram encontrados no presente estudo (Tabela 2). Os genes *papC*, *hlyA*, *papG*, *cnf-1*, *usp* e *sfaS* foram mais frequentemente detectados em estirpes obtidas de conteúdo uterino em comparação com amostras de suabe fecal (Figura 5). Especificamente os genes de virulência *papC*, *papG* e *usp* foram mais frequentes nas fezes das cadelas com infecção uterina por *E. coli* que nos isolados dessa bactéria obtidos de cadelas com piometra por outros patógenos (Figura 4).

Tabela 2: Número de isolados e frequência (%) de fatores de virulência de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra.

Fatores de virulência	Conteúdo uterino	Suabe retal		Total
		Cadelas com piometra por <i>Escherichia coli</i>	Cadelas com piometra por outro patógeno	
<u>Adesinas</u>				
<i>fimH</i>	90 (100%)	75 (100%)	60 (100%)	225 (100%)
<i>focG</i>	44 (48,8%)	35 (46,6%)	18 (30%)	97 (43,1%)
<i>papC</i>	44 (48,8%)	27 (36%)*	10 (16,6%)	81 (36%)
<i>papG</i>	40 (44,4%)	21 (28%)*	7 (11,6%)	68 (30,2%)
<i>sfaS</i>	12 (13,3%)	5 (6,6%)	1 (1,6%)	18 (8%)
<u>Toxinas</u>				
<i>cnf-1</i>	33 (36,6%)	17 (22,6%)	9 (15%)	59 (26,2%)
<i>hlyA</i>	43 (47,7%)	23 (30,6%)	10 (16,6%)	76 (33,7%)
<i>usp</i>	24 (26,6%)	12 (16%)*	0	36 (16%)
<u>Sistema de aquisição de ferro</u>				
<i>iutA</i>	21 (23,3%)	23 (30,6%)	15 (25%)	59 (26,2%)
<u>Protectinas</u>				
<i>traT</i>	58 (64,4%)	44 (58,6%)	42 (70%)	144 (64%)
Total	90	75	60	225

* Valores em destaque indicam diferenças estatísticas ao teste exato de Fisher ($p < 0,05$) ao comparar as amostras de fezes obtidas do suabe retal.

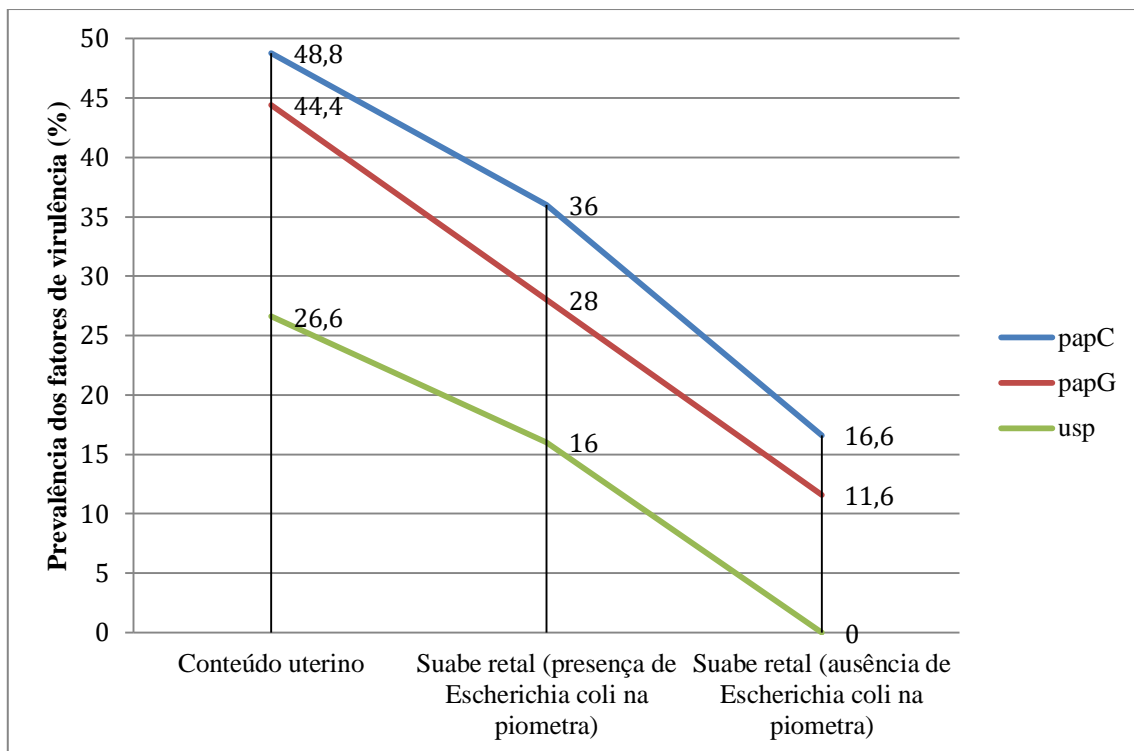


Figura 4: Frequência de detecção dos genes de virulência *papC*, *papG* e *usp* em isolados de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra por *E. coli* ou por outros agentes.

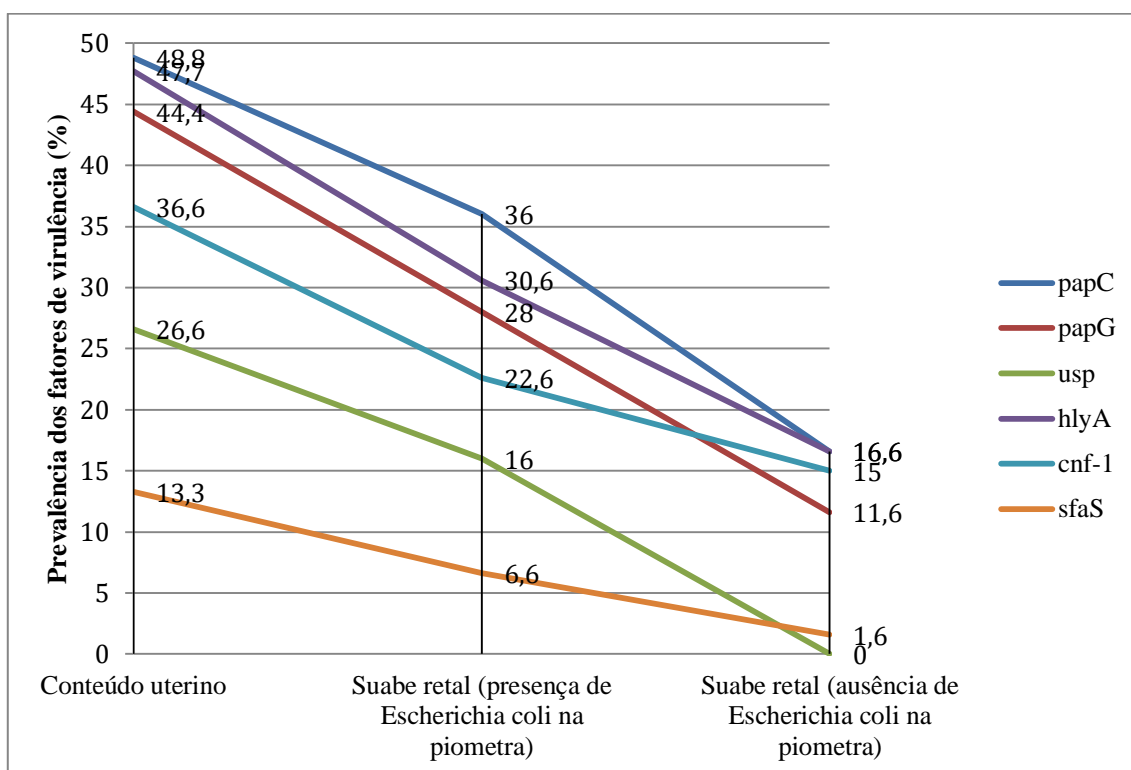


Figura 5: Frequência de detecção dos genes de virulência *papC*, *hlyA*, *papG*, *cnf-1*, *usp* e *sfaS* em isolados de *E. coli* identificados no conteúdo uterino e fezes de cadelas com piometra por *E. coli* ou por outros agentes.

6. Discussão

A diferenciação em grupos filogenéticos e a pesquisa de fatores de virulência têm sido amplamente utilizadas em estudos com *E. coli*, ajudando a elucidar a epidemiologia das infecções e mesmo a dinâmica de colonização dessa bactéria (Clermont et al., 2013; Müştak et al., 2015). Estudos prévios demonstram que estirpes isoladas da microbiota intestinal de cães saudáveis comumente enquadram-se nos grupos filogenéticos B1 e A, enquanto estirpes patogênicas extraintestinais de *E. coli* isoladas de quadros de piometra e cistite canina tendem a agrupar-se principalmente nos filogrupos B2 e D (Mateus et al., 2013; Müştak et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Liu et al., 2017; Coura et al., 2018). De fato, no presente estudo, o filogrupo B2 foi o mais frequente no conteúdo uterino de cadelas com casos clínicos de piometra (Figura 3), correspondendo a 90% dos isolados. Essa frequência é similar a encontrada

em trabalhos anteriores com piometra canina (Mateus et al., 2013; Henriques et al., 2014; Müştak et al., 2015) e sugere uma alta capacidade de estirpes do filogrupo B2 de colonizar o útero de cadelas. Esses resultados corroboram ainda trabalhos com estirpes de *E. coli* isoladas casos de cistite e infecção de feridas em seres humanos, o que reforça ainda o risco de cães agirem como possíveis reservatórios com possível impacto na saúde pública (Johnson et al., 2001-b; Crémet et al., 2012; Mateus et al., 2013; Henriques et al., 2013; Osugui et al., 2014). Por outro lado, estirpes de *E. coli* isoladas de bovinos com metrite tendem a se agrupar nos filogrupos A e B1, além de apresentarem uma menor frequência de fatores de virulência em comparação com isolados de infecção uterina em cadelas, o que, de acordo com os autores, explicaria em parte as diferenças na gravidade da infecção uterina nessas duas espécies domésticas (Henriques et al., 2014).

Apesar da patogênese da piometra ser pouco esclarecida, estudos sugerem que o intestino é a fonte principal de estirpes de *E. coli* para o útero (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Mateus et al., 2013; Agostinho et al., 2014; Hagman, 2018). O presente trabalho reforça essa hipótese já que cadelas com piometra por *E. coli* foram mais propensas a apresentar isolados do filogrupo B2 nas fezes, enquanto em cadelas que não apresentaram piometra por *E. coli* há uma tendência de isolamento dos filogrupos B1 e F (Figura 3), típicos da microbiota intestinal canina (Mateus et al., 2013; Müştak et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Liu et al., 2017; Coura et al., 2018). Considerando que *E. coli* é responsável pela maioria dos casos de piometra (Munson et al., 2002; Chen et al., 2003; McCain et al., 2009; Ikeda, Takahashi e Kurachi, 2013; Henriques et al., 2014; Junginger et al., 2015; Kassé, Fairbrother e Dubuc, 2016; Castillo et al., 2018; Hagman, 2018; Rainey et al., 2018), estudos futuros devem esclarecer se a simples presença de *E. coli* do filogrupo B2 aumentaria o risco de ocorrência de piometra nesses animais. Se confirmada tal hipótese, entender os fatores que alteram a microbiota e favorecem o estabelecimento do filogrupo B2 no intestino podem ser de grande importância para o controle e prevenção de piometra em cães.

Outra característica marcante de estirpes patogênicas extraintestinais, além de seu comum agrupamento no filogrupo B2, é a presença de determinados fatores de virulência que permitem infecções em locais diversos (Müştak et al., 2015). Fatores de virulência que promovem adesão e colonização do agente, sobretudo fímbrias, são considerados de grande relevância para o estabelecimento de infecção por estirpes de *E. coli* no ambiente uterino de cadelas (Siqueira et al., 2009; Krekeler et al., 2013). Estudos demonstram que a simples

inativação de algumas adesinas, como as fímbrias tipo 1 (*fimH*), P (*papC* e *papG*) e S (*sfaS*) resulta em considerável redução da ligação bacteriana a linhagens celulares do endométrio canino, reforçando a importância desses fatores na patogênese da doença (Krekeler et al., 2013).

No presente estudo, os genes de virulência codificadores de fímbria tipo P, α -hemolisina, fator necrosante citotóxico tipo 1, proteína uropatogênica específica e fímbria tipo S foram encontrados com maior frequência em amostras de *E. coli* obtidas a partir do conteúdo uterino em relação aos demais fatores de ExPEC pesquisados (Figura 5), resultado similar encontrado em outros estudos com isolados de cadelas com infecção uterina mas também de seres humanos com infecção no trato urinário (Johnson et al., 2000; Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Ghanbarpour e Akhtardanesh, 2012; Mateus et al., 2013; Agostinho et al., 2014). Esse resultado reforça a hipótese de que alguns fatores de virulência uropatogênicos estão associados na ocorrência de piometra por *E. coli* em cadelas. Interessantemente, estirpes de *E. coli* isoladas das fezes de cadelas com piometra por esse agente foram mais comumente positivas para genes de virulência que codificam fímbrias tipo P e proteína uropatogênica específica quando comparadas a estirpes de *E. coli* isoladas de animais com piometra por outros agentes bacterianos (Figura 4). Esse resultado corrobora os achados na pesquisa de filogrupo e reforça a possível ligação de uma colonização intestinal específica com a ocorrência de piometra por *E. coli* em cadelas.

Especificamente as adesinas fimbriais do tipo P (codificadas pelos genes *papC* e *papG*) são importantes para adesão e colonização de *E. coli* no endométrio, sendo frequentemente encontrados em estirpes que colonizam o trato urogenital de cadelas (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009). A adesina codificada pelo gene *papG* apresenta variantes da molécula, sendo pesquisados neste estudo as de classe II e III, encontradas em quadros de pielonefrite e cistite por *E. coli*, respectivamente, inclusive em quadros de infecção do trato urinário associado a piometra (Siqueira et al., 2009). Neste estudo, os genes *papC* e *papG* foram encontrados em 48,8% e 44,4% dos isolados de conteúdo uterino, respectivamente. Essa frequência é similar ao identificado em outros trabalhos realizados em cadelas com isolados de piometra (Chen et al., 2003; Coggan et al., 2008; Siqueira et al., 2009; Henriques et al., 2014; Maluta et al., 2014). Por outro lado, o gene codificador da adesina fimbrial do tipo S (*sfaS*), também importante fator de adesão ao epitélio urogenital, foi encontrada em 13,3% de isolados obtidos de conteúdo uterino, frequência relativamente menor que outros estudos (Chen et al., 2003; Coggan et al., 2008; Siqueira et al., 2009; Ghanbarpour e Akhtardanesh, 2012).

Adicionalmente às adesinas, acredita-se que outros fatores de virulência são também responsáveis pela patogenicidade de *E. coli* na ocorrência da piometra (Siqueira et al., 2009). Estudos prévios apontam que ExPEC obtidas de conteúdo uterino de cadelas com piometra comumente expressam genes codificadores de toxinas como a α -hemolisina (*hlyA*), fator necrosante citotóxico tipo 1 (*cnf-1*) e proteína uropatogênica específica (*usp*) (Siqueira et al., 2009; Henriques et al., 2014). O gene codificador da toxina fator necrosante citotóxico tipo 1, detectado no conteúdo uterino em frequência similar a outros estudos (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Ghanbarpour e Akhtardanesh, 2012; Mateus et al., 2013; Maluta et al., 2014), é responsável por induzir a reorganização de microfilamentos de actina em células eucarióticas, além de facilitar a invasão bacteriana na corrente sanguínea e causar a apoptose de células epiteliais, como as da bexiga (Siqueira et al., 2009). Similarmente a *hlyA* e *cnf1*, o gene *usp* foi também identificado em elevadas frequências no conteúdo uterino (26,6%) e fezes de cadelas com piometra por *E. coli* (16%) (Figura 5). Essa proteína é comumente detectada em estirpes de ExPEC associadas a piometra em cadelas, com frequência que varia de 17,7 a 69,2%, sendo possivelmente responsável a um aumento da infectividade por atuar como uma bacteriocina (Siqueira et al., 2009; Henriques et al., 2014).

Pesquisas sobre a comparação de filogrupos e fatores de virulência de *E. coli* de diferentes origens aumentaram ao longo dos últimos anos, porém muitas lacunas permanecem obscuras sobretudo para os quadros infecciosos de cães. Estudos prévios relataram estirpes do filogrupo B2 com fatores de virulência típicos de ExPEC em amostras de fezes de cães saudáveis, demonstrando que o trato intestinal pode abrigar, mesmo que em baixa frequência relativa, estirpes potencialmente causadoras de piometra e outras infecções extraintestinais (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Mateus et al., 2013; Agostinho et al., 2014; Coura et al., 2018). Ao mesmo tempo os trabalhos, incluindo o estudo atual, tem demonstrado claramente a importância desses isolados em quadros de piometra canina e de infecções urinárias em seres humanos e cães (Johnson et al., 2000-b).

No presente trabalho demonstramos, pela primeira vez na literatura, que cães com piometra por *E. coli* são mais frequentemente colonizados por estirpes do filogrupo B2 e com fatores de virulência típicos de ExPEC, sugerindo que a colonização por esse agente seria um fator de risco para ocorrência da infecção em cães. Dessa forma, o presente estudo fornece informações epidemiológicas relacionadas aos grupos filogenéticos e fatores de virulência de isolados de *E. coli* oriundos do conteúdo uterino e microbiota intestinal, auxiliando no entendimento da patogênese da piometra por esse agente. Considerando que *E. coli* é responsável pela maioria dos casos de piometra (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Ghanbarpour e Akhtardanesh, 2012; Mateus et al., 2013; Maluta et al., 2014; Hagman, 2018), estudos futuros devem esclarecer se a simples presença de *E. coli* do filogrupo B2 e com fatores de virulência típicos de ExPEC aumentaria o risco de ocorrência de infecção uterina nesses animais. Se confirmada tal hipótese, entender os fatores que alteram a microbiota e favorecem o estabelecimento do filogrupo B2 no intestino podem ser de grande importância para o controle e prevenção de piometra em cães. Deve-se salientar ainda que diversos estudos demonstram a importância de cães como reservatório de ExPEC, patotipo comum em infecções de feridas cirúrgicas, meningite neonatal, bacteremia gram-negativa, pielonefrite e cistite em humanos e animais (Johnson e Stell, 2000; Johnson, Stell e Delavari, 2001; Smith, Fratamico e Gunther, 2007). Dessa forma, entender melhor a dinâmica de colonização e infecção por ExPEC em cães tem potencial também na saúde pública.

7. Conclusão

O presente trabalho demonstrou a elevada frequência de estirpes pertencentes ao filogrupo B2 e carreadoras de fatores de virulência associados a ExPEC em isolados de conteúdo uterino de cadelas com piometra. Em adição, o presente trabalho encontrou uma maior frequência dessas estirpes nas fezes de cadelas com piometra por *E. coli* em comparação a cadelas com piometra por outros microrganismos, sugerindo que a colonização intestinal por tais tipos de *E. coli* poderia configurar um fator de risco para ocorrência de piometra em cães.

8. Referências bibliográficas

ABDALLAH, Kamal Said; CAO, Yang; WEI, Dian-Jun. Epidemiologic Investigation of Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) based on PCR phylogenetic group and *fimH* single nucleotide polymorphisms (SNPs) in China. **International journal of molecular epidemiology and genetics**, v. 2, n. 4, p. 339, 2011.

AGOSTINHO, Juliana et al. *Escherichia coli* strains isolated from the uteri horn, mouth, and rectum of bitches suffering from pyometra: virulence factors, antimicrobial susceptibilities, and clonal relationships among strains. **International journal of microbiology**, v. 2014, 2014.

BAHADORI, Maryam et al. Genetic relatedness of the *Escherichia coli* fecal population and strains causing urinary tract infection in the same host. **Microbiology Open**, p. e759, 2019.

BASSESSAR, Varun; VERMA, Yamini; SWAMY, Madhu. Antibigram of bacterial species isolated from canine pyometra. **Veterinary World**, v. 6, n. 8, p. 546, 2013.

CASTILLO, J. M. et al. Pyometra and unilateral uterine horn torsion in a sheep. **Reproduction in domestic animals**, v. 53, n. 1, p. 274-277, 2018.

CHEN, Yvette MM et al. Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. **Veterinary microbiology**, v. 94, n. 1, p. 57-69, 2003.

COGGAN, Jennifer Anne et al. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 477-483, 2008.

CLERMONT, Olivier et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2013.

CLERMONT, Olivier; GORDON, David; DENAMUR, Erick. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 980-988, 2015.

CONTRI, Alberto et al. Effectiveness of a modified administration protocol for the medical treatment of canine pyometra. **Veterinary research communications**, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2015.

COURA, Fernanda Morcatti et al. Detection of virulence genes and the phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil. **Ciência Rural**, v. 48, n. 2, 2018.

- CRÉMET, Lise et al. Orthopedic-implant infections by *Escherichia coli*: molecular and phenotypic analysis of the causative strains. **Journal of Infection**, v. 64, n. 2, p. 169-175, 2012.
- DĄBROWSKI, Roman; KOSTRO, Krzysztof; SZCZUBIAŁ, Marek. Concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in uterine arterial and peripheral blood in bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 80, n. 5, p. 494-497, 2013.
- DALE, Adam P.; WOODFORD, Neil. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. **Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 615-626, 2015.
- ENGINLER, S. O. et al. Measurement of C-reactive protein and Prostaglandin F₂α Metabolite Concentrations in Differentiation of Canine Pyometra and Cystic Endometrial Hyperplasia/Mucometra. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 4, p. 641-647, 2014.
- FIENI, Francis; TOPIE, Emmanuel; GOGNY, Anne. Medical treatment for pyometra in dogs. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, p. 28-32, 2014.
- GHANBARPOUR, Reza; AKHTARDANESH, Baharak. Genotype and antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* strains involved in canine pyometra. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 5, p. 737-744, 2012.
- HAGMAN, R. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, p. 323-325, 2012.
- HAGMAN, Ragnvi et al. A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1251-1257, 2011.
- HAGMAN, Ragnvi. Pyometra in small animals. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 48, n. 4, p. 639-661, 2018.
- HENRIQUES, Sofia et al. Genotypic and phenotypic comparison of *Escherichia coli* from uterine infections with different outcomes: clinical metritis in the cow and pyometra in the bitch. **Veterinary microbiology**, v. 170, n. 1-2, p. 109-116, 2014.
- HENRIQUES, Sofia et al. Immunomodulation in the canine endometrium by uropathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary research**, v. 47, n. 1, p. 114, 2016.
- IKEDA, Michi; TAKAHASHI, Toshifumi; KURACHI, Hirohisa. Spontaneous perforation of pyometra: a report of seven cases and review of the literature. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 75, n. 4, p. 243-249, 2013.

JITPEAN, Supranee et al. Closed cervix is associated with more severe illness in dogs with pyometra. **BMC veterinary research**, v. 13, n. 1, p. 11, 2016.

JITPEAN, Supranee et al. Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 6, 2014.

JITPEAN, Supranee et al. Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 43-48, 2014.-b

JOHNSON, James R. et al. Evidence of Commonality between Canine and Human Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains That Express *papG* Allele III. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3327, 2000.-b

JOHNSON, James R. et al. Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 1, p. 337-345, 2003.

JOHNSON, James R. et al. Phylogenetic and pathotype similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 6, p. 897-906, 2001.-b

JOHNSON, James R.; STELL, Adam L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 1, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, James R.; STELL, Adam L.; DELAVARI, Parissa. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 69, n. 3, p. 1306-1314, 2001.

JUNGINGER, Johannes et al. Pathology in captive wild felids at German zoological gardens. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130573, 2015.

KANUKOLLU, Usha et al. Contribution of the *traT* gene to serum resistance among clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. **Journal of medical microbiology**, v. 19, n. 1, p. 61-67, 1985.

KASSÉ, F. N.; FAIRBROTHER, J. M.; DUBUC, J. Relationship between *Escherichia coli* virulence factors and postpartum metritis in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4656-4667, 2016.

- KATOULI, Mohammad. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. **Iranian journal of microbiology**, v. 2, n. 2, p. 59, 2010.
- KREKELER, N. et al. The role of Type 1, P and S fimbriae in binding of *Escherichia coli* to the canine endometrium. **Veterinary microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 399-404, 2013.
- KREKELER, N. et al. Uropathogenic virulence factor *FimH* facilitates binding of uteropathogenic *Escherichia coli* to canine endometrium. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 35, n. 5, p. 461-467, 2012.
- LIU, Xiaoqiang et al. Association between virulence profile and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in China. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 04, p. 306-313, 2017.
- LOW, D. A. et al. Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. **Infection and immunity**, v. 56, n. 10, p. 2601-2609, 1988.
- MADDENS, Bert et al. *Escherichia coli* pyometra induces transient glomerular and tubular dysfunction in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 24, n. 6, p. 1263-1270, 2010.
- MALUTA, Renato P. et al. Frequencies of virulence genes and pulse field gel electrophoresis fingerprints in *Escherichia coli* isolates from canine pyometra. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 2, p. 393-395, 2014.
- MATEUS, Luisa et al. Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 590-594, 2013.
- MCCAIN, Stephanie et al. Pyometra in captive large felids: a review of eleven cases. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 1, p. 147-151, 2009.
- MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 9, p. 3350-3354, 1996.
- MELANDRI, Monica et al. Fertility outcome after medically treated pyometra in dogs. **Journal of veterinary science**, v. 20, n. 4, 2019.

- MUNSON, L. et al. Endometrial hyperplasia and mineralization in zoo felids treated with melengestrol acetate contraceptives. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 419-427, 2002.
- MÜŞTAK, Hamit Kaan et al. Phylo-typing of clinical *Escherichia coli* isolates originating from bovine mastitis and canine pyometra and urinary tract infection by means of quadruplex PCR. **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 4, p. 194-199, 2015.
- NATARO, James P.; KAPER, James B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- OSUGUI, L. et al. Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic background of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of dogs and cats in Brazil. **Veterinary microbiology**, v. 171, n. 1-2, p. 242-247, 2014.
- PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in applied microbiology**, v. 8, n. 4, p. 151-156, 1989.
- PRAPAIWAN, N. et al. Expression of oxytocin, progesterone, and estrogen receptors in the reproductive tract of bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 89, p. 131-139, 2017.
- PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 359-363, 2008.
- QIAN, Cunzhong; HOU, Jiafa. *Escherichia coli* virulence influences the roles of sex hormone receptors in female dogs with simulated pyometra. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 4, p. 3013-3021, 2017.
- RAINEY, Blair et al. Laparoscopic-assisted ovariohysterectomy for the treatment of pyometra in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 8, p. 895-898, 2018.
- RAUTELA, Rupali et al. Review on canine pyometra, oxidative stress and current trends in diagnostics. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 8, n. 2, p. 45, 2019.
- ROS, Linnea; HOLST, Bodil Ström; HAGMAN, Ragnvi. A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. **Theriogenology**, v. 82, n. 9, p. 1281-1286, 2014.

- RUSSO, Thomas A.; JOHNSON, James R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.
- SAMBROOK, Joseph et al. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold spring harbor laboratory press**, 1989.
- SAUGET, Marlène et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 977-983, 2014.
- SCHMIDT, Vanessa M. et al. Antimicrobial resistance risk factors and characterization of faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. **Preventive veterinary medicine**, v. 119, n. 1-2, p. 31-40, 2015.
- SIQUEIRA, Amanda K. et al. 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, n. 2, p. 206-210, 2009.
- SMITH, James L.; FRATAMICO, Pina M.; GUNTHER, Nereus W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne pathogens and disease**, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.
- SPERLING, Susan et al. Singleton pregnancy with concurrent pyometra in the contralateral horn in a bitch with a live puppy outcome. **Reproduction in domestic animals**, v. 53, n. 6, p. 1609-1612, 2018.
- STATA, Corporation. Stata statistical software: Release 12. **Special Edition**, v. 201, n. 1, 2011.
- TENAILLON, Olivier et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207, 2010.
- THRUSFIELD, Michael; CHRISTLEY, Robert. **Veterinary epidemiology**. John Wiley & Sons, 2018.
- YOON, Hun-Young et al. Sterile Pyometra in Two Dogs. **Immune network**, v. 17, n. 2, p. 128-131, 2017.