

PRIMEIRO RELATO DE PIOMETRA CANINA POR BACTÉRIAS DA MICROBIOTA ORAL DE CÃES

Isadora Maria Soares de Melo^{1*}, Clara Alcântara Lara de Mesquita¹, Giulia Said Oliveira¹, Isabela Pádua Zanon¹, Rafael Gariglio Clark Xavier² e Rodrigo Otávio Silveira Silva³.

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil – *Contato: isamelo2740@gmail.com

²Discente no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

³Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

INTRODUÇÃO

A piometra é caracterizada por ser uma infecção bacteriana no trato reprodutivo de cadelas, estando presente com frequência na rotina da clínica de pequenos animais^{1,2,3}. Geralmente, acomete fêmeas de meia idade e idosas, sendo que 25% das cadelas são diagnosticadas com piometra antes dos dez anos de idade⁴. Essa enfermidade apresenta manifestações clínicas locais e sistêmicas, sendo sinais comuns: prostração, anorexia, êmese e descargas vulvares purulentas^{1,2,5}. Sabe-se que algumas raças são mais predispostas a serem acometidas com essa patologia, como Boxer, Cocker Spaniel, Collie, Golden Retriever, Labrador, Pinscher, Rottweiler, São Bernardo, Schnauzer e Chow-Chow⁶.

A patogênese da piometra ainda não é totalmente compreendida, porém sabe-se que alterações hormonais de estrogênio e progesterona podem afetar as células epiteliais do útero e facilitar a colonização, aderência e crescimento de bactérias que ascenderiam do trato intestinal do próprio hospedeiro^{1,5}. Ainda, estudos sugerem que a administração de hormônios esteroides, para evitar a reprodução, pode aumentar a predisposição da piometra⁵.

Diversos microrganismos podem ser causadores da piometra, sendo *Escherichia coli* a principal bactéria associada a essa doença^{3,4}. Entretanto, em muitos casos, nenhum microrganismo é isolado, mesmo com sinais clínicos característicos presentes. Há diversas hipóteses que tentam justificar esse fenômeno, como a possibilidade da redução da sensibilidade no isolamento pelo uso de antimicrobianos previamente à coleta do espécime. Além disso, acredita-se que existem microrganismos que se desenvolvem apenas em condições e meios de cultivo específicos, não sendo utilizados comumente na rotina laboratorial². Mesmo recorrente, nenhum estudo tentou elucidar essas hipóteses através de biologia molecular. Uma das técnicas que poderia auxiliar na avaliação dessas hipóteses e no diagnóstico é a extração de DNA diretamente do conteúdo uterino seguida da amplificação e sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S (rRNA) para a identificação da espécie bacteriana associada a esses casos⁷.

Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar a presença de microrganismos em casos de piometra negativos nas técnicas de cultivo convencionais do conteúdo uterino, por meio de técnicas de biologia molecular e, assim, ajudar a elucidar a patogênese dessa doença.

METODOLOGIA

Cadelas diagnosticadas com piometra pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFMG) foram submetidas a cirurgia ovariohisterectomia (OH), sendo este o tratamento de escolha. Posteriormente, foi realizada a punção aspirativa do conteúdo uterino. Os espécimes clínicos permaneceram resfriados a 4 °C até o momento do processamento, que aconteceu em até 24 horas após a coleta. Todos os procedimentos foram aprovados previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o protocolo n° 51/2015.

Os conteúdos uterinos foram plaqueados em ágar Mueller Hinton (Kasvi, Itália) suplementado 5% com sangue equino e ágar MacConkey (Kasvi, Itália). Posteriormente, foram incubados a 37 °C durante 48 horas em aerobiose e anaerobiose. Os isolados bacterianos obtidos foram identificados a partir da espectrometria de massas, sendo aceito o valor de $\log_{\geq 2,3}$ seguindo as recomendações do fabricante (MALDI-ToF MS; Bruker Daltonics, Alemanha)⁸. Sendo as amostras positivas no crescimento bacteriano convencional excluídas do presente estudo.

Objetivando a identificação de microrganismos não cultiváveis nos meios de cultivo usados nas etapas anteriores, os conteúdos uterinos negativos para crescimento bacteriano foram submetidos a extração de DNA pelo método da guanidina com lisozima⁹, o DNA obtido foi submetido a técnica de PCR para amplificação do RNA ribossômico 16S presente em bactérias⁷. Posteriormente, foi realizado o sequenciamento genético das amostras pelo método de Sanger¹⁰. As sequências encontradas foram

submetidas ao BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), sendo comparadas com as sequências depositadas no banco de dados. Resultados de similaridade $\geq 97\%$ foram considerados como a mesma espécie¹¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 55 amostras de conteúdo uterino de cadelas com piometra, as quais foram submetidas a cultura bacteriana. Trinta (55%) animais foram positivos para *E. coli* no conteúdo uterino e doze (31%) apresentaram crescimento de outro patógeno. Oito amostras (14,5%) não apresentaram crescimento microbiano e foram submetidas a extração do DNA e a PCR 16S. Cinco amostras apresentaram amplificação e foram submetidas ao sequenciamento. Em duas amostras foi possível determinar os microrganismos envolvidos, sendo *Porphyromonas salivosa* em um animal e um representante da família Pasteurellaceae em outro cão.

A bactéria *P. salivosa* e representantes da família Pasteurellaceae são microrganismos gram-negativos encontrados na microbiota oral dos cães podendo causar doenças periodontais, apresentando sintomas como mau hálito, inflamações na gengiva, formação de tártaro entre outros problemas^{12,13,14,15}. Esses microrganismos, normalmente, não apresentam bom crescimento nos meios de cultivo comumente utilizados para diagnóstico, necessitando de condições específicas^{12,13,14}. Isso justifica a detecção dessas bactérias apenas pela PCR 16S. O presente trabalho levanta a hipótese da microbiota oral agir como fonte para ocorrência de piometra, similar ao já descrito para infecções renais, cardíacas e hepáticas¹²(Fig. 1).

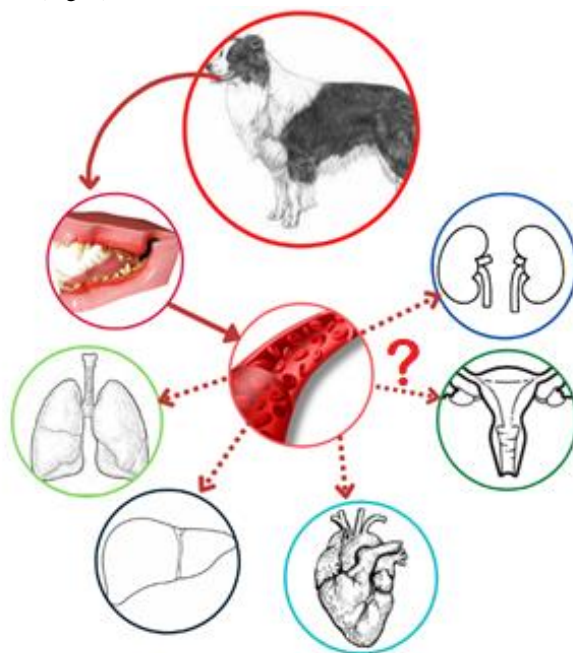
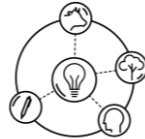


Figura 1: Disseminação sistêmica de bactérias da microbiota oral através da corrente sanguínea para diversos órgãos (Fonte: arquivo pessoal).

Esse foi o primeiro trabalho demonstrando tais espécies bacterianas como causadoras da piometra em cadelas, sugerindo uma nova origem da infecção uterina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo demonstra que a piometra canina pode ser ocasionada por bactérias comumente presentes na microbiota oral de cães, sugerindo uma via adicional na patogênese dessa doença. Desse modo, sugerimos que a



IX Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente

piometra canina pode ser causada por microrganismos da microbiota oral de cães, seja por disseminação através da corrente sanguínea ou até mesmo, pela lambedura comportamental dos cães. É aceito na literatura que a disseminação de bactérias da microbiota oral através da corrente sanguínea ocorre em outras doenças, como endocardite, infecção renal, pulmonar e hepática. Assim, é reforçado a importância da manutenção da saúde oral em cães e dos métodos de diagnóstico molecular, uma vez que a partir dessas técnicas foi possível identificar microrganismos que não apresentaram crescimento microbiano em meios de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FIENI, F.; TOPIE, E.; GOGNY, A. Medical treatment for pyometra in dogs reproduction in domestic animals, v.49, p.28-32, 2014.
2. YOON, H. et al. Sterile pyometra in two dogs. immune network, v.17(2), p.128-131, 2017.
3. QUINN, P.J. et al. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Artmed, 2005.
4. HAGMAN, R. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. reproduction in domestic animals, v.47, p.323-325, 2012.
5. HAGMAN, R. Pyometra in small animals. Veterinary clinics: Small animal practice, v.48(4), p.639-661, 2018.
6. RAUTELA, R. et al. Review on canine pyometra, oxidative stress and current trends in diagnostics. Asian Pacific Journal of Reproduction, v.8(2), p.45, 2019
7. FOX, J.G. et al. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel Helicobacter species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. Journal of clinical microbiology, v. 33(2), p. 445-454, 1995.
8. SAUGET, M. 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(8), p.977-983, 2014.
9. PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters in applied microbiology, v.8(4), p.151-156, 1989.
10. TEWARI, D.; CIEPLY, S.; LIVENGOOD, J. Identification of bacteria recovered from animals using the 16S ribosomal RNA gene with pyrosequencing and Sanger sequencing. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 23(6), p. 1104-1108, 2011.
11. NGUYEN, N. et al. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. NPJ biofilms and microbiomes, v. 2, p. 16004, 2016.
12. HARDHAM, J. et al. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. Veterinary microbiology, v. 106, n. 1-2, p. 119-128, 2005.
13. MÄTTÖ, J. et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. Journal of Clinical Microbiology, v. 36(1), p. 157-160, 1998.
14. HOLCOMBE, L.J. et al. Early canine plaque biofilms: characterization of key bacterial interactions involved in initial colonization of enamel. PLoS One, v. 9 (12), 2014.
15. KOYATA, Y. et al. Purification and characterization of a fimbrial protein from *Porphyromonas salivosa* ATCC 49407. Journal of Veterinary Medical Science, v. 81(6), p. 916-923, 2019.

APOIO:

