

Descobrimos patógenos ocultos na piometra canina: análise metagenômica e de rRNA 16S de amostras uterinas negativas para cultura

Camilla Cardoso Guedes^{1*}, Isadora Maria Soares de Melo¹, Rafael Gariglio Clark Xavier², Clarissa Helena Santana², Yasmin Gonçalves de Castro², Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho³, Tales Fernando da Silva², Vasco Ariston de Carvalho Azevedo⁴, Flávia Figueira Aburjaile⁵, Renato Lima Santos⁵, Rodrigo Otávio Silveira Silva⁵.

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG– Belo Horizonte/MG – Brasil – *Contato: cmllcrds38@gmail.com

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

³Discente do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG– Belo Horizonte/MG – Brasil

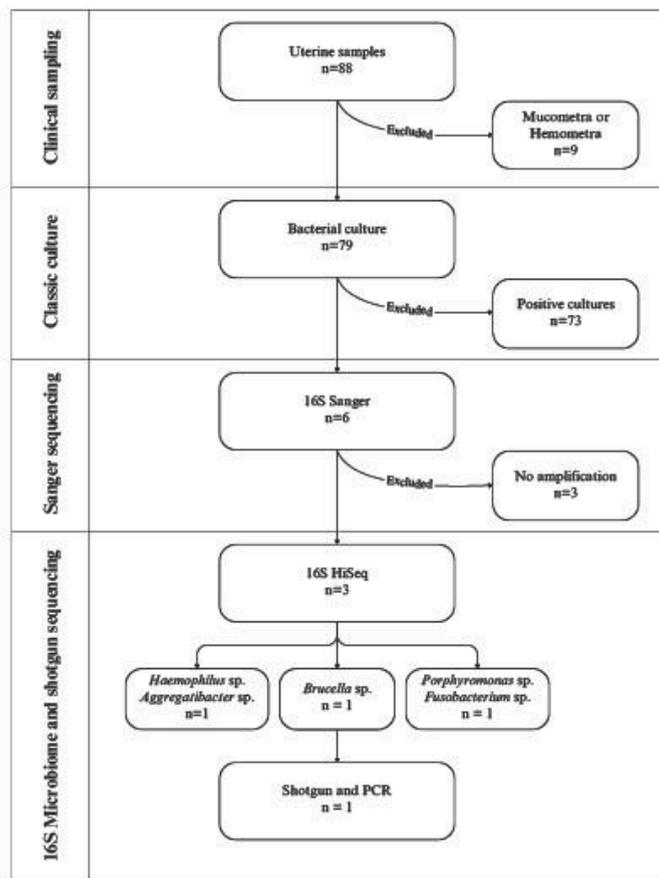
⁴Docente do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG– Belo Horizonte/MG – Brasil

⁵Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil. Contato: rodrigo.otaviosilva@gmail.com

INTRODUÇÃO

A piometra é a doença reprodutiva mais comum em cadelas, afetando cerca de 25% dos animais não castrados¹. Seus sintomas variam de sinais locais, como secreção purulenta vulvar, a manifestações sistêmicas graves, como peritonite, sepse e falência múltipla de órgãos². Apesar de sua relevância clínica, a patogênese ainda não é totalmente compreendida, mas acredita-se que os hormônios facilitem a adesão e o crescimento bacteriano no útero. *Escherichia coli* é responsável por mais de 50% dos casos, embora outros gêneros de microrganismos possam estar envolvidos, como *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*³. Em contrapartida, em até 25% dos casos, nenhum microrganismo foi isolado e identificado usando o método clássico de cultura bacteriana^{4,5}. Várias hipóteses foram propostas para a ausência de crescimento bacteriano, incluindo não crescimento devido ao uso prévio de antimicrobianos e, mais notavelmente, microrganismos não cultiváveis em meios comumente utilizados para diagnóstico. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar o conteúdo uterino de cadelas com piometra que apresentaram resultados negativos em métodos de cultura bacteriana convencionais, usando amplificação do gene 16S rRNA, sequenciamento de próxima geração 16S e metagenômica *shotgun*.

MATERIAL E MÉTODOS



Em seis amostras não foi observado crescimento bacteriano. O DNA dessas seis amostras foi submetido à amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram obtidos amplicons de três amostras de secreção uterina purulenta, e suas sequências foram comparadas com o banco de dados BLAST. Para entender melhor o papel e a distribuição dos gêneros bacterianos nos quais não houveram crescimento, as amostras foram submetidas ao sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA utilizando o MiSeq.

Na amostra P28, *Brucella spp.* foi identificada por sequenciamento 16S rRNA, representando 94% das leituras, o que é inesperado, pois *Brucella spp.* nunca foi relatada como causa de piometra em cães. Para confirmar o achado, foi realizado um ensaio de sequenciamento *shotgun* de PCR visando o gene BCSP31 gênero-específico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

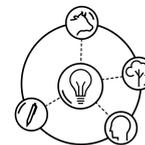
Das amostras testadas, 73 (92,5%) apresentaram crescimento bacteriano, corroborando estudos anteriores^{3,6,7}. A *E. coli* foi a bactéria mais isolada, encontrada em 48 (60,7%) das amostras. Também foram detectadas bactérias dos gêneros *Staphylococcus* (10,1%), *Streptococcus* (8,8%), *Klebsiella* (3,7%) e *Enterococcus* (2,5%), o que é consistente com outros estudos^{3,5}. Em seis amostras (7,5%) não foi observado crescimento bacteriano. Estudos anteriores relataram variação de 5 a 30% em amostras sem crescimento^{4,5, 8-10}.

Na amostra P49, os gêneros *Haemophilus* e *Aggregatibacter* representaram 70% e 23% das leituras, respectivamente. Na amostra P62, os principais foram *Porphyromonas* e *Fusobacterium*, representando cerca de 45% das leituras. Esses resultados, especialmente os táxons *Haemophilus* e *Porphyromonas*, confirmaram os achados anteriores do sequenciamento do gene 16S rRNA. Essas espécies têm crescimento limitado ou nenhum em meios de cultura comumente utilizados para diagnóstico, o que pode levar a subestimar sua importância como causadoras da infecção uterina. Adicionalmente, foi observado que os quatro gêneros mencionados são conhecidos membros da microbiota oral de várias espécies, incluindo cães^{11,12,13}, e estão associados a infecções em múltiplos locais^{12,14,41}. As bactérias orais, como *Porphyromonas spp.*, podem se disseminar pelo sangue e causar infecções urogenitais, sepse e endocardite^{11,14,15}. Pesquisas adicionais são necessárias para investigar se a piometra está relacionada à disseminação bacteriana da cavidade oral, o que pode trazer novas perspectivas sobre os fatores de risco e a patogênese da doença.

Na amostra P28, *Brucella spp.* foi identificada por sequenciamento 16S rRNA, representando 94% das leituras, o que é inesperado, pois *Brucella spp.* nunca foi relatada como causa de piometra em cães. No ensaio de sequenciamento *shotgun* e PCR visando o gene BCSP31 bacteriana^{16,17}, foi gerado a maioria das leituras para *Brucella* e uma banda específica respectivamente, confirmando a presença de *Brucella spp.*, sugerindo que essa bactéria zoonótica causou a piometra na cadela.

A brucelose canina pode se manifestar de forma variada, desde infecções assintomáticas até distúrbios sistêmicos, como aborto, incapacidade de concepção e aumento dos linfonodos^{19,20}. No caso investigado de piometra, não foi possível identificar com precisão a espécie de *Brucella*

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



devido à alta similaridade genética entre elas¹⁸. A falta de coleta de amostras adicionais, devido à dificuldade de contato com o proprietário, impediu um diagnóstico definitivo.

Embora os cães não sejam a principal fonte de transmissão da brucelose humana, eles podem contribuir para a persistência da infecção em uma população. O contato próximo com cães infectados, especialmente através de secreções vulvares em casos de piometra aberta, é um potencial risco de transmissão zoonótica e disseminação para outros animais^{19,20}. O gênero *Brucella* já foi identificado em secreções uterinas de um gato com piometra e de um cão saudável na mesma propriedade no Egito. Este estudo é o primeiro a identificar *Brucella sp.* como causa de piometra em cães no mundo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo revelou a presença de um patógeno zoonótico e outras bactérias que não haviam sido relatadas anteriormente como causadoras de piometra em cães, sugerindo um possível papel dessas bactérias recém identificadas em infecções uterinas caninas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hagman R. **Pyometra in Small Animals**. Vet Clin Small Anim Pract. 2018;48(4):639-661.
2. Jitpean S, Ambrosen A, Emanuelson U, Hagman R. **Closed cervix is associated with more severe illness in dogs with pyometra**. BMC Vet Res. 2017;13(1):11.
3. Xavier RGC, Santana CH, de Castro YG, et al. **Canine Pyometra: A Short Review of Current Advances**. Animals. 2023;13(21):3310.
4. Coggan JA, Melville PA, de Oliveira CM, Faustino M, Moreno AM, Benites NR. **Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra**. Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol. 2008;39(3):477-483.
5. Lansubsakul N, Sirinarumitr K, Sirinarumitr T, et al. **First report on clinical aspects, blood profiles, bacterial isolation, antimicrobial susceptibility, and histopathology in canine pyometra in Thailand**. Vet World. 2022;15(7):1804-1813.
6. Rautela R, Katiyar R. **Review on canine pyometra, oxidative stress and current trends in diagnostics**. Asian Pac J Reprod. 2019;8(2):45.
7. Anjos MS dos, Bittencourt RF, Biscarde CEA, et al. **Canine pyometra: interferences of age and type in blood count and serum biochemistry**. Rev Bras Ciênc Veterinária. Published online 2021:167-173.
8. Dhaliwal GK, Wray C, Noakes DE. **Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra)**. Vet Rec. 1998;143(24):659-661.
9. Maddens B, Daminet S, Smets P, Meyer E. **Escherichia coli Pyometra Induces Transient Glomerular and Tubular Dysfunction in Dogs**. J Vet Intern Med. 2010;24(6):1263-1270.
10. Hamidi A, Sylejmani D, Robaj A. **Occurrence and antimicrobial susceptibility of bacterial agents of canine pyometra**. Indian J Anim Res. 2016;(OF).
11. Holcombe LJ, Patel N, Colyer A, Deusch O, O'Flynn C, Harris S. **Early Canine Plaque Biofilms: Characterization of Key Bacterial Interactions Involved in Initial Colonization of Enamel**. PLOS ONE. 2014;9(12):e113744
12. Karthikeyan R, Yadav A, Agri H, et al. **Microbiological and molecular detection of Canicola (Haemophilus) haemoglobinophilus from the urine of a dog**. INDIAN J Anim Health. Published online November 28, 2022.
13. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. **Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance**. Nat Rev Microbiol. 2010;8(7):471-480.
14. Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, Shokouhi B, Fakhrzadeh V, Kafil HS. **Oral pathogenesis of Aggregatibacter actinomycetemcomitans**. Microb Pathog. 2017;113:303-311.

15. Nagaraja TG, Narayanan SK, Stewart GC, Chengappa MM. **Fusobacterium necrophorum infections in animals: Pathogenesis and pathogenic mechanisms**. Anaerobe. 2005;11(4):239-

16. Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, et al. **The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic Brucella abortus protein**. Gene. 1988;63(1):1-9.

17. Baily G, Drasar B, Stoker N. **Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification**. J Trop Med Hyg. 1992;95:271-275.

18. Corbel MJ. **Brucellosis: an overview**. Emerg Infect Dis. 1997;3(2):213-221.

19. Keid LB, Chiebao DP, Batinga MCA, et al. **Brucella canis infection in dogs from commercial breeding kennels in Brazil**. Transbound Emerg Dis. 2017;64(3):691-697.

20. Wareth G, Melzer F, El-Diasty M, et al. **Isolation of Brucella abortus from a Dog and a Cat Confirms their Biological Role in Re-emergence and Dissemination of Bovine Brucellosis on Dairy Farms**. Transbound Emerg Dis. 2017;64(5):e27-e30.

APOIO:

