

Primeiro relato de piometra canina causada por bactérias da microbiota oral de cães

SANTANA, R. S. T.^{1*}, XAVIER, R.G.C¹, FREITAS, P.M.C.³, SILVA, R.O.S⁴.

1 Ranielle Stephanie Toledo Santana. Graduanda do 9º período de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. E-mail: raniellestefani@gmail.com. Tel.: (31) 9 9239-7264. *Autor Correspondente

2 Rafael Gariglio Clark Xavier. Doutorando em Ciência Animal. Universidade Federal de Minas Gerais. E-mail: rafaelgariglio90@gmail.com. Tel.: (31) 992717992.

3 Patrícia Maria Coletto Freitas. Professora Adjunta. Universidade Federal de Minas Gerais. E-mail: pcoletto@yahoo.com.br Tel.: (31) 996966655.

4 Rodrigo Otávio Silveira Silva. Professor Adjunto. Universidade Federal de Minas Gerais. E-mail: rodrigo.otaviosilva@gmail.com. Tel.: (31) 986336492.

Resumo

Piometra canina é a doença reprodutiva mais frequente na clínica de pequenos animais e caracteriza-se por uma infecção bacteriana no útero com manifestações clínicas locais e sistêmicas, podendo levar ao óbito. Diversos agentes bacterianos estão associados com a ocorrência de piometra em cadelas, porém em até 25% dos casos, nenhum microrganismo é isolado através da cultura microbiológica do conteúdo uterino. Para entender melhor essa questão, o objetivo do presente estudo foi analisar, por meio de técnicas de biologia molecular, a presença de microrganismos em casos de piometra negativos nas técnicas de cultivo básicas. Oito amostras uterinas de cadelas com piometra negativas no cultivo, foram submetidas a extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S para identificação da espécie bacteriana. Dessas, quatro revelaram a presença de DNA bacteriano de dois microrganismos típicos da cavidade oral de cães: *Porphyromonas salivosa* (n=2) e *Pasteurella* sp. (n=2). Sabe-se que tais microrganismos estão envolvidos em doenças periodontais em cães e que sua disseminação hematológica pode levar a quadros em outros órgãos, tais como endocardite, infecção pulmonar, hepática e renal em cães e seres humanos. Este é o primeiro relato da ocorrência de piometra canina causada por bactérias oriundas da microbiota oral de cães e sugere que, similarmente a outras doenças, a piometra pode ocorrer através da disseminação sanguínea de alguns patógenos de origem dentária, ou até mesmo através da lambadura comportamental canina. O presente trabalho reforça a importância da manutenção da saúde dentária e profilaxia oral, podendo configurar um fator de prevenção para a ocorrência de piometra em cães.

Palavras-chave: cavidade oral, útero, patogênese.

Introdução

Piometra é a doença reprodutiva mais frequente em cadelas, acometendo em média 25% das fêmeas não castradas (Hagman, 2018). A doença caracteriza-se por uma infecção bacteriana no útero com manifestações clínicas locais e sistêmicas que variam desde descargas vulvares purulentas a peritonite, sepse e disfunção de vários órgãos, podendo levar ao óbito (Fieni, Topie e Gogny, 2014; Henriques et al., 2014; Jitpean et al., 2014; Müştak et al., 2015). Estudos sugerem alguns fatores que predispõem a ocorrência da piometra, tais como idade superior a sete anos e uso de hormônios esteroides para evitar a reprodução (Hagman et al., 2011; Jitpean et al., 2014). Em adição, algumas raças parecem mais predispostas, tais como Boxer, Cocker Spaniel, Collie, Golden Retriever, Labrador, Pinscher, Rottweiler, São Bernardo, Schnauzer e Chow-Chow (Rautela et al., 2019). Nestas, o acometimento chega a cerca de 50% (Hagman et al., 2012).

Apesar de sua grande relevância clínica, a patogênese da doença ainda é pouco compreendida. Acredita-se que há o envolvimento de fatores hormonais que parecem favorecer a adesão, colonização e o crescimento bacteriano no útero, e que os microrganismos envolvidos ascenderiam do trato intestinal do próprio hospedeiro (Chen et al., 2003; Siqueira et al., 2009; Henriques et al., 2014; Hagman, 2018). Diversos microrganismos podem estar envolvidos nos quadros de piometra, sobretudo microrganismos comensais do trato gastrointestinal (Hagman, 2018). Porém, estudos reportam que em até 25% dos quadros de piometra canina nenhum microrganismo é isolado. Diversas hipóteses possíveis para esse fenômeno têm sido descritas, como a redução da sensibilidade no isolamento pelo uso de antimicrobianos previamente à coleta do espécime e, principalmente, a presença de microrganismos que não crescem normalmente nos meios de cultivo utilizados para diagnóstico (Yoon et al., 2017). Apesar da alta frequência de amostras negativas no cultivo bacteriano, até o momento, nenhum estudo tentou elucidar tais hipóteses. Uma das técnicas que poderia auxiliar no esclarecimento dessa questão é a extração de DNA diretamente do conteúdo uterino seguida da amplificação e sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S (rRNA) para identificação da espécie (Fox et al., 1995). Tal técnica permitiria a identificação bacteriana sem necessidade das etapas de cultivo, elucidando, portanto, quais espécies estão envolvidas nesses quadros.

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, por meio de técnicas de biologia molecular, a presença de microrganismos em casos de piometra negativos nas técnicas de cultivo básicas do conteúdo uterino para ajudar a elucidar a patogênese da doença.

Material e Métodos

Uma amostragem não probabilística por conveniência foi realizada no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Amostras de conteúdo uterino de cadelas com piometra foram obtidas por punção aspirativa logo após cirurgia de ovariectomia. Os espécimes clínicos foram mantidos resfriados a 4°C até o processamento que ocorreu em até 24 horas após a coleta. Todos os procedimentos de coleta de amostras foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o protocolo n° 51/2015.

O plaqueamento dos conteúdos uterinos foi realizado em ágar Mueller Hinton (Kasvi, Itália) suplementado 5% com sangue equino e ágar MacConkey (Kasvi, Itália), posteriormente incubados a 37°C durante 48 horas em aerobiose e anaerobiose. Os isolados

bacterianos obtidos foram identificados com equipamento de espectrometria de massas, sendo aceito o valor de $\log \geq 2,3$ de acordo com as recomendações do fabricante (MALDI-ToF MS; Bruker Daltonics, Alemanha) (Sauget et al., 2014).

Com o objetivo de avaliar possíveis microrganismos não cultiváveis nos meios de cultivo utilizados nas etapas anteriores, os conteúdos uterinos negativos para crescimento bacteriano foram submetidas a extração de DNA pelo método da guanidina com lisozima (Pitcher, Saunders e Owen, 1989) e o DNA molde foi utilizado para amplificação e sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S (Fox et al., 1995). As sequências obtidas foram submetidas ao BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) comparando com as sequências existentes no banco de dados. Resultados de similaridade $\geq 97\%$ foram considerados como a mesma espécie (Nguyen et al., 2016).

Resultados e Discussão

Foram amostradas 55 cadelas com diagnóstico de piometra, onde foram submetidas ao protocolo de isolamento bacteriano. O total de 30 (55%) animais foram positivos para *E. coli* no conteúdo uterino, 12 (31%) apresentaram outro patógeno e 8 (14%) nenhum microrganismo foi isolado.

As amostras negativas foram submetidas a extração do DNA, PCR 16S e posterior sequenciamento genético. Quatro das oito amostras apresentaram amplificação e foram submetidas ao sequenciamento para identificação. As espécies envolvidas de acordo com o padrão determinado (similaridade $\geq 97\%$) foram *Porphyromonas salivosa* (n=2) e *Pasteurella* sp. (n=2).

A bactéria *Porphyromonas salivosa* e aquelas representantes do gênero *Pasteurella* sp. são frequentemente encontradas na microbiota oral de cães e não apresentam bom crescimento nos meios de cultivo comumente utilizadas para diagnóstico de piometra (Mättö et al., 1998; Hardham et al., 2005; Holcombe et al., 2014), o que justificaria a detecção apenas pela PCR 16S. Tais microrganismos são ainda reconhecidos causadores de doença periodontal, podendo ainda, via disseminação pela corrente sanguínea causar quadros graves tais como endocardite, infecção pulmonar, hepática e renal em cães e seres humanos (Hardham et al., 2005). Esse é o primeiro relato destas espécies bacterianas causando piometra em cadelas e sugere uma nova possível origem da contaminação uterina na piometra (Figura 1), contribuindo para o melhor entendimento da patogênese e fatores de riscos associados a doença. O trabalho reforça ainda a necessidade da manutenção da saúde oral em cães ao apontar mais uma possível lesão a distância associada a microrganismos desse sítio.

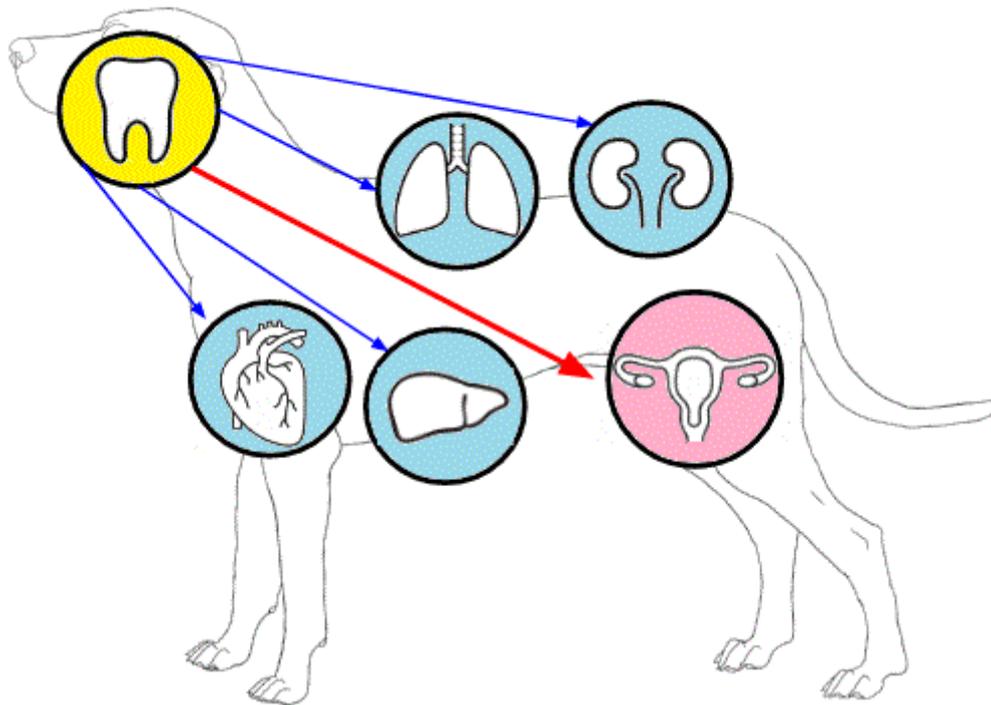


Figura 1: Microrganismos causadores de doença periodontal, via disseminação pela corrente sanguínea, causam infecções graves no coração, pulmões, fígado, rins e possivelmente no útero. Esse achado sugere uma nova provável origem de contaminação em piometra canina.

Conclusão

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez a ocorrência de piometra canina causada por bactérias comumente encontradas na microbiota oral de cães. Sugere-se que similarmente a outras doenças, como endocardite e infecção renal, a piometra possa ocorrer através da disseminação sanguínea de alguns patógenos de origem dentária, ou até mesmo pela lambertura comportamental dos cães.

Referências Bibliográficas

- 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.
- FIENI, Francis; TOPIÉ, Emmanuel; GOGNY, Anne. Medical treatment for pyometra in dogs. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, p. 28-32, 2014.
- 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, n. 2, p. 445-454, 1995.
- 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.
- HARDHAM, John et al. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *Veterinary microbiology*, v. 106, n. 1-2, p. 119-128, 2005.
- 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.
- HOLCOMBE, Lucy J. et al. Early canine plaque biofilms: characterization of key bacterial interactions involved in initial colonization of enamel. *PLoS One*, v. 9, n. 12, 2014.
- 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.
- MÄTTÖ, Jaana et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 1, p. 157-160, 1998.
- 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.
- NGUYEN, Nam-Phuong et al. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ biofilms and microbiomes*, v. 2, p. 16004, 2016.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- YOON, Hun-Young et al. Sterile Pyometra in Two Dogs. *Immune network*, v. 17, n. 2, p. 128-131, 2017.