



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE LESÃO RENAL E DE PERITONITE EM CADELAS COM
PIÓMETRA

ANA PAULA GONÇALVES MARTINS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba
Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus
Doutora Ana Catarina Belejo Móra Torres

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal
Mateus

2019

LISBOA

Financiamento

Este trabalho foi financiado pelo projeto UID/CVT/00276/2013 da Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) e pelo projeto MIMV 4.2017 do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.



FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE LESÃO RENAL E DE PERITONITE EM CADELAS COM
PIÓMETRA

ANA PAULA GONÇALVES MARTINS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Ana Catarina Belejo Móra Torres

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

2019

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, a Professora Doutora Luísa Mateus, por ter aceite esta orientação, pelo apoio prestado na elaboração e desenvolvimento deste trabalho, por todos os conhecimentos transmitidos e por me ter incentivado a conhecer mais do mundo laboratorial na medicina veterinária; por ser um grande exemplo de dedicação, trabalho, rigor e sentido crítico.

À Dra. Marta Silva que me acompanhou, orientou e desafiou numa jornada nova que foi a passagem pela biologia molecular. Pela paciência com que me foi transmitindo não só conhecimento técnicos, mas também a paixão pelo que faz. Obrigada por toda a ajuda e todos os conselhos.

A toda a equipa do Hospital veterinário das Laranjeiras, pela forma como me acolheram, por toda a dedicação, paciência e carinho com que fui recebida, por terem contribuído de forma tão marcante para o meu crescimento pessoal e profissional. Serei sempre orgulhosamente uma pequena laranjinha.

A toda a equipa da Reprodução e Obstetrícia por me terem tranquilizado em tantos momentos de pânico e por me terem motivado em tantos outros.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) pelo apoio financeiro concedido e por ter permitido a utilização das suas instalações e equipamentos para a elaboração deste trabalho.

Ao Laboratório Professor Dr. Braço Forte e sua equipa Dra. Alexandra, Dra. Vera e Dra. Salomé. Um obrigado especial à Dra. Alexandra por toda paciência que teve quando ainda era um principiante no mundo da análise de urina, por me ter recebido desde início com um sorriso e por me ter encaminhado para além de ensinar.

À equipa de Anatomia Patológica, D^a Maria do Rosário Luís e Sandra Carvalho, pelos serviços prestados no processamento do material para análise histopatológica.

Ao Dr. Hugo Piçarra pela disponibilidade e simpatia com que me recebeu e ajudou.

À Carla Carneiro pela enorme amabilidade e ajuda que me deu ao longo deste ano, pelos momentos de incentivo, por todos os conselhos e ensinamentos que talvez mesmo sem se aperceber me foi transmitindo.

A toda a equipa do centro veterinário Anjos de Assis, pela disponibilidade com que me aceitaram ajudar e por terem sido sempre o mais prestáveis que podiam ser.

A toda a equipa de cirurgia do Hospital Escolar, em especial à Dra. Leonor Iglesias e Dr. Rodrigo Bom por toda a ajuda e por se lembrarem da chata das piómetras.

À Inês Machado da Mvet e ao José Diogo da VetOeiras, por me terem mostrado como a generosidade e solidariedade dentro da medicina veterinária faz toda a diferença.

Ao Emanuel e ao Anthony pelo companheirismo ao longo destes 6 anos, por de colegas terem passado a amigos e de amigos a família.

À Catarina por ter sido muito mais do que uma colega de casa, por depositar em mim tanta confiança, por toda a boa disposição e alegria.

À Ana e à Joana pela companhia nas viagens na caça às piómetras, por terem sido o meu GPS nesses dias e em outros de modo não tão literal.

Às minhas colegas estagiárias de reprodução, Raquel e Beatriz, pela companhia nas sessões de trabalho naquela salinha já tão familiar, por terem sido uma fonte de boa energia e motivação.

Aos meus pais pelo apoio e amor incondicional, e por me terem tornado em tudo o que sou hoje. Ao meu pai por ser a minha fonte de tranquilidade, por em cada teste e exame me fazer acreditar em mim. À minha mãe por ser uma perfeccionista e me incentivar a procurar ser cada vez melhor. Estes 6 anos foram uma caminhada minha, mas todas as conquistas foram nossas.

À minha irmã por ser um exemplo em tudo, por me organizar as ideias, por me dar novas ideias e por ser sempre o meu mais doce porto seguro.

Aos meus avós que estariam certamente orgulhosos por me terem tornado numa apaixonada pelos animais. À avó Alice e à avó Carmo, por serem as mais sábias e sensatas amigas que poderia ter. A toda a minha família por terem tido um papel tão importante e presente na concretização deste sonho de me tornar Médica Veterinária.

Por fim, ao meu melhor amigo, companheiro desta e de outras etapas, pela ajuda incansável, pelo carinho, por ser um exemplo de determinação e por me tornar uma pessoa melhor e mais completa todos os dias, ao Levi.

RESUMO

Avaliação da presença de lesão renal e peritonite em cadelas com piómetra

A piómetra é uma doença de diestro comum em cadelas adultas intactas. Esta está associada a uma grande variedade de sinais clínicos e laboratoriais e frequentemente surgem complicações. Entre elas encontram-se a peritonite, a infecção do trato urinário (ITU) e a lesão renal. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a frequência destas complicações e contribuir para a sua deteção precoce. Um total de 28 cadelas com diagnóstico confirmado de piómetra foi incluído neste trabalho. *Escherichia coli* foi a bactéria isolada em 16 dos casos (57,1%), e nos restantes 12 foram isoladas outras bactérias (42,9%). Verificou-se a presença de peritonite em 25%, ITU em 21,4% e alteração da função renal em 46,4%. A presença de peritonite foi associada a valores normais de leucócitos totais e ao aumento do período de hospitalização pós-cirúrgico. A utilização de SDMA como marcador de lesão renal precoce demonstrou ser extremamente útil em cadelas com piómetra. Sendo *E. coli* o agente mais frequentemente isolado em cadelas com piómetra, um outro objetivo passou por caracterizar a estrutura populacional de *E. coli* presente na microbiota fecal, uterina, urinária e extra-uterina. Foram obtidos um total de 383 isolados dos quais 160 foram de origem uterina, 35 provenientes de amostras de urina, 42 de amostras extra-uterinas e 146 origem fecal. Independentemente da origem dos isolados, o grupo filogenético mais prevalente foi o grupo B2 (89%). A média de clones de *E. coli* por cadela foi de 1,25 e 81,3% das cadelas tinha apenas um clone do GF B2, comum a todos os locais de colheita em que o isolamento foi positivo.

Palavras chave: Piómetra, Peritonite, Lesão renal; *Escherichia coli*

ABSTRACT

Evaluation of renal dysfunction and peritonitis in female dogs with pyometra

Pyometra is a common uterine disease diagnosed during diestrus in intact adult bitches. It is associated with a wide variety of clinical and laboratory findings and complications are often observed. These include peritonitis, urinary tract infection (UTI), and renal damage. One aim of this study was to evaluate the frequency of these complications and to contribute to their early detection. A total of 28 bitches with confirmed pyometra diagnosis were included in this study. *Escherichia coli* (57.1%) was isolated in 16 cases and in the remaining 12 other bacteria were isolated (42.9%). The presence of peritonitis was found in 25%, UTI in 21.4% and renal lesion in 46.4%. The presence of peritonitis was associated with normal values of total leukocytes and with the increase of post-surgical hospitalization. The use of SDMA as a marker of early renal damage has proved extremely useful in bitches with pyometra. Since *E. coli* is the most frequent agent identified in bitches with pyometra, another aim was to characterize *E. coli* population structure present in the fecal, uterine, urinary and extrauterine microbiota. A total of 383 isolates were obtained, of which 160 were from uterine origin, 35 from urine samples, 42 from extrauterine samples and 142 from fecal origin. Independently of the origin of the isolates, the most prevalent phylogenetic group was group B2 (89%). The average of *E. coli* clones per bitch was 1.25 and 81.3% of the bitches had only one B2 clone, common to all sources of samples where isolation was positive.

Key words: Pyometra, Peritonitis, Renal damage; *Escherichia coli*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE.....	vi
RELATÓRIO DE ESTÁGIO	1
INTRODUÇÃO.....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Piómetra	5
1.1. Epidemiologia	5
1.2. Etiologia.....	6
1.2.1. Componente Hormonal.....	6
1.2.2. Componente bacteriana.....	8
1.2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	8
1.3. Diagnóstico	10
1.3.1. História e sinais clínicos	10
1.3.2. Achados laboratoriais	11
1.3.3. Diagnóstico imagiológico	12
1.4. Terapêutica.....	12
1.4.1. Abordagem cirúrgica	13
1.4.2. Terapêutica médica	14
2. Complicações	15
2.1. Peritonite.....	15
2.1.1. Diagnóstico	16
2.1.2. Tratamento e prevenção.....	16
2.2. Lesão renal	17
2.2.1. Creatinina e Ureia	18
2.2.2. Proteinúria.....	18
2.2.3. Dimetilarginina simétrica	19
2.3. Infecção do trato urinário.....	19
2.3.1. Urinálise	20
2.4. Síndrome de resposta inflamatória sistêmica e sépsis	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22

1. Amostragem	22
1.1 Exame de estado geral	22
2. Colheita de amostras	23
3. Caracterização das amostras.....	24
3.1. Caracterização da fase do ciclo éstrico	24
3.2. Análise histopatológica.....	25
4. Análise bacteriológica e identificação.....	25
5. <i>Escherichia coli</i>	26
5.1. Identificação de fenótipos	26
5.2. Extração de ADN.....	26
5.3. Rep-PCR	27
5.4. Determinação de grupo filogenético.....	28
6. Urinálise	30
7. Determinação de rácio proteína/creatinina urinário	30
8. Determinação de concentração de dimetilarginina simétrica.....	31
9. Análise estatística.....	31
RESULTADOS	32
1. Caracterização da população	32
2. Exame físico.....	32
3. Sinais clínicos.....	33
4. Historial reprodutivo	34
5. Fase do ciclo éstrico	35
6. Caracterização da piómetra	35
6.1 Análise histopatológica.....	37
6.1.1 Cadelas com piómetra por <i>E. coli</i>	38
6.1.2. Animais com piómetra por outros agentes	38
6.2. Leucograma	40
6.3. Hemograma e contagem plaquetária.....	42
6.4. Bioquímicas séricas	43
6.5 Mortalidade.....	44
6.6 Morbilidade.....	44
7. Avaliação do aparelho urinário	45
7.1. Análise de Urina tipo II	45
7.1.1. Exame físico	45
7.1.2. Exame químico	45

7.1.3. Exame microscópico de sedimento.....	46
7.2. Rácio UPC	47
7.3. Concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA)	47
8. Resultados microbiológicos	48
8.1. Urocultura	48
8.2. Zaragoas extra-uterinas	49
8.3. Zaragoas fecais.....	49
9. Caracterização dos isolados de <i>E. coli</i>	49
9.1. Fenótipos.....	49
9.2. Grupo Filogenético	50
9.3. Rep PCR	52
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO.....	59
BIBLIOGRAFIA	60
ANEXO 1	68
ANEXO 2	78
ANEXO 3	79
ANEXO 4	81

Lista de Figuras

Figura 1 – Translocação bacteriana transmural.....	15
Figura 2 - Material recolhido por cadela	24
Figura 3 - Representação esquemática da árvore de decisão usada para determinação do grupo filogenético de <i>E. coli</i>	29
Figura 4 - Edema vulvar.....	34
Figura 5 - Corrimento vulvar sanguíneo-purulento.....	34
Figura 6 - Citologia vaginal num caso de piómetra aberta associada a corrimento purulento	35
Figura 7 - Citologia vaginal num caso de piómetra aberta associada a corrimento sanguíneo-purulento.....	35
Figura 8 - Útero de cadela de 9 anos, com piómetra fechada.....	35
Figura 9 - Rotura uterina	36
Figura 10 - Ovário com estruturas quísticas e corpos lúteos.....	36
Figura 11 - Exemplos de diferentes aspetos do conteúdo uterino.....	37
Figura 12 - Exemplos de alterações histopatológicas em úteros de cadelas diagnosticadas com piómetra, cortes histológicos do útero corados com H&E.	40
Figura 13 - Sedimento urinário ativo com leucocitúria e presença bactérias (400×).....	46
Figura 14 - Urocultura positiva, crescimento de <i>E. coli</i> em meio de agar suplementado com sangue de carneiro	49
Figura 15 - Aspeto morfológico de colónias de <i>E. coli</i> com diferentes fenótipos em meio de agar suplementado com sangue de carneiro	50
Figura 16 - PCR de determinação do grupo filogenéticos dos isolados: UT1 e F8 cadela 2, UT5 cadela 7, UT4 cadela 11, F9 da cadela 13; F3 cadela 12; F8 cadela 30 e F4 cadela 33...	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequências de oligonucleótidos iniciadores usados para PCR de filogenia.....	29
Tabela 2 - Valores médios de parâmetros do exame físico	33
Tabela 3 - Alterações observadas no exame físico.....	33
Tabela 4 - Distribuição da população em relação ao número deaios por ano	34
Tabela 5 - Distribuição da população quanto ao período de tempo decorrido desde o último cio	34
Tabela 6 - Frequência das espécies bacterianas isoladas de úteros com piómetra	36

Tabela 7- Avaliação histopatológica dos ovários e útero em piômetras por <i>E. coli</i>	38
Tabela 8- Avaliação histopatológica de alterações ováricas e uterinas em piômetras por outras bactérias	39
Tabela 9- Alterações histopatológicas observadas em úteros de cadelas com piômetra por <i>E. coli</i> e piômetras por outras bactérias	39
Tabela 10- Resultados médios dos diferentes parâmetros do leucograma	41
Tabela 11- Alterações no leucograma no grupo de animais com piômetra por <i>E. coli</i> e no grupo de piômetras por outros agentes	41
Tabela 12- Resultados médios dos diferentes parâmetros do eritrograma	42
Tabela 13- Alterações no eritrograma e contagem de plaquetas no grupo de animais com piômetra por <i>E. coli</i> e no grupo piômetra por outros agentes.....	43
Tabela 14- Resultados médios dos parâmetros bioquímicos séricos.....	43
Tabela 15- Distribuição de alterações bioquímicas entre grupo de animais com piômetra por <i>E. coli</i> e piômetra por outros agentes	44
Tabela 16- Avaliação da presença de eritrócitos na urina pela tira de urina	46
Tabela 17- Avaliação da presença de proteína na urina pela tira de urina	46
Tabela 18 - Resultados médios de concentração de proteína e creatinina urinária e rácio UPC	47
Tabela 19- Estudo de correlação utilizando o coeficiente de Spearman entre os vários parâmetros estudados e concentrações de SDMA.....	48
Tabela 20- Frequência absoluta e relativa dos diferentes fenótipos nos diferentes grupos de isolados	50
Tabela 21- Distribuição dos isolados por grupo filogenético e grupo de origem de isolados.	51
Tabela 22- Representação da associação entre grupo filogenético dos diferentes isolados e número de clones de <i>E. coli</i> presente por animal.	52

Lista de Gráficos

Gráfico 1- Frequência absoluta de hematúria, piúria e bacteriúria no sedimento urinário.....	47
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADH – Hormona Antidiurética
ADN – Ácido desoxirribonucleico
ALT – Alanina aminotransferase
AST – Aspartato aminotransferase
bpm – Batimentos Por Minuto
CEBEA – Comissão de Ética e Bem-Estar Animal
cel - Células
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CIISA- Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
COS – Agar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro
dNTP - Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DU – Densidade Urinária
EU – Isolados Extra-uterinos
ExPEC - *Escherichia coli* Patogénica extraintestinal
FAS – Fosfatase Alcalina Sérica
FC – Frequência Cardíaca
FR – Frequência Respiratória
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
GF – Grupo Filogenético
H - Hemolítico
Hb – Hemoglobina
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média
HQE – Hiperplasia Quística do Endométrio
HVL – Hospital Veterinário das Laranjeiras
H&E – Hematoxilina e Eritrosina
InPEC – *Escherichia coli* patogénica intestinal
ITU – Infecção do Tracto Urinário
LPS – Lipopolissacarídeo
M - Mucóide
NH – Não Hemolítico
NM – Não Mucóide
OVH – Ovariohisterectomia
PCR- Reação em cadeia da polimerase

PD- Polidipsia
PS – Poliestereno
PU - Poliúria
PGF2 α – Prostaglandina natural F2alfa
R – Isolados Retais
Rep-PCR – PCR em sequências Palindrómicas Repetidas
Rpm – Rotações Por Minuto
rpm – Respirações por minuto
TFG – Taxa de Filtração Glomerular
TRC – Tempo de Repleção Capilar
TSA – Teste de Sensibilidade a Antibióticos
U - Isolados urinários
UI – Unidade Internacional
UFC – Unidade Formadora de Colónia
UPC – Rácio Proteína/Creatinina Urinária
UPEC – *Escherichia coli* Uropatogénicas
UT – Isolados de conteúdo uterino
SDMA – Dimetilarginina Simétrica
Sp - Species
Spp - Species pluralis
SRIS – Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica
VCM – Volume Corpuscular Médio

Lista de Símbolos

% - Percentagem
°C – Grau Celsius
+ - Mais
× - Vezes
< - Menor
> - Maior
± - Mais ou Menos
 α – Alfa
 β – Beta
 μ l – Microlitros

μm – Micrometros

dL – Decilitro

fl – Fentolitro

g – Grama

L - Litro

mg - Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

Nº - Número

n – Número de animais

ng - Nanograma

pg - Picograma

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular teve lugar no Hospital Veterinário das Laranjeiras (HVL), localizado no centro metropolitano de Lisboa. Este teve início a 18 de setembro de 2017, tendo terminado a 18 de março de 2018, perfazendo o total de 1008 horas. A carga horária semanal variou entre as 36 e as 48 horas, distribuídas pelos sete dias da semana nos seguintes turnos: manhã (8h-16h), tarde (14h-22h), dia (9h-21h), noite (21h-9h).

Após o período mencionado continuou a frequentar pontualmente o HVL no sentido de concluir a sua recolha de dados e amostras para o desenvolvimento do presente trabalho.

No início de cada dia de trabalho (9h), o corpo clínico reúne para a passagem de casos onde são discutidas as progressões clínicas dos doentes internados, revendo e atualizando o plano diagnóstico e terapêutico. A participação livre e ativa de todos os membros da equipa, incluindo a do estagiário permite que todo o corpo clínico esteja a par do desenvolvimento dos diferentes casos e que contribua para a sua resolução. Este momento serve também para partilhar dúvidas, experiências e conhecimentos técnicos entre médicos, enfermeiros e estagiários. Para além desta reunião, nas trocas de turno (13h e 21h), o médico veterinário responsável pelo internamento atualiza novamente a equipa sobre o desenvolvimento clínico de cada paciente.

Foi possível assistir e participar em consultas de medicina interna, preventiva e de especialidade de animais de companhia bem como de novos animais de companhia, incluindo consultas de primeira e segunda opinião, e consultas de referência. No âmbito da consulta, foi possível discutir com o clínico responsável os diagnósticos diferenciais mais prováveis e o estabelecimento do plano de diagnóstico e terapêutico para o animal em questão. A estagiária teve ainda a oportunidade de participar em diversos procedimentos: contenção do animal, vacinação e desparasitação, colocação de microchip, preparação e administração de fármacos por via oral e parentérica, colheita de amostras biológicas, limpeza e observação do conduto auditivo externo, limpeza e desinfeção de feridas, entre outros procedimentos, sob a supervisão do médico veterinário atribuído.

As principais funções desempenhadas no espaço de internamento foram: monitorização dos doentes internados, cuidados básicos de saúde, higiene e bem-estar, passeio e alimentação dos animais, preparação e administração de alimentação entérica, preparação e administração de medicação de acordo com as indicações do médico responsável, determinação da taxa de fluidoterapia, cateterização venosa, oxigenoterapia, toracocentese, abdominocentese, cistocentese, colocação de sonda nasoesofágica de alimentação, algaliação de cães e gatos, colheita de sangue e outras amostras biológicas, medição das curvas de glicémia, medição de

pressão arterial, reconhecimento, pontuação e manejo da dor, preparação e realização de enemas, pequenas sessões de fisioterapia, contenção dos animais, e outros serviços de enfermagem como limpeza e desinfecção de feridas e realização de pensos simples e rígidos, procedimentos de eutanásia, monitorização contínua de parâmetros vitais de pacientes críticos. Nos horários que incluíam exclusivamente serviço de urgência (noites e domingos), para além do referido anteriormente, foi ainda possível que a estagiária pudesse realizar serviço de triagem, realizando a anamnese e exames físicos dos pacientes assistidos, assistir e auxiliar na reanimação de animais em estado crítico. Outros procedimentos em que a estagiária foi integrada durante o internamento de pacientes e que merecem destaque: transfusão de componentes sanguíneos, quimioterapia, diálise peritoneal, hemodiálise, acupuntura e terapêutica e internamento de animais exóticos.

Os procedimentos cirúrgicos, na sua maioria são realizados no período da manhã, onde foi possível a observação de cirurgias eletivas e de urgência, em diversas áreas, nomeadamente cirurgia geral, cirurgia de estomatologia, destartarização e exodontias, cirurgia do aparelho génito-urinário, cirurgia da cavidade abdominal, cirurgia ortopédica e cirurgia oncológica. Entre as várias tarefas atribuídas aos estagiários nesta área estão incluídas: cateterização venosa do paciente, cálculo da dose da pré-medicação e do anestésico, preparação e administração da medicação pré-anestésica e indutora da anestesia, tricotomia, limpeza e assepsia da região a ser intervencionada, entubação endotraqueal e monitorização anestésica do paciente. No decorrer da cirurgia foi possível que a estagiária ocupasse uma de várias funções incluindo: circulante, anestesista, tendo sido permitida a sua participação em intervenções cirúrgicas de menor complexidade como orquiectomias em gato, suturas de aproximação dos planos musculares e subcutâneos, suturas de pele. No pós-operatório, era ainda função da estagiária vigiar a recuperação anestésica do animal. Foi ainda possível assistir frequentemente à realização de endoscopias, principalmente endoscopia digestiva alta, colonoscopias, rinoscopias, broncoscopia e vídeo-otoscopias.

Nos exames de diagnóstico imagiológico, a estagiária foi responsável pela preparação e posicionamento do animal, seleção de constantes radiográficas, auxílio na contenção ou na monitorização de pacientes sedados durante o exame ecográfico ou radiográfico. Em todas as atividades a estagiária pode sempre contar com o apoio dos médicos veterinários, enfermeiros e auxiliares presentes.

No laboratório do HVL foi possível realização de diferentes análises por parte da estagiária que incluíram; hemograma, perfis bioquímicos, I-sat, medições de lactato e glicémia, provas de coagulação, esfregaços sanguíneos, citologias de ouvido, pele, vaginais e de líquido livre abdominal, observação e avaliação de sedimentos urinários, provas bioquímicas urinárias,

medição de densidade urinária, testes rápidos de diagnóstico serológico de doenças infecciosas e pancreatite, entre outros.

Durante o período de estágio, os estagiários estiveram envolvidos na realização de uma apresentação oral para o corpo clínico do HVL, sobre diversos temas de interesse clínico. No caso da estagiária foi feita a apresentação do tema “Estratégias de antibioterapia em infeções do trato urinário”.

Todas as atividades desenvolvidas permitiram à estagiária ganhar autonomia na realização das várias tarefas, desenvolver a capacidade de organização e gestão do trabalho, assim como uma perspetiva crítica face às escolhas efetuadas para os diferentes pacientes.

Entre março e agosto de 2018, foi desenvolvido, no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) e no Laboratório de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), trabalho de investigação, o qual faz parte desta Dissertação. Durante esses 6 meses, houve a possibilidade de integrar o ambiente de laboratório e adquirir conhecimentos numa área pouco explorada durante a formação académica em Medicina Veterinária. Assim, sob orientação da Professora Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus e colaboração da Dr^a Marta Silva (estudante de Doutoramento), a estagiária desenvolveu mais-valias, neste campo, que incluem a extração de ADN (Ácido Desoxirribonucleico), realização de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e electroforese em géis de agarose. Para além disso, na área da bacteriologia foi possível executar algumas técnicas básicas de propagação de culturas bacterianas, em meio líquido e sólido, e posterior identificação de fenótipos de *E. coli*.

INTRODUÇÃO

A piómetra é uma das doenças mais comuns em cadelas adultas intactas. Está associada a sinais clínicos variados que refletem alterações a nível sistémico. A identificação de complicações associadas a piómetra é vital para uma boa monitorização e tratamento das pacientes. Entre as complicações clínicas descritas em cadelas com piómetra está a presença de peritonite, infeção do trato urinário e lesão renal.

Este estudo teve como objetivos:

- 1) Identificar a presença de co-morbilidades: ITU, peritonite e lesão renal
- 2) Identificar marcadores da presença de complicações ou que possam prever o prolongamento da hospitalização;
- 3) Comparar diferentes marcadores de lesão renal em casos de piómetra;
- 4) Caracterizar a estrutura populacional de *E. coli* presente na microbiota fecal, uterina, urinária e extra-uterina.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto MIMV 4.2017 denominado “*Evaluation of renal disfunction and/ or peritonitis in female dogs with pyometra*” e financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Parte do trabalho realizado foi aceite como comunicação em forma de painel:

A. Martins, M.A. Basso, L. Mateus. **Renal injury in bitches diagnosed with pyometra.**

Congresso “*Exploring the boundaries of animal, veterinary and biomedical sciences*” do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, 16 e 17 de novembro de 2018, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal (Anexo 4).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Piómetra

A piómetra é uma das doenças mais comuns em cadelas intactas de meia idade a geriátricas. Esta consiste numa infeção bacteriana, que conduz à acumulação de material purulento no lúmen uterino durante a fase lútea do ciclo éstrico da cadela. É uma afeção de carácter crónico, com manifestações agudas (Bergström, 2017; Mateus & Eilts, 2010). Está associada a um elevado risco de vida e à diminuição do potencial reprodutivo dos animais, sendo por isso uma das doenças do foro reprodutivo mais importantes, relacionada com uma grande variedade de sinais clínicos e laboratoriais (Jitpean *et al.*, 2014).

1.1 Epidemiologia

Em cadelas intactas até aos 10 anos de idade a incidência de piómetra é de 25% (Jitpean *et al.*, 2014; Hagman, 2012; Egenvall *et al.*, 2001). A média de idades tem sido descrita entre os 6,4 e os 9,5 anos, no entanto existem registos de ocorrência de piómetra desde os 7 meses de idade até aos 19 anos (Niskanen & Thrusfield, 1998; Gibson, Dean, Yates & Stavisky, 2013). A prevalência desta doença tem demonstrado variar de acordo com a frequência com que se pratica a esterilização das cadelas nos diferentes países, sendo superior nos países escandinavos, onde apenas 7% das cadelas são esterilizadas. Deste modo, nestes países a prevalência chega a atingir valores de 50% em algumas raças (Egenvall *et al.*, 2001; Hagman, 2012).

A existência de predisposição genética e de uma maior prevalência em determinadas raças é um assunto controverso (Egenvall *et al.*, 2001; Gibson *et al.*, 2013). No estudo de Egenvall e colaboradores (2001), as raças em que a piómetra foi mais prevalente foram: Golden Retriever, Cavalier King Charles Spaniel, Rough Collie, Bouvier Bernois e Rottweiler (Egenvall *et al.*, 2001).

Um importante fator predisponente para o desenvolvimento desta doença é a presença de hiperplasia quística do endométrio (HQE) (Verstegen, Dhaliwal & Verstegen-Onclin, 2008). Esta condição encontra-se associada à idade dos animais, apresentando uma prevalência de 6,3% aos 3 anos de idade e de 56,3% aos 7 anos (Moxon, Whiteside & Engalnd, 2016). A HQE consiste no espessamento do endométrio devido à hiperplasia e hipertrofia das suas glândulas, com consequente aumento da atividade secretora das mesmas, conduzindo a uma acumulação de fluido no lúmen uterino (De Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch, Van Den

Broeck & Coryn, 2001). Ao contrário da piómetra, a HQE pode existir em animais de meia idade a geriátricos sem qualquer sintomatologia associada (Jitpean, 2015). Apesar da forte correlação entre estas duas condições, elas podem existir de forma independente (De Bosschere *et al.*, 2001). Outros fatores de risco para o aparecimento de piómetra são a administração de hormonas exógenas, como estrogénio e os progestagénios (Whitehead, 2008; Nelson & Feldman, 1986) e a nuliparidade. Contudo, a gestação não confere total proteção ao longo da vida das cadelas, uma vez que a doença é também diagnosticada em animais múltiparos (Hagman, Lagerstedt, Hedhammar & Egenvall 2011). Não parece haver associação entre a pseudogestação e o aparecimento ou prevenção da piómetra (Hagman *et al.*, 2011; Mateus & Eilts, 2010).

1.2 Etiologia

A piómetra é uma doença complexa que resulta de uma interação de diversos componentes que contribuem para o seu desenvolvimento. Na sua patogenia estão envolvidos fatores hormonais, alterações estruturais do endométrio, o tipo de bactéria e o seu potencial de virulência e ainda, a resposta imunitária uterina (Hagman, 2016; Jitpean, 2015; Mateus & Eilts, 2010).

1.2.1 Componente Hormonal

A doença ocorre durante a fase lútea. De um modo geral, é reconhecido um desequilíbrio hormonal primário ou resposta anormal a concentrações normais de estrogénios e progesterona. Como consequência surgem alterações ao nível uterino que facilitam a adesão, a colonização e o crescimento bacteriano (Fieni, Topie & Gogny, 2014).

O intervalo de maior suscetibilidade para indução de piómetra em cadelas é a primeira metade do diestro devido à supressão da imunidade celular que resulta das concentrações baixas de estrogénio e aumentadas de progesterona (Smith, 2006).

A progesterona estimula a proliferação e a secreção das glândulas endometriais, induz o encerramento do cérvix, suprime as contrações do miométrio e diminui a resposta imunitária uterina (Jitepean, 2015; Fransson & Ragle, 2003). Deste modo, a progesterona quer endógena, quer exógena potencia alterações uterinas que tornam este órgão apto para o desenvolvimento embrionário. No entanto, cria-se um ambiente que facilita a adesão e o crescimento bacteriano. Esta hormona atinge concentrações séricas máximas entre o dia um e o dia 20 do diestro (Tsumagari *et al.*, 2005).

A ação estrogénica está associada ao crescimento, vascularização e edema do endométrio, relaxamento e dilatação cervical e migração de neutrófilos para o lúmen uterino. A

administração de estrogénio, por si só, não induz o aparecimento de piómetra, mas potencia os efeitos da progesterona, o que poderá levar ao desenvolvimento da doença (Jitpean, 2015; Hagman, 2016). Porém, as concentrações plasmáticas de progesterona e de estrogénios não parecem estar alteradas em animais diagnosticados com piómetra quando comparadas com animais saudáveis. Este achado apoia a hipótese de que os recetores destas hormonas possam desempenhar um papel na patogenia desta doença (Hagman, 2016; Dhaliwal, England, Noakes, 1999). Neste sentido, foi observado um aumento dos recetores de estrogénio e progesterona em endométrios com HQE, contrariamente ao que acontece quando comparado com endométrios de animais saudáveis ou diagnosticados com piómetra (Fransson & Ragle, 2003). De Bosschere e colaboradores (2002), verificaram que nos casos de piómetra a expressão dos recetores de estrogénio se encontra diminuída em todos os tipos de células uterinas, e a dos recetores de progesterona aumentada quando comparada com animais saudáveis, com exceção das células epiteliais superficiais (De Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch, Simoens, Coryn, 2002). Por outro lado, Ververidis e colaboradores (2004), apresentaram resultados não concordantes com o estudo de De Bosschere e colaboradores (2002), revelando uma diminuição quer de recetores de estrogénio quer de progesterona quando comparados com os respetivos grupos de controle. Contudo, convém salvaguardar que Ververidis e colaboradores (2004) não distinguem a HQE da piómetra.

Assim sendo, ainda não se encontra completamente esclarecido o mecanismo hormonal por detrás da piómetra, existindo ainda algumas questões sobre a influência hormonal e a resposta uterina à progesterona e ao estrogénio (Hagman, 2016; Mateus & Eilts, 2010). É, no entanto, claro que neste processo estará envolvida uma prévia estimulação do útero por estrogénios, seguida de longos períodos de dominância de progesterona (Smith, 2006; Ververidis *et al.*, 2004). Após vários ciclos éstricos consecutivos, acabam por surgir modificações estruturais no útero como consequência dos efeitos hormonais cumulativos que tornam o endométrio mais suscetível à ação da progesterona (Smith, 2006; Kitshoff *et al.*, 2015).

1.2.2 Componente bacteriana

A *Escherichia coli* é a bactéria mais frequentemente isolada de úteros com piómetra, podendo chegar aos 90% das cadelas diagnosticadas com esta doença (Henriques *et al.*, 2016). Contudo, podem estar envolvidas outras bactérias nomeadamente, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, e *Pseudomonas spp.*. Estes são também microrganismos que fazem parte da microbiota vaginal de animais saudáveis (Bergström, 2017; Mateus & Eilts, 2010) e que podem ascender ao útero durante o pró-estro ou estro, devido à patência cervical. Por vezes, é possível isolar-se mais do que um agente bacteriano (Hagman, 2018).

1.2.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo de Gram-negativo, anaeróbio facultativo (Sousa, 2006). Com base na sua patogenicidade e no local da infeção, as estirpes de *E. coli* são classificadas em três grupos distintos: estirpes comensais, patogénicas intestinais (IPEC) e patogénicas extraintestinais (ExPEC). As ExPEC podem colonizar o trato gastrointestinal, assim como as comensais, mas ao contrário desse grupo estas são responsáveis por infeções fora do trato intestinal (Hussain, 2015). As *E. coli* ExPEC detêm no seu genoma determinados genes que codificam fatores de virulência (Siqueira *et al.*, 2009) e que podem ser adquiridos por transferência horizontal. Deste modo, torna-se possível a colonização de nichos onde estirpes comensais não se conseguiriam adaptar (Mateus *et al.*, 2013). Os fatores de virulência que as tornam capazes de provocar infeção estão relacionados com: adesão bacteriana, sistemas de captação de ferro, endotoxinas ou exotoxinas. Entre as *E. coli* ExPEC incluem-se as classificadas como uropatogénicas (UPEC) (Siqueira *et al.*, 2009; Sousa, 2006; Hagman & Kühn, 2002).

As estirpes de *E. coli* dividem-se ainda em quatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D. Esta distinção entre grupos pode ser feita através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR), avaliando a presença ou ausência dos marcadores genéticos *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TspE4.C2 (Clermont, Bonacorsi, Bingen, 2000). As *E. coli* pertencentes a diferentes grupos filogenéticos diferem no seu ambiente e características, como perfis de resistência a antibióticos e potencial de virulência (Hussain, 2015). Estirpes ExPEC pertencem com maior frequência aos grupos B2 e D. *E. coli* pertencentes a estes dois grupos contêm maior número de fatores de virulência do que dos grupos A e B1 (Hussain, 2015). Os isolados com maior

capacidade de colonizar o útero de cadelas são os isolados de *E. coli* pertencentes ao grupo filogenético B2 (Henriques *et al.*, 2016; Mateus *et al.*, 2013).

As estirpes de *E. coli* isoladas em casos de piómetra têm características semelhantes às UPEC, provavelmente por terem uma origem comum, nomeadamente a microbiota vaginal ou fecal do hospedeiro. Apesar de existirem semelhanças nos diferentes genes que codificam para fatores de virulência, os isolados de piómetra apresentam um maior número de genes que codificam fatores de virulência, quando comparados com os isolados de cistites ou de origem fecal (Mateus *et al.*, 2013; Chen, Wright, Lee & Browning, 2003). Quando existe simultaneamente infeção provocada por *E. coli* quer ao nível do trato urinário, quer uterina, esta pode ser provocada pela mesmo clone (Hagman & Kühn, 2002).

Após a contaminação uterina durante o proestro e o estro, o estabelecimento e desenvolvimento da infeção ocorre no diestro (Pretzer, 2008). A adesão e a colonização do epitélio é o fenómeno mais importante da patogenia de uma infeção, sendo a adesão bacteriana facilitada pela presença de adesinas (Willey, Sherwood & Wollverton, 2008). Após a adesão, a *E. coli* irá multiplicar-se no útero, contudo, e uma vez que o ferro é essencial para o metabolismo da bactéria, este poderia ser um fator limitante no desenvolvimento da infeção (Siqueira *et al.*, 2009). Porém, estas bactérias dispõem de vários sistemas de captação de ferro no seu genoma, o que pode refletir uma redundância funcional e/ ou uma vantagem para a sobrevivência e persistência no ambiente uterino (Mateus *et al.*, 2013). Os genes codificadores de toxinas mais frequentemente encontrados em estirpes de *E. coli* codificam a α -hemolisina e o fator citotóxico necrosante 1 (Siqueira *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2003; Henriques *et al.*, 2014; Mateus *et al.*, 2013) sendo que ambas contribuem para a destruição do tecido uterino. Os casos de piómetra por *E. coli* β -hemolítica estão associados com maior frequência à ocorrência de metrite e a um maior grau de destruição do tecido uterino. As células do estroma do endométrio apresentam uma maior sensibilidade aos efeitos citotóxicos provocados pela α -hemolisina do que as células epiteliais, o que permite que a bactéria chegue ao miométrio mais rapidamente (Henriques *et al.*, 2016).

Tal como todas as bactérias de Gram-negativas, *E. coli* apresenta na constituição da sua parede celular lipopolissacarídeos (LPS). Esta endotoxina é libertada aquando do crescimento exacerbado ou destruição da bactéria (Hagman *et al.*, 2006).

1.3 Diagnóstico

1.3.1 História e sinais clínicos

O diagnóstico ocorre com maior frequência entre as 4 e as 6 semanas, embora existam relatos de diagnóstico até aos 4 meses após o estro (Smith, 2006; Hagman, 2012). Apesar da doença se manifestar de modo subtil nos estadios mais precoces, o diagnóstico geralmente é feito apenas numa fase mais avançada da doença (Bergström, 2017; Smith, 2006). Este deverá incluir a realização de anamnese, exame físico de estado geral, análises laboratoriais e ainda exame imagiológico (Jitpean, Ambrosen, Emanuelson & Hagman, 2017).

Na anamnese, a recolha de informações sugestivas de piómetra incluem: ser uma fêmea inteira, de meia idade a geriátrica, em diestro e com sintomatologia associada. Quanto aos sinais clínicos, estes podem variar consoante se trate de uma piómetra aberta ou fechada e ainda com o tipo de bactéria associada. De um modo geral, o animal poderá apresentar prostração, anorexia ou hiporexia, polidipsia, poliúria, vômito, diarreia, dor abdominal e desidratação. Pode ainda acrescentar-se hipotermia ou febre, alteração da coloração das mucosas, aumento do tempo de repleção capilar e frequência respiratória, que apesar de menos frequentes podem também estar presentes entre as manifestações desta doença (Kitshoff *et al.*, 2015). No que diz respeito à coloração das mucosas, pacientes com mucosas pálidas, que podem estar associadas à presença de anemia, têm sido associados a um aumento do período de hospitalização, ao contrário do que se verificou com animais cujas mucosas estão hiperémicas estando associados a um menor risco de hospitalização prolongada (Jitpean *et al.*, 2014). A presença ou ausência de corrimento vulvar depende da patência do cérvix. Em alguns casos poderá ser difícil de observar a presença de corrimento caso este esteja presente em pequenas quantidades e seja eliminado da região vulvar durante o *grooming*. As características do corrimento vulvar podem variar dependendo da bactéria presente, podendo ser classificados como mucopurulento, purulento (com maior probabilidade de se tratar de *Streptococcus* spp.) ou sanguinopurulento (associado frequentemente a *E. coli* hemolítica ou mucoide) (Gilbert, Nothling & Oettlé, 1989). Um dos métodos de diagnóstico que se torna particularmente útil quando o animal apresenta corrimento é a citologia vaginal. Quando se trata de uma piómetra aberta observa-se na citologia a presença de neutrófilos degenerados em grande quantidade e ainda bactérias intra e extracelulares (Pretzer, 2008). A citologia de animais com piómetra fechada pode não apresentar alterações (Hagman, 2014).

Cadelas com piómetra fechada geralmente apresentam quadros mais graves (Gilbert *et al.*, 1989) no momento do diagnóstico, sendo mais frequente o aparecimento de animais em sépsis

nesta condição. No entanto, não existe uma relação entre a patência do cérvix e o período de hospitalização pós-operatório (Jitpean *et al.*, 2017).

1.3.2 Achados laboratoriais

Na maioria dos casos a piómetra está associada a alterações quer de parâmetros hematológicos quer bioquímicos. No entanto, alguns animais podem não apresentar valores diferentes dos intervalos de referência. As alterações no leucograma incluem: leucocitose, presente em mais de 50% dos animais diagnosticados, neutrofilia com desvio à esquerda e monocitose. Podem também, apesar de menos frequente, surgir animais com leucopénia, associada à supressão da medula óssea induzida pelas endotoxinas em circulação e/ou pela perda crónica de leucócitos para o lúmen uterino (Jitpean, 2014).

Quanto às alterações no eritrograma, a anemia normocítica normocrómica não regenerativa, faz parte dos achados mais frequentes. A presença desta anemia estará relacionada com a diminuição da eritropoiese secundária à inflamação crónica, quer pela supressão da médula óssea quer pela diminuição da concentração de ferro (Bergström, 2017). A presença de anemia torna-se por vezes difícil de avaliar, já que pode ser mascarada pela desidratação concomitante (Hagman, 2012; Kaymaz, Bastan, Erünal, Aslan & Findik, 1999). Alguns animais apresentam trombocitopénia que pode surgir como resultado dos efeitos tóxicos sobre a medula óssea ou ainda como consequência de coagulação intravascular disseminada ou hemorragia uterina, por aumento do consumo de plaquetas (Hagman, 2012; Plavec, Celinsek, Dolinar & Butinar, 2006).

No que diz respeito aos parâmetros bioquímicos, estes irão refletir alterações funcionais em órgãos como o fígado e o rim. Está frequentemente presente um aumento da fosfatase alcalina sérica (FAS), da aspartato aminotransferase (AST), da bilirrubina, do colesterol, das globulinas e das proteínas totais. O aumento de FAS, bilirrubina e colesterol pode indicar colestase intra-hepática (Jitpean, 2015). Por outro lado, pode existir uma diminuição de alanina aminotransferase (ALT) e da albumina. A albumina é considerada uma proteína negativa de fase aguda, esta diminui durante a inflamação possivelmente como resultado do aumento produção hepática de proteínas de fase aguda positivas e outros componentes inflamatórios (Plavec *et al.*, 2006). A hipoalbuminémia pode ser um efeito da diminuição da produção de albumina, mas também pode surgir como reflexo do aumento da permeabilidade vascular em resposta a inflamação (revisto por Jitpean, 2015) ou ainda por perda a nível renal (Hagman, 2012; Kaymaz *et al.*, 1999). O valor da albumina como fator de prognóstico para piómetra não se encontra ainda completamente explorado.

Como marcadores de lesão renal, podem verificar-se aumentos nas concentrações de creatinina e de ureia. A presença de azotemia pode ser pré-renal devido a desidratação ou renal como consequência das alterações a nível glomerular e/ou tubular (Jitpean, 2015; Bergström, 2017).

A glicemia encontra-se normal na maioria dos pacientes e é um bom marcador de prognóstico no período pós-cirúrgico, estando associado ao prolongamento do tempo de hospitalização quando diminuída (Jitpean, 2015). Em humanos com sépsis devido a infecção por *E. coli*, foi demonstrada a associação entre a hipoglicemia e o elevado risco de mortalidade (Alamgir *et al.*, 2006).

1.3.3 Diagnóstico imagiológico

O diagnóstico de piómetra por radiografia é frequentemente inconclusivo. Com este meio de diagnóstico pode ser detetada a presença de um órgão tubular, com conteúdo, na região ventro-caudal do abdómen (Smith, 2006). Contudo, caso o animal não apresente ainda sintomatologia não será possível excluir a hipótese de que esteja gestante até aos 42 a 45 dias pós estro (Pretzer, 2008). A não visualização do útero aumentado radiograficamente não é suficiente para excluir o diagnóstico de piómetra (Nelson & Feldman, 1986).

Com recurso à ecografia abdominal será possível para além de detetar a acumulação de conteúdo uterino, avaliar a sua ecogenicidade, a espessura da parede uterina, a presença de quistos no endométrio e ainda sinais de alterações ováricas (Hagman, 2016). O conteúdo uterino varia entre anecogénico a hipocogénico, sendo geralmente homogéneo (Pretzer, 2008). Na ausência de sinais clínicos, a visualização de conteúdo uterino à ecografia, pode não ser suficiente para o diagnóstico definitivo. Para a confirmação da presença de piómetra deverá ainda ser feito o isolamento do agente bacteriano e a análise macroscópica e histopatológica do útero e ovários (Hagman, 2014; Jitpean, 2015).

1.4 Terapêutica

A piómetra é uma emergência médica, que requer uma intervenção rápida de modo a prevenir complicações que agravem o quadro clínico do animal (Fieni *et al.*, 2014). Antes de se decidir por uma resolução cirúrgica ou apenas médica, é sempre necessário estabilizar o paciente através de fluidoterapia, resolução de acidose metabólica, hipoglicémia ou alterações eletrolíticas que possam estar presentes. A gravidade da doença está associada à toxémia, por esse motivo a fluidoterapia tem um papel fundamental na terapêutica da piómetra (Bergström, 2017).

Dever-se-á instituir uma antibioterapia empírica até à obtenção dos resultados do isolamento bacteriano e do teste de sensibilidade a antibióticos (TSA) (Brissot *et al.*, 2016). O antibiótico escolhido empiricamente deve então, ser eficaz contra a bactéria mais comum em piómetra, *E. coli*, e não deve ser nem nefrotóxico, (Fieni *et al.*, 2014; Hagman, 2018) nem hepatotóxico (Brissot *et al.*, 2016). Os antibióticos recomendados para este fim são a amoxiciclina em combinação ou não com o ácido clavulânico e as sulfonamidas com trimetoprim. Após o resultado do TSA, a terapêutica deve ser ajustada sendo a duração da antibioterapia recomendada de 2 a 3 semanas (Brissot *et al.*, 2016). O tratamento apenas com antibióticos pode atrasar a progressão da doença, mas não levará à cura (Brissot *et al.*, 2016; Hagman, 2018). Hagman e Greko (2005) e Henriques e colaboradores (2014) demonstraram que a maioria das estirpes de *E. coli* isoladas de casos de piómetra são sensíveis aos antibióticos normalmente utilizados. No estudo de Henriques e colaboradores (2014), a percentagem de isolados sensíveis a todos os antibióticos testados foi de 69%. No entanto em ambos os estudos, foram encontrados isolados de *E. coli* multirresistentes. Interessantemente, a prevalência de estirpes multirresistência foi inferior nas *E. coli* pertencentes ao grupo B2 do que em estirpes do grupo filogenético B1 e A (Henriques *et al.*, 2014).

1.4.1 Abordagem cirúrgica

A ovariectomia (OVH) é a terapia tradicionalmente eleita como resolução da piómetra. A OVH é o método recomendado sobretudo se o animal não tem valor reprodutivo, quando se trata de piómetra em estado avançado, com complicações associadas como peritonite, com presença de lesão renal ou hepática e em casos de piómetra fechada (Fieni *et al.*, 2014).

Em animais em risco de vida com sépsis ou choque séptico, para além da terapêutica de suporte já mencionada, está indicada a combinação de antibióticos, permitindo ação contra um maior número de agentes patogénicos (Hagman, 2018). As combinações recomendadas incluem ampicilina ou amoxiciclina, associada ou não a ácido clavulânico, e enrofloxacina ou marbofloxacina (Brissot, 2016). Após estabilização, o animal deve ser intervencionado cirurgicamente (Bergström, 2017). A OVH tradicionalmente realizada em casos de piómetra é semelhante à realizada na esterilização de animais saudáveis com algumas modificações, tendo em conta que o útero se encontra aumentado, friável e sujeito a rutura, exigindo um manuseamento cuidadoso. Deve também ter-se particular atenção à extravasão de conteúdo uterino para o abdómen durante a intervenção quer por rutura da parede, quer a partir das bursas ováricas (Rubio *et al.*, 2014; Hagman, 2018).

A taxa de mortalidade em animais tratados cirurgicamente é baixa, variando entre 1% a 4,5% (Jitpean *et al.*, 2017; Jitpean *et al.*, 2014; Gibson *et al.*, 2013)

1.4.2 Terapêutica médica

O tratamento médico está indicado para cadelas em que se pretende preservar a fertilidade, pacientes em que o risco anestésico é muito elevado, quando a condição clínica do indivíduo é débil e se pretende estabilizar o animal antes de optar por OVH ou ainda, caso existam grandes restrições económicas. Esta terapêutica está contraindicada em animais hipotérmicos ou febris com suspeita de peritonite concomitante (Jitpean, 2015; Fieni *et al.*, 2014). O tratamento médico em animais com piómetra fechada também não é recomendado (Bergström, 2017; Mateus & Eilts, 2010). Esta abordagem terapêutica terá resultados mais favoráveis em animais sem HQE ou quistos ováricos (Jitpean, 2015).

É importante que os pacientes sejam monitorizados atentamente sendo recomendada a hospitalização. Este fato deve-se ao risco de desenvolvimento de peritonite ou septicémia, transformando-se um quadro clínico estável numa situação de emergência (Hagman, 2018; Bergström, 2017; Fieni *et al.*, 2014).

Em complemento com a antibioterapia utilizada, a função do tratamento médico passa por minimizar os efeitos da progesterona, reduzindo a sua produção e/ou ação e pela eliminação do conteúdo uterino, promovendo a abertura do cérvix e a expulsão do conteúdo. Os fármacos normalmente usados incluem: a prostaglandina natural F2 α (PGF2 α) ou análogos sintéticos como o cloprostenol, agonistas da dopamina ou antagonistas dos recetores da progesterona como a aglepristona (Hagman, 2018).

As prostaglandinas são agentes ecbólicos, induzem a luteólise, promovem a contração do miométrio e a dilatação cervical. Estão indicadas para o tratamento de cadelas com piómetra aberta, já que em animais com cérvix fechado o risco de rutura uterina é elevado. O período de tratamento varia entre 3 a 5 dias. Nos casos em que se tenha que prolongar além dos 5 dias ou haja uma recorrência, a eficácia da terapêutica será menor (Fieni *et al.*, 2014; Smith, 2006). A taxa de sucesso após a administração de prostaglandinas varia entre 70% a 100% dependendo também do protocolo utilizado (Hagman, 2018).

Os agonistas da dopamina como a cabergolina ou bromocriptina têm efeito luteolítico indireto ao inibirem a produção de prolactina que é luteotrófica. São utilizados em combinação com as prostaglandinas naturais ou sintéticas, o que permite um luteólise mais rápida (Mateus & Eilts, 2010). A taxa de sucesso dos protocolos em que há associação de cabergolina e doses baixas de cloprostenol, varia entre 83% a 90,5% (Hagman, 2018)

Os antagonistas dos recetores de progesterona, atuam por competição, bloqueando os recetores de progesterona. A administração de aglepristona pode ser associada à administração de prostaglandina. A associação de aglepristona e cloprostenol apresenta

valores de eficácia de 84%. Quando administrada isoladamente, a taxa de sucesso baixa para 60% (Fieni *et al.*, 2014).

Após a terapêutica médica, as fêmeas devem cruzar no ciclo seguinte. Animais que não fiquem gestantes após cruzamento ou completem um ciclo sem cruzar têm maior probabilidade de recorrência de piômetra (Smith, 2006).

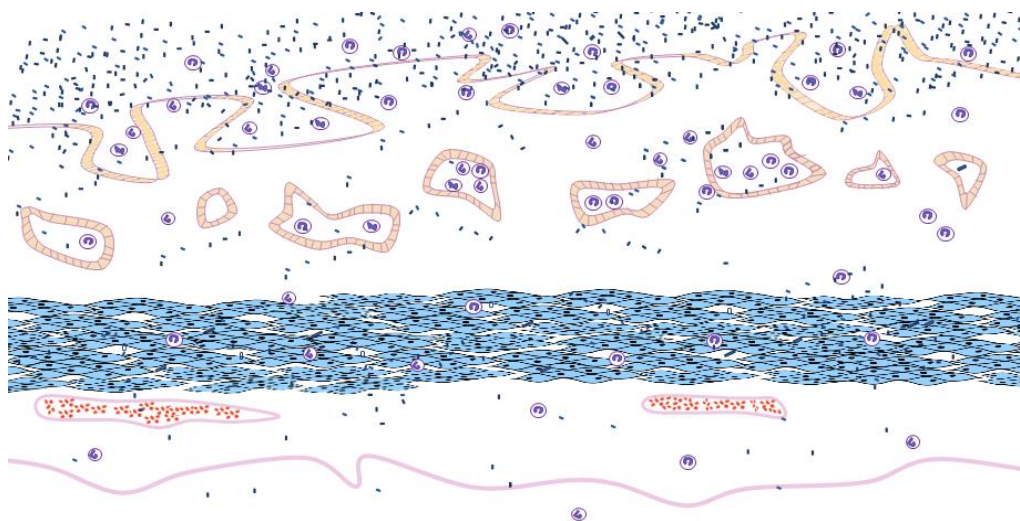
2. Complicações

Dos animais submetidos a OVH, cerca de 20% apresenta complicações específicas pós-cirúrgicas. Entre elas o desenvolvimento de peritonite é a mais comum, com uma frequência de 12% (Hagman, 2018). Para além de peritonite, existem outras complicações igualmente graves que colocam o animal em risco de vida, nomeadamente sépsis, choque séptico, septicémia e hemorragia. Num estudo realizado por Jitpean e colaboradores (2014) foram ainda reportadas as seguintes complicações: infecção do trato urinário (ITU) (5,3%), infecção da ferida cirúrgica (2,2%), uveíte (1,7%), arritmia cardíaca (1,4%), persistência de poliúria/polidipsia (0,3%), lesão hepática associada a ascite (0,3%) e ainda lesão renal (0,3%).

2.1 Peritonite

O desenvolvimento de peritonite séptica secundária a piômetra pode surgir como consequência da disseminação de bactérias por rutura da parede uterina que se encontra distendida e friável. Outra via de contaminação da cavidade peritoneal é a translocação bacteriana transmural através das paredes uterinas inflamadas (Figura 1).

Figura 1 – Translocação bacteriana transmural (original)



Outra via possível para o desenvolvimento de peritonite é através das bursas ováricas. Neste caso as bactérias têm acesso à cavidade abdominal ascendendo pelos cornos uterino até às bursas ováricas onde existe uma estreita comunicação com o peritoneu. Contudo, os resultados de Rubio e colaboradores (2014) indicam que a microbiota identificada nas bursas ováricas não reflete de modo consistente a microbiota presente a nível uterino. Deste modo torna-se pouco claro qual a origem da microbiota bacteriana das bursas ováricas, se uterina, se por contaminação a partir do peritoneu ou por via hematogénica. No entanto, no estudo de Rubio e colaboradores (2014), a presença de contaminação bacteriana das bursas ováricas foi detetada em 20,3% dos animais diagnosticados com piómetra.

Alguns achados laboratoriais têm sido apontados como indicadores de risco de peritonite, nomeadamente leucopénia e contagem de leucócitos normal, quando comparados com animais com leucocitose (Jitpean *et al.*, 2014). Prostração, febre ou hipotermia também são indicadores de risco de desenvolvimento de peritonite (Jitpean *et al.*, 2017). Por outro lado, parece não existir uma relação entre o diâmetro do corno uterino e o aparecimento desta complicação (Jitpean *et al.*, 2014).

2.1.1 Diagnóstico

Animais com peritonite concomitante podem manifestar, de modo evidente, dor abdominal (revistos por Mateus & Eilts, 2010). Radiograficamente, associado a um útero aumentado, poderá ser observada uma perda de detalhe dos diferentes órgãos abdominais. No exame ecográfico pode ser detetada a presença de líquido livre e/ou aumento da ecogenicidade da gordura abdominal. Macroscopicamente podem identificar-se sinais sugestivos de peritonite, nomeadamente através da identificação de fibrina ou outros sinais de inflamação no abdómen, ou pela presença de pus na cavidade peritoneal (Jitpean *et al.*, 2014). A confirmação do agente responsável pela infeção da cavidade abdominal só será possível com recurso a recolha asséptica de amostras de líquido livre, durante a OVH, para cultura bacteriana (Hagman, 2018)

2.1.2 Tratamento e prevenção

No momento do diagnóstico da piómetra, dever-se-á efetuar uma palpação abdominal cuidada evitando a rutura uterina já que as paredes do útero se encontram frágeis e distendidas (Hagman, 2018). Já durante a OVH e uma vez que as bursas ováricas podem constituir um reservatório de bactérias, é recomendado que estas sejam mantidas intactas prevenindo assim

a contaminação do abdómen (Rubio *et al.*, 2014). Caso o abdómen esteja já contaminado com pus, este deve ser removido e a cavidade abdominal lavada com vários litros de solução salina fisiológica aquecida. Deverá ser ponderada a colocação de drenos, caso a fonte da contaminação não tenha sido completamente controlada ou se houver peritonite significativa (Devey, 2013).

Em animais com peritonite deve optar-se por uma combinação de antibióticos que tenha espectro alargado contra bactéria aeróbias e anaeróbias (Hagman, 2018), como por exemplo amoxicilina associada a ácido clavulânico ou cefazolina em combinação com metronidazol (Brissot *et al.*, 2016).

2.2 Lesão renal

A presença de lesão renal associada a piómetra pode estar associada a alteração da função glomerular, a lesão tubular renal e a diminuição da resposta a hormona ADH (Hagman, 2018). A poliúria e polidipsia (PU/PD), a proteinúria e a azotémia são alguns dos sinais associados a piómetra. Contudo, uma vez que os sinais clínicos nomeadamente PU/PD geralmente desaparecem após a terapêutica, leva a que a lesão renal associada a esta doença seja descrita como temporária (Heine, Kristiansen, Teige & jansen, 2007), de natureza aguda ou subaguda (Maddens, Daminet, Smets & Meyer, 2010).

Tem sido sugerido que a lesão renal secundária a piómetra seja consequência da deposição de imuno-complexos a nível glomerular provocando glomerulonefrite. Consequentemente, existe extravasamento de proteínas plasmáticas, principalmente de albumina, para o filtrado glomerular conduzindo ao aparecimento de proteinúria. A lesão tubular proximal desenvolve-se após a alteração glomerular e precede a insuficiência renal (Zaragoza, Barrera, Centeno, Tapia & Mañe, 2004).

No entanto, tem-se questionado se os achados indicativos de nefrite tubulointersticial e glomerulonefrite serão realmente agravados por piómetra ou se já existirão previamente e serão comparáveis a animais saudáveis da mesma faixa etária (Heine *et al.*, 2007). Maddens e seus colaboradores (2011), reportaram a ausência de evidência de glomerulopatia mediada por imunocomplexos em paciente com piómetra. Neste estudo, os achados de biópsia renal indicam a existência de nefrite tubulointersticial, em cadelas com piómetra e rácio proteína creatinina urinária superior a 0.5, ou glomeruloesclerose, em pacientes cujo rácio proteína creatinina urinária é superior a 1.0. Contudo, os autores salvaguardam que a glomerulosclerose focal e segmentar não está completamente definida em termos clínicos e patológicos, podendo ocorrer em cães de meia idade e sendo mais comum em fêmeas do que

em machos. Como a glomerulosclerose pode estar presente antes da piómetra e persistir após a OVH, não é claro se os mecanismos patológicos associados à piómetra causam ou exacerbam as lesões de glomeruloesclerose destes animais (Maddens *et al.*, 2011).

No entanto, independentemente da etiologia exata subjacente às alterações renais e à proteinúria, a monitorização de pacientes proteinúricos com piómetra após cirurgia é importante para melhorar o prognóstico (Maddens *et al.*, 2011).

2.2.1 Creatinina e Ureia

A doença renal é diagnosticada principalmente com base no aumento da concentração sérica de creatinina. A concentração de creatinina pode ser afetada pela idade, sexo, massa muscular e estado de hidratação. Uma perda de cerca de 75% da função renal é considerada necessária para que a concentração sérica de creatinina aumente acima do limite de referência superior. A creatinina é geralmente considerada um marcador pouco sensível para diagnosticar de forma fiável insuficiência renal aguda (Dahlem *et al.*, 2017). Esta baixa sensibilidade é explicável pela relação entre a creatinina e a taxa de filtração glomerular, que nos estadios iniciais de doença renal pode diminuir rapidamente, sem qualquer aumento óbvio da concentração de creatinina no sangue ou com ligeiros aumentos não excedendo os limites de referência e que podem ser considerados sem importância (Lefebvre, Watson & Heiene, 2015).

A ureia é produzida a partir de derivados nitrogenados provenientes do metabolismo dos aminoácidos, e posteriormente excretada a nível renal. No rim, a ureia é filtrada no glómulo. No entanto, não é um método fiável para avaliação da taxa de filtração glomerular, uma vez que a ureia pode ser passivamente reabsorvida a nível tubular (Palm, 2017).

Uma grande desvantagem do uso de biomarcadores séricos para estimar a taxa de filtração glomerular (TFG) é o facto de parâmetros extra renais como o fluxo plasmático renal ou a pressão hidráulica no espaço de Bowman, diminuírem a TFG sem causa renal, podendo levar a aumentos inespecíficos nas concentrações destes marcadores (Loor, Daminet, Smets, Maddens & Meyer, 2013).

2.2.2 Proteinúria

O teste colorimétrico com tira reativa para exame bioquímico de urina é o teste de triagem de primeira linha usado para a deteção de proteinúria. Contudo, são comuns as reações falso-positivas. A avaliação de proteinúria deve ser sempre confirmada e quantificada utilizando o rácio proteína/creatinina urinária (UPC) (Grauer, 2016)

De acordo com Maddens e colaboradores (2011), o rácio proteína/creatinina urinária apresenta-se apenas ligeiramente aumentado em cães com piómetra, estando até abaixo do limite superior em 44% dos casos.

Uma desvantagem da avaliação do rácio UPC é que, mesmo que os valores sejam diferentes entre cães saudáveis e cães com piómetra, este parâmetro renal não fornece informação sobre a origem das proteínas excretadas na urina (Loor *et al.*, 2013). É ainda importante acrescentar que na presença de inflamação do trato urinário, esta pode contribuir para o aumento do rácio UPC, sendo por isso difícil de avaliar a proteinúria renal em animais com ITU concomitante (Maddens *et al.*, 2011).

2.2.3 Dimetilarginina simétrica

A dimetilarginina simétrica (SDMA) é uma molécula que resulta da metilação intranuclear do aminoácido arginina, e é libertada na corrente sanguínea após proteólise. É eliminada principalmente através da filtração glomerular, não sendo afetada pela reabsorção ou secreção tubular, o que permite a sua utilização como indicador da TFG (Grauer, 2016). A sua concentração sérica não é influenciada pela massa muscular, o que representa uma vantagem em comparação com a avaliação de creatinina. É um marcador adequado para identificar doença renal aguda e crónica em cães, não permitindo, no entanto, a sua distinção (Dahlem *et al.*, 2017). As concentrações de SDMA também não parecem sofrer alterações com a idade, o sexo ou alimentação do animal (Hall *et al.*, 2015).

A determinação da concentração de SDMA permite a identificação de lesão renal precocemente comparado com a avaliação da concentração de creatinina ou da TFG, já que sofre alteração a partir de 30% de perda da função renal. É também consensual a sua estabilidade quer no soro, quer no plasma (Nabity *et al.*, 2015).

2.3 Infecção do trato urinário

A ITU caracteriza-se por uma diminuição temporária ou permanente dos mecanismos de defesa do hospedeiro, o que possibilita a adesão, multiplicação e persistência de um agente infeccioso no sistema urogenital (Smee, Loyd & Grauer, 2013a). A ITU associada a piómetra deve ser classificada como complicada já que neste grupo se incluem infeções do trato urinário concomitantes a outras morbilidades que predisponham o paciente a infeção persistente, recorrente ou falhas terapêuticas (Weese *et al.*, 2011). A ITU que ocorra

secundariamente a doença sistêmica com imunossupressão pode ser clinicamente silenciosa (Smee *et al.*, 2013a).

Ainda permanece por esclarecer, se a infecção do trato urinário ocorre antes ou depois da piómetra, não se conhecendo ainda o papel exato do trato urinário como reservatório de bactérias patogênicas para o útero (Hagman, 2016; Hagman & Kühn, 2002).

O tratamento da ITU associada a piómetra passa pela resolução da piómetra. Se a condição clínica do paciente o permitir, o tratamento da ITU complicada apenas deve ser iniciado após os resultados da urocultura e do TSA. Nos casos em que o tratamento tem de ser iniciado imediatamente, o antibiótico utilizado deve ser um dos recomendados como antibioterapia empírica em infecções do trato urinário não complicadas. Os antibióticos selecionados devem ser, preferencialmente, excretados ativamente na urina (Weese *et al.*, 2011). A terapêutica empírica nestes casos pode ser amoxicilina associada a ácido clavulânico ou sulfonamidas com trimetoprim (Brissot *et al.*, 2016).

Idealmente, uma amostra de urina para cultura bacteriana e TSA deve ser obtida por cistocentese quando a bexiga é exposta durante a OVH (Hagman, 2018), já que a realização de cistocentese pré-cirúrgica não é recomendada devido ao risco de perfuração uterina (Bergström, 2017).

2.3.1 Urianálise

A urianálise completa compreende a determinação da densidade urinária (DU), a análise bioquímica recorrendo a fitas com reagente e o exame microscópico do sedimento urinário (Weese *et al.*, 2011). A DU é usada frequentemente para ajudar a avaliar a função renal, determinando se a água está a ser retida ou eliminada para manter a homeostase. O refratômetro é o instrumento necessário para fazer a sua avaliação. A DU pode também ajudar a verificar a presença de poliúria e auxiliar na avaliação do estado de hidratação do paciente (Watson, Lefebvre & Elliott, 2015).

A hematúria ou a proteinúria são achados frequentes no teste colorimétrico com tira reativa para análise bioquímica de urina, em animais com ITU. A avaliação de sedimento urinário é também útil na deteção de bacteriúria e piúria (Smee, Loyd & Grauer, 2013b). No entanto, a realização de urocultura para a confirmação de ITU é importante (Smee *et al.*, 2013a)

2.4 Síndrome de resposta inflamatória sistêmica e sépsis

A sépsis é definida como uma alteração grave do funcionamento dos órgãos que resulta de uma resposta exacerbada do hospedeiro à infecção (Singer *et al.*, 2016) ou como síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SRIS) associado a uma causa infecciosa (DeClue, 2017; Fransson, 2003). O SRIS é definido como o conjunto de sinais clínicos apresentados pelo paciente quando está em curso uma resposta inflamatória sistêmica, quer devido a causas infecciosas, quer não infecciosas (Jitpean, 2015; DeClue, 2017). O SRIS é diagnosticado se o paciente apresentar pelo menos dois dos seguintes critérios: hipotermia ou hipertermia, taquicardia, taquipneia, leucocitose ou leucopenia e ainda neutrófilos imaturos em percentagem superior a 5% (DeClue, 2017; Fransson, 2003).

A endotoxemia é a presença do LPS em circulação, podendo ou não estar associado a bacteriemia (Fransson, 2003). O LPS é responsável por alguns dos sinais sistêmicos de cadelas com piómetra, nomeadamente febre, letargia, taquicardia e taquipneia (Mateus & Eilts, 2010). Pode ainda estar associada a coagulação intravascular disseminada e insuficiência orgânica generalizada, estando assim relacionada com um pior prognóstico (Hagman, 2018), já que se trata de uma das consequências graves da infecção uterina e que pode progredir para sépsis (Fransson 2003; Hagman *et al.* 2006). A nível renal, o LPS interfere com a capacidade da ansa de Henle reabsorver sódio e cloro. Têm ainda a capacidade de causar insensibilidade tubular à hormona antidiurética (ADH), o que conduz a uma perda adicional da capacidade de concentrar a urina (Bergström, 2017).

A presença de sépsis é detetada em mais de 50% dos animais diagnosticados com piómetra e a tem sido associada ao prolongamento do período de hospitalização destes pacientes (Jitpean, 2016).

Animais com piómetra fechada parecem ter uma maior incidência de casos de sépsis. Contudo, não existe relação entre a patência do cérvix e o período de hospitalização ou o aparecimento de outras complicações (Jitpean *et al.*, 2017).

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da FMV.

1. Amostragem

Neste estudo foram incluídas 33 cadelas submetidas a ovariectomia (OVH) após diagnóstico clínico de piómetra. A autorização da participação do animal no estudo foi formalizada através da assinatura de um termo de consentimento informado pelo respetivo tutor (Anexo 2).

Pré-cirurgicamente recolheram-se dados de cada animal, através do preenchimento de uma ficha clínica (Anexo 3), que inclui dados relativos a idade, raça, condição corporal, história clínica, diagnóstico de outras doenças pré-existentes ou associadas, historial reprodutivo, nomeadamente número deaios por ano, data do último cio ou administração de progestagénios. Foram ainda recolhidos dados relativos ao exame de estado geral, estado vacinal e desparasitação, medicações instituídas e análises pré-cirúrgicas. Foi ainda feita a caracterização do tipo de piómetra (aberta ou fechada). Nas piómetras abertas, questionou-se sobre a data de início do corrimento e foram registadas as características do mesmo. Os parâmetros envolvidos na avaliação das análises pré-cirúrgicas incluíram hemograma e parâmetros bioquímicos gerais séricos, nomeadamente: proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina sérica (FAS), ureia e creatinina.

Foi ainda recolhida informação sobre o período de hospitalização de cada animal e a recuperação pós cirúrgica.

As OVH foram realizadas no Hospital Veterinário das Laranjeiras, no serviço de cirurgia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, no centro de medicina veterinária Anjos de Assis, na Mvet clínica veterinária da moita e na clínica veterinária de Sintra.

1.1 Exame de estado geral

Foi utilizado como referência para os valores de frequência respiratória o intervalo entre 10 a 30 rpm (O'Sullivan, 2017) e para frequência cardíaca foram considerados normais valores compreendidos entre 70 a 160 bpm (Anderson, 2017).

Foram classificados como febris animais cuja temperatura retal se encontrava acima de 39,2°C (Ramsey & Tasker, 2017).

A avaliação da condição corporal foi feita utilizando uma escala de 9 pontos, de acordo com as diretrizes para cães e gatos da *American Animal Hospital Association* (Baldwin *et al.*, 2010).

As alterações da coloração das mucosas, tempo de repleção capilar (TRC) e pulso femoral foram registadas de acordo com Englar (2017).

A avaliação do estado de hidratação foi feita de acordo com as diretrizes de fluidoterapia em cães e gatos da *American Animal Hospital Association* (Davis *et al.*, 2013).

A postura corporal foi outro parâmetro avaliado no exame de estado geral, dividindo-se em animais com postura normal ou em cifose. No que diz respeito à palpação abdominal a sua classificação foi categorizada em: dolorosa generalizada, dolorosa de modo focal ou não dolorosa.

2. Colheita de amostras

Antes da realização da OVH, foi feita uma citologia vaginal. Após a indução anestésica da paciente, foi ainda colhida uma amostra de sangue, cerca de 2 ml para tubo seco, por venopunção da veia cefálica ou da veia safena. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000g durante 10 minutos e o soro armazenado a -20°C até ao seu posterior processamento.

Por cada animal foram realizadas três colheitas de amostras por zaragatoa que posteriormente foram acondicionadas em meio de transporte (VWR® transport swabs, sterile, with snappable PS + viscose, Amies médium): uma zaragatoa rectal recolhida antes da cirurgia, outra durante a OVH logo após a abertura da cavidade abdominal em torno dos dois cornos uterinos e ainda uma do conteúdo uterino, recolhida após OVH. Foi feito o registo fotográfico do aspeto macroscópico do útero e do conteúdo uterino.

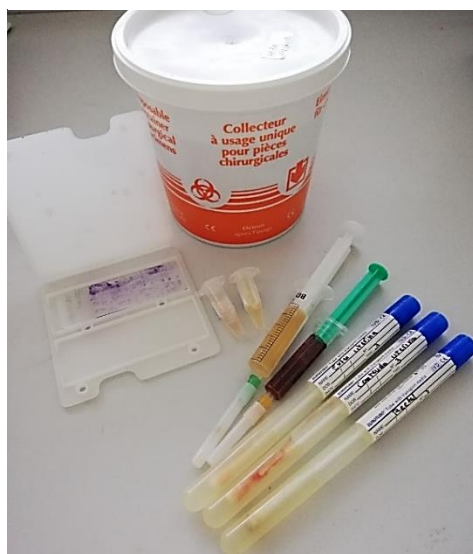
Durante a OVH, com a bexiga exposta foi recolhida uma amostra de urina (5 ml) por cistocentese.

As zaragatoas e as amostras de urina foram armazenadas a uma temperatura $\leq 4^{\circ}\text{C}$ e entregues no laboratório num prazo máximo de 24 horas após a colheita.

As amostras de urina para urocultura e as zaragatoas rectal, extra-uterina e do conteúdo uterino foram entregues para processamento no Laboratório de Microbiologia da FMV.

Após OVH foram recolhidas amostras representativas de cada corno uterino (com cerca de 5 cm de comprimento) e ambos os ovários, e colocados em frascos com formol tamponado (Formaldeído a 4%, VWR, Leuven) até serem processados. O volume de formol utilizado foi de dez vezes o volume ocupado pelas amostras. Na Figura 2 estão representadas todas as amostras recolhidas por animal.

Figura 2- Material recolhido por cadela



3. Caracterização das amostras

3.1. Caracterização da fase do ciclo éstrico

A caracterização da fase do ciclo éstrico foi efetuada através da data do último cio, da citologia vaginal, do doseamento de progesterona e da observação macroscópica das estruturas ováricas.

As citologias vaginais foram coradas com *Diff-Quik*® (Kit de coloração TRH, Maim S.L., Barcelona, Espanha).

O doseamento de progesterona sérica foi efetuado sem extração da amostra por quimioluminescência (Immulite 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Lda., Amadora, Portugal) utilizando um kit comercial (Immulite 1000 Progesterone Kit, Siemens). O coeficiente de variação inter-ensaio para o controlo C1 (1,58 ng/mL) e C2 (5,1 ng/mL) variou entre 2-4% (K9 CON, Siemens). Este procedimento decorreu no Laboratório de Endocrinologia da FMV.

3.2. Análise histopatológica

Após o corte das peças de tecido uterino e ovários, os fragmentos obtidos foram incluídos em parafina, utilizando o processador de tecidos LEICA TP 1020. Após a inclusão, foram realizados, por intermédio dum micrótomo, cortes de 4µm de espessura. Por fim, efetuou-se a coloração dos mesmos com Hematoxilina & Eritrosina (H&E). Este processamento foi feito no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa).

A caracterização histológica das alterações observadas no útero baseou-se na classificação de De Boschere e colaboradores (2001): piómetra (hiperplásica ou atrófica), endometrite e mucómetra. Em cada corte, foram avaliados a presença ou ausência de determinados parâmetros, nomeadamente: destruição geral do tecido, edema e hemorragia, metrite, grau de dilatação e destruição das glândulas endometriais, localização e grau de infiltração das células de reação inflamatória e presença de adenomiose.

Nos cortes dos ovários, foi feito o registo da presença/ausência de corpos lúteos/corpos hemorrágicos, quistos ováricos (foliculares ou luteínicos) e tumores ováricos. As alterações histopatológicas foram consideradas presentes sempre que pelo menos um dos cornos uterinos ou um dos ovários apresentasse a respetiva alteração.

4. Análise bacteriológica e identificação

As zaragatoas foram inoculadas em dois meios sólidos, Agar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro (43041, bioMérieux SA) (COS) e Agar McConkey (CM0115, OXOID Deutschland GmbH). Estes meios de cultura foram incubados a 37 °C durante 24 horas.

Após isolamento, as diferentes colónias identificadas nas culturas foram sujeitas à coloração diferencial de Gram que permite fazer a confirmação da pureza e a identificação da morfologia da cultura.

No caso de as bactérias serem cocos e de Gram positivo, foi realizado o teste da catalase de forma a identificar a família a que pertencem.

No presente estudo todos os isolados de Gram positivos foram negativos ao teste da catalase.

Assim sendo, os isolados catalase negativos foram semeados por esgotamento em dois meios em simultâneo: Agar Slanetz & Bartley e Meio de Edwards e posteriormente incubados a 37°C durante 24 horas. A identificação foi feita de acordo com o tipo de reação (positiva ou negativa) a ambos os meios. No caso de reação positiva a ambos os meios, a identificação

presuntiva foi de *Enterococcus sp.* e se positiva a Agar Slanetz & Bartley e negativa a Meio de Edwards a identificação presuntiva foi de *Streptococcus sp.*.

Nos casos em que se confirmou a presença de bacilos de Gram negativo, foi efetuado o teste da oxidase (Bactident Oxidase, 1.13300.0001, Merck KGaA Darmstadt, Germany) e uma galeria IMViC (Simmons Citrate Agar, CM155, OXOID Ltd. Basingstoke, Hampshire, England; MR-VP Broth, 610032, Liofilchem, Italy; SIM Medium, 1.05470, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a qual permitiu uma identificação presuntiva de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

A identificação presuntiva de *E. coli*, foi realizada nos casos em que no meio de McConkey, as colónias eram lactose positivas (coloração rosa) e apresentavam um halo translúcido em seu torno, aspeto acinzentado no meio COS e testavam negativo no teste de oxidase. Após esta identificação foram repicadas 10 colónias de cada cultura (urina, conteúdo uterino, extra-uterina e fecal) de meio McConkey e armazenadas em criotubos a -20°C até posterior utilização.

5. *Escherichia coli*

5.1. Identificação de fenótipos

A classificação das colónias quanto aos seus fenótipos, ou seja, classificação como não mucóide ou mucóide e não hemolítico ou hemolítico, foi feita nas placas de COS após incubação a 37°C durante 24 horas. O fenótipo mucóide/não mucóide foi avaliado através da observação macroscópica do aspeto mucóide das colónias que cresceram nas placas de COS. A atividade hemolítica associada à expressão da α -hemolisina foi avaliada pela formação de um halo de hemólise claro à volta das colónias presentes nas placas de COS.

5.2. Extração de ADN

A partir dos isolados guardados nos criotubos, fez-se novamente a propagação das bactérias em placas COS a 37°C, durante a noite, tendo-se posteriormente, repicado uma única colónia isolada para 10 ml de meio Luria-Bertani (MB02803, NZYTech, Lisboa, Portugal). Os meios foram depois incubados durante a noite numa incubadora com agitação orbital, a 37°C e a 180 rotações por minuto (Rpm).

A extração de ADN foi realizada por uma técnica rápida de fervura, a qual permitiu a obtenção simultânea de ADN cromossómico e ADN plasmídico (Féria, Machado, Correia, Gonçalves & Gaastra, 2001).

Após incubação, 2 ml do inóculo foram centrifugados a 13.000 Rpm, durante 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 500 µL de água estéril. Foi feita nova centrifugação a 13.000 Rpm durante 3 minutos, sendo mais uma vez o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em 100 µL de água desionizada estéril, para de seguida ser incubado durante 15 minutos a 100°C. Quando terminada a incubação, procedeu-se novamente a centrifugação a 13.000 Rpm durante 8 minutos. Por fim, o sobrenadante foi recolhido e foi feita ainda uma diluição de 1:20 em água estéril e desionizada. Após diluição foi feita a quantificação de ADN por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific™). Quer o ADN extraído, quer a diluição feita a partir do mesmo foram armazenados a -20°C até posterior utilização.

5.3. Rep-PCR

A técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR) em sequências palindrômicas extragênicas repetidas (Rep-PCR) foi usada para tipagem do ADN genómico e diferenciação dos isolados de *E. coli*, segundo as condições utilizadas em estudos anteriores (Silva *et al.*, 2009; Lourenço *et al.*, 2017).

A técnica de Rep-PCR utiliza oligonucleótidos iniciadores complementares de sequências de ADN repetidas, altamente conservadas e presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias (Olive & Bean, 1999).

Nesta técnica Rep-PCR utilizaram-se 2 oligonucleótidos iniciadores opostos, REP1-I (5 'IIIICGICGICATCIGGC 3') e REP2-I (5 'ICGICTTATCIGGCCTAC 3'). As reações ocorreram em um termociclador (Doppio Thermal Cycler, VWR; MJ Mini Personal Thermal Cycler, Biorad) num volume de reação de 25 µL. A mistura foi constituída por 2 µM de cada oligonucleótido iniciadore, 300 ng de ADN, 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) (BIORON, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha), 1× PCR Incomplet buffer (BIORON), 2 mM de MgCl₂ (BIORON) e 2 UI de ADN polimerase (DFS-TAQ DNA pol., BIORON).

O programa de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 95 °C durante 7 minutos, foi seguido por 30 ciclos de desnaturação a 90 °C durante 30 segundos, hibridação a 40 °C durante 1 minuto e extensão a 72 °C durante 8 minutos, com um único ciclo de extensão final a 72 °C durante 16 minutos. Um controlo negativo contendo a mesma mistura de PCR e água desionizada e esterilizada foi incluído em todas as sessões de Rep-PCR. Um volume de 20 µL dos produtos de PCR e de marcador (HyperLadder II, Biorad), foram sujeitos a electroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio, durante 4 horas e

30 minutos a 55 Volts. O marcador permitiu fazer a identificação dos pesos moleculares das diferentes bandas. Os géis foram posteriormente fotografados com Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Os perfis de Rep-PCR gerados foram analisados através do *software* BioNumerics (versão 6.6, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Os dendrogramas de similaridade dos isolados foram construídos usando o coeficiente de correlação de *Pearson* pelo método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (*UPGMA: Unweighted Pair Groups using Arithmetic averages*). Tendo em conta a reprodutibilidade da técnica de Rep-PCR de 87,4%, avaliada para 10% dos isolados em análise, os isolados de *E. coli* com uma similaridade no perfil do Rep-PCR superior ou igual a 87,4% foram considerados representativos do mesmo clone.

5.4. Determinação de grupo filogenético

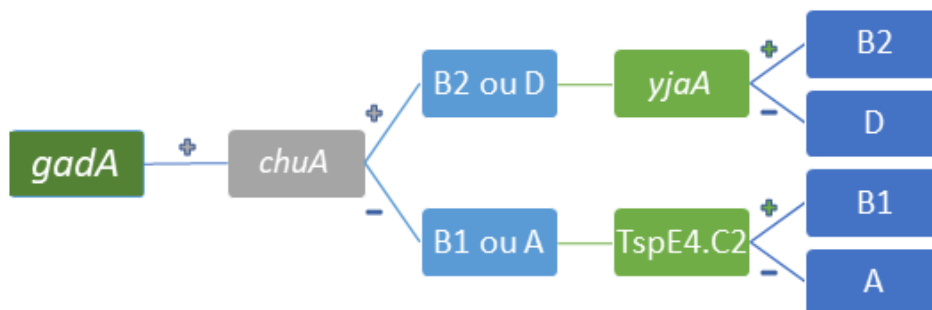
O grupo filogenético foi determinado com recurso a um PCR-multiplex para os genes *chua*, *yjaA*, *gadA* e para o fragmento de ADN TspE4-C2, tal como descrito por Doumith, Day, Hope, Wain & Woodford (2012) (Tabela 1) na sua proposta de adaptação de PCR- multiplex apresentado anteriormente por Clermont, Bonacorsi & Bingen (2000). Este método permite a discriminação de 4 grupos filogenéticos distintos: A, B1, B2 e D (Figura 3). A estirpe de referência usadas como controlo positivo nas reações foi uma estirpe do grupo filogenético B2 previamente sequenciada (Lourenço *et al.*, 2017).

Tabela 1- Sequências de oligonucleótidos iniciadores usados para PCR de filogenia

Gene	Sequência 5'- 3'	Produto de PCR (pb)
<i>gadA</i>	FW- GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG RV- GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC	373
<i>chuA</i>	FW- ATGATCATCGCGGCGTGCTG RV- AAACGCGCTCGCGCCTAAT	281
<i>yjaA</i>	FW- TGTTGCGGATCTTGAAAGCAAACGT RV- ACCTGTGACAAACCGCCCTCA	216
TspE4-C2	FW- GCGGGTGAGACAGAAACGCG RV- TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG	152

(Adaptado Doumith *et al.*, 2012)

Figura 3- Representação esquemática da árvore de decisão usada para determinação do grupo filogenético de *E. coli*



(Adaptado Clermont *et al.*, 2000 e Doumith *et al.*, 2012)

6. Urinálise

A partir das amostras de urina obtidas por cistocentese, para além da urocultura, foram feitas a análise de urina tipo II e a avaliação do rácio proteína/creatinina urinário (Laboratório de Análises clínicas Professor M. Braço Forte)

A análise de urina tipo II incluiu o exame físico, químico e a análise de sedimento. O exame físico compreendeu a avaliação do aspeto macroscópico, da cor, da presença de depósito, a avaliação do cheiro, as determinações de pH (com recurso a tira de urina) e da densidade urinária (DU) (com recurso a refratómetro manual). No que diz respeito ao exame químico foi avaliada a presença de proteínas, urobilinogénio, bilirrubina, eritrócitos, glucose, corpos cetónicos e nitritos. Todos os parâmetros químicos foram avaliados com recurso a teste colorimétrico com tira reativa de urina (Aution sticks 10 EA, A. Menarini, Shiga, Japão).

O exame microscópico do sedimento foi feito após centrifugação de 0,5 mL de amostra a 1500 Rpm durante 5 minutos, 0,4 mL de sobrenadante foi desperdiçado e o sedimento ressuspenso, na urina que permaneceu no tubo (0,1 mL) (Raskin & Meyer, 2016). Foi utilizado um volume de 20 µL para observação microscópica sobre lâmina de vidro. A quantificação dos números de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais e cilindros foi feita em 10 campos observados com objetiva de 40×. Os resultados expressos em intervalos de células foram obtidos através da realização de uma média desses 10 campos (Sink & Weisten, 2012). A quantificação de cristais, lipúria e bactérias foi feita com recurso a uma escala que inclui raros, 1+, 2+, 3+, 4+ que corresponde respetivamente a 2 - 3 elementos por campo com objetiva de 10×, < 1, 1 a 5, 6 a 20 e > 20 elementos por campo, com objetiva de 40×. Para este fim foram igualmente observados 10 campos e a atribuição da escala feita após a média ponderada dos mesmos.

7. Determinação de rácio proteína/creatinina urinário

Após centrifugadas as amostras de urina a 1500 Rpm durante 5 minutos, foi feita mensuração das concentrações de proteína e de creatinina, através de química húmida, utilizando um analisador automático de bioquímicas (rx dayton, Randox, Crumlin, Irlanda) que calcula também o rácio proteína/creatinina urinário. A creatinina é medida pelo método picrato alcalino sem desproteinização e a medição de proteínas totais urinárias pelo método colorimétrico vermelho de pirogalol.

8. Determinação de concentração de dimetilarginana simétrica

As medições de SDMA foram feitas a partir das amostras de soro previamente congeladas a -20°C . Para este fim utilizou-se o kit Catalyst SDMA Test (IDEXX Laboratories, Maine, USA). A medição foi feita através de química seca utilizando um analisador automático de bioquímicas compatível (Catalyst One, IDEXX Laboratories, Maine, USA).

9. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente usando R Commander (Fox, J. e Bouchet-Valat, M. (2018). Rcmdr: R Commander. R package version 3.5-1) e através do programa Microsoft Office Excel 2016.

A realização do teste de Shapiro-Wilk permitiu avaliar o pressuposto de normalidade das variáveis que foram correlacionadas. Assim, para o estudo de correlação, consoante a distribuição das variáveis estudadas, utilizou-se o Teste de Spearman ou o teste de Pearson.

Quando se pretendeu avaliar as diferenças entre variáveis quantitativas e qualitativas utilizou-se o Teste t de Student ou o teste U de Mann-Whitney, consoante as amostras numéricas tivessem uma distribuição normal ou não normal, respetivamente.

Quando se testou amostra qualitativas o teste utilizado foi o teste de Qui quadrado.

O nível de significância escolhido foi de 5% ($p < 0,05$).

Os resultados referentes a valores médios dos diferentes parâmetros serão apresentados juntamente com o respetivo erro padrão.

RESULTADOS

1. Caracterização da população

Um total de 33 cadelas com diagnóstico presuntivo de piómetra foram inicialmente selecionadas para este estudo. O intervalo de idades variou entre os 4 e os 13 anos, sendo a média de idades de $8,94 \pm 0,44$ anos. A análise da frequência relativa de cada raça demonstrou um predomínio de cadelas sem raça definida (n=7; 21,2%), seguida pela raça Retriever do Labrador (n= 3; 9,1%). Com igual frequência foram diagnosticadas cadelas de raça Cocker Spaniel, Bulldog Francês, Pastor Alemão, Caniche, Daschund e Pequinês (n= 2; 6,1%). Os restantes animais foram de raças distintas (n=1; 3,3%) nomeadamente, Pastor de Berna, Pit Bull, West highland white terrier, Podengo português, Serra da Estrela, Doberman, Springer Spaniel, Cane corso, Weimaraner, Golden Retrievier e Drever.

A condição corporal média apresentada pelas cadelas em estudo no momento do diagnóstico presuntivo de piómetra foi de $6,1 \pm 0,2$.

A maioria das cadelas pertenciam ao grupo classificado como de interior (n= 18; 54,5%), seguido por animais com acesso livre ao exterior (n= 9; 27,3%), de rua (n = 3; 9,1%) e de canil (n = 3; 9,1%).

Quanto ao estado sanitário foi possível concluir que 66,7 % (n = 22) dos animais estavam vacinados, 33% (n = 10) não cumpriam o protocolo vacinal e em 3,3% (n = 1) não se conhecia o seu estado vacinal. Os resultados foram semelhantes no que diz respeito à desparasitação em que 57,6% (n = 19) dos animais estavam devidamente desparasitados, 33,3% (n = 11) não estavam devidamente desparasitados e em 9,1% (n = 3) dos animais, os tutores não tinham conhecimento do estado de desparasitação do seu animal.

Entre as doenças previamente diagnosticadas, a neoplasia mamária (n = 6; 18,2%) e a doença periodontal (n = 4; 12,1%) foram as mais frequentes.

Foram posteriormente excluídos do estudo os dados das cadelas que se encontravam em estro citológico aquando do diagnóstico presuntivo de piómetra. O diagnóstico final foi de endometrite (n=5) e os resultados destes animais estão descritos no Anexo 1.

2. Exame físico

Os valores médios da frequência respiratória (FR), cardíaca (FC) e temperatura retal estão representados na Tabela 2 e as alterações registadas no exame físico descritas na Tabela 3.

A avaliação da postura corporal não foi possível avaliar numa cadela por se apresentar comatosa e a palpação abdominal não foi possível avaliar em 3 das pacientes (10,7%), numa cadela por se encontrar comatosa e nos outras duas por demonstrarem agressividade.

Tabela 2- Valores médios de parâmetros do exame físico

Parâmetro do exame físico	Media ± erro padrão
FR	32,1 ± 2,8 rpm
FC	112,2 ± 8,6 bpm
Temperatura retal	38,6 ± 0,1 °C

Tabela 3- Alterações observadas no exame físico

Alteração dos parâmetros de exame físico	n	%
Taquipneia	14	50
Taquicardia	2	7,1
Mucosas pálidas	7	25%
Mucosas hiperémicas	2	7,1
Mucosas cianóticas	1	3,6
Ligeira desidratação (< 5%)	6	21,4
Desidratação entre 6 a 8%	1	3,6
Pulso femoral fraco	2	7,1
Aumento do TRC	2	7,1
Febre	6	21,4
Postura cifótica	7	25%
Palpação abdominal dolorosa generalizada	15	53,6
Palpação abdominal dolorosa focal	1	3,6

3. Sinais clínicos

Os sinais clínicos registados incluíram: anorexia (n=26; 92,9%), prostração (n=26; 92,9%), corrimento vulvar (n= 16; 57,1%) (Figura 5), polidipsia associada a poliúria (n=17; 60,7%), edema vulvar (n=14; 50%) (Figura 4), vômito (n=13; 46,4%) e diarreia (n=4; 14,3%).

O corrimento vulvar, quando presente, variou de mucoide a sanguíneo-purulento.

Figura 4- Edema vulvar



Figura 5- Corrimento vulvar sanguíneo-purulento



4. Historial reprodutivo

A distribuição da população em relação ao número deaios por ano está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4- Distribuição da população em relação ao número deaios por ano

Número deaios por ano	Número de animais	Porcentagem
1	3	10,7
2	17	60,7
3	2	7,1
4	2	7,1
Sem conhecimento	4	14,2
Total	28	100

O intervalo entre a data do último aiao até ao diagnóstico variou entre os 3 meses a uma semana (Tabela 5).

Tabela 5- Distribuição da população quanto ao período de tempo decorrido desde o último aiao

Intervalo entre o último aiao e o diagnóstico	Número de animais	Porcentagem
3 meses	1	3,6
2 meses	8	28,5
1 mês e meio	4	14,3
1 mês	10	35,7
1 semana	1	3,6
Sem conhecimento	4	14,3
Total	28	100

A maioria das cadelas não tinha historial clínico de piómetras anteriores, com exceção de 2 cadelas (7,1%).

Quanto à administração de progestagénios, o panorama foi consensual, não tendo sido administrados a nenhuma cadela.

5. Fase do ciclo éstrico

Apenas foram incluídos dados de animais que não se encontravam em estro ou pró-estro. Exemplos de duas citologias vaginais de animais com piómetra aberta encontram-se nas figuras 6 e 7.

O valor médio da concentração de progesterona ao diagnóstico foi de $5,3 \pm 1,2$ ng/ml, sendo que o valor mínimo foi de 0,2 ng/ml e o valor de máximo foi de 23,9 ng/ml.

Figura 6 - Citologia vaginal num caso de piómetra aberta associada a corrimento purulento

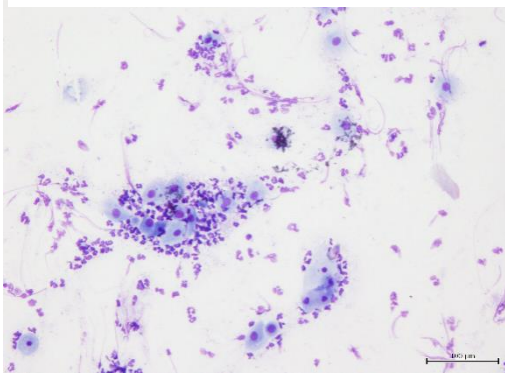
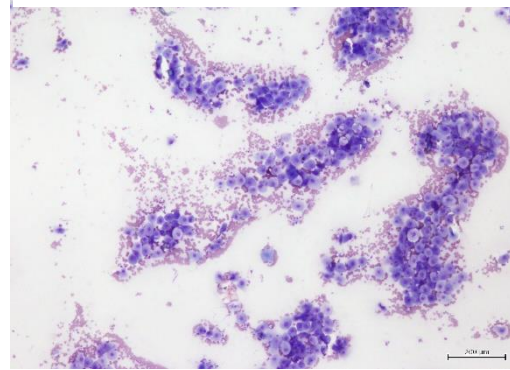


Figura 7 - Citologia vaginal num caso de piómetra aberta associada a corrimento sanguíneo-purulento



6. Caracterização da piómetra

A piómetra foi classificada como aberta em 16 animais (57,1%) e fechada em 12 animais (42,9%) (Figura 8). A concentração de progesterona no grupo com piómetra aberta foi de $2,7 \pm 0,7$ ng/ml (0,2 a 10,4 ng/ml). No grupo com piómetra fechada foi de $9,7 \pm 2,7$ ng/ml (1,1 a 23,9 ng/ml).

Nos casos de piómetra aberta, o início do corrimento vulvar variou entre 1 a 30 dias antes da consulta.

As bactérias de Gram-negativo foram os agentes isolados com maior frequência a partir do conteúdo intrauterino, com *Escherichia coli* a ser isolada em 57,1 % dos casos (Tabela 6)

Figura 6- Útero de cadela de 9 anos, com piómetra fechada



Tabela 6- Frequência das espécies bacterianas isoladas de úteros com piômetra

Agente	Porcentagem de casos (%) (n=28)	N
<i>Escherichia coli</i>	57,1	16
<i>Enterobacter</i> sp.	14,3	4
<i>Klebsiela</i> sp.	10,7	3
<i>Citrobacter</i> sp.	3,6	1
<i>Proteus</i> sp.	3,6	1
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,6	1
<i>Enterococcus</i> sp.	3,6	1
<i>Streptococcus</i> sp.	3,6	1

Em 12 cadelas, os ovários apresentavam estruturas quísticas (42,9%) (Figura 9), das quais 6 tinham ação estrogénica no epitélio vaginal. Em 4 cadelas observou-se rotura uterina (14,3%) (Figura 10), em 5 (17,9 %) foi observado presença de líquido livre abdominal e noutra cadela apesar da ausência de líquido existia uma marcada reatividade do omento. Em todas estas, registou-se crescimento bacteriano na zaragatoa extra-uterina.

O conteúdo uterino variou entre purulento (n=4; 14,3%), mucopurulento (n=2; 7,1%), sanguinolento (n=5; 17,9%) e sanguíneo-purulento (n=17; 69,7%) (Figura 11).

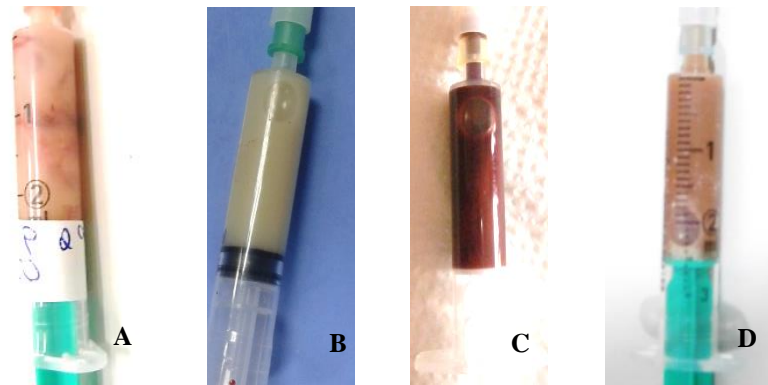
Figura 8- Rotura uterina



Figura 7- Ovário com estruturas quísticas e corpos lúteos



Figura 9- Exemplos de diferentes aspetos do conteúdo uterino



Legenda: A- Mucopurulento; B- Purulento; C Sanguinolento; D- Sanguíneo-purulento

6.1 Análise histopatológica

Para a avaliação histopatológica, as cadelas foram divididas em dois grupos de acordo com a bactéria isolada: grupo de piómetras por *E. coli* (n=16) e grupo de piómetras por outras bactérias (n=12). A caracterização histopatológica do útero encontra-se descrita na Tabela 9 e alguns exemplos das alterações histopatológicas descritas estão representados na Figura 12. Não se observaram diferenças significativas nos diferentes parâmetros avaliados entre grupos, exceto no caso da presença de hemorragia focal no endométrio ($p = 0,027$), sendo mais frequentemente verificada no grupo de piómetras por *E. coli*.

6.1.1 Cadelas com piómetra por *E. coli*

As alterações histopatológicas de ovários e útero e descrição do conteúdo das glândulas endometriais encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7- Avaliação histopatológica dos ovários e útero em piómetras por *E. coli*

	n	%	Observações		
Ovários			Ambos classificados como adenocarcinoma papilar bilateral		
Quistos	6	37,5			
Tumor	2	12,5			
Piómetra				n	%
Hiperplásica	10	62,5	Aberta	9	56,2
Atrófica	6	37,5	Fechada	7	43,8
Conteúdo das glândulas edometriais					
Neutrófilico e mucinoso	13	81,3			
Neutrófilico	2	12,5			
Sero-hemorrágico	1	6,3			

6.1.2. Animais com piómetra por outros agentes

Alterações no ovário, tipo de piómetra e conteúdo das glândulas endometriais encontram-se descritas na Tabela 8.

Tabela 8- Avaliação histopatológica de alterações ováricas e uterinas em piômetras por outras bactérias

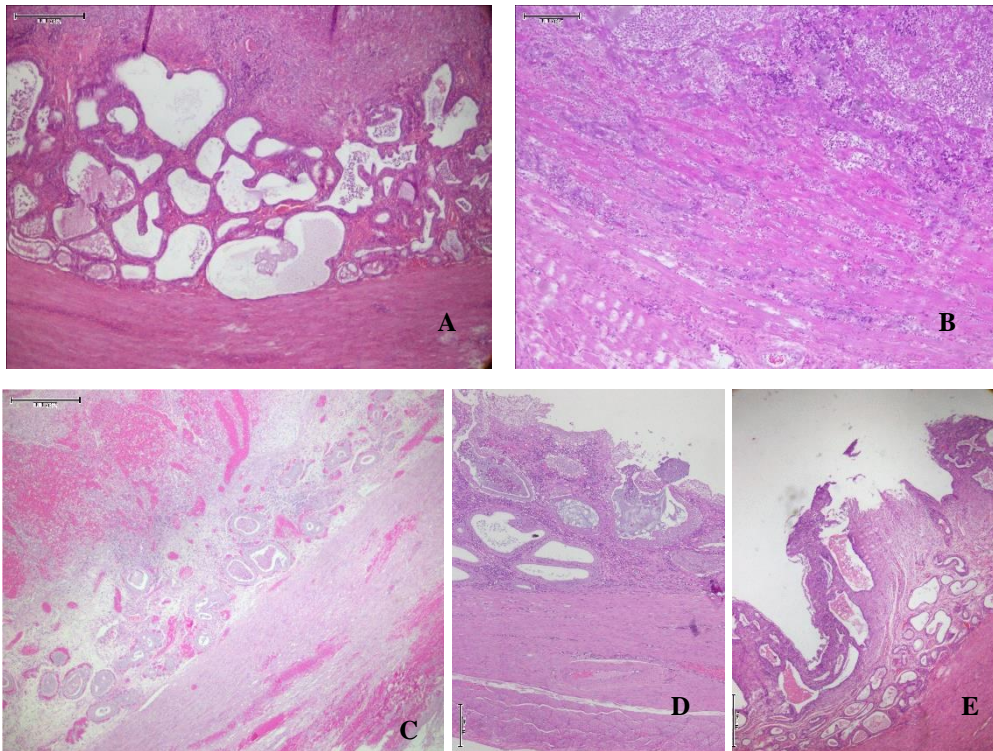
	n	%			
Ovários			Observações		
Quistos	6	50	Três classificados como adenocarcinoma papilar, 2 bilaterais e 1 unilateral; um Adenoma papilar bilateral		
Tumor	4	33,3			
Piômetra				n	%
Hiperplásica	8	66,7	Aberta	8	66,7
Atrófica	4	33,3	Fechada	4	33,3
Conteúdo das glândulas endometriais					
Neutrofilico e mucinoso	8	66,7			
Neutrofilico	2	16,7			
Neutrofilico e hemorrágico	2	16,7			

Tabela 9- Alterações histopatológicas observadas em úteros de cadelas com piômetra por *E. coli* e piômetras por outras bactérias

Critérios de avaliação	P. <i>E. coli</i>	n	P. O (%)	n
	(%)			
Destruição do epitélio luminal	100	16	91,7	11
HQE	75	12	66,7	8
Necrose difusa do endométrio	37,5	6	41,7	5
Necrose focal do endométrio	62,5	10	58,3	7
Hemorragia difusa no endométrio	18,8	3	50	6
Hemorragia focal no endométrio	75	12	33,3	4
Adenomiose	31,3	5	16,7	2
Necrose difusa do miométrio	12,5	2	16,7	2
Necrose focal do miométrio	43,8	7	41,7	5
Hemorragia difusa do miométrio	6,3	1	0	0
Hemorragia focal do miométrio	31,3	5	50	6
Metrite	93,8	15	83,3	10

Legenda: P. *E. coli* – Piômetras por *E. coli* (n=16); P. O.- Piômetras por bactérias que não *E. coli* (n=12)

Figura 10- Exemplos de alterações histopatológicas em úteros de cadelas diagnosticadas com piômetra, cortes histológicos do útero corados com H&E.



Legenda: A- Hiperplasia quística do endométrio (40x); B- Infiltração de células de reação inflamatória no miométrio (100x); C- Extravasão de sangue no endométrio e miométrio (40x); D-Destruição das glândulas apicais (40x); E- Destruição geral do endométrio (40x)

6.2. Leucograma

Foram excluídos desta análise 2 animais nos quais não foram feitas análises pré-cirúrgicas (n=26). A contagem diferencial de neutrófilos e quantificação de basófilos foi feita em 11 e 23 animais, respectivamente. Os resultados das médias e valores de referência são apresentados na Tabela 10 e a frequência relativa e absoluta das alterações registradas na Tabela 11.

Tabela 10- Resultados médios dos diferentes parâmetros do leucograma

Parâmetro hematológico	n	Média ± erro-padrão	Valores de referência
Leucócitos totais (x10 ³ /μL)	26	27,2 ± 2,5	6 – 17
Neutrófilos totais (/μL)	26	22630 ± 2062	3000 – 11800
Neutrófilos não segmentados (/μL)	11	4874 ± 1448	0 – 300
Neutrófilos segmentados (/μL)	11	17739 ± 3484	3000 – 11500
Linfócitos (/μL)	26	2790 ± 303	1000 – 4800
Monócitos(/μL)	26	1931 ± 404	150 – 1350
Eosinófilos (%)	26	1,2 ± 0,3	2 – 10
Basófilos (/μL)	23	10,9 ± 10,9	Raros

Tabela 11- Alterações no leucograma no grupo de animais com piómetra por *E. coli* e no grupo de piómetras por outros agentes

Alteração hematológica	n	Cadelas com alteração		n	P. <i>E.coli</i>		N	P. O	
			%			%			%
Leucocitose	26	20	76,9	15	11	73,3	11	9	81,8
Neutrofilia	26	22	84,6	15	13	86,7	11	9	81,8
Desvio à esquerda	11	9	81,8	8	6	75,0	3	3	100,0
Monocitose	26	9	34,6	15	6	40,0	11	3	27,3
Linfocitose	26	3	11,5	15	2	13,3	11	1	9,1
Linfopénia	26	2	7,7	15	1	6,7	11	1	9,1
Basofilia	23	1	4,3	14	0	0	9	1	11,1

Legenda: P. *E. coli* – Piómetras por *E. coli*; P. O.- Piómetras por outras bactérias que não *E. coli*

6.3. Hemograma e contagem plaquetária

Foram também excluídos desta análise os 2 animais que não efetuaram análises pré cirúrgicas (n=26). Os resultados médios e a frequência das alterações registadas de acordo com os grupos de animais com piómetra por *E. coli* ou por outros agentes encontram-se descritos nas Tabelas 12 e 13, respetivamente.

Anemia normocítica, normocrómica, foi observada em cerca de 6 cadelas, tendo estas sido classificadas como não regenerativas. Vinte animais (64,5%) apresentaram valores de hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) dentro do normal. Apenas duas cadelas com anemia, apresentaram aumento do VCM e sinais de regeneração da linha eritrocitária na observação do esfregaço sanguíneo, tendo-se considerado que nestes casos se tratava de uma anemia regenerativa. Numa cadela, a contagem de eritrócitos, Hb, Hematócrito, VCM e HCM estavam aumentadas.

Agregação plaquetária foi a característica mais frequentemente mencionada como observação nos esfregaços sanguíneos, seguida de anisocitose eritrocitária, e ainda observações esporádicas de policromasia eritrocitária, agregação leucocitária, presença de linfócitos reativos e macroplaquetas.

Tabela 12- Resultados médios dos diferentes parâmetros do eritrograma e contagem de plaquetas

Parâmetro hematológico	Média ± erro-padrão	Valores de referência
Hematócrito (%)	41 ± 1,7	37 – 55
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	6,2 ± 0,2	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/dL)	12,4 ± 0,5	12 – 18
VCM (fl)	66,4 ± 1,2	60 – 77
HCM (pg)	22,5 ± 0,3	19,5 – 24,5
CHCM (g/dL)	34,1 ± 0,4	32 – 36
Plaquetas (x10 ³ /μL)	273,2 ± 29,4	200 – 500

Tabela 13- Alterações no eritrograma e contagem de plaquetas no grupo de animais com piómetra por *E. coli* e no grupo piómetra por outros agentes

Alteração hematológica	Piómetras com alteração (n=26)	%	P. <i>E. coli</i> (n=15)	%	P.O (n=11)	%
Anemia não regerativa	6	23,1%	4	26,7%	2	18,2%
Anemia regerativa	2	7,7%	1	6,7%	1	9,1%
Trombocitopénia	6	23,1%	3	20 %	3	27,3%
Trombocitose	2	7,7%	1	6,7%	1	9,1%

Legenda: P. *E. coli* – Piómetras por *E. coli*; P. O.- Piómetras por outras bactérias que não *E. coli*

6.4. Bioquímicas séricas

Na Tabela 14, encontram-se os resultados médios e valores de referência para os parâmetros bioquímicos avaliados. Os resultados das análises bioquímicas séricas dos animais que apresentaram alterações estão descritos na Tabela 15.

Tabela 14- Resultados médios dos parâmetros bioquímicos séricos.

Parâmetro bioquímico	n	Média ± erro-padrão	Valores de referência	Unidades
Proteínas totais	13	7,7 ± 0,3	5,2 – 8,2	g/dL
Albumina	19	2,7 ± 0,1	2,2 – 3,5	g/dL
FAS	22	150,8 ± 24,7	0 – 200	U/L
ALT	23	69,6 ± 17,9	0 – 130	U/L
Ureia	25	23,9 ± 3,9	12 – 56	mg/dL
Creatinina	26	0,88 ± 0,06	0,62 – 1,64	mg/dL
Glucose	21	87,7 ± 4,6	59 – 157	mg/dL

Tabela 15- Distribuição de alterações bioquímicas entre grupo de animais com piômetra por *E. coli* e piômetra por outros agentes

Alteração bioquímica	n	Cadelas com alteração	%	P. <i>E. coli</i>	%	P.O	%
Hiperproteinémia	13	4	30,8%	3	75%	1	25%
Hiperalbuminémia	19	1	5,3%	0	0%	1	100%
Hipoalbuminémia	19	3	15,8%	1	33,3%	2	66,7%
Aumento da FAS	22	5	22,7%	4	80%	1	20%
Aumento da ALT	23	4	17,4%	2	50%	2	50%
Aumento da ureia	25	1	4,0%	0	0%	1	100%
Diminuição da ureia	25	5	20,0%	2	40%	3	60%
Aumento da creatinina	26	1	3,8%	1	100%	0	0%
Diminuição da creatinina	26	4	15,4%	2	50%	2	50%
Hipoglicémia	21	2	9,5%	2	100%	0	0%

Legenda: P. *E. coli* – Piômetras por *E. coli*; P. O.- Piômetras por outras bactérias que não *E. coli*

6.5 Mortalidade

Ainda durante o período de hospitalização 2 cadelas acabaram por morrer, sendo a taxa de mortalidade de 7,1%.

6.6 Morbilidade

A média de período de hospitalização foi de $2,1 \pm 0,3$ dias, excluindo os dois animais que morreram (n=26) e variou entre 1 a 8 dias após a cirurgia. O grupo de cadelas com peritonite confirmada por cultura bacteriana apresentou um período de hospitalização de $5,5 \pm 2,3$ dias, que foi superior aos $1,6 \pm 0,7$ dias do grupo sem peritonite ($p < 0,05$).

Quanto ao período de hospitalização e o tipo de piômetra não se registaram diferenças significativas ($p > 0,05$)

No nosso estudo, nenhum dos parâmetros avaliados pôde ser considerado como marcador para presença de peritonite, levando também a um maior período de hospitalização: temperatura, dor abdominal, alteração do TRC, contagem de leucócitos, contagem total de neutrófilos, valor de hematócrito e concentração de glucose. Porém, utilizando um teste de qui

quadrado, quando comparadas contagens de leucócitos alteradas ou dentro dos valores de referência, as últimas estiveram relacionadas com a presença de peritonite ($p=0,01$), mas não com o período de hospitalização ($p > 0,05$). Os tipos de piómetra, aberta ou fechada e hiperplásica ou atrófica, também não estiveram associadas ao aparecimento de peritonite. Contudo, verificou-se uma diferença significativa em relação à idade e a presença de peritonite ($p = 0,02$), sendo a média de idades para os animais com peritonite de $10,6 \pm 0,4$ anos e para os animais sem infecção no peritoneu de $8,4 \pm 0,6$ anos.

7. Avaliação do aparelho urinário

7.1. Análise de Urina tipo II

A análise de urina tipo II foi realizada apenas em 27 animais, uma vez que numa cadela não foi possível recolher o volume necessário de urina, durante a cirurgia.

7.1.1. Exame físico

A cor da urina variou entre amarelo ($n = 16$), amarelo claro ($n = 4$) e escuro ($n = 7$). Quanto ao aspeto, este foi classificado como turvo ($n = 11$), ligeiramente turvo ($n = 6$) e translucido ($n = 10$). A presença de depósito foi verificada em 17 amostras e cheiro considerado fétido em 8 casos. Em relação ao pH, 11 amostras de urina (40,7%) apresentaram pH igual ou superior a 7,5 e as restantes amostras assumiam valores normais, entre 5,5 e 7,5 (59,3%). No que diz respeito à densidade urinária (DU), duas amostras foram classificadas como isostenúricas (7,4%) e as restantes 25 (92,6%) foram classificadas como hiperestenúricas, com 4 (14,8%) a apresentarem uma DU superior a 1045.

7.1.2. Exame químico

Na avaliação química não foram encontradas alterações nos parâmetros urobilinogénio, corpos cetónicos e bilirrubina. Duas cadelas apresentaram glucosúria (7,4%) e apenas uma revelou presença de nitritos (3,7%). Os resultados da avaliação da presença de eritrócitos e de proteína pela tira de urina estão descritos nas Tabelas 16 e 17, respetivamente.

Tabela 16- Avaliação da presença de eritrócitos na urina pela tira de urina

Eritrócitos	Número de animais (n)	Porcentagem (%)
Negativo	16	59,3
Indícios	7	25,9
25 cel/ μ l	1	3,7
80 cel/ μ l	1	3,7
200 cel/ μ l	2	7,4

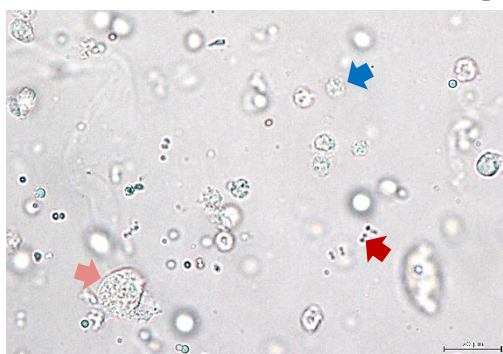
Tabela 17- Avaliação da presença de proteína na urina pela tira de urina

Concentração de proteína urinária	Número de animais (n)	Porcentagem (%)
Negativo	3	11,1
15 mg/dl	2	7,4
30 mg/dl	10	37,0
100 mg/dl	7	25,9
300 mg/dl	5	18,5

7.1.3. Exame microscópico de sedimento

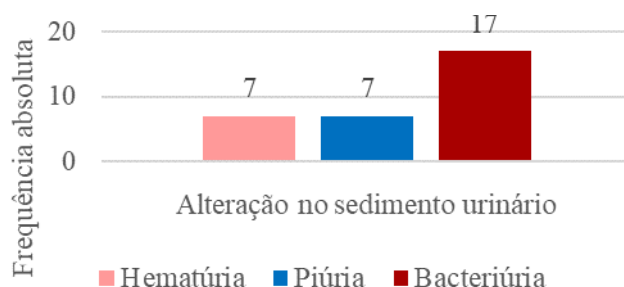
A avaliação de presença de eritrócitos, leucócitos e bactérias no sedimento urinário (Figura 13) encontra-se descrita no Gráfico 1. Apenas foram encontrados cristais de estruvite em 5 amostras, com quantificações que variaram entre raros a 2+. Foram identificados cilindros granulosos em 7 animais, com quantificações que variaram de raros a 2 - 4 células por campo (400 \times). A avaliação de células epiteliais variou desde ausentes a 2 - 5 células por campo (40 \times), contudo a descrição mais frequente foi de raras células epiteliais de descamação e ainda presença de aglomerados de células de transição. Lipúria foi observada em 74,1% (n=20) dos animais.

Figura 11- Sedimento urinário ativo com leucocitúria e presença bactérias (400 \times)



Legenda: Seta rosa- Célula epitelial de transição; seta azul- Leucócito; Seta Vermelha- Bactérias

Gráfico 1- Frequência absoluta de hematúria, piúria e bacteriúria no sedimento urinário



7.2. Rácio UPC

A análise rácio UPC foi realizada em 26 animais, encontrando-se aumentado em 14 animais (53,8%), (Tabela 18). O cruzamento de dados obtidos a partir do rácio UPC, da urianálise e urocultura revelou que apenas dois dos rácios UPC alterados seriam valorizáveis (7,7%).

Tabela 18 - Resultados médios de concentração de proteína e creatinina urinária e rácio UPC

Parâmetro	N	Média ± erro-padrão	Valores de referência
Proteína urinária	26	122,0 ± 23,00 mg/dL	
Creatinina urinária	26	146,8 ± 19,20 mg/dL	
Rácio UPC total	26	1,41 ± 0,40	
Rácio UPC negativo	6	0,16 ± 0,01	< 0,2
Rácio UPC incipiente	6	0,32 ± 0,02	0,2 – 0,5
Rácio UPC significativo	14	2,4 ± 0,61	>0,5

7.3. Concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA)

As concentrações séricas de SDMA foram mensuradas nos 28 animais, não tendo havido diferenças significativas entre grupos. As concentrações médias de SDMA foram $16,5 \pm 3,2$ $\mu\text{g/dL}$ e 11 animais (39,3%) apresentaram valores superiores a 14 $\mu\text{g/dL}$.

Utilizou-se um teste U de Mann-Whitney de amostras independentes para testar se existiam alterações nas concentrações de SDMA entre o grupo de animais com piómetra por *E. coli* e grupo de animais com piómetra por outros agentes, não se tendo verificado alterações significativas ($p = 0,717$). Não foram encontradas correlações significativas entre a concentração de SDMA e a idade, rácio UPC, e as concentrações séricas de ureia e creatinina (Tabela 19).

Dos animais com rácio UPC negativo (n=6), 2 tinham aumento do SDMA (33,3%); no grupo de animais cujo rácio UPC foi considerado incipientes (n=6), 3 tinham aumento de SDMA (50%); e dos animais cujo rácio se encontrava alterado (n=14) 7 (50%) tinha valores de SDMA superiores aos de referência. Os dois animais com rácio UPC valorizável não tinham alterações das concentrações de SDMA. Os dois animais azotémicos tinham valores aumentados de SDMA.

Tabela 19- Estudo de correlação utilizando o coeficiente de Spearman entre os vários parâmetros estudados e concentrações de SDMA

	Parâmetros	Valor de <i>p</i>
SDMA	Idade	0.2045
	Rácio UPC	0.3761
	Creatinina	0.9365
	Ureia	0.2706
	Densidade urinária	0.6338

8. Resultados microbiológicos

8.1. Urocultura

Foram efetuadas 26 uroculturas, uma vez que, em 2 animais não foi possível recolher o volume de urina para todas as avaliações que envolviam amostras de urina. Embora tenha sido observado crescimento bacteriano em 8 uroculturas, somente 6 (21,4%) apresentaram contagens de unidades formadoras de colónias (UFC) superiores a 1000 UFC/ml, podendo afirmar-se que existia infeção do trato urinário.

Nos dois casos em que as contagens de UFC não foram significativas o agente isolado foi *E. coli*. Nos animais em que as contagens de UFC foram superiores, as bactérias isoladas foram *E. coli* (n=4) (Figura 14), *E. coli* e *Streptococcus* sp (n=1) e um isolado foi classificado como pertencente à família *Enterobacteriaceae* não tendo sido possível concluir o seu género ou espécie.

Figura 12- Urocultura positiva, crescimento de *E. coli* em meio de agar suplementado com sangue de carneiro



8.2. Zaragatoas extra-uterinas

Esta avaliação foi feita nos 28 animais, tendo existido crescimento bacteriano em 7 casos, 6 dos quais com sinais macroscópicos de peritonite.

Em 5 amostras foi identificado *E. coli*, numa *Streptococcus* sp. e em outra *Enterobacter* sp. O isolamento de *E. coli* nas zaragatoas extra-uterinas foi independente do fenótipo, mas não do grupo filogenético associado a esta bactéria, já que todas pertenciam ao grupo B2.

8.3. Zaragatoas fecais

As zaragatoas fecais foram feitas nas 28 cadelas, tendo sido registado crescimento bacteriano em 27. Em 4 zaragatoas não foi possível identificar *E. coli*, tendo sido isolado *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Proteus* sp. e duas bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

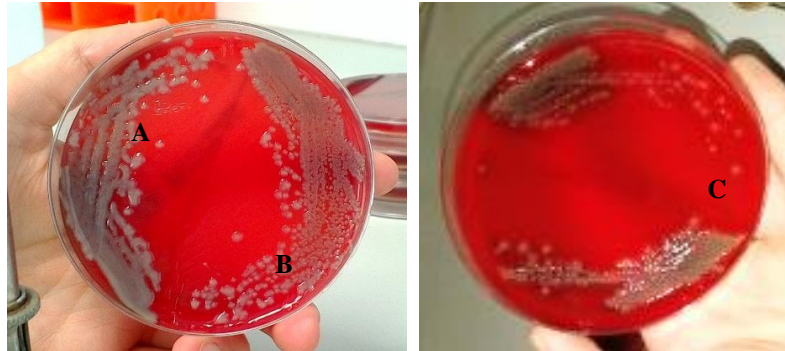
9. Caracterização dos isolados de *E. coli*

Foram obtidos um total de 383 isolados dos quais 160 foram de origem uterina, 35 provenientes de amostras de urina, 42 de amostras extra-uterinas e 146 origem fecal.

9.1. Fenótipos

O fenótipo não hemolítico (NH) foi mais frequente nos isolados extra-uterinos e urinários. Nos isolados fecais e intra-uterinos, os fenótipos hemolítico e não hemolítico apresentaram frequência semelhante. Em todos os tipos de isolados o fenótipo hemolítico predominou, exceto nos de origem fecal, onde o fenótipo hemolítico predominou. O fenótipo mucóide (M) apenas não foi encontrado nos isolados de urina (Tabela 20). Exemplos dos aspetos macroscópicos dos diferentes fenótipos de *E. coli* são apresentados na Figura 15.

Figura 13- Aspetto morfológico de colônias de *E. coli* com diferentes fenótipos em meio de agar suplementado com sangue de carneiro



Legenda: A- não hemolítico e mucoide (NH/M);
B- não hemolítico e não mucoide (NH/ NM); C- hemolítico e não mucoide (H/ NM)

Tabela 20- Frequência absoluta e relativa dos diferentes fenótipos nos diferentes grupos de isolados

Origem dos Isolados	Fenótipos								Frequência absoluta
	H/M	%	H/NM	%	NH/M	%	NH/NM	%	
UT	3	1,9	71	44,4	4	2,5	82	51,3	160
EU	0	0,0	12	28,6	2	4,8	28	66,7	42
Urina	0	0,0	10	28,6	0	0,0	25	71,4	35
Fecal	2	1,4	78	53,4	0	0,0	66	45,2	146
Total	5		171		6		201		383

Legenda: UT- isolados de conteúdo uterino; EU- isolados extra-uterinos; UT e fecal: %H e %NH semelhante ($p > 0,05$) EU e urina: %NH < %H ($p < 0,01$)

9.2. Grupo Filogenético

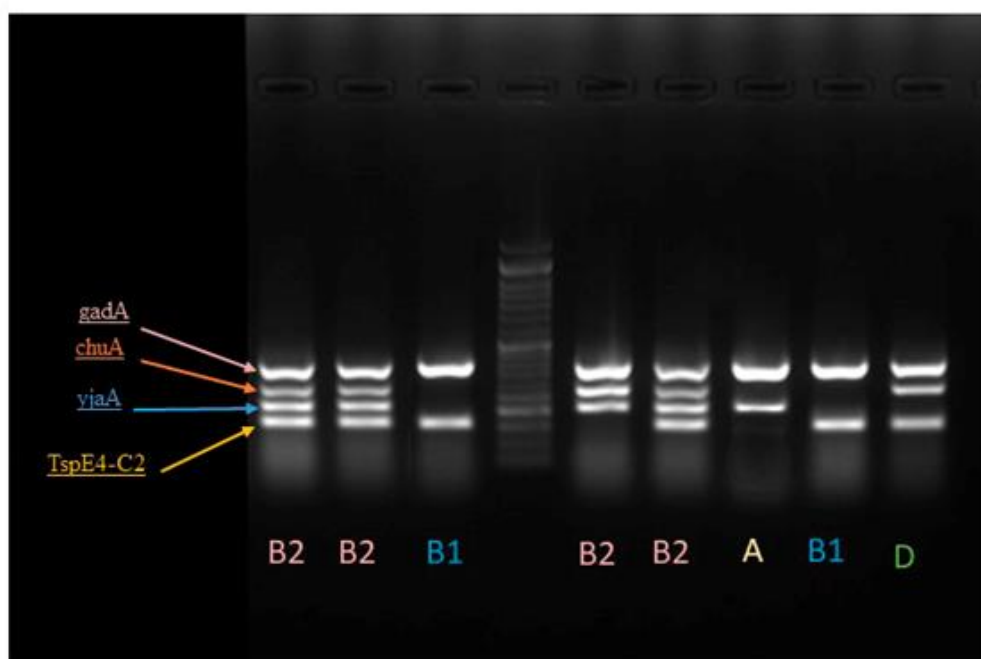
Independentemente da origem dos isolados, o grupo filogenético mais prevalente foi o grupo B2. Os grupos filogenéticos D e A foram apenas encontrados nos isolados de origem fecal (F) (Figura 16). O grupo filogenético B1 apresentou uma distribuição semelhante entre os isolados fecais e urinários (U), não tendo sido observado nos isolados extra-uterinos (EU) (Tabela 21).

Tabela 21- Distribuição dos isolados por grupo filogenético e grupo de origem de isolados

GF	Origem dos isolados								Frequência Absoluta	%
	UT	%	EU	%	U	%	F	%		
A	0	0	0	0	0	0	10	6,8	10	2,6%
B1	10	6,2	0	0	2	5,7	18	12,3	30	7,8%
B2	150	93,8	42	100	33	94,3	116	79,5	341	89,0%
D	0	0	0	0	0	0	2	1,4	2	0,5%
Total	160	41,8	42	11,0	35	9,1	146	38,1	383	100%

Legenda: GF- grupo filogenético; UT- isolados de conteúdo uterino; EU- isolados extra-uterinos; U- Isolados de urina; F- isolados fecais

Figura 14- PCR de determinação do grupo filogenéticos dos isolados: UT1 e F8 cadela 2, UT5 cadela 7, UT4 cadela 11, F9 da cadela 13; F3 cadela 12; F8 cadela 30 e F4 cadela 33



9.3. Rep PCR

Dos 383 isolados obtidos foram identificados 20 clones, com uma média de 1,25 clones/cadela. Na maioria das cadelas, os isolados de *E. coli* pertenciam somente a um clone (81,3%) e ao grupo filogenético B2 (Tabela 22), independentemente da origem das amostras.

Tabela 22- Representação da associação entre grupo filogenético dos diferentes isolados e número de clones de *E. coli* presente por animal.

Identificação do paciente	UT	F	EU	U	Nº de Clones	Nº de Isolados
2	B2 (10)	B2 (10)	*	*	1	20
11	B2 (10)	B2 (10)	*	*	1	20
13	B2 (10)	B2 (10)	*	*	1	20
23	B2 (10)	B2 (10)	*	*	1	20
26	B2 (10)	B2 (10)	*	*	1	20
30	B2 (10)	B2 (8) B1 (2)	*	*	3	20
34	B2 (10)	B2 (10)	*	*	1	20
38	B2 (10)	B2 (10)	*	*	1	20
17	B2 (10)	B2 (10)	B2 (2)	*	1	22
33	B2 (10)	B2 (8) D (2)	B2 (10)	*	2	30
12	B2 (10)	A (10)	B2 (10)	*	2	30
3	B2 (10)	B2 (10)	*	B2 (10)	1	30
14	B1(10)	B1(10)	*	B1 (2)	1	22
36	B2 (10)	B2 (10)	*	B2 (10)	1	30
7	B2 (10)	B2 (6)	B2 (10)	B2 (3)	1	29
1	B2 (10)	*	B2 (10)	B2 (10)	1	30

Legenda: UT- isolados de conteúdo uterino; EU- isolados extra- uterinos; U- Isolados de urina; F- isolados fecais; * - Isolados sem crescimento

DISCUSSÃO

A piómetra é uma das doenças mais comuns em cadelas intactas durante a fase de diestro. Embora após a OVH, a maioria das cadelas tenha uma recuperação rápida, existem complicações associadas com a doença que podem comprometer essa recuperação (Jitpean *et al.*, 2014). Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a presença de duas das complicações mais frequentes: peritonite e ITU. Ambas as complicações apresentaram uma frequência semelhante (25% para a peritonite e 21,4% para a ITU) e superior ao observado num trabalho recente (12,4% para a peritonite e 5,3% para a ITU) (Jitpean *et al.*, 2014). Esta diferença poderá relacionar-se com a idade das cadelas, o tipo de piómetra, as bactérias isoladas ou com a precocidade do diagnóstico.

A média de idades das cadelas incluídas neste estudo foi de 8,9 anos, o que vai de encontro à ideia de que a piómetra é uma doença de cadelas de meia idade a geriátricas (Küplülü, Vural, Demirel, Polat & Akçay, 2009; Whitehead, 2008; Gibson *et al.*, 2013; Jitpean *et al.*, 2014).

Ao contrário do que foi reportado no trabalho de Jitpean e colaboradores. (2014), no nosso estudo a idade foi um fator de risco para a presença de peritonite, o que poderá significar que animais mais velhos apresentam maior risco de desenvolver esta complicação, que está associada a uma recuperação mais prolongada. De facto, a presença de peritonite esteve associada a um prolongamento da hospitalização, tal como observado no estudo de Jitpean e colaboradores (2014). No nosso estudo, o tipo de piómetra não esteve associada à presença de peritonite nem ao período de hospitalização, o que sugere que embora as piómetras fechadas estejam associadas a uma doença mais grave no momento do diagnóstico, não têm pior prognóstico (Jitpean *et al.*, 2017).

A associação entre peritonite e alguns marcadores como temperatura, dor abdominal, alteração do TRC não foi estabelecida no nosso estudo, ao contrário do observado no trabalho de Jitpean e colaboradores (2014). No entanto, foi possível associar as contagens de leucócitos dentro dos valores de referência com a presença de peritonite. Este resultado poderá demonstrar que em termos de prognóstico, a presença de leucocitose poderá ser favorável quando comparada com os valores normais, já que estes valores poderão refletir a transição entre leucocitose e leucopénia. A leucopénia é considerada como o marcador mais importante de peritonite, com um risco de 18 vezes para o aparecimento desta complicação (Jitpean *et al.*, 2014).

O intervalo de tempo entre o último cio e o diagnóstico da piómetra variou entre uma semana a 3 meses, não tendo havido relação entre o momento do diagnóstico e a ocorrência de peritonite. Intervalos semelhantes foram documentados por outros autores (Küplülü *et al.*,

2009; Pretzer, 2008; Smith, 2006). A contaminação do útero ocorre durante o pró-estro e o estro, quando o cérvix está aberto, e durante o diestro as bactérias permanecem num ambiente privilegiado para a colonização e proliferação bacteriana acabando por causar infeção (Feldman & Nelson, 2004). Embora a maioria das piómetras tenha sido diagnosticada em diestro, a concentração sérica de progesterona variou entre 0,2 e 23,9 ng/ml, com as piómetras abertas a apresentarem concentrações de progesterona mais baixas. Durante a infeção uterina há um aumento da produção de prostaglandinas pelas células do endométrio e pelas células de reação inflamatória, principalmente de PGF2 α (Silva *et al.*, 2010). Este aumento vai provocar uma luteólise precoce do corpo lúteo, induzindo a abertura do cérvix antes do diestro estar finalizado. Cerca de 60% das cadelas com piómetra possuem concentrações de progesterona inferiores a 1ng/mL (Fieni, 2006; England, Freeman & Russo, 2007).

Embora *E. coli* tivesse sido isolada em 57% dos casos de piómetra, esta percentagem ficou muito abaixo do observado em outros trabalhos do grupo de Reprodução (Machado, 2017; Mateus *et al.*, 2013). No entanto, a maioria das bactérias isoladas são de Gram negativas, tal como observado em outros trabalhos (Coggan *et al.*, 2008; Bigliardi *et al.*, 2004). Esta variação poderá estar relacionada com os diferentes ambientes onde os animais incluídos habitam e com os diferentes padrões alimentares que afetam a microbiota intestinal.

Em todos os casos de peritonite, as bactérias isoladas nas zaragatoas extra-uterinas foram da mesma espécie das bactérias isoladas no útero, mesmo nos animais sem rutura da parede uterina detetada macroscopicamente, o que apoia a hipótese de que possa existir translocação bacteriana através da parede uterina ou do oviduto em animais com piómetra. Nos casos de piómetra por *E. coli*, foi possível verificar que os isolados intra e extra-uterinos eram do mesmo clone.

Nos isolados intra-uterinos de *E. coli*, o fenótipo hemolítico teve uma prevalência semelhante à do fenótipo não hemolítico. Apesar de ter sido demonstrado que *E. coli* β -hemolítica está associada a metrite e a uma maior destruição do endométrio, quando comparado com *E. coli* não hemolítica (Henriques *et al.*, 2016), seria de esperar que as amostras de isolados do peritoneu apresentassem o fenótipo hemolítico, o que não se verificou.

Tal como em estudos anteriores do nosso grupo, os isolados de *E. coli* associados à piómetra são maioritariamente do grupo filogenético B2 (93,8%) (Machado 2017; Mateus *et al.*, 2013; Merino, 2013). De facto, estes isolados têm no seu genoma um elevado número de genes que codificam diversos fatores de virulência que estão presentes em alguns isolados uropatogénicos (Chen *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2014). Este facto poderá justificar a elevada prevalência de isolados B2 nas amostras de urina dos animais que

tinham ITU concomitante (94,3%). Por outro lado, os isolados de *E. coli* intra-uterinos e de ITU foram sempre do mesmo clone. No entanto, ainda está por determinar se a cistite é causa ou consequência da piómetra. O facto da maioria dos isolados de *E. coli* de origem fecal pertencerem ao grupo filogenético B2, sugere que o reto poderá funcionar como um reservatório de estirpes potencialmente patogénicas. O nosso estudo vem ainda reforçar os resultados de Lourenço (2017), que demonstrou, em cadelas saudáveis, uma associação entre a dominância clonal e o grupo filogenético B2, sugerindo que antes da ocorrência de um episódio de piómetra, a cadela pode apresentar um aumento significativo na colonização fecal e vaginal de *E. coli* deste grupo. A dominância de um só clone é clara nos nossos resultados, sendo a média de clones por cadela de 1,25 e 81,3% das cadelas tinha apenas um clone do GF B2. Isto indica que, em casos de piómetra por *E. coli*, apenas um clone se estabelece no útero, multiplica e atua como o principal agente na doença. O facto do GF B2 ser mais persistente nas amostras fecais (Lourenço 2017; Nowrouzian, Wold, & Adlerberth, 2005) justifica que passado 1 a 2 meses da entrada de *E. coli* no útero, ainda se consiga isolar o mesmo clone das fezes.

Os sinais mais comuns de doença, presentes em mais de 50% da população estudada, incluíram anorexia, prostração, corrimento vulvar, polidipsia e poliúria refletindo a gravidade da doença e o facto das piómetras serem maioritariamente provocadas por bactérias de Gram negativo (Hagman & Greko, 2005).

Nos casos de piómetra, a poliúria e a polidipsia compensatória observada raramente é associada a insuficiência renal (Jitpean *et al.*, 2014). Contudo, quando considerada a presença de lesão renal, uma vez que os sinais clínicos nomeadamente PU/PD geralmente desaparecem após a terapêutica, leva a que esta seja descrita como temporária (Heine *et al.*, 2007), de natureza aguda ou subaguda (Maddens *et al.*, 2010). Há diversos fatores que podem ser identificados como associados com a lesão renal como a diminuição da capacidade de reabsorção de cloro e sódio pela ansa de Henle, a presença de alterações nas células dos túbulos renais ou pelo aumento da insensibilidade dos túbulos renais à hormona antidiurética (ADH) devido à ação do LPS (Revisto por Mateus & Eilts, 2010; Heiene *et al.*, 200). Outros dois achados comuns de piómetra são a proteinúria e a azotémia. Tem sido sugerido que a lesão renal secundária a piómetra seja consequência da deposição de imuno-complexos a nível glomerular provocando glomerulonefrite. Consequentemente, existe extravasamento de proteínas plasmáticas, principalmente de albumina, para o filtrado glomerular conduzindo ao aparecimento de proteinúria (Zaragoza *et al.*, 2004). Um outro objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de lesão renal nestas pacientes. No nosso estudo, duas cadelas apresentaram

azotemia e 53% apresentaram proteinúria, o que vai de encontro ao observado por Maddens e colaboradores (2011). No entanto, a avaliação do rácio UPC, permitiu concluir que a proteinúria detetada apenas poderia ser atribuída a causas renais em dois animais (7,7%). Assim, em cadelas com piómetra associada a inflamação e/ou infeção concomitante do aparelho urinário, o rácio UPC poderá não ser um bom marcador de lesão renal. Heine e colaboradores (2007) reportaram que algumas das cadelas com piómetra e proteinúria grave evoluem para insuficiência renal fulminante, demonstrando a importância da investigação da fonte de proteína urinária e do acompanhamento pós-cirúrgico destas pacientes.

Alteração da função renal foi confirmada em 46,4% (n=13), detetada em 2 animais por alteração valorizável do rácio UPC e nos restantes 11 (39,3%) por alteração de SDMA, sendo que dois destes tinham também azotemia. Até à data não estão descritos trabalhos que utilizem a mensuração das concentrações séricas de SDMA para avaliação de lesão renal em cadelas com piómetra. O facto de ser um marcador específico para a função renal que não é afetado por fatores extra renais, incluindo condição corporal, idade ou doença concomitante (Hall *et al.*, 2015), torna este biomarcador particularmente conveniente para a avaliação renal em cadelas com piómetra. No nosso estudo, não houve correlação entre idade e aumento de SDMA, o que corrobora a ideia de que a lesão renal possa estar associada à piómetra e não apenas relacionada à idade, como havia sido sugerido por Heine e colaboradores (2007), para além de confirmar que este biomarcador não é alterado pela mesma. Por outro lado, os valores do rácio UPC, creatinina e ureia não mostraram correlação com a SDMA, o que está de acordo com estudos prévios que mostram que a SDMA pode detetar lesão renal mais precocemente do que a creatinina (Nabity *et al.*, 2015), e que o rácio UPC nestes pacientes não é um bom marcador. Com estes resultados compreende-se a importância da realização de testes que identifiquem a lesão renal precoce, já que esta é muitas vezes uma condição silenciosa. No entanto, no nosso estudo, não podemos excluir completamente a presença de doença renal pré-existente, uma vez que esta não foi avaliada previamente ao aparecimento de piómetra.

No nosso estudo, a maior prevalência da doença foi obtida em cadelas de raça indeterminada, contrariamente ao descrito por Egenvall e colaboradores (2001). Este facto pode ser devido a diferentes práticas de contraceção, bem como nas diferenças de raças mais populares nos diferentes países.

O risco combinado de desenvolvimento piómetra e tumor mamário, foi descrito por Jitpean e colaboradores (2012) como superior em determinadas raças, indicando que existe fatores

predisponentes que podem ser semelhantes para as duas doenças (Jitpean, *et al.*, 2012). Contudo, dos seis animais que foram diagnosticados com as duas afeções nenhum está incluído na lista de raças com maior risco apresentada por estes autores. Num estudo sueco, o risco de desenvolvimento de piómetra em cadelas inteiras até aos 10 anos foi de cerca de 25% (Egenvall *et al.*, 2001) enquanto que para tumor de mama foi de 13% (Egenvall *et al.*, 2005). Sendo doenças com um risco mais elevado em cadelas mais velhas, é natural que possam surgir no mesmo espaço temporal.

Um dos fatores que predispõem ao aparecimento de piómetra é a HQE. A persistência de quistos ováricos durante o diestro leva à produção simultânea de estrogénios e de progesterona, o que induz o aumento do número e da expressão dos recetores de progesterona nas células potencializando a ação desta (Dhaliwal *et al.* 1999; De Bosschere *et al.*, 2002). Uma das consequências desta situação é o aumento dos índices de proliferação das células das criptas glandulares e dos fibroblastos do estroma podendo estas alterações participar na génese HQE (Murta 2013). A presença de estruturas quísticas nos ovários em cerca de 42,9% dos animais suporta uma maior predisposição destes animais para desenvolvimento de piómetra, quer pela presença de HQE quer pela diminuição da imunidade uterina. O facto de somente em 6 cadelas se ter identificado ação estrogénica no epitélio vaginal, pode estar associada à dinâmica dos quistos ováricos quer em termos morfológicos quer em termos endócrinos (Arlt & Haimerl, 2016).

Contrariamente ao estudo de Coggan e colaboradores (2008), no nosso estudo não foi possível associar as alterações observadas no útero ao tipo de bactérias isoladas. que provoca lesões no tecido uterino. O fato de praticamente todas as bactérias serem de Gram negativas pode assim justificar a ausência de diferenças entre grupos. A reação inflamatória exuberante associada a esta doença, demonstrada pela presença marcada de células de reação inflamatória no útero e pelo aumento da transcrição de genes associados a quimiocinas, citocinas, extravasamento de células inflamatórias, ação antibacteriana, sistema complemento e respostas imunes inatas (Hagman, 2012) é responsável pelas alterações observadas e é comum a várias bactérias. Da mesma forma não houve diferença nos resultados do hemograma.

Uma marcada leucocitose com neutrofilia, desvio à esquerda, constituíram o leucograma mais comumente observado, o que corrobora resultados obtidos noutros estudos (Hagman, Reezigt, Bergström & Karlstam 2009; Küplülü *et al.*, 2009; Verstegen *et al.*, 2008). No nosso estudo nenhum animal apresentou leucopenia, e tal como já referido, as contagens de leucócitos normais estiveram associadas à presença de infeção do peritoneu, mas não com o período de hospitalização. No estudo de Jitpean e colaboradores (2014) a hospitalização foi

avaliada como variável qualitativa, sendo prolongada ou não e no presente estudo utilizou-se o número de dias como variável quantitativa, o que poderá justificar a diferença de resultados. A contagem de leucócitos normal poderá estar associada a uma transição entre leucocitose e leucopenia e, portanto, aparecer numa fase mais avançada da doença.

A anemia, na maioria dos casos normocítica, normocrômica e não regenerativa, foi observada em 23,1% das cadelas. Doenças inflamatórias crônicas podem provocar anemia por diminuição da disponibilidade de ferro. Os efeitos das toxinas na medula óssea, a diminuição da do tempo de semi-vida dos eritrócitos e a perda de eritrócitos para o lúmen uterino são possíveis causas adicionais para a anemia observada nas cadelas com piómetra (Hagman *et al.*, 2009). Nas cadelas em que os valores de hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume VCM, HCM e CHCM estavam dentro do normal, há que ter em conta que a sua avaliação é frequentemente complicada pela desidratação concomitante (Verstegen *et al.*, 2008), o que se verifica em 6 das cadelas consideradas sem anemia.

A contagem de plaquetas estava normal na maioria das cadelas, embora trombocitopénia tenha ocorrido em alguns casos (23,1%). Esta alteração poderá ser o resultado do aumento do consumo, diminuição da produção de plaquetas na medula óssea ou mediada por endotoxinas (Plavec *et al.*, 2006; Tsuchiya *et al.*, 1999).

No presente estudo, a deteção de lesão hepática foi pouco frequente (17,4%) e pouco significativa, quando avaliada pela determinação da ALT. Da mesma forma, o aumento das concentrações de FAS foi detetado em 22,7% dos casos. Plavec e colaboradores (2006) sugerem que a piómetra pode estar associada a uma necrose mínima dos hepatócitos como resultado da colestase intra-hepática, o que poderá justificar os nossos resultados. Biópsias hepáticas efetuadas em cadelas com piómetra evidenciaram a existência de infiltração gorda e aumento dos pigmentos biliares nos hepatócitos, consistentes com colestase intra-hepática, mas não com a existência de necrose hepatocelular extensa (Sevelius, Tidholm & Thoren, 1990).

A hiperproteinémia observada em 4 animais poderá estar associada à desidratação em dois deles e a hiperglobulinémia noutros dois (Hagman *et al.*, 2009). A hipoalbuminémia ligeira observada em 3 animais (15,8%) justifica-se por ser uma proteína de fase aguda negativa, e porque na presença de sepsis ou endotoxémia há um aumento da permeabilidade vascular o que poderá contribuir para a perda de albumina (Plavec *et al.* 2006).

CONCLUSÃO

Não foram identificados marcadores para a presença de peritonite, contudo, em termos de prognóstico, a presença de leucocitose demonstrou ser favorável quando comparada com os valores normais de leucócitos totais.

Foi frequente a presença de ITU concomitante, cujo agente identificado foi o mesmo que o responsável pela infecção uterina. A presença de proteinúria, devido a infecção e inflamação do trato urinário que surge frequentemente nestes pacientes, dificulta a avaliação da função renal com recurso à medição de rácio UPC. A utilização de SDMA revelou ser o biomarcador mais conveniente para a avaliação renal em cadelas com piómetra.

Seria pertinente estender a monitorização renal das pacientes em que foi identificada alteração de parâmetros de avaliação de função renal, de modo a compreender a extensão e o impacto da lesão renal provocada pela piómetra.

Nos casos em que o agente isolado foi *E. coli* e independentemente do local de colheita (útero, extra-uterino, bexiga e reto), o grupo filogenético mais prevalente foi o grupo B2.

Foi clara a dominância de um só clone, sugerindo que a associação entre maior dominância e maior potencial de virulência pode estar relacionada com a maior probabilidade dos clones do GF B2 causarem piómetra.

BIBLIOGRAFIA

- Alamgir, S., Volkova, N. B., & Peterson, M. W. (2006). Prognostic Value of Low Blood Glucose at the Presentation of *E. coli* Bacteremia. *The American Journal of Medicine*, 119(11), 952–957.
- Anderson, E. (2017). Electrocardiography. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult* (8a ed., vol. 1, pp. 1119-1124). St Louis, Missouri: Elsevier.
- Arlt, S. P., & Haimerl, P. (2016). Cystic ovaries and ovarian neoplasia in the female dog – a systematic review. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 3–11.
- Baldwin, K., Freeman, L. M., Grabow, M., & Legred, J. (2010). AAHA Nutritional Assessment Guidelines for Dogs and Cats.
- Bean, P., & Methods, M. T. (1999). Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1661–1669.
- Bergström, A. (2017). Pyometra and Cystic Endometrial Hyperplasia. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult* (8a ed., vol. 2, pp. 4542-4552). St Louis, Missouri: Elsevier.
- Bigliardi, E., Parmigiani, E., Cavirani, S., Luppi, A., Bonati, L., & Corradi, A. (2004). Ultrasonography and cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(3), 136–140.
- Brissot, H., Cervantes, S., Guardabassi, L., Hibber, A., Lefebvre, H., Mateus, A., Noli, C., Nuttall, T., Pomba, C. & Schulz, B. (2016). GRAM: Guidance for the rational use of antimicrobials (2nd edition)
- Chen, Y. M., Wright, P. J., Lee, C. S., & Browning, G. F. (2003). Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Veterinary Microbiology*, 94 (1), 57-69.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.
- Coggan, J. A., Melville, P. A., De Oliveira, C. M., Faustino, M., Moreno, A. M., & Benites, N. R. (2008). Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 477–483.
- Dahlem, D. P., Neiger, R., Schweighauser, A., Francey, T., Yerramilli, M., Obare, E., & Steinbach, S. M. L. (2017). Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(3), 799–804.
- Davis, H., Jensen, T., Johnson, A., Knowles, P., Meyer, R., Rucinsky, R., & Shafford, H. (2013). 2013 AAHA/AAFP Fluid Therapy Guidelines for Dogs and Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49(3), 149–159.

- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W., & Coryn, M. (2001). Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: Should the two entities be disconnected?. *Theriogenology*, 55 (7), 1509-1519.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Simoens, P., & Coryn, M. (2002). Estrogen- α and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Animal Reproduction Science*, 70 (3-4), 251-259.
- DeClue, A. E. (2017). Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult* (8a ed., vol. 1, pp. 1492-1504). St Louis, Missouri: Elsevier.
- Devey, J. J. (2013). Surgical considerations in the emergent small animal patient. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 43(4), 899-914.
- Dhaliwal, G. K., England, G. C. W., & Noakes, D. E. (1999). Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. *Veterinary Record*, 145(16), 455-457.
- Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J., & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 3108-3110.
- Egenvall, A., Bonnett, B. N., Öhagen, P., Olson, P., Hedhammar, Å., & Von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1-2), 109-127.
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B. N., Hedhammar, A., Olson, P., & Lagerstedt, A. S. (2001). Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15 (6), 530-538.
- England, G. C. W., Freeman, S. L., & Russo, M. (2007). Treatment of spontaneous pyometra in 22 bitches with a combination of cabergoline and cloprostenol. *Veterinary Record*, 160(9), 293-296.
- Englar, R. (2017). Examining the Cardiovascular and Respiratory Systems of the Dog. In *Performing the Small Animal Physical Examination* (1^a edição, pp 842-898). Ames, Iowa: Wiley Blackwell.
- Féria, C., Machado, J., Correia, J. D., Gonçalves, J., & Gaastra, W. (2001). Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 82(1), 81-89.
- Fieni, F. (2006). Clinical evaluation of the use of aglepristone with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in bitches. *Theriogenology*, 66, 1550-1556.
- Fieni, F., Topie, E., & Gogny, A. (2014). Medical treatment for pyometra in dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), 28-32.

- Fransson, B. A. (2003). Systemic inflammatory response in canine pyometra; the response to uterine bacterial infection (Tese de doutoramento). Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Suécia.
- Fransson, B. A., & Ragle, C. A. (2003). Canine pyometra: an update on pathogenesis and treatment. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 25(8), 602-612
- Gibson, A., Dean, R., Yates, D., & Stavisky, J. (2013). Open access: A retrospective study of pyometra at five RSPCA hospitals in the UK: 1728 cases from 2006 to 2011. *Veterinary Record*, 173(16), 396.
- Gilbert, R. O., Nothling, J. O. & Oettle, E. E. (1989). A retrospective study of 40 cases of canine pyometra – metritis treated with prostaglandin F2 alpha and broad – spectrum antibacterial drugs. *Journal of Reproduction and Fertility*. (39) 225-229.
- Grauer, G. G. (2016). Measurement and interpretation of proteinuria and albuminuria. Acedido em Junho. 8, 2018, de IRIS (International Renal Interest Society), disponível em <http://www.iris-kidney.com/education/proteinuria.html>
- Hagman, R. (2012). Clinical and Molecular Characteristics of Pyometra in Female Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 323–325.
- Hagman, R. (2014). Diagnostic and prognostic markers for uterine diseases in dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), 16–20
- Hagman, R. (2016). Canine pyometra: What is new? *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 288–292.
- Hagman, R. (2018). Pyometra in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 48(4), 639–661.
- Hagman, R., & Greko, C. (2005). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. *Veterinary Record*, 157(7), 193–197.
- Hagman, R., & Kühn, I. (2002). *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 84 (1-2), 143-153.
- Hagman, R., Kindahl, H., Fransson, B. A., Bergström, A., Holst, B. S., & Lagerstedt, A. S. (2006). Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2αmetabolite analysis. *Theriogenology*, 66(2), 198–206.
- Hagman, R., Lagerstedt, A., Hedhammar, Å., & Egenvall, A. (2011). A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. *Theriogenology*, 75(7), 1251–1257.
- Hagman, R., Reezigt, B. J., Bergström Ledin, H., & Karlstam, E. (2009). Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(1), 1–9.
- Hall J. A., Yerramilli M., Obare E., Yerramilli M., Melendez L. D., Jewell D. E. (2015) Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *J Vet Intern Med*. 2015;29(3):808–814.

- Heine, R., Kristiansen, V., Teige, J., & Jansen, J. H. (2007). Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of kidney disease. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 1–9.
- Henriques, S., Silva, E., Lemsaddek, A., Lopes-da-Costa, L., & Mateus, L. (2014). 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*, 170 (1- 2), 109-116. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.021
- Henriques, S., Silva, E., Silva, M. F., Carvalho, S., Diniz, P., Lopes-Da-Costa, L., & Mateus, L. (2016). Immunomodulation in the canine endometrium by uteropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research*, 47(1), 1–17.
- Hussain, T. (2015). An introduction to the serotypes, pathotypes and phylotypes of *Escherichia coli*. *International Journal of Microbiology and Allied Sciences*, 2(1), 9–16.
- Jitpean, S. (2015). Predictive Markers and Risk Factors in Canine Pyometra. Doctoral Thesis. Uppsala: Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Department of Clinical Sciences - Swedish University of Agricultural Sciences.
- Jitpean, S., Ambrosen, A., Emanuelson, U., & Hagman, R. (2017). Closed cervix is associated with more severe illness in dogs with pyometra. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 7–13.
- Jitpean, S., Hagman, R., Ström Holst, B., Höglund, O. V., Pettersson, A., & Egenvall, A. (2012). Breed Variations in the Incidence of Pyometra and Mammary Tumours in Swedish Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 347–350.
- Jitpean, S., Ström-Holst, B., Emanuelson, U., Höglund, O. V., Pettersson, A., Alneryd-Bull, C., & Hagman, R. (2014). Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. *BMC Veterinary Research*, 10.
- Kaymaz, M., Başjan, A., Erünal, N., Aslan, S., & Findik, M. (1999). The Use of Laboratory Findings in the Diagnosis of CEH-Pyometra Complex in the Bitch. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23(2), 127–133.
- Kitshoff, A. M., Van Goethem, B., Boyen, F., Tas, O., Polis, I., & De Rooster, H. (2015). Clinical parameters as predictors of bacterial isolation in the uterine content of dogs suspected of pyometra. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 84(4), 188–196.
- Kunkitti, P., Srisuwatanasagul, S., & Chatdarong, K. (2011). Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor, and leukocyte infiltration in the cervix of cyclic bitches and those with pyometra. *Theriogenology*, 75(6), 979–987.
- Küplülü, S., Vural, M. R., Demirel, A., Polat, M., & Akçay, A. (2009). The comparative evaluation of serum biochemical, haematological, bacteriological and clinical findings of dead and recovered bitches with pyometra in the postoperative process. *Acta Veterinaria*, 59(2–3), 193–204.
- Lefebvre, H. P., Watson, A. D. J., Heiene, R. (2015). Interpreting blood creatinine concentration in dogs. Acedido em Junho. 8, 2018, de IRIS (International Renal Interest Society), disponível em http://www.iris-kidney.com/education/creatinine_dogs.html

- Loor, J. De, Daminet, S., Smets, P., Maddens, B., & Meyer, E. (2013). Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury in Dogs, 1–13.
- Lourenço, B. L. (2017). Análise da estrutura populacional de *Escherichia coli* em amostras de origem fecal e vaginal de cadelas. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Machado, I. F. (2017). Piómetra na cadela e na gata : diferenças e semelhanças. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Maddens, B., Daminet, S., Smets, P., & Meyer, E. (2010). *Escherichia coli* Pyometra Induces Transient Glomerular and Tubular Dysfunction in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(6), 1263–1270.
- Maddens, B., Heiene, R., Smets, P., Svensson, M., Aresu, L., van der Lugt, J., Daminet, S., Meyer, E. (2011). Evaluation of Kidney Injury in Dogs with Pyometra Based on Proteinuria, Renal Histomorphology, and Urinary Biomarkers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(5), 1075–1083.
- Mateus, L., & Eilts, B. E. (2010). Cystic Endometrial Hyperplasia and Pyometra. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult (7a ed., vol. 2, pp. 1668-1688)*. St Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Mateus, L., Henriques, S., Merino, C., Pomba, C., Lopes da Costa, L., & Silva, E. (2013). Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. *Veterinary Microbiology*, 166 (3-4), 590-594. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.07.018.
- Merino, C. P. (2013). Comparação de perfis de virulência de isolados de *Escherichia coli* de cadela associados a piómetra, cistite e de origem fecal. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa
- Moxon, R., Whiteside, H., & England, G. C. W. (2016). Prevalence of ultrasound-determined cystic endometrial hyperplasia and the relationship with age in dogs. *Theriogenology*, 86(4), 976–980.
- Murta, A.C.M. (2013) Apoptose e proliferação celular na hiperplasia quística do endométrio em cadelas. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Nabity, M. B, Lees G. E., Boggess M. M, Yerramilli M., Obare E., Yerramilli M., Rakitin A., Aguiar J., and Relford R. (2015). Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(4), 1036–1044.
- Nelson, R. W., & Feldman, E. C. (1986). Pyometra. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 16(3), 561–576.
- Niskanen, M. & Thrusfield, M. V. (1998). Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. *The Veterinary Record*, 143(18), 493–498

- Nowrouzian, F. L., Wold, A. E., & Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* Strains Belonging to Phylogenetic Group B2 Have Superior Capacity to Persist in the Intestinal Microflora of Infants. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(7), 1078–1083.
- O’Sullivan, M. (2017). Tachypnea, Dyspnea, and Respiratory Distress. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (8ª edição.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult* (8ª ed., vol. 2, pp. 518-522). St Louis, Missouri: Elsevier.
- Palm, C, A (2017). Blood Urea Nitrogen and Creatinine. Em S. J. Ettinger, E. C. Feldman, & E. Cotê (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (8th ed., pp. 777–78 0). Missouri: Elsevier.
- Plavec, T., Celinšek, B., Dolinar, K., Pečar, J., Nemec, A., & Butinar, J. (2006). Haemostasis impairment in bitches with pyometra. *Acta Veterinaria*, 56(5–6), 529–540.
- Pretzer, S. D. (2008). Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology*, 70 (3), 359-363. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.028.
- Ramsey, I. & Tasker, S. (2017). Fever. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (8ª edição.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult* (8ª ed., vol. 2, pp.678-694). St Louis, Missouri: Elsevier.
- Raskin, R. & Meyer, M. (2016). Microscopic Examination of the Urinary Sediment. In *Canine and Feline Cytology* (3ª edição, pp 295-312). St Louis, Missouri: Elsevier.
- Rubio, A., Boyen, F., Tas, O., Kitshoff, A., Polis, I., Van Goethem, B., & de Rooster, H. (2014). Bacterial colonization of the ovarian bursa in dogs with clinically suspected pyometra and in controls. *Theriogenology*, 82(7), 966–971
- Sevelius, E.; Tidholm, A.; Thorentolling, K. (1990). Pyometra in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.26, n.1, p.33-8.
- Silva, E., Leitão, S., Henriques, S., Kowalewski, M. P., Hoffmann, B., Ferreira-Dias, G., da Costa, L. L. & Mateus, L. (2010). Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. *Journal of reproductive immunology*, 84(1), 66–74.
- Silva, E., Leitão, S., Tenreiro, T., Pomba, C., Nunes, T., Lopes da Costa, L., & Mateus, L. (2009). Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 6000–6010.
- Singer, M., Opal, S. M., Rubinfeld, G. D., Poll, T. Van Der, Vincent, J., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), 315(8), 801–810.
- Sink, C. & Weinstein, N. (2012). Routine Urinalysis: Microscopic Elements. In *Practical Veterinary Urinalysis* (1ª edição, pp 55-59). Ames, Iowa: Willey Blackwell.
- Siqueira, A. K., Ribeiro, M. G., Leite, D. S., Tiba, M. R., Moura, C., Lopes, M. D., Silva, A. V. (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86(2), 206-210.

- Smee, N., Loyd, K., & Grauer, G. (2013a). UTIs in Small Animal Patients : Part 1 : Etiology and Pathogenesis, 1–7.
- Smee, N., Loyd, K., & Grauer, G. F. (2013b). UTIs in Small Animal Patients : Part 2 : Diagnosis , Treatment , and Complications, 83–94.
- Smith, F. O. (2006). Canine pyometra. *Theriogenology*, 66(3), 610-612.
- Sousa, C. P. (2006). The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 12(13), 363–373.
- Tsuchiya, R., Kyotani, K., Scott, M. A., Nishizono, K., Ashida, Y., Mochizuki, T., Kobayashi, K. (1999). Role of platelet activating factor in development of thrombocytopenia and neutropenia in dogs with endotoxemia. *American Journal of Veterinary Research*, 60(2), 216–221.
- Tsumagari, S., Ishinazaka, T., Kamata, H., Ohba, S., Tanaka, S., Ishii, M., & Memon, M. A. (2005). Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features. *Animal Reproduction Science*, 87(3–4), 301–308.
- Vaden, S. L., Pressler, B. M., Lappin, M. R., & Jensen, W. A. (2004). Effects of urinary tract inflammation and sample blood contamination on urine albumin and total protein concentrations in canine urine samples. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1), 14–19.
- Verstegen, J., Dhaliwal, G., & Verstegen-Onclin, K. (2008). Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*, 70(3), 364–374.
- Ververidis, H. N., Boscós, C. M., Stefanakis, A., Saratsis, P., Stamou, A. I., & Krambovitis, E. (2004). Serum estradiol 17- β , progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. *Theriogenology*, 62 (3-4), 614-623.
- Watson, A. D. J., Lefebvre, H. P., Elliott, J. (2015). Using urine specific gravity. Acedido em Junho. 15, 2018, de IRIS (International Renal Interest Society), disponível em http://www.iris-kidney.com/education/urine_specific_gravity.html
- Weese, J. S., Blondeau, J., Boothe, D., Breitschwerdt, E. B., Guardabassi, L., Hillier, A., Lloyd, D. H., Papich, M. G., Rankin, S. C., Turnidge, J. D., Sykes, J. E. (2011). Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(2), 279–294.
- Whitehead, M. L. (2008). Risk of pyometra in bitches treated for mismating with low doses of oestradiol benzoate. *Veterinary Record*, 162(23), 746–749.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. (2008). Pathogenicity of Microorganisms. In Prescott, Harley and Klein's (Eds) *Microbiology* (7th edition, pp. 820-829). Avenue of Americas, New York: The McGraw-Hill Companies.

Zaragoza, C., Barrera, R., Centeno, F., Tapia, J. A., & Mañe, M. C. (2004). Canine pyometra: A study of the urinary proteins by SDS-PAGE and Western blot. *Theriogenology*, 61(7–8), 1259–1272.

ANEXO 1

Resultados das cadelas com endometrite

Das 33 cadelas com diagnóstico presuntivo de piómetra 5 foram posteriormente diagnosticadas com endometrite. A média de idades destas cadelas foi de $8,8 \pm 1,5$ anos. Todos os animais eram de raças diferentes nomeadamente: Pit Bull, West highland white terrier, bulldog francês, Podengo e Teckel. A condição corporal média foi de $5,2 \pm 0,6$. Quanto ao estilo de vida, quatro viviam dentro de casa (80%) e uma era de rua (20%). No que diz respeito ao estatuto sanitário, duas estavam devidamente vacinados e desparasitadas (40%) e três não (60%).

No historial clínico a única doença previamente diagnosticada e descrita em mais do que um caso foi neoplasia mamária.

1. Exame físico

Os valores médios dos parâmetros de exame físico encontram-se na Tabela 1 e as alterações registadas na Tabela 2. Numa cadela não foram registadas quaisquer alterações no exame físico.

Tabela 1- Valores médios de parâmetros do exame físico

Parâmetro do exame físico	Media \pm erro padrão
FR	$22,6 \pm 2,1$ rpm
FC	$120 \pm 9,9$ bpm
Temperatura retal	$38,4 \pm 0,2$ °C

Tabela 2- Alterações observadas no exame físico

Alteração dos parâmetros de exame físico	n	%
Ligeira desidratação (< 5%)	2	40
Palpação abdominal dolorosa generalizada	2	40

2. Sinais clínicos

Os sinais clínicos registados incluíram: anorexia (n=4; 80%), prostração (n=2; 40%), corrimento vulvar (n= 4; 80%), polidipsia associada a poliúria (n=4; 80%), edema vulvar (n=5; 100%), vômito (n=3; 60%). O corrimento vulvar foi caracterizado como purulento (n= 2) ou sanguíneo-purulento (n=2). O início do corrimento vulvar variou entre um dia a um mês antes da consulta.

3. Historial reprodutivo

A distribuição da população em relação ao número deaios por ano está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição das cadelas com endometrite em relação ao número deaios por ano

Número deaios por ano	Número de animais	Percentagem
2	2	40
4	1	20
Sem conhecimento	2	40
Total	5	100

Nenhuma cadela tinha historial clínico de piómetras anteriores ou de administração de progestagénios.

4. Fase do ciclo éstrico

Todos os animais com endometrite encontravam-se em estro. O valor médio da concentração de progesterona deste grupo de animais foi de $2,6 \pm 1,1$ ng/ml, sendo que o valor mínimo foi de 0,4 ng/ml e o valor de máximo foi de 6,0 ng/ml.

5. Caracterização microbiológica

A descrição dos agentes isolados no útero destas cadelas encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4- Frequência das espécies bacterianas isoladas de úteros com endometrite

Agente	Percentagem de casos (%) (n=5)	n
<i>Escherichia coli</i>	60	3
<i>Klebsiela</i> sp.	20	1
<i>Streptococcus</i> sp.	20	1

6. Análise histopatológica

Em três cadelas, os ovários apresentavam estruturas quísticas (60%), todas elas caracterizadas como foliculares. As alterações histopatológicas do ovário e do conteúdo das glândulas endometriais encontram-se na Tabela 5 e do útero na Tabela 6.

Tabela5- Avaliação histopatológica dos ovários e conteúdo das glândulas endometriais de cadelas com endometrite

	n	%
Ovários		
Quistos	3	60
Tumor	0	0
Conteúdo das glândulas endometriais		
Neutrófilico e sanguinolento	1	20
Neutrófilico	3	60
Linfoplasmocítico	1	20

Tabela 6- Alterações histopatológicas observadas em úteros de cadelas com endometrite

Crítérios de avaliação	Porcentagem de casos (%)	n
Destruição do epitélio luminal	80	4
HQE	80	4
Necrose difusa do endométrio	60	3
Necrose focal do endométrio	40	2
Hemorragia difusa no endométrio	80	4
Hemorragia focal no endométrio	20	1
Adenomiose	20	1
Necrose focal do miométrio	60	3
Hemorragia focal do miométrio	80	4
Metrite	80	4

7. Análises clínicas

7.1. Leucograma

Os resultados das médias e valores de referência são apresentados na Tabela 7 e a frequência relativa e absoluta das alterações registadas na Tabela 8.

Tabela 7- Resultados médios dos diferentes parâmetros avaliados no leucograma

Parâmetro hematológico	n	Média ± erro-padrão	Valores de referência
Leucócitos totais ($\times 10^3$ / μ L)	5	13,4 ± 3,7	6 – 17
Neutrófilos totais (/ μ L)	5	11202 ± 3385	3000 - 11800
Neutrófilos não segmentados (/ μ L)	3	483 ± 836,6	0 - 300
Neutrófilos segmentados (/ μ L)	3	7588 ± 7779,6	3000 - 11500
Linfócitos (/ μ L)	5	1550 ± 361	1000 - 4800
Monócitos(/ μ L)	5	641 ± 151	150 - 1350
Eosinófilos (%)	5	0,5 ± 0,4	2 - 10
Basófilos (/ μ L)	4	2,6 ± 2,1	Raros

Tabela 8- Alterações no leucograma das cadelas com endometrite

Alteração hematológica	n	Cadelas com alteração	%
Leucócitose	5	2	40
Neutrófilia	5	3	60
Desvio à esquerda	3	1	33,3
Linfopénia	5	2	40
Basofilia	4	1	25

7.2. Hemograma e contagem plaquetária

Os resultados médios e a frequência das alterações registadas nestas cadelas encontram-se descritos nas Tabelas 9 e 10, respetivamente.

Tabela 9- Resultados médios dos diferentes parâmetros do eritrograma

Parâmetro hematológico	Média ± erro-padrão	Valores de referência
Hematócrito (%)	41 ± 3,7	37 - 55
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	5,7 ± 0,5	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g/dL)	14,1 ± 1,2	12 - 18
VCM (fl)	71,8 ± 1,7	60- 77
HCM (pg)	24,8 ± 0,6	19,5- 24,5
CHCM (g/dL)	34,6 ± 1,1	32- 36
Plaquetas	312,2 ± 83,3	200 - 500

Tabela 10- Alterações no eritrograma e contagem de plaquetas no grupo de animais com endometrite

Alteração hematológica	Cadelas com alteração (n=5)	%
Anemia não regenerativa	1	20%
Anemia regenerativa	1	20%
Trombocitopénia	2	40%

7.3. Bioquímicas séricas

Na Tabela 11, encontram-se os resultados médios e valores de referência para os parâmetros bioquímicos avaliados, e na Tabela 12 a frequência de alterações nos mesmos.

Tabela 11- Resultados médios dos parâmetros bioquímicos séricos.

Parâmetro bioquímico	n	Média ± erro-padrão	Valores de referência	Unidades
Proteínas totais	2	7,8 ± 0,5	5,2- 8,2	g/dL
Albumina	3	3,2 ± 0,2	2,2 – 3,5	g/dL
FAS	5	171,2 ± 64,1	0- 200	U/L
ALT	5	56,8 ± 12,9	0- 130	U/L
Ureia	5	24,5 ± 2,2	12- 56	mg/dL
Creatinina	5	0,77 ± 0,18	0,62-1,64	mg/dL
Glucose	4	105,8 ± 12,0	59 – 157	mg/dL

Tabela 12- Distribuição de alterações bioquímicas em cadelas com endometrite

Alteração bioquímica	n	Cadelas com alteração	%
Aumento da FAS	5	2	40%
Diminuição da creatinina	5	2	40%

7. Avaliação do aparelho urinário

7.1. Análise de Urina tipo II.

7.1.1. Exame físico

A cor da urina variou entre amarelo (n = 4) e amarelo claro (n = 1). Quanto ao aspeto, este foi classificado ligeiramente turvo (n = 1) ou translúcido (n = 4). A presença de depósito foi verificada em 3 amostras, e o cheiro classificado como *suis generis* em todas as amostras (n=5). Em relação ao pH, 2 amostras de urina apresentaram pH igual ou superior a 7,5 e as restantes apresentaram valores normais (n=3). No que diz respeito à densidade urinária (DU), todas as amostras foram classificadas como hiperestenúricas.

7.1.2. Exame químico

Apenas foram registadas alterações numa cadela, nomeadamente proteinúria (100 ng/dl) e hematúria (80 células/ μ l).

7.1.3. Exame microscópico de sedimento

Com a avaliação do sedimento urinário confirmou-se a hematúria detetada na tira de urina e identificou-se leucocitúria noutra cadela. Apenas foram identificados raros cilindros granulosos num animal, A avaliação de células epiteliais variou desde ausentes a 2 - 5 células por campo (40 \times), contudo a descrição de presença de aglomerados de células de transição surgiu em 3 animais. Lipúria foi observada em 4 das cadelas deste grupo.

7.2. Rácio UPC

O rácio UPC encontrou-se aumentado numa cadela. O cruzamento de dados obtidos a partir do rácio UPC, da urianálise e urocultura revelou que este não seria valorizável. Os valores médios de rácio UPC, proteína e creatinina urinárias encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13- Resultados médios de concentração de proteína e creatinina urinária e rácio UPC

Parâmetro	N	Média \pm erro-padrão	Valores de referência
Proteína urinária	5	58,6 \pm 24,9 mg/dL	
Creatinina urinária	5	144,9 \pm 82,7 mg/dL	
Rácio UPC total	5	0,71 \pm 0,44	
Rácio UPC negativo	2	0,17 \pm 0,05	< 0,2
Rácio UPC incipiente	2	0,39 \pm 0,09	0,2 – 0,5
Rácio UPC significativo	1	2,44	>0,5

7.3. Concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA)

As concentrações séricas de SDMA foram mensuradas nos 5 animais e as concentrações médias de SDMA foram 10,2 \pm 1,7 μ g/dL. Apenas um animal apresentou uma concentração superior a 14 μ g/dL. O rácio UPC deste animal era negativo.

8. Mortalidade e morbidade

Nenhum dos animais com endometrite morreu ou desenvolveu peritonite após a cirurgia. A média de período de hospitalização foi de $1,4 \pm 0,2$ dias.

9. Resultados microbiológicos

9.1. Urocultura

Embora tenha sido observado crescimento bacteriano em 3 uroculturas, somente 2 apresentaram contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) superiores a 1000 UFC/ml, podendo afirmar-se que existia infecção do trato urinário. Nos dois casos em que as contagens de UFC foram significativas os agentes isolados foram *Proteus* sp. e *Klebsiella* sp. e no caso em que as UFC não foi significativa o agente isolado foi *E. coli*.

9.2. Zaragatoas extra-uterinas

Nenhuma cadela com endometrite teve crescimento bacteriano na cultura de zaragatoa extra-uterina.

9.3. Zaragatoas fecais

Em todas as zaragatoas fecais foi registado crescimento bacteriano, com isolamento de *E. coli*.

10. Caracterização dos isolados de *E. coli*

Foram obtidos um total de 65 isolados das cadelas com endometrite, dos quais 30 foram de origem uterina, 5 provenientes de amostras de urina e 30 de origem fecal.

10.1. Fenótipos

O fenótipo não hemolítico (NH) foi mais frequente em todos os tipos de isolados. O fenótipo mucóide (M) não foi encontrado em nenhum dos isolados. A frequência de fenótipos encontrados encontra-se descrito na Tabela 14.

Tabela 14- Frequência absoluta e relativa dos diferentes fenótipos dependendo da origem dos isolados

Origem dos Isolados	Fenótipos								Frequência absoluta
	H/M	%	H/NM	%	NH/M	%	NH/NM	%	
UT	0	0	10	33,3	0	0	20	66,7	30
Urina	0	0,0	0	0	0	0,0	5	100	5
Fecal	0	0	10	33,3	0	0,0	20	66,7	30
Total	0		20		0		45		65

Legenda: UT- isolados de conteúdo uterino; EU- isolados extra-uterinos

10.2. Grupo Filogenético

O grupo filogenético mais prevalente foi o grupo D. Os grupos filogenéticos B1 e A não foram detetados, independentemente da origem (Tabela 15).

Tabela 15- Distribuição dos isolados de *E. coli* de cadelas com ednometrite por grupo filogenético e grupo de origem de isolados

GF	Origem dos isolados						Frequência Absoluta	%
	UT	%	U	%	F	%		
A	0	0	0	0	0	0	0	0
B1	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	10	33,3	0	0	10	33,3	20	30,8%
D	20	66,7	5	100	20	66,7	45	69,2%
Total	30	46,2	5	7,7	30	46,2	65	100%

Legenda: GF- grupo filogenético; UT- isolados de conteúdo uterino; U- Isolados de urina; F- isolados fecais

10.3. Rep PCR

Em cada cadela e independentemente da origem das amostras e do grupo filogenético, os isolados de *E. coli* eram somente de um clone (Tabela 16).

Tabela 16- Representação da associação entre grupo filogenético dos diferentes isolados e número de clones de *E. coli* presente por cadelas com endometrite

Identificação do paciente	UT	F	U	Nº de Clones	Nº de Isolados
10	B2 (10)	B2 (10)	*	1	20
18	D (10)	D (10)	D (5)	1	25
32	D (10)	D (10)	*	1	20

Legenda: UT- isolados de conteúdo uterino; U- Isolados de urina; F- isolados fecais; * - Isolados sem crescimento

ANEXO 2



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



Declaração de Consentimento Informado

“Avaliação da presença de lesão renal e de peritonite em cadelas com piómetra”

Estudo de dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da estagiária Ana Paula Martins, sob orientação da Professora Doutora Luísa Mateus

Eu, _____ tutor do canídeo _____, após devidamente informado sobre o estudo em causa, que se destina a determinar a existência de lesão renal e de peritonite em cadelas com piómetra, declaro que concedo de livre vontade a participação do animal ao meu cuidado no presente estudo sabendo que está prevista uma colheita de citologia vaginal e uma amostra de sangue (2 ml) para análise complementar às já previstas; colheita de urina por cistocentese e uma zaragatoa peritoneal durante a cirurgia. Após ovariectomia, será feita a colheita de conteúdo uterino e de uma amostra de tecido uterino e ovário.

Autorizo ainda a divulgação dos dados obtidos e registos fotográficos do meu animal no meio científico desde que garantido o anonimato.

Data: ____ de _____ de _____

Assinatura do tutor _____

ANEXO 3

Ficha clínica

Nome do tutor

Nome do paciente

Raça

Idade

Condição corporal (de 1 a 9)

Animal de

- Rua
- Casa

- Com acesso ao exterior
- Canil

Medicina Preventiva

- Vacinada

- Desparasitada

Doenças previamente diagnosticadas

Exame Físico

- Frequência respiratória _____ rpm

- Profundidade respiratória
 - Normal
 - Dispneia
 - Polipneia

- Tipo de respiração:
 - Costoabdominal
 - Costal
 - Abdominal

- Ritmo respiratório
 - Normal
 - Hiperventilação
 - Apneia momentânea

- Frequência cardíaca _____ bpm

- Mucosas:
 - Rosadas
 - Pálidas
 - Congestionadas
 - Ictéricas
 - Cianóticas

- Tempo de repleção capilar:
_____”

- Pulso arterial
 - Uniforme
 - Sim
 - Não
 - Amplitude
 - Forte
 - Fraco
 - Forma
 - Rápido
 - Lento
 - Ritmo
 - Normal
 - Arritmico
 - Simetria
 - Sim
 - Não

- Grau de desidratação
 - Normal
 - Ligeira desidratação
 - Moderada desidratação
 - Desidratação grave

- Temperatura corporal
_____ °C

- Postura
 - Normal
 - Cifose
 - Lordose

- Linfonodos
 - Normais
 - Aumentados

- Palpação abdominal
 - Normal
 - Dolorosa
 - Focal
 - Difusa

Apresentação clínica

- Poliúria
- Polidipsia
- Vômito
- Diarreia
- Anorexia

- Hipertermia
- Edema vulvar
- Atitude:
 - Normal
 - Prostrada
 - Agressiva

Caracterização da Piómetra

- Fechada
- Aberta
 - Tipo de corrimento: _____
 - Início do corrimento: _____

Historial Reprodutivo

- Data do último cio: _____
- Número de cios por ano: _____
- Piómetras anteriores
 - Sim (Data _____)
 - Não
- Métodos contraceptivos
 - Sim _____
 - Não

Medicação pré cirúrgica


(Princípio ativo e hora de administração)

Data de entrada : __/__/____

Data de colheita de amostras: __/__/____

Data da alta : __/__/____

ANEXO 4




U LISBOA
UNIVERSIDADE DE LISBOA

Renal injury in bitches diagnosed with pyometra

A. Martins¹; M. A. Basso²; L. Mateus³


¹ Integrated Master Student of Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Portugal. ² Laboratory of Clinic Pathology, M. Braço Forte, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Portugal. ³ CIISA- Center for Interdisciplinary Research for Animal Health, Reproduction and Development Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Portugal.



INTRODUCTION

Renal dysfunction is a common finding in bitches with pyometra, leading in some cases to elevated serum urea and creatinine. These high values are assigned to dehydration, reduced renal perfusion and/or toxemia. However, observation of increased serum concentrations of urea and creatinine are not a constant and it has been questioned if renal histological changes are attributed to pyometra or just age related ⁽¹⁾.

MATERIAL AND METHODS



Sampling
Twenty-eight bitches with confirmed diagnose of pyometra

Serum concentrations of urea and creatinine evaluation

Renal proteinuria assessment
Urine protein/creatinine ratio Dipstick protein

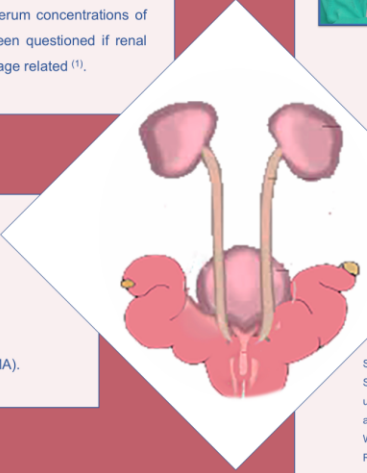
Proteinuria validation⁽²⁾

Microscopic sediment analysis

SDMA concentration determination

Mean age
8.9 years

Range
4-13 years



Statistical analysis:
Spearman's test was used to evaluate correlation between UPC ratio and SDMA values; urea and creatinine values and SDMA concentrations; age and SDMA concentrations and between dipstick proteinuria and results of proteinuria of the chemical analyzer. Wilcoxon test was used to relate presentation of PU/PD and SDMA concentrations. Results were considered significant if $p < 0,05$.

OBJECTIVES

Evaluate the degree of renal damage in patients diagnosed with pyometra using:

- Serum concentrations of urea and creatinine;
- Renal proteinuria;
- Symmetric dimethylarginine measurements (SDMA).

RESULTS

Percentage of patients with alteration in the parametes used to assess renal injury

Renal parameters evaluated	%
Increased plasmatic urea/creatinine	0,0%
Proteinuria	82,0%
Validated proteinuria	10,7%
Increased SDMA	35,7%

Presentation of PU/PD and SDMA concentrations



The presence of PU/PD was associated with higher SDMA concentrations

Correlation between proteinuria measurement in dipstick and chemical analyzer



Measurements of protein in dipstick and with chemical analyzer had strong correlation

No correlation were found between SDMA concentration and:

- Age;
- UPC ratio;
- Creatinine and urea concentrations.

CONCLUSIONS

- The absence of correlation between age and increased SDMA concentration supports the idea that renal injury is associated with pyometra and not only age related;
- Creatinine and urea values showed no correlation with SDMA concentration which is in accordance with previous studies showing that SDMA can detect renal injury in earlier stages ⁽³⁾ ;
- Proteinuria evaluation can be done by Dipstick or chemical analyser. However, both techniques are not reliable for the assessment of protein origin;
- Validation of proteinuria source through microscopic sediment analyses is crucial to understand if there is renal protein loss;
- Renal evaluation in pyometra patients should combine assessment of SDMA concentration and proteinuria origin.

References: ⁽¹⁾ Heiene, R. et al. (2007). Acta Veterinaria Scandinavica, 49(1), 13. ⁽²⁾ Vaden, S. L. et al. (2004). Veterinary Clinical Pathology, 33(1), 14–19. ⁽³⁾ Nabily, M. B. et al. (2015). Journal of Veterinary Internal Medicine, 29(4), 1036–1044.

Funding: UID/CVT/00276/2013 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT); MIMV 4.2017 from CIISA, FMV.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA