

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

ETIOLOGIA POLIMICROBIANA NAS INFECÇÕES URINÁRIAS EM CÃES
IDENTIFICADA POR PROTEÔMICA E MULTIRRESISTÊNCIA DOS ISOLADOS
AOS ANTIMICROBIANOS

NATÁLIA RODRIGUES PASCHOAL

Botucatu, SP

Maio – 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ETIOLOGIA POLIMICROBIANA NAS INFECÇÕES URINÁRIAS EM CÃES
IDENTIFICADA POR PROTEÔMICA E MULTIRRESISTÊNCIA DOS ISOLADOS
AOS ANTIMICROBIANOS**

NATÁLIA RODRIGUES PASCHOAL

Dissertação apresentada junto ao programa de pós-graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ-UNESP/Botucatu, SP

Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança
Alimentar

BOTUCATU, SP

Maio – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Paschoal, Natália Rodrigues.

Etiologia polimicrobiana nas infecções urinárias em cães identificada por proteômica e multirresistência dos isolados aos antimicrobianos / Natália Rodrigues Paschoal. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Marcio Garcia Ribeiro
Capes: 50502034

1. Cães - Doenças. 2. Infecções urinárias. 3. Resistência a múltiplos medicamentos. 4. Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz.

Palavras-chave: Cães domésticos; Etiologia microbiana; Infecções urinárias em cães; MALDI-TOF; Multirresistência bacteriana.

Nome da autora: Natália Rodrigues Paschoal

Título: ETIOLOGIA POLIMICROBIANA NAS INFECÇÕES URINÁRIAS EM
CÃES IDENTIFICADA POR PROTEÔMICA E MULTIRRESISTÊNCIA DOS
ISOLADOS AOS ANTIMICROBIANOS

Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP/Botucatu – SP

Prof. Titular Antonio Carlos Paes

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP/Botucatu – SP

Prof. Dr. Geraldo de Nardi Júnior

Disciplinas de Produção Animal e Agronegócios

Faculdade de Tecnologia (FATEC), Unidade de Botucatu, SP

Data da defesa: 31 de maio de 2023.

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. POPULAÇÃO DE CÃES NO BRASIL	10
2.2. ETIOLOGIA MICROBIANA DAS INFECÇÕES URINÁRIAS	10
2.3. ASPECTOS DA EPIDEMIOLOGIA	11
2.4. FISIOPATOLOGIA.....	12
2.5. SINAIS CLÍNICOS.....	13
2.6. DIAGNÓSTICO.....	14
2.6.1 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly)	14
2.7. TRATAMENTO	15
2.8. MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA	16
2.9. SAÚDE ÚNICA.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. GERAL	19
3.2. ESPECÍFICOS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Comissão de ética.....	20
4.2. Amostras de urina	20
4.3. Dados epidemiológicos	20
4.4. Cultivo microbiológico.....	21
4.5. Teste de sensibilidade microbiana in vitro dos isolados.....	21
4.6. Espectrometria de massas.....	22
4.7. Cálculo do universo amostral e análise estatística.....	22
5.1. RESULTADOS	24
5.1. Dados epidemiológicos	24
5.2. Identificação microbiológica	24
5.2.1. Enterobactérias.....	27
5.2.2. <i>Enterococcus</i> spp.	28
5.2.3. <i>Staphylococcus</i> spp.....	28
5.2.4. <i>Streptococcus</i> spp.	28
5.2.5. <i>Pseudomonas</i> spp.	28
5.2.6. Fungos e Leveduras	28
5.2.7. Miscelânea	29
5.3. Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos.....	29
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	41
9. COMITÊ DE ÉTICA	49

PASCHOAL, N. R. **ETIOLOGIA POLIMICROBIANA NAS INFECÇÕES URINÁRIAS EM CÃES IDENTIFICADA POR PROTEÔMICA E MULTIRRESISTÊNCIA DOS ISOLADOS AOS ANTIMICROBIANOS**. Botucatu, 2023. 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Resumo

As infecções urinárias em cães apresentam etiologia complexa e representam afecção frequente na rotina de atendimento de animais de companhia. No entanto, o diagnóstico dos micro-organismos comumente tem sido baseado em testes fenotípicos clássicos ou restrito em nível de gênero. Ainda, por vezes, os animais são tratados sem o respaldo de testes *in vitro* dos isolados aos antimicrobianos. Neste cenário, 170 amostras de urina de cães com sinais de infecção do trato urinário, colhidas por cistocentese, foram submetidas ao cultivo microbiológico nos meios de ágar sangue bovino e ágar MacConkey, e os isolados ao teste de sensibilidade microbiana *in vitro* pelo método de difusão com discos. Os micro-organismos foram identificados em nível de espécie pela espectrometria de massas (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-fly* - MALDI-TOF MS). Foram isoladas 26 espécies diferentes de micro-organismos, totalizando 190 micro-organismos, dos quais 98,42% (187/190) de origem bacteriana e 1,58% (3/190) fungos/leveduras. Os principais grupos de patógenos identificados foram enterobactérias (114/190=60%), enterococos (26/190=13,7%), estafilococos (24/190=12,6%), estreptococos (13/190=6,8%), e espécies dos gêneros *Pseudomonas* (5/190=2,6%) e *Candida* (3/190=1,6%). Os principais micro-organismos isolados em cultura pura foram: *E. coli* (58/147=39,5%), *Proteus mirabilis* (15/147=10,2%), *Klebsiella pneumoniae* (10/147=6,8%), *Staphylococcus pseudintermedius* (10/147=6,8%), *Enterococcus faecium* (8/147=5,4%), *Staphylococcus intermedius* (8/147=5,4%), *Streptococcus canis* (7/147=4,8%) e *Pseudomonas aeruginosa* (5/147=3,4%). Em associação foram identificados principalmente *E. coli* + *Enterococcus faecalis* (5/21=23,8%), e *E. coli* + *Streptococcus canis* (4/21=19%). O antimicrobiano com maior efetividade diante dos principais grupos/micro-organismos isolados foi amoxicilina/ácido clavulânico ($\geq 70\%$), com efetividade moderada foram amicacina ($\geq 60\%$) e marbofloxacino ($\geq 60\%$). Em contraste, elevada resistência *in vitro* (40-100%) foi observada para os grupos/micro-organismos isolados, particularmente para enterococos (cefalexina 80,8%, ceftriaxona 73,1%, ciprofloxacino 65,4%), enterobactérias (cefalexina 40,4%), estafilococos (sulfametoxazole/trimetoprim 54,2%), estreptococos (ciprofloxacino 61,5%, enrofloxacino 76,9%, marbofloxacino 53,9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (cloranfenicol 80%, enrofloxacino 40%). Resistência simultânea ≥ 3 grupos de antimicrobianos foi identificada em 21,9% (41/187) dos isolados, considerados multirresistentes. Infere-se a natureza polimicrobiana nas infecções urinárias em cães identificadas por proteômica, bem como elevada multirresistência dos isolados bacterianos diante de antimicrobianos de uso no tratamento de infecções urinárias em cães (sulfonamidas, derivados beta-lactâmicos e aminoglicosídeos). O presente estudo contribui com a investigação da etiologia das infecções urinárias em cães e com a vigilância da multirresistência bacteriana aos antimicrobianos.

Palavras-chaves: cães domésticos, infecções urinárias em cães, etiologia microbiana, MALDI-TOF MS, multirresistência bacteriana aos antimicrobianos.

PASCHOAL, N. R. **POLYMICROBIAL ETIOLOGY IN URINARY TRACT INFECTIONS IN DOGS IDENTIFIED BY PROTEOMIC AND MULTIDRUG RESISTANCE OF ISOLATES.** Botucatu, 2023. 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Abstract

Canine urinary tract infections comprise a complex etiology and represent a frequent disorder in the routine care of companion animals. Nonetheless, commonly the diagnosis of microorganisms has been based on classical phenotypic tests or restricted to the gender level. Also, frequently the animals are treated without previous *in vitro* susceptibility tests of isolates. In this scenario, 170 urine samples from dogs collected using cystocentesis among animals showing clinical signs of urinary tract infection were submitted to microbiological culture in bovine blood agar and MacConkey agar, and isolates subjected to *in vitro* susceptibility testing based on disk diffusion method. The microorganisms were identified at the species level using mass spectrometry (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly* - MALDI-TOF MS). Twenty-six different species of microorganisms were identified (190 isolates), of which 98.42% (187/190) and 1.58% (3/190) from bacterial and fungi/yeast origin, respectively. The main groups of pathogens identified were enterobacteria (114/190=60%), enterococci (26/190=13.7%), staphylococci (24/190=12.6%), streptococci (13/190=6.8 %), and species of the genus *Pseudomonas* (5/190=2.6%) and *Candida* (3/190=1.6%). The main microorganisms isolated in pure culture were *E. coli* (58/147=39.5%), *Proteus mirabilis* (15/147=10.2%), *Klebsiella pneumoniae* (10/147=6.8%), *Staphylococcus pseudintermedius* (10/147=6.8%), *Enterococcus faecium* (8/147=5.4%), *Staphylococcus intermedius* (8/147=5.4%), *Streptococcus canis* (7/147=4.8 %) and *Pseudomonas aeruginosa* (5/147=3.4%). In association, *E. coli* + *Enterococcus faecalis* (5/21=23.8%) and *E. coli* + *Streptococcus canis* (4/21=19%) were microorganisms predominant. The most effective antimicrobial against the main isolated groups/microorganisms was amoxicillin/clavulanic acid ($\geq 70\%$), with moderate effectiveness were amikacin ($\geq 60\%$) and marbofloxacin ($\geq 60\%$). In contrast, the groups/microorganisms isolated showed greater *in vitro* resistance (40-100%), particularly enterococci (cefalexin 80.8%, ceftriaxone 73.1%, ciprofloxacin 65.4%), enterobacteria (cefalexin 40.4%), staphylococci (sulfamethoxazole/trimethoprim 54.2%), streptococci (ciprofloxacin 61.5%, enrofloxacin 76.9%, marbofloxacin 53.9%), and *Pseudomonas aeruginosa* (chloramphenicol 80%, enrofloxacin 40%). Simultaneous resistance ≥ 3 groups of antimicrobials was identified in 21.9% (41/187) of the isolates that were considered multidrug-resistant ones. A polymicrobial nature of canine urinary tract infections was identified based on proteomic diagnostic, in addition to high *in vitro* bacterial multidrug resistance among antimicrobials commonly used in urinary infections therapy approaches. Our results contribute to the etiological investigation of canine urinary tract infections, and vigilance of bacterial multidrug resistance from domestic animals.

Keywords: domestic dogs, canine urinary infections, microbial etiology, MALDI-TOF MS, bacterial multidrug resistance

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a segunda maior população de animais de estimação do mundo, com cerca de 84 milhões de cães e gatos. Destes, a população canina é estimada em 54 milhões, superada somente pelos Estados Unidos, que detêm cerca de 135 milhões de cães e gatos. Cerca de 44% dos domicílios brasileiros possuem o cão como animal de estimação. Aproximadamente 95% dos tutores de cães e/ou gatos consideram a saúde do seu animal de estimação tão importante quanto a saúde dos membros da família (SINDAN, 2020; INSTITUTO PET BRASIL, 2022).

As infecções do trato urinário (ITU) figuram dentre as afecções mais comuns em cães, representando entre 16 e 22% dos atendimentos de animais de companhia (GÓMEZ-BELTRÁN et al., 2020; GUZMÁN RAMOS et al., 2021).

Elevada complexidade de agentes tem sido observada na etiologia das ITU em cães, com predomínio de enterobactérias, estafilococos, estreptococos, enterococos e certos actinomicetos (HALL; HOLMES; BAINES, 2013; BYRON, 2019). *Escherichia coli* parece constituir o agente mais comumente encontrado, em cerca de 50% da casuística em cães, com tendência à cronicidade dos casos, devido à complexidade de virulência do patógeno (SIQUEIRA et al., 2009) e a resistência aos antimicrobianos convencionais (BALL; RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2015; WONG; EPSTEIN; WESTROPP, 2015).

A proximidade anatômica do reto com o trato geniturinário favorece a disseminação de bactérias localizadas na região perianal - via ascendente pelo canal uretral - tornando as ITU mais comuns nas fêmeas caninas (LING et al., 2001; BYRON, 2019). A incapacidade de esvaziar completamente a bexiga em animais com problemas neurológicos, presença de urolitíase, incontinência urinária, imunossupressão e glicosúria em animais portadores de diabetes mellitus são fatores considerados predisponentes nas infecções urinárias em cães (BYRON, 2019; HARRER e DORSH, 2020; MACHADO et al., 2021).

O diagnóstico de rotina das ITU em cães é realizado com base nos achados clínico-epidemiológicos, exames hematológicos, bioquímicos e urinálise, diagnóstico por imagem, cultivo microbiológico e testes de sensibilidade microbiana *in vitro* (LING et al., 2001; WEESE et al., 2019).

33 Polaciúria, disúria, estranguria, hematúria e piúria são sinais clínicos
34 sugestivos das ITU em cães (WEESE et al., 2019; HERNANDO et al., 2021),
35 embora o diagnóstico inequívoco deva ser firmado com base no isolamento e
36 identificação dos patógenos (BYRON, 2019; WEESE et al., 2019). No entanto,
37 apesar da complexidade etiológica (HALL; HOLMES; BAINES, 2013; BYRON,
38 2019), na maioria dos estudos com ITU em cães, o diagnóstico dos micro-
39 organismos tem sido baseado em testes fenotípicos clássicos ou restrita a
40 identificação em nível de gênero dos agentes (WADA et al 1996, FORRESTER
41 et al., 1999; WILLIAMS et al., 2000). Com efeito, número restrito de estudos tem
42 utilizado métodos moleculares no diagnóstico dos micro-organismos envolvidos
43 na casuística das infecções urinárias em cães (NALLY et al., 2015; PIRAS et al.,
44 2015).

45 Fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração,
46 sulfonamidas/trimetoprim e amoxicilina/ácido clavulânico representam os
47 grupos/antimicrobianos mais frequentemente utilizados no tratamento das ITU
48 em cães (GUZMÁN RAMOS et al., 2021).

49 A multirresistência em bactérias de origem animal e humana é
50 considerada fenômeno emergente, de âmbito mundial (OMS, 2022). Neste
51 contexto, as infecções urinárias em cães representam afecções em animais
52 domésticos com altas taxas de multirresistência bacteriana (HALL; HOLMES;
53 BAINES, 2013; WONG; EPSTEIN; WESTROPP, 2015; MCMEEKIN et al., 2017;
54 GÓMEZ-BELTRÁN et al., 2020; JOHNSTONE, 2020; YU et al., 2020; GUZMÁN
55 RAMOS et al., 2021), provavelmente em virtude do uso de antimicrobianos no
56 tratamento sem o respaldo da identificação dos patógenos e testes de
57 sensibilidade microbiana *in vitro* (OLIN; BARTGES, 2015; WEESE et al., 2019).
58 Neste cenário, o presente estudo investigou a etiologia microbiana das infecções
59 urinárias em cães diagnosticada com base em proteômica e a
60 sensibilidade/multirresistência *in vitro* bacteriana aos antimicrobianos.

61

62

63 2. REVISÃO DA LITERATURA

64

65 2.1. População de cães no Brasil

66 Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a
67 Saúde Animal (SINDAN) estima-se que o Brasil detenha a segunda maior
68 população de cães do mundo, com cerca de 84 milhões de animais, superado
69 pelos Estados Unidos, com a população de cães e gatos estimada em 135
70 milhões (SINDAN, 2020; INSTITUTO PET BRASIL, 2022).

71 Estima-se que 53% dos domicílios brasileiros possuam cães e/ou gatos
72 como animais de estimação, representando, aproximadamente 37 milhões de
73 habitações residenciais. Cerca de 95% dos tutores de animais de companhia
74 consideram que a saúde do cão e/ou gato é tão importante como a saúde dos
75 membros da família (SINDAN, 2020).

76

77 2.2. Etiologia microbiana das infecções urinárias

78 As infecções urinárias em cães são de natureza polimicrobiana.
79 Enterobactérias, estafilococos, estreptococos, enterococos e, ocasionalmente,
80 certos actinomicetos, fungos e leveduras se constituem nos principais grupos de
81 patógenos relacionados às ITU em cães (BAINES, 2013; BYRON, 2019; HALL;
82 HOLMES; YU et al., 2020)

83 As enterobactérias, e.g., *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae*
84 (*K. pneumoniae*) e espécies de *Proteus*, parecem representar o grupo de
85 patógenos mais frequentemente envolvidos nas infecções urinárias em cães,
86 acometendo cerca de 50% dos animais (BALL; RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2015;
87 WONG; EPSTEIN; WESTROPP, 2015; MCMEEKIN et al., 2017).
88 Particularmente *E. coli*, pode representar 30% da etiologia das ITU em cães (YU
89 et al., 2020).

90 Estudo investigando a etiologia das infecções urinárias em cães na
91 Espanha observou predomínio de *E. coli* (45,3%), *Proteus* spp. (13,2%),
92 *Staphylococcus* spp. (11%) e *Enterococcus* spp. (8,6%) (HERNANDO et al.,
93 2021). Estudo similar na Suécia encontrou predomínio de *E. coli* (68%) e

94 *Staphylococcus* spp. (11%) nas ITU em cães (WINDAHL et al., 2014). Na Itália,
 95 *E. coli* (38,7%) foi o agente prevalente na etiologia das infecções urinárias em
 96 cães, seguido por *Klebsiella* spp. (14,2%), *Pseudomonas* spp. (13,3%) e
 97 *Enterococcus* spp. (9,9%) (RAMPACCI et al., 2018). Em Portugal, *E. coli*
 98 (43,5%), *Proteus* spp. (16,4%), *Staphylococcus* spp. (13,2%) e *Enterococcus*
 99 spp. (7%) foram os micro-organismos mais frequentes nas ITU em cães
 100 (MARQUES et al., 2018). De modo similar, *E. coli* (64%), *Proteus* spp. (9%),
 101 *Staphylococcus* spp. (8%) e *Enterococcus* spp. (7%) foram os principais micro-
 102 organismos isolados na casuística de ITU em cães na Austrália (ROBERTS;
 103 WHITE; LAM, 2019).

104

105 2.3. Aspectos da epidemiologia

106 As fêmeas possuem maior risco de infecções urinárias devido à
 107 proximidade anatômica do reto com o trato geniturinário, que favorece a infecção
 108 dos micro-organismos pela uretra, principalmente por enterobactérias
 109 provenientes das fezes do ambiente dos animais, bem como da microbiota
 110 perianal (LING et al., 2001).

111 Cães velhos apresentam maior risco de infecção, devido a comorbidades
 112 e/ou diminuição da resposta imune. A idade mais comum das infecções urinárias
 113 varia entre 5 e 11 anos, correspondendo acima de 70% dos casos.
 114 Particularmente nas infecções urinárias por *E. coli*, considerado o principal
 115 agente causal, os casos predominam nas fêmeas e machos entre 7 e 9 anos
 116 (HALL; HOLMES; BAINES, 2013).

117 A incapacidade de esvaziar completamente a bexiga (animais com
 118 problemas neurológicos), presença de urolitíase, incontinência urinária,
 119 imunossupressão e glicosúria em animais portadores de diabetes mellitus são
 120 fatores também considerados como predisponentes nas ITU em cães (BYRON,
 121 2019; HARRER e DORSH, 2020; MACHADO et al., 2021).

122 No que tange ao efeito sazonal na ocorrência dos patógenos, estudo
 123 realizado na Espanha observou que os isolados de *Enterococcus* spp. foram
 124 prevalentes no verão, enquanto *E. coli* e *Proteus* spp. mais comuns na primavera
 125 e *Pseudomonas* spp. no outono (HERNANDO et al., 2021). Estudo realizado no

126 Irã constatou que as infecções urinárias por *E. coli* são mais frequentemente
127 isoladas no verão (YOUSEFI; TORKAN, 2017).

128 Nos humanos, estudo conduzido na região do nordeste brasileiro
129 investigou as principais causas de internações pediátricas e a influência da
130 sazonalidade das doenças. As infecções do rim e trato urinário, foram a segunda
131 afecção mais frequente, correspondendo a 26,3% das causas de internação na
132 pediatria. Superadas somente pelas infecções entéricas. Neste estudo, elevada
133 frequência dos casos de infecções do trato urinário foram observadas no período
134 de verão (de alta pluviosidade e temperatura), que aumenta o hábito da população
135 de frequentar ambientes aquáticos (e.g., praias, piscinas), cujas altas
136 temperaturas e umidade podem favorecer a multiplicação bacteriana
137 (JANUÁRIO DE LIMA; FARIAS, 2020). Em contraste, estudo realizado no
138 estado de Minas Gerais, identificou *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella* spp. em
139 uroculturas de mulheres na faixa etária de 18 a 60 anos, com maior frequência
140 nos períodos de outono/inverno (63,4% dos casos), alertando que as infecções
141 urinárias em mulheres podem ocorrer ao longo de todas as estações do ano
142 (REZENDE; NOGUEIRA, 2022).

143

144 2.4. Fisiopatologia

145 O trato urinário possui mecanismos inatos de defesa que previnem a
146 aderência de patógenos na mucosa. Neste contexto, o próprio fluxo da micção
147 auxilia na remoção de bactérias da microbiota do canal urinário. A uretra proximal
148 e vesícula urinária possuem microvilosidades que se expandem à medida que a
149 urina é eliminada, auxiliando também na remoção das bactérias. A microbiota da
150 uretra distal, prepúcio e vulva auxiliam na prevenção do acesso dos patógenos
151 para o interior do trato urinário pela produção de bacteriocinas, que interferem
152 na colonização de outras bactérias. A produção de imunoglobulinas e
153 glicosaminoglicanos que atuam na mucosa podem prevenir a aderência de
154 uropatógenos ao epitélio urinário. A alta osmolaridade da urina e a alta
155 concentração de ureia também inibem a multiplicação bacteriana (HERNANDO
156 et al., 2021).

157 Apesar dos mecanismos de defesa inatos do trato urinário dos cães,
158 vários patógenos possuem diferentes fatores de virulência que podem
159 sobrepujar os mecanismos de defesa anatômicos e da resposta imune local.
160 Neste contexto, *E. coli* apresenta grande complexidade de fatores de virulência,
161 incluindo extra intestinais, que possibilitam a manutenção e multiplicação em
162 ambiente extra entérico, incluindo no trato urinário (SIQUEIRA et al., 2009).

163 Uma vez que os micro-organismos se disseminam via ascendente pela
164 uretra, podem se instalar na vesícula urinária, ou alcançar os ureteres e rins,
165 causando pielonefrite. Dependendo dos fatores de virulência do patógeno, idade,
166 *status* imune e higidez do animal podem ocorrer infecções urinárias
167 autolimitantes (transitórias) ou graves. As infecções autolimitantes (transitórias)
168 são resolvidas pelos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro, poucos dias
169 após o início da infecção. Em contraste, as infecções mais graves tendem a
170 evoluir para casos crônicos, de difícil tratamento, podendo acometer a vesícula
171 urinária e rins (JOHNSTONE, 2020).

172

173 2.5. Sinais clínicos

174 Os principais sinais clínicos observados nas infecções urinárias em cães
175 são representados pela polaciúria (aumento da frequência de micção), disúria
176 (dor ao urinar), estrangúria (retenção da urina), micções inapropriadas (micção
177 em local inadequado onde o animal não costuma urinar), hematúria (sangue na
178 urina) e piúria (presença de pus na urina) (BYRON, 2019).

179 Nos animais cuja infecção se dissemina para os rins, podem ser
180 observados sinais de pielonefrite, incluindo hiporexia/anorexia, febre, letargia,
181 hematúria, uremia e episódios de vômito. No tocante às alterações
182 hematológicas, a leucocitose pode estar presente na maioria dos casos das ITU
183 causadas por bactéria (WEESE et al., 2019).

184 No que tange à persistência dos casos, as infecções urinárias em cães
185 podem ser classificadas em persistentes (identificação da bactéria no decorrer
186 do tratamento com antimicrobianos), reincidentes (bactéria identificada dias ou
187 semanas após o término do antimicrobiano), reinfecções (identificação de outra

188 bactéria meses após o término da antibioticoterapia) e superinfecções (infecção
189 por duas ou mais bactérias) (JOHNSTONE, 2020).

190

191 2.6. Diagnóstico

192 O diagnóstico de rotina das infecções urinárias em cães é fundamentado
193 nos achados epidemiológicos, aspectos clínicos, exames hematológicos e
194 bioquímicos, urinálise, diagnóstico por imagem, cultivo microbiológico e testes
195 de sensibilidade microbiana *in vitro* (LING et al., 2001; WEESE et al., 2019). No
196 entanto, o cultivo microbiológico da urina é considerado crucial no diagnóstico,
197 possibilitando a identificação dos patógenos e testes de sensibilidade microbiana
198 *in vitro*, que podem respaldar o tratamento (BYRON, 2019; WEESE et al., 2019;
199 HARRER; DORSCH, 2020).

200 Apesar da complexidade etiológica (HALL; HOLMES; BAINES, 2013;
201 BYRON, 2019), na maioria dos estudos com ITU em cães, a identificação dos
202 patógenos tem sido baseada em testes fenotípicos clássicos, ou mesmo o
203 diagnóstico restrito somente ao nível de gênero dos micro-organismos (WADA
204 et al., 1996; FORRESTER et al., 1999; WILLIAMS et al., 2000). Assim, número
205 restrito de estudos tem utilizado métodos moleculares no diagnóstico dos
206 agentes envolvidos na casuística das ITU em cães (NALLY et al., 2015; PIRAS
207 et al., 2015; MACHADO et al., 2021). Neste contexto, métodos de identificação
208 de micro-organismos com base em proteômica, como a espectrometria de
209 massas, tem se mostrado rápidos, fidedignos e de custo acessível na
210 caracterização de espécies de micro-organismos em diferentes afecções em
211 animais domésticos (GONÇALVES et al., 2014; DA SILVA et al., 2020; LEMOS
212 et al., 2021; MACHADO et al., 2021; MARTINS et al., 2023).

213

214 2.6.1 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fly)

215 A proteômica consiste em tecnologia de nova geração que consiste na
216 identificação, quantificação e interações de moléculas em sistemas biológicos
217 (proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e lipídeos) (HOU; CHIANG-NI; TENG,

218 2019) presentes em micro-organismos, tecidos, células ou fluidos biológicos
219 (NOOR et al., 2021).

220 A análise proteômica envolve técnicas como a eletroforese em gel, a
221 cromatografia líquida e a espectrometria de massas, que podem separar e
222 identificar as proteínas em uma amostra. Uma vez que as proteínas são
223 identificadas, é possível determinar as suas funções e interações com outras
224 moléculas no organismo. Além disso, a análise proteômica pode ser usada para
225 identificar biomarcadores de doenças ou monitorar a eficácia de tratamentos
226 (SINGHAL et al., 2015; ASLAM et al., 2017).

227 A técnica de MALDI-TOF é uma modalidade de técnica de espectrometria
228 de massas, amplamente utilizada em muitas áreas da pesquisa biomédica,
229 química e farmacêutica (JANG; KIM, 2018; OVIAÑO; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ,
230 2021). A técnica fundamenta-se na irradiação de amostras com laser UV de alta
231 energia, que resulta na ionização das proteínas em tubo de vácuo, que são
232 identificados (espectros) com base na sua relação massa/carga (DINGLE;
233 BUTLER-WU, 2013).

234 Os benefícios da técnica MALDI-TOF incluem a capacidade de análise de
235 amostras de proteínas em alta velocidade, a sensibilidade em detectar pequenas
236 quantidades de proteínas e a capacidade de identificar proteínas desconhecidas.
237 Além disso, a técnica é rápida, acurada, de custo acessível e requer pouca
238 preparação da amostra (YOON; JEONG, 2021), apesar do alto custo de
239 investimento com o equipamento (SCHUBERT; KOSTRZEWA, 2017).

240

241 2.7. Tratamento

242 Fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, sulfonamidas e
243 amoxicilina associada com ácido clavulânico são considerados os principais
244 grupos/antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções urinárias em cães
245 (GUZMÁN RAMOS et al., 2021). Recomenda-se que o tratamento, sempre que
246 possível, seja respaldado em testes de sensibilidade *in vitro* dos isolados
247 (BYRON, 2019).

248 Os tratamentos com antimicrobianos devem perdurar entre 5 e 14 dias.
249 Nos animais com histórico de recidivas ou casos crônicos, recomenda-se nova
250 urocultura cerca de uma a duas semanas após o encerramento do tratamento.
251 O uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) pode ser considerado em
252 alguns animais com infecções crônicas (WEESE et al., 2019).

253

254 2.8. Multirresistência bacteriana

255 A emergência da multirresistência em bactérias de origem animal e
256 humana é considerada problema de Saúde Única de ordem mundial (OMS,
257 2022). Estima-se que até 2050 haverá cerca de 10 milhões de mortes por ano
258 devido às infecções multirresistentes, superando as mortes por neoplasias
259 (O'NEILL, 2016).

260 Infecções multirresistentes representam problema em Saúde Única, pois
261 podem resultar em complicações graves, como sepse, falência de múltiplos
262 órgãos e morte (DUGAR; CHOUDHARY; DUGGAL, 2020; ROUTSI et al., 2020).

263 As infecções multirresistentes também podem aumentar o custo do
264 tratamento, pois os medicamentos mais caros podem ser necessários. Bactérias
265 multirresistentes podem se disseminar rapidamente em ambientes de saúde,
266 como hospitais e clínicas (SLAMA, 2008; DOS SANTOS et al., 2019), bem como
267 em comunidades (ARMAND-LEFÈVRE; ANDREMONT; RUPPÉ, 2018; RUPPÉ;
268 ANDREMONT; ARMAND-LEFÈVRE, 2018).

269 Medidas de prevenção e controle são de extrema importância, bem como
270 promover o uso racional de antimicrobianos para minimizar o risco de infecções
271 multirresistentes e resguardar a saúde pública (FAR; MARINO, 2001; PURO et
272 al., 2022).

273 Neste contexto, as ITU em cães representam uma das desordens em
274 animais domésticos que apresentam elevadas taxas de multirresistência
275 bacteriana (HALL; HOLMES; BAINES, 2013; WONG; EPSTEIN; WESTROPP,
276 2015; JOHNSTONE, 2020; GUZMÁN RAMOS et al., 2021). Tal ocorrência
277 elevada de resistência bacteriana tem sido atribuída ao uso intenso de
278 antimicrobianos no tratamento, sem o respaldo da identificação dos patógenos

279 e testes de sensibilidade microbiana *in vitro* (OLIN; BARTGES, 2015; WEESE et
280 al., 2019).

281 Estudo conduzido entre 2010 e 2017 na Espanha observou aumento de
282 22% de bactérias multirresistentes isoladas da urina de cães com infecções
283 urinárias. Cerca de 25% das enterobactérias foram multirresistentes aos
284 antimicrobianos comumente utilizados nas ITU em cães, incluindo
285 amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de terceira geração e
286 fluoroquinolonas (GUZMÁN RAMOS et al., 2021).

287 No Rio de Janeiro, Brasil, foram investigados os padrões de resistência,
288 genes produtores de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e
289 similaridade genética entre *Escherichia coli* obtidas de cães e tutores. Foi
290 detectada a presença simultânea de *E. coli* multirresistente em cães e tutores,
291 embora com diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos. Não foi
292 encontrada diferença no perfil de resistência aos antimicrobianos em relação ao
293 grupo de pessoas com cães e grupo controle (pessoas que relataram não ter
294 contato com cães), indicando ampla distribuição da multirresistência entre as
295 bactérias. Entretanto, certos isolados de cães e humanos do mesmo domicílio
296 apresentaram padrões de resistência aos antimicrobianos semelhantes, genes
297 ESBL, grupos filogenéticos idênticos e perfis PFGE idênticos ou intimamente
298 relacionados, indicando a possibilidade de clones de *E. coli* resistentes estejam
299 circulando entre indivíduos e animais no mesmo ambiente (CARVALHO et al.,
300 2016).

301 Estudo realizado em hospital veterinário do norte do Paraná avaliou as
302 características clínicas e microbiológicas de 37 cães em sepse. Foi identificada
303 a presença de *E. coli* ESBL-positiva em 31,5% dos casos, *K. pneumoniae*-ESBL
304 (15,7%) e *P. aeruginosa* (15,7%) colonizando o trato gastrointestinal desses
305 animais, enquanto 13,5% dos animais apresentavam infecções concomitantes
306 do trato urinário (CAMARGO; BAHR ARIAS; PERUGINI, 2020).

307

308 2.9. Saúde Única

309 Elevada complexidade de patógenos tem sido descrita nas ITU em cães
310 (HALL; HOLMES; BAINES, 2013; BYRON, 2019), muitos dos quais com

311 potencial zoonótico, posto a eliminação destes micro-organismos pela urina no
312 ambiente dos tutores. Neste sentido, a ocorrência de isolados de *E. coli* ESBL
313 positivas foi identificada em casos de infecções do trato urinário em cães da
314 Nova Zelândia. No mesmo estudo, a presença de *E. coli* produtoras de ESBL
315 nas fezes dos tutores - dos mesmos domicílios dos cães - foi identificada em
316 63,6% (7/11) das pessoas, indicando riscos de transmissão de *E. coli*
317 multirresistentes entre animais e humanos (TOOMBS-RUANE et al., 2020).

318 A prevalência de enterobactérias resistentes a cefalosporinas de espectro
319 estendido (ESCR-E) foi investigada antes e após o tratamento com
320 cefalosporinas de terceira geração. O estudo revelou que após sete dias de
321 tratamento, a carga fecal de ESCR-E era 85% em cães internados com o vírus
322 da parvovirose canina e, quatro semanas após o término do tratamento, quando
323 tinham retornado aos domicílios, a carga fecal era de 89% (SALGADO-CAXITO
324 et al., 2021).

325 No Brasil, foi relatado caso de cão de um ano de idade, que após o uso
326 indiscriminado de antimicrobianos apresentou uma infecção urinária necro-
327 hemorrágica crônica difusa grave, onde identificou-se o agente causal como
328 sendo uma *Corynebacterium urealyticum* multirresistente. A colheita de secreção
329 nasofaríngea dos moradores do domicílio identificou a mesma bactéria, com
330 perfil idêntico de resistência aos antimicrobianos (JOTHA; BRANCOLI;
331 CAVALCANTE, 2021).

332 Considerando a elevada população de cães no Brasil, a alta frequência das
333 infecções urinárias, a natureza polimicrobiana das ITU, a emergência da
334 multirresistência bacteriana em todo o mundo, e o reduzido número de estudos
335 com uso de técnicas moleculares no diagnóstico das infecções urinárias em
336 cães; o presente estudo investigou a etiologia das infecções urinárias em cães
337 diagnosticada por espectrometria de massas e a multirresistência bacteriana aos
338 antimicrobianos.

339

340

341 3. OBJETIVOS

342

343 3.1. Geral

344 Identificar a etiologia microbiana envolvida nas infecções urinárias em
345 cães utilizando a proteômica, bem como a multirresistência bacteriana aos
346 antimicrobianos

347

348 3.2. Específicos

349

350 3.2.1 Avaliar a relação de dados epidemiológicos (sexo, idade, período do ano
351 de ocorrência) com a etiologia das infecções urinárias em cães;

352

353 3.2.2 Identificar as espécies dos micro-organismos isolados de infecções
354 urinárias em cães utilizando a espectrometria de massas;

355

356 3.2.3 Investigar o perfil de sensibilidade *in vitro* dos isolados aos
357 antimicrobianos e a ocorrência de multirresistência bacteriana em
358 isolados obtidos de cães com ITU.

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369 4. MATERIAIS E MÉTODOS

370

371 4.1. Comissão de ética

372

373 O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais
374 (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, protocolo número 0052/2021.

375

376 4.2. Amostras de urina

377 Foram utilizadas amostras de urina de cães com sinais clínicos de
378 infecções do trato urinário como polaciúria, disúria, estranguria, micções
379 inapropriadas e hematúria ou piúria, associados ou não a sinais de hiporexia,
380 anorexia, febre, letargia e episódios de vômito.

381 As amostras de urina foram provenientes do material de rotina enviado
382 para diagnóstico no Laboratório de Microbiologia, da Faculdade de Medicina
383 Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP/Botucatu, SP, bem como amostras
384 enviadas por clínicas particulares da cidade de Botucatu, SP, e região, entre o
385 período de 2021 a 2022.

386 Foram incluídas no estudo somente amostras de urina colhidas por
387 cistocentese, após antissepsia da pele com álcool (70%), iodo-povidine (5%),
388 clorexidine alcoólico (0,5%), clorexidine degermante (4%) ou álcool-iodado
389 (70%/5%) e inoculadas em meios de transporte (Stuart), encaminhadas em
390 temperatura de refrigeração (4-8°C), em caixas isotérmicas contendo gelo
391 reciclável.

392

393 4.3. Dados epidemiológicos

394 Foram obtidos dados epidemiológicos de sexo e raça dos animais, bem
395 como do período de ocorrência das estações do ano no momento da colheita de
396 urina, a saber: primavera (setembro a novembro), verão (dezembro a fevereiro),
397 outono (março a maio) e inverno (junho a agosto).

398 A idade dos cães foi estratificada como segue: <1 ano de idade (jovens),
399 1 a ≤5 anos (adulto-jovem), >5 a ≤10 anos (adulto) e >10 anos (velho) (RIBEIRO
400 et al., 2022).

401

402 4.4. Cultivo microbiológico

403 Todas as amostras foram cultivadas em ágar suplementado com sangue
404 bovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey (Oxoid do Brasil®, São Paulo,
405 Brasil), mantidas em condições de aerobiose, incubadas a 37°C, por 72 horas.

406 Os micro-organismos de origem bacteriana e leveduras isolados foram
407 encaminhados para o diagnóstico em nível de espécies por espectrometria de
408 massas. Micro-organismos de origem fúngica foram classificados com base em
409 métodos fenotípicos (QUINN et al., 2011).

410

411 4.5. Teste de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados

412 Todos os isolados foram submetidos ao teste *in vitro* padrão de difusão
413 com discos preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI
414 (CLSI, 2020a,b) utilizando nove antimicrobianos de cinco classes de fármacos,
415 preferencialmente utilizados no tratamento de infecções bacterianas em cães, a
416 saber: 1) aminoglicosídeos (amicacina 30mcg), 2) anfenicóis (cloranfenicol
417 30mcg), 3) fluoroquinolonas (enrofloxacino 5mcg, marbofloxacino 5mcg e
418 ciprofloxacino 5mcg), 4) beta lactâmicos e derivados (amoxicilina 30mcg + ácido
419 clavulânico, ceftriaxona 30mcg, ceftiofur 30mcg e cefalexina 30mcg), e 5)
420 sulfonamidas (sulfametoxazole/trimetoprim 25mcg).

421 Foram considerados multirresistentes os isolados de origem bacteriana
422 que apresentaram resistência simultânea ≥3 diferentes grupos (classes) de
423 antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012) recomendados para cada
424 grupo/espécie bacteriana (CLSI, 2020a,b).

425

426 4.6. Espectrometria de massas

427 Todos os isolados de origem bacteriana e leveduras foram submetidos à
428 técnica de espectrometria de massas (*Matrix-Assisted Laser Desorption*
429 *Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* - MALDI-TOF MS) no laboratório de
430 Pesquisa de Qualidade do Leite (QUALILEITE), do Departamento de Nutrição e
431 Produção Animal da FMVZ-USP/Pirassununga, SP.

432 Para tanto, três a quatro colônias recém isoladas (24 a 48h) em ágar
433 sangue bovino (5%) (Oxoid do Brasil®, São Paulo, Brasil) foram submetidas à
434 extração utilizando 20-40µL de ácido fórmico (70%) e centrifugadas, visando a
435 lise bacteriana e liberação de proteínas (predominantemente de origem
436 ribossomal) e formação de íons, necessários para a formação dos espectros
437 bacterianos. Após 15 minutos, foi adicionado em cada amostra 20-40µL de
438 acetronil (100% P.A.), na mesma proporção do ácido fórmico (1:1), e
439 centrifugado. Em seguida, 1µL da solução de cada amostra foi adicionada em
440 placas específicas contendo 96 orifícios (Bruker e Daltonics™, Bremen,
441 Alemanha) e mantida por cerca de 20 minutos para secar em temperatura
442 ambiente. Os orifícios com as amostras secas foram cobertos com 1µL de
443 solução matriz (ácido 2-ciano-4-hidroxicinâmico diluído a 50% de acetromil e
444 2,5% de ácido trifluoracético). As placas foram dispostas no receptáculo do
445 equipamento Bruker e Daltonics™ (Bremen, Alemanha), operado com 337-nm
446 de laser.

447 Os dados dos espectros foram analisados entre 2.000-20.000m/z, usando
448 o software FlexControl 3.3. A caracterização de gênero e espécie dos isolados
449 foi considerada para espectros ≥ 1.7 e ≥ 2.0 , respectivamente (BARCELOS et al.,
450 2019).

451

452 4.7. Cálculo do universo amostral e análise estatística

453 O cálculo do tamanho amostral foi realizado para estimar a prevalência
454 das infecções urinárias em cães associada a uma margem de erro. Por força da
455 complexidade etiológica, a prevalência dos casos de *E. coli* (30%) foi utilizada
456 para o cálculo, posto que representa o patógeno mais frequente nas ITU em

457 cães. Com efeito, considerando a prevalência de isolamento de *E. coli* de 30% e
458 margem de erro de $\pm 5\%$, foi estimada a colheita mínima de 165 amostras de
459 urina de cães com sinais de ITU. O cálculo supracitado foi realizado utilizando o
460 programa Open Epi (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) (DEAN et
461 al., 1994).

462 A associação entre possíveis fatores de risco (estações do ano, sexo,
463 idade e grupos de agentes) e multirresistência foi avaliada pelo teste de Qui-
464 quadrado de Pearson, ou exato de Fisher (valores nas caselas $< 5,0$). Procedeu-
465 se o cálculo das razões de chances (Odds Ratio) em relação a uma categoria de
466 referência, com respectivas estimativas por intervalo de confiança a 95%. Todas
467 as análises foram conduzidas no Programa R, considerando nível de
468 significância $p < 0,05$ (R Core Team, 2023).

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

5.1. RESULTADOS

5.1. Dados epidemiológicos

No período de agosto de 2021 a dezembro de 2022 foram encaminhadas ao laboratório de microbiologia do hospital veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, SP 389 amostras de urina. Destas, 206 foram positivas (52,96%) e 183 foram negativas (47,04%), para o isolamento microbiano. Foram elegíveis para o presente estudo 170 amostras de urina, animais tinham sinais clínicos supracitados de infecção do trato urinário (subitem 3.2).

Entre os 170 animais estudados, 48,82% (83/170) eram machos e 51,18% (87/170) fêmeas.

A idade dos animais variou de 3 meses até 18 anos de idade, com média de 8 anos. Do total de animais, 5,29% (9/170) tinham idade <1 ano (jovens), 11,18% (19/170) entre 1 e ≤5 anos (adulto-jovem), 51,76% (88/170) entre >5 e ≤10 anos (adulto) e 31,76% (54/170) >10 anos (velho).

Os animais foram amostrados principalmente nas estações de inverno (56/170=32,94%) e primavera (54/170=31,76%), seguidos do verão (31/170=18,24%) e outono (29/170=17,06%).

Animais sem raça definida foram os mais frequentes amostrados no estudo (99/170=58,24%), seguido por animais das raças lhasa-apso (22/170=12,94%), shih-tzu (11/170=6,47%), pitbull (7/170=4,12%) e labrador (6/170=2,94%).

Não foi observada associação estatística ($p>0,05$) entre os dados epidemiológicos e os grupos de micro-organismos isolados.

5.2. Identificação microbiológica

A frequência dos micro-organismos isolados, em cultura pura ou associação, diagnosticada por espectrometria de massas, está sumariada nas Tabelas 1 e 2.

514 Foram identificados 190 isolados, dos quais 98,42% (187/190) de origem
515 bacteriana e 1,58% (3/190) fungos/leveduras. Em 77,37% (147/190) das
516 amostras de urina ocorreu o isolamento de bactérias, fungos ou leveduras em
517 cultura pura.

518 Os principais micro-organismos isolados em cultura pura foram: *E. coli*
519 (58/147=39,5%), *Proteus mirabilis* (15/147=10,2%), *Klebsiella pneumoniae*
520 (10/147=6,8%), *Staphylococcus pseudintermedius* (10/89=6,8), *Enterococcus*
521 *faecium* (8/147=5,4%), *Staphylococcus intermedius* (8/147=5,4%),
522 *Streptococcus canis* (7/147=4,8%) e *Pseudomonas aeruginosa* (5/147=3,4%).
523 Em 23,14% (34/147) dos isolados em cultura pura foi identificada miscelânea de
524 outras espécies de micro-organismos (Tabela 1).

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541 **TABELA 1. Frequência de micro-organismos isolados em cultura pura,**
 542 **identificados por espectrometria de massas*, obtidos de infecções urinárias em**
 543 **cães* (2021-2022).**

Micro-organismos	N	%
<i>Escherichia coli</i>	58	39,5
<i>Proteus mirabilis</i>	15	10,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	6,8
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	10	6,8
<i>Enterococcus faecium</i>	8	5,4
<i>Staphylococcus intermedius</i>	8	5,4
<i>Streptococcus canis</i>	7	4,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	4,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	3,4
<i>Candida glabrata</i>	2	1,4
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2	1,4
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	2	1,4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1,4
<i>Klebsiella variicola</i>	2	1,4
<i>Salmonella</i> spp.	2	1,4
**Miscelânea	8	5,4
Total Geral	147	100

545 *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-Flight Mass Spectrometry =

546 MALDI-TOF; N=Número de isolados; % = percentual

547 ** *Acinetobacter baumannii* (n=1), *Staphylococcus aureus* (n=1), *Staphylococcus felis* (n=1),

548 *Staphylococcus schleiferi* (n=1), *Klebsiella aerogenes* (n=1), *Candida albicans* (n=1),

549 *Lactobacillus murinus* (n=1) e *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1).

550

551 Em 22,63% (43/190) das amostras de urina ocorreu o isolamento de
 552 micro-organismos em associações (coinfecções), de dois ou três espécies
 553 diferentes. As principais associações de micro-organismos foram entre *E. coli* +
 554 *Enterococcus faecalis* (5/21=23,8%), *E. coli* + *Streptococcus canis* (4/21=19%),
 555 *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* (2/21=9,5%) e *Staphylococcus*
 556 *pseudintermedius* + *Enterococcus faecalis* (2/21=9,5%) (Tabela 2).

557 **TABELA 2. Frequência de micro-organismos isolados em associação,**
 558 **identificados por espectrometria de massas, obtidos de infecções urinárias**
 559 **em cães* (2021-2022).**

Micro-organismos	N	%
<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	5	23,8
<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus canis</i>	4	19
<i>E. coli</i> + <i>Proteus mirabilis</i>	2	9,5
<i>S. pseudintermedius</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	2	9,5
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> + <i>Enterococcus hirae</i>	1	4,8
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Enterococcus faecium</i>	1	4,8
<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus hirae</i>	1	4,8
<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	4,8
<i>K. pneumoniae</i> + <i>Enterobacter asburiae</i> + <i>E. faecium</i>	1	4,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Streptococcus canis</i>	1	4,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Streptococcus lutetiensis</i>	1	4,8
<i>Proteus mirabilis</i> + <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	1	4,8
Total Geral	21	100

560 *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-Flight Mass Spectrometry =
 561 MALDI-TOF; N = Número de isolados; % = percentual
 562 *E. coli* = *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* = *Klebsiella pneumoniae*, *P. mirabilis* = *Proteus mirabilis*, *E.*
 563 *faecium* = *Enterococcus faecium*

564

565 5.2.1. Enterobactérias

566 Foram isoladas enterobactérias em 61,8% (105/170) das amostras de
 567 urina, considerando isolamento em cultura pura ou em associação, totalizando
 568 114 micro-organismos isolados (114/190=60%). *E. coli* (71/190=37,4%) foi a
 569 espécie identificada com maior frequência, seguida por *Klebsiella* (19/190=10%),
 570 *Proteus* (18/190=9,5%), *Enterobacter* (4/190=2,1%) e *Salmonella* (2/190=1,05%)
 571 (Tabelas 1 e 2).

572

573 5.2.2. *Enterococcus* spp.

574 Colônias típicas do gênero *Enterococcus* foram isoladas em 11,2%
575 (19/170) das amostras, em cultura pura ou em associação. Houve predomínio
576 de *Enterococcus faecalis* (14/190=7,4%), seguido por *Enterococcus faecium*
577 (10/190=5,3%) e *Enterococcus hirae* (2/190=1,05%) (Tabelas 1 e 2).

578

579 5.2.3. *Staphylococcus* spp.

580 Colônias típicas de estafilococos foram isoladas em 13,5% (23/170) das
581 amostras, em cultura pura ou em associação, com predomínio de *S.*
582 *pseudintermedius* (13/190=6,8%) e *S. intermedius* (8/190=4,2%), seguido de *S.*
583 *aureus* (1/190=0,53%), *S. felis* (1/190=0,53%) e *S. schleiferi* (1/190=0,53%)
584 (Tabelas 1 e 2).

585

586 5.2.4. *Streptococcus* spp.

587 Colônias típicas de estreptococos foram isoladas em 5,9% (10/170) das
588 amostras, em cultura pura ou em associação. Houve predomínio de
589 *Streptococcus canis* (12/190=6,3%), seguido por *Streptococcus lutetiensis*
590 (1/190=0,53%) (Tabelas 1 e 2).

591

592 5.2.5. *Pseudomonas* spp.

593 Foram isoladas colônias compatíveis com o gênero *Pseudomonas* em
594 2,9% (5/170) das amostras em cultura pura ou em associação. *Pseudomonas*
595 *aeruginosa* foi a identificada em 2,6% (5/190) do total de isolados (Tabelas 1 e
596 2).

597

598 5.2.6. Fungos e Leveduras

599 Micro-organismos de origem fúngica foram isolados em 1,8% (3/170) das
600 amostras, em cultura pura ou em associação (Tabelas 1 e 2). Duas espécies de
601 leveduras do gênero *Candida* foram identificadas: *Candida glabrata*
602 (2/190=1,05%) e *Candida albicans* (1/190=0,53%).

603 5.2.7. Miscelânea

604 Outros micro-organismos foram identificados no presente estudo, a saber:
605 *Haemophilus haemoglobinophilus* (2/190=1,05%), *Lactobacillus murinus*
606 (1/190=0,53%) e *Stenotrophomonas maltophilia* (1/190=0,53%) (Tabelas 1 e 2).

607

608 5.3. Teste de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

609 O antimicrobiano com maior efetividade diante dos principais
610 grupos/micro-organismos isolados foi amoxicilina/ácido clavulânico ($\geq 70\%$), com
611 efetividade moderada foram amicacina ($\geq 60\%$), exceto para enterobactérias
612 ($=39,5\%$) e marbofloxacino ($\geq 60\%$), exceto para estreptococos ($=30,8\%$). Em
613 contraste, elevada resistência *in vitro* (40-100%) foi observada para os
614 grupos/micro-organismos isolados, particularmente para enterococos
615 (cefalexina 80,8%, ceftriaxona 73,1%, ciprofloxacino 65,4%), enterobactérias
616 (cefalexina 40,4%), estafilococos (sulfametoxazole/trimetoprim 54,2%),
617 estreptococos (ciprofloxacino 61,5%, enrofloxacino 76,9%, marbofloxacino
618 53,9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (cloranfenicol 80%, enrofloxacino 40%).
619 (Tabela 3).

620 A ocorrência de resistência bacteriana a ≥ 3 classes de antimicrobianos foi
621 observada em 21,9% (41/187) dos isolados, classificados como
622 multirresistentes, envolvendo principalmente *E. coli* e espécies de *Enterococcus*
623 (Tabelas 3 e 4).

624

TABELA 3. Perfil por grupo de sensibilidade microbiana *in vitro* em isolados bacterianos obtidos de cães com infecções urinárias (2021-2022).

Grupo / Antimicrobiano	Micro-organismos																	
	Enterobactérias (n=114)			Enterococos (n=26)			Estafilococos (n=24)			Estreptococos (n=13)			<i>Pseudomonas</i> sp. (n=5)			Miscelânea (n=5)		
	S (%)	PS (%)	R (%)	S (%)	PS (%)	R (%)	S (%)	PS (%)	R (%)	S (%)	PS (%)	R (%)	S (%)	PS (%)	R (%)	S (%)	PS (%)	R (%)
Aminoglicosídeos	45	37	32	--	--	--	19	2	3	--	--	--	5	0	0	3	0	2
Amicacina	(39,5)	(32,5)	(28,1)				(79,2)	(8,3)	(12,5)				(100)			(60)		(40)
Anfenicóis	94	8	12	13	5	8	19	0	5	12	0	1	1	0	4	3	0	2
Cloranfenicol	(82,5)	(7)	(10,5)	(50)	(19,2)	(30,8)	(79,2)		(20,8)	(92,3)		(7,7)	(20)		(80)	(60)		(40)
Fluoroquinolonas	75	21	18	--	--	--	14	4	6	2	1	10	1	2	2	3	0	2
Enrofloxacino	(65,8)	(18,4)	(15,8)				(58,3)	(16,7)	(25)	(15,4)	(7,7)	(76,9)	(20)	(40)	(40)	(60)		(40)
Ciprofloxacino	88	13	13	3	6	17	15	4	5	2	3	8	5	0	0	3	0	2
	(77,2)	(11,4)	(11,4)	(11,5)	(23,1)	(65,4)	(62,5)	(16,7)	(20,8)	(15,4)	(23,1)	(61,5)	(100)			(60)		(40)
Marbofloxacino	98	7	9	--	--	--	16	2	6	4	2	7	5	0	0	3	0	2
	(86)	(6,1)	(7,9)				(66,7)	(8,3)	(25)	(30,8)	(15,4)	(53,9)	(100)			(60)		(40)
Beta-lactâmicos	89	11	14	--	--	--	20	0	4	10	1	2	--	--	--	5	0	0
Amox/ác. clavulânico	(78,1)	(9,7)	(12,3)				(83,3)		(16,7)	(76,9)	(7,7)	(15,4)				(100)		
Cefalexina	32	36	46	5 (19,2)	0	21 (80,8)	20	1	3	10	1	2	--	--	--	2	0	3
	(28,1)	(31,6)	(40,4)				(83,3)	(4,2)	(12,5)	(76,2)	(7,7)	(15,4)				(40)		(60)
Ceftriaxona	90	13	11	5 (19,2)	2 (7,7)	19 (73,1)	22	2	0	10	1	2	0	4	1	3	0	2
	(79)	(11,4)	(9,7)				(91,7)	(8,3)		(76,9)	(7,7)	(15,4)		(80)	(20)	(60)		(40)
Ceftiofur	45	21	13	--	--	--	12	2	1	8	2	1	--	--	--	1	2	1
	(57)	(26,6)	(16,5)				(80)	(13,3)	(6,7)	(72,7)	(9,1)	(18,2)				(25)	(50)	(25)
Sulfonamidas	77	5	32	--	--	--	11	0	13	5	3	5	--	--	--	3	0	2
Sulfa/trimetoprim	(67,5)	(4,4)	(28,1)				(45,8)		(54,2)	(38,5)	(23,1)	(38,5)				(60)		(40%)

Amox/Ác. Clavulânico = amoxicilina/ácido clavulânico; Sulfa/trimetoprim = Sulfametoxazole/trimetoprim

Enterobactérias = *E. coli*, *Enterobacter xiangfangensis*, *Enterobacter asburiae*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. aerogenes*, *K. variicola*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp.; Enterococos = *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*; Estafilococos = *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. aureus*, *S. schleifefri*, *S. felis*; Estreptococos = *S. canis*, *S. lutetiensis*; Pseudomonas = *Pseudomonas aeruginosa*;

Miscelânea: *Lactobacillus murinus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Acinetobacter baumannii*

630 **TABELA 4. Frequência de bactérias multirresistentes isoladas, em cultura**
 631 **pura ou em associação, identificadas por espectrometria de massas* (2021-**
 632 **2022).**
 633

Micro-organismos	N	%
<i>Escherichia coli</i>	16	39
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	14,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	9,8
<i>Proteus mirabilis</i>	4	9,8
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	3	7,3
<i>Streptococcus canis</i>	2	4,9
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	2,4
<i>Enterococcus faecium</i>	1	2,4
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	1	2,4
<i>Klebsiella variicola</i>	1	2,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2,4
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1	2,4
Total Geral	41	100

634 *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-Flight Mass Spectrometry = MALDI-TOF;
 635 N = Número de isolados; % = frequência dos isolados
 636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653 6. DISCUSSÃO

654 O Brasil possui uma das maiores populações de cães do mundo, estimada
655 em 54,2 milhões de animais em 2021 (INSTITUTO PET BRASIL, 2022), dado
656 que pode ter subestimado, se considerarmos a população de animais não
657 domiciliados (errantes), podendo atingir ~70 milhões de cães. As infecções
658 urinárias figuram dentre as doenças mais comuns em cães, responsável por
659 cerca de 20% dos atendimentos na rotina de pequenos animais (GÓMEZ-
660 BELTRÁN et al., 2020; GUZMÁN RAMOS et al., 2021) e, devido à complexidade
661 etiológica – particularmente de origem bacteriana – necessitam de diagnóstico
662 laboratorial que, na rotina, é realizado utilizando métodos microbiológicos
663 convencionais. Tais infecções podem ser causadas por bactérias
664 multirresistentes aos antimicrobianos (HALL; HOLMES; BAINES, 2013; BYRON,
665 2019), que merece preocupação em Saúde Única, em virtude do contato estreito
666 entre os animais e tutores nos domicílios (WONG; EPSTEIN; WESTROPP, 2015;
667 RUPPÉ; ANDREMONT; ARMAND-LEFÈVRE, 2018; JOHNSTONE, 2020;
668 TOOMBS-RUANE et al., 2020; GUZMÁN RAMOS et al., 2021); fatos que podem
669 ser considerados as principais motivações para o desenvolvimento do presente
670 estudo.

671 Diferentes fatores são considerados predisponentes para as ITU em cães,
672 incluindo a anatomia do aparelho geniturinário dos cães, produção hormonal,
673 imunidade, higiene dos animais e do ambiente, e coinfeções (diabetes mellitus)
674 (BYRON, 2019; HARRER; DORSCH, 2020; MACHADO et al., 2021). No
675 presente estudo foi observada certa equivalência da ocorrência das infecções
676 urinárias entre os sexos dos cães, com 51,2% e 48,8% dos casos observados
677 em fêmeas e machos, respectivamente. Ao contrário, tem-se observado certa
678 tendência das infecções urinária em fêmeas, em virtude da proximidade da
679 genitália feminina com a região perianal, que poderia favorecer a infecção
680 ascendente da uretra (LING et al., 2001), particularmente por enterobactérias
681 presentes na microbiota perianal e do ambiente (BYRON, 2019; HARRER;
682 DORSCH, 2020; MACHADO et al., 2021). No entanto, a avaliação de certos
683 fatores predisponentes (*i.e.*, limpeza do ambiente, imunidade, comorbidades,
684 produção hormonal nas fêmeas) não foram objeto do presente estudo.

685 A maior frequência das ITU nos cães foi observada em animais sem raça
686 definida (~60%), dificultando a análise do fator raça no presente estudo, em
687 detrimento de pequeno número de animais de raças puras (lhasa apso, shih-tzu
688 e pitbull). O predomínio das infecções urinárias em cães sem raça definida no
689 presente estudo poderia ser atribuído, em parte, ao perfil dos tutores que utilizam
690 os serviços do laboratório de microbiologia do hospital veterinário-escola da
691 FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, em sua maioria com baixo poder aquisitivo
692 (ALMEIDA, 2023), bem como a popularização da criação de animais mestiços
693 (GUZMÁN RAMOS et al., 2021).

694 Ampla variação de idade foi observada nos cães com ITU, acometendo
695 animais desde 3 meses até 18 anos de idade (média de 8 anos), com predomínio
696 das infecções em animais estratificados com adultos (>5 e ≤10 anos) e velhos
697 (>10 anos) acometendo 51,76% e 31,76% dos casos, respectivamente. A maior
698 ocorrência das ITU com o envelhecimento dos cães concorda com estudos
699 similares (LING et al., 2001; HALL; HOLMES; BAINES, 2013), e poderia ser
700 creditada às disfunções da resposta imune em cães mais velhos, ou distúrbios
701 hormonais, que podem favorecer o declínio da função renal (BYRON, 2019;
702 GUZMÁN RAMOS et al., 2021), bem como maior exposição do trato urinário aos
703 agentes com o decorrer da idade (BONNETT; EGENVALL, 2010).

704 Evidências sugerem que a sazonalidade poderia influenciar na ocorrência
705 de infecções urinárias em cães. Neste contexto, estudo na Espanha revelou
706 maior frequência de *Enterococcus* spp. em cães com ITU nos meses de verão,
707 enquanto *E. coli* e *Proteus* spp. foram prevalentes na primavera (HERNANDO et
708 al., 2021). Períodos do ano com maior pluviosidade e umidade poderiam
709 favorecer a multiplicação de enterobactérias ou bactérias do ambiente,
710 contribuindo com as ITU em animais. A elevação das temperaturas poderia
711 resultar em desidratação e maior concentração da urina, favorecendo a
712 multiplicação microbiana (YOUSEFI; TORKAN, 2017). No entanto, no presente
713 estudo, 50,5% dos animais foram amostrados nos meses mais quentes do ano
714 (primavera/verão), enquanto 49,5% dos casos nas estações frias
715 (outono/inverno), não havendo impacto aparente do efeito sazonal na ocorrência
716 das ITU, sugerindo que as infecções urinárias podem acometer os animais, na
717 região amostrada, ao longo de todo ano.

O cultivo microbiológico da urina de 170 cães com sinais de ITU possibilitou a identificação de 190 isolados de micro-organismos, pertencentes a 26 espécies distintas. Do total de isolados, 77,4% foram isolados em cultura pura, enquanto em 22,6% foram observadas coinfeções de micro-organismos, com predomínio de agentes de origem bacteriana (>98%). Tal achado reforça a natureza polimicrobiana das infecções urinárias em cães (HALL; HOLMES; BAINES, 2013; BYRON, 2019) e a importância de firmar o diagnóstico com o suporte laboratorial (CONRADO et al., 2010).

Escherichia coli (39,5%), *Proteus mirabilis* (10,2%), *Klebsiella pneumoniae* (6,8%), *Staphylococcus pseudintermedius* (6,8%), *Enterococcus faecium* (5,4%) e *Staphylococcus intermedius* (5,4%) foram os micro-organismos mais frequentemente identificados em cultura pura, bem como nas associações nos animais amostrados, utilizando a espectrometria de massas.

O grupo das enterobactérias representou >50% das espécies de micro-organismos isolados dos cães com ITU, em cultura pura ou em associação. Tal resultado concorda com estudos similares, nos quais este complexo grupo de bactérias gram-negativas tem sido identificado como os principais agentes primários das ITU, tanto em animais como em humanos (RAMPACCI et al., 2018; ROBERTS; WHITE; LAM, 2019), cuja infecção pode ser favorecida pela presença destes agentes na microbiota perianal dos cães, bem como no ambiente dos animais (SIQUEIRA et al., 2009; QUINN et al., 2011; BYRON, 2019; HARRER; DORSCH, 2020; MACHADO et al., 2021).

Escherichia coli pertencem ao grupo das enterobactérias, e se caracterizam como bactérias gram-negativas versáteis, de comportamento oportunista, com grande variedade clonal e de fatores de virulência entéricos e extraentéricos, além de multirresistência aos antimicrobianos convencionais (JESSER; LEVY, 2020; DENAMUR et al., 2021). Podem ser encontradas em grande variedade de biomas (e.g., solo, água, vegetais, material em decomposição) (JANG et al., 2017), veiculadas por insetos (BERTOLINI et al., 2022), bem como pertencem a microbiota do trato intestinal de animais e humanos (JANG et al., 2017). Apesar da presença em grande variedade de biomas, as infecções por *E. coli* comumente estão relacionadas a contaminação

750 de origem fecal ou do ambiente (JESSER; LEVY, 2020; DENAMUR et al., 2021).
751 *E. coli* é considerado o principal agente primário de infecções do trato
752 geniturinário (ITU), tanto em animais (SIQUEIRA et al., 2009) quanto em
753 humanos (JESSER; LEVY, 2020; DENAMUR et al., 2021).

754 Estudo no Brasil comparou fatores de virulência de *E. coli* isoladas de ITU,
755 piometra e das fezes de cães saudáveis, e observou certa similaridade da
756 presença de genes, apesar da maior frequência de fatores de virulência
757 extraentéricos nos isolados obtidos de afecções geniturinárias e piometra
758 (SIQUEIRA et al., 2009). No presente estudo, houve predomínio de isolamento
759 de *E. coli* em cultura pura (~40%) e nas coinfeções – resultado que era
760 esperado -, reforçando esta bactéria como o principal agente primário das ITU
761 em cães, sinalizando que as infecções pelo micro-organismo ocorram de modo
762 oportunista – via ascendente pela uretra – a partir da microbiota perianal ou a
763 partir do ambiente dos animais (SIQUEIRA et al., 2009; RIBEIRO; LEITE;
764 SIQUEIRA, 2016).

765 *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* foram bactérias
766 identificadas em 10,2% e 3,4%, respectivamente, das amostras de urina com
767 isolamento em cultura pura. Estas espécies de bactérias gram-negativas
768 possuem, em comum, multirresistência aos antimicrobianos, comportamento
769 oportunista e habitat hídrico ou presença no ambiente contendo excesso de
770 umidade e/ou fezes de animais (QUINN et al., 2011). Estudo no Brasil descreveu
771 o predomínio de infecções do trato urinário (48,2%) em 73 isolados de *Proteus*
772 *mirabilis* e *Proteus vulgaris* isolados de diferentes afecções em animais
773 domésticos, incluindo 27 cães (ZAPPA et al., 2017). No que tange as infecções
774 urinárias por espécies de *Pseudomonas*, estudos conduzidos em diferentes
775 países têm revelado a ocorrência do agente entre 2 e 4%, similar ao observado
776 nos cães amostrados (HALL; HOLMES; BAINES, 2013; WONG; EPSTEIN;
777 WESTROPP, 2015; RAMPACCI et al., 2018; ROBERTS; WHITE; LAM, 2019). A
778 identificação de *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (comumente
779 associados com infecções de origem hídrica) nos animais do presente estudo,
780 sugere provável infecção por via ascendente pela uretra, relacionadas a
781 ambientes com excesso de água ou umidade na criação dos animais.

782 *Klebsiella pneumoniae*, outro representante do complexo grupo das
783 enterobactérias, foram isoladas em cultura pura em 6,8% das infecções
784 urinárias, além de outras espécies do gênero (*K. oxytoca*, *K. variicola*, *K.*
785 *aerogenes*). Espécies do gênero *Klebsiella* são encontradas no ambiente (solo,
786 fezes, água, matéria orgânica), bem como no trato entérico de animais e
787 humanos (MARTIN; BACHMAN, 2018). A virulência e patogenicidade das
788 espécies de *Klebsiella* para animais e humanos tem sido atribuída a presença
789 de fatores capsulares, adesinas, sistemas de captação de ferro e resistência aos
790 mecanismos de imunidade sérica (WARETH; NEUBAUER, 2021). Grande
791 variedade de manifestações clínicas tem sido atribuída às infecções por *K.*
792 *pneumoniae* em animais, incluindo no trato urinário (RIBEIRO et al., 2022). Estas
793 infecções se caracterizam pelo comportamento oportunista, associadas a
794 isolados multirresistentes aos antimicrobianos (QUINN et al., 2011). Nos
795 humanos, *K. pneumoniae* tem sido associada à infecções graves adquiridas em
796 hospitais (MARTIN; BACHMAN, 2018). O isolamento de espécies de *Klebsiella*,
797 particularmente *K. pneumoniae*, nas infecções do trato urinário nos cães do
798 presente estudo provavelmente também está relacionado a contaminação de
799 origem ambiental, e merece preocupação em Saúde Única, em virtude do
800 potencial zoonótico do agente.

801 *Enterobacter xiangfangensis* (1,6%) e *Enterobacter asburiae* (0,53%)
802 também pertencem ao grupo das enterobactérias (QUINN et al., 2011), e foram
803 isolados em baixa frequência nos cães amostrados. No entanto, *Enterococcus*
804 *hiraes* e *E. xiangfangensis* foram descritos recentemente como agentes causais
805 de grave processo septicêmico em cão e gato (identificados por MALDI-TOF MS
806 em hemocultura), nos quais ambos os casos evoluíram para óbito
807 (SCARPELLINI et al., 2023), alertando para patogenicidade de espécies de
808 *Enterococcus* envolvidas em processos infecciosos disseminados em animais.

809 *Salmonella* spp., enterobactéria de reconhecido comportamento
810 oportunista em infecções entéricas e extraentéricas em animais e humanos
811 (QUINN et al., 2011), foi identificada em somente dois (2/190=1,05%) cães com
812 ITU do presente estudo. Similar as demais enterobactérias, possui como habitat
813 o ambiente, além do trato intestinal de animais e humanos (QUINN et al., 2011),
814 cujas infecções provavelmente ocorrem por contaminação do trato urinário dos

815 cães a partir das fezes ou do ambiente dos animais. No entanto, a não
816 identificação dos sorotipos do patógeno dificulta avaliar o potencial zoonótico ou
817 mesmo a origem dos isolados.

818 Espécies do gênero *Staphylococcus* são bactérias gram-positivas que
819 possuem como habitat a pele, mucosas e conjuntivas dos animais e humanos.
820 Possuem diferentes fatores de virulência relacionados a patogenicidade das
821 espécies, e tem sido descritas em grande variedade de afecções clínicas, e.g.,
822 dermatopatias, abscessos, otites, mastites, pneumonia e infecções do trato
823 geniturinário (SILVA et al., 2015; BENITES; MELVILLE; RIBEIRO, 2016). No
824 presente estudo, *Staphylococcus pseudintermedius* e *S. intermedius* foram
825 isolados em cultura pura nos cães com ITU em 6,8% e 5,4% dos animais,
826 respectivamente, resultado que está em consonância com estudos similares, nos
827 quais espécies de *Staphylococcus* têm sido frequentemente identificadas nas
828 infecções urinárias cães, variando entre 6 e 14% dos casos (WINDAHL et al.,
829 2014; MCMEEKIN et al., 2017; RAMPACCI et al., 2018). Ademais, o uso do
830 MALDI-TOF MS possibilitou a diferenciação fidedigna entre as espécies
831 *Staphylococcus pseudintermedius* e *S. intermedius*, posto que não é totalmente
832 inequívoca a diferenciação destas espécies utilizando métodos fenotípicos
833 (bioquímicos) tradicionais nas infecções em animais (SILVA et al., 2015;
834 ALMEIDA, 2023).

835 À semelhança dos estafilococos, espécies de *Streptococcus* habitam a
836 pele, mucosas e conjuntivas dos animais e humanos, e estão relacionadas a
837 grande variedade de infecções piogênicas (QUINN et al., 2011). No presente
838 estudo, *Streptococcus canis* foi isolado em cultura pura a partir de 4,8% dos cães
839 com ITU, resultado que concorda com estudos similares, que têm descrito
840 espécies de *Streptococcus* entre 3,5% e 7,5% da casuística de infecções
841 urinárias em cães (HALL; HOLMES; BAINES, 2013; HERNANDO et al., 2021).
842 A presença destes grupos de micro-organismos (estreptococos e estafilococos)
843 na microbiota da pele e mucosas dos animais, pode favorecer infecções
844 oportunistas, incluindo do trato urinário de cães (QUINN et al., 2011; BENITES;
845 MELVILLE; RIBEIRO, 2016).

846 Outro grupo de bactérias gram-positivas isoladas no presente estudo foi
847 representado por espécies de *Enterococcus*, particularmente *Enterococcus*
848 *faecalis*, isolados em cultura pura de 4,1% dos cães com ITU, além da
849 identificação (por espectrometria de massas) de outras espécies em menor
850 ocorrência (*E. faecium* e *E. hirae*). Estudos em outros países têm descrito
851 ocorrência variável de espécies de enterococos nas infecções urinárias em cães,
852 entre 8,6 a 11,2% (HALL; HOLMES; BAINES, 2013; HERNANDO et al., 2021),
853 cujas diferenças nas prevalências podem ser justificadas pelos métodos
854 utilizados no diagnóstico, em virtude da dificuldade de diferenciação por métodos
855 bioquímicos tradicionais. À semelhança das enterobactérias, *Enterococcus* spp.
856 podem habitar o trato intestinal de animais e humanos, causando infecções do
857 trato urinário por contaminação a partir do ambiente ou da região perianal
858 (TUMPA; ŠTRITOF; PINTARIĆ, 2022). Espécies do gênero *Enterococcus* têm
859 merecido atenção em Saúde Única, posto a elevada resistência múltipla dos
860 isolados às principais classes de antimicrobianos, representando desafio no
861 tratamento das infecções (SIMJEE et al., 2002).

862 Infecções urinárias por leveduras das espécies *Candida glabrata* (1,4%)
863 e *Candida albicans* (0,7%) foram identificadas em baixa frequência nos cães do
864 presente estudo. Estudos similares também têm relevado reduzida participação
865 de agentes fúngicos e leveduras nas ITU em cães (HERNANDO et al., 2021).
866 Leveduras do gênero *Cândida* podem ser encontradas na microbiota da vulva e
867 prepúcio dos animais, bem como em ambientes com excesso de umidade, e
868 desenvolvem infecções das vias urinárias particularmente em animais com
869 tratamento intensivo/prolongado com antimicrobianos ou em animais
870 imunossuprimidos, que resultam em desequilíbrio da microbiota local,
871 favorecendo infecções oportunistas por este grupo de agentes (PRESSLER et
872 al., 2003; REAGAN et al., 2019).

873 Miscelânea de outros micro-organismos foi identificada em cultura pura
874 ou em associação nos cães estudados com ITU, *i.e.*, *Lactobacillus murinus*,
875 *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus haemoglobinophilus*,
876 *Acinetobacter baumannii*. Na literatura consultada, *Lactobacillus murinus* e
877 *Stenotrophomonas maltophilia* são descritos pela primeira vez como agentes
878 primários de infecções urinárias em cães. Tal resultado poderia ser justificado

879 pelo diagnóstico do presente estudo baseado em proteômica (MALDI-TOF MS),
880 que se caracteriza como método rápido, de custo acessível e de alto poder
881 discriminatório de espécies de bactérias e leveduras (LI et al., 2022) e que,
882 gradualmente, tem sido adotado como técnica de rotina (GONÇALVES et al.,
883 2014) ou de confirmação diagnóstica em medicina veterinária (RIBEIRO et al.,
884 2022).

885 Em 183 amostras de urina não foi obtido o isolamento microbiano no
886 decorrer do estudo. Tal resultado pode ser atribuído a distúrbios urinários não
887 sépticos (cistite inflamatória, urolitíase e/ou processos neoplásicos) ou causadas
888 por agentes não convencionalmente isoláveis nos meios de cultura utilizados.

889 Amoxicilina/ácido clavulânico foi o antimicrobiano que apresentou maior
890 eficácia *in vitro* (>70%) diante dos isolados bacterianos nos cães com ITU, os
891 antimicrobianos com efetividade moderada foram amicacina ($\geq 60\%$), exceto para
892 enterobactérias ($=39,5\%$) e marbofloxacino ($\geq 60\%$), exceto para estreptococos
893 ($=30,8\%$). Tal resultado indica que, em geral, estes antimicrobianos podem ser
894 considerados boas opções no tratamento de infecções urinárias em cães. Estudo
895 similar na Suécia, identificou >90% de eficácia de antimicrobianos do grupo dos
896 aminoglicosídeos e fluorquinolonas em isolados de *Escherichia coli*, *Proteus*
897 *mirabilis* e *Klebsiella* spp. (WINDAHL et al., 2014), enquanto nos EUA, foi
898 observada sensibilidade de ~77% e 85% para amoxicilina/ácido clavulânico e
899 cloranfenicol, respectivamente, em isolados bacterianos obtidos de ITU em cães
900 (WONG; EPSTEIN; WESTROPP, 2015). A baixa eficácia de fármacos no
901 tratamento de diferentes infecções em animais, comumente está associada ao
902 uso indevido (não racional) dos antimicrobianos no tratamento, que incluem
903 subdoses, uso de fármacos profiláticos, tempo inapropriado de terapia, ou
904 tratamentos conduzidos sem o respaldo de testes prévios *in vitro* de
905 sensibilidade aos isolados (GUIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013).

906 Neste contexto, elevada resistência *in vitro* (~20%) dos isolados obtidos
907 dos cães com ITU foi observada para os antimicrobianos utilizados (e.g.,
908 sulfonamidas, certas cefalosporinas e fluoroquinolonas), principalmente diante
909 de enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterococcus*. No
910 que tange às sulfonamidas, tal resultado era esperado, uma vez que este grupo

911 de fármacos é utilizado há décadas no tratamento de diferentes infecções em
912 animais domésticos (RABELO, 2022), fato que pode aumentar a pressão seletiva
913 para bactérias multirresistentes (GUIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013).
914 Na última década, estudos com diferentes afecções em animais, conduzidos em
915 diferentes países, incluindo no Brasil, têm revelado de modo preocupante a
916 crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos do grupo dos beta-
917 lactâmicos, tetraciclínas, sulfonamidas e fluoroquinolonas (WONG; EPSTEIN;
918 WESTROPP, 2015; MCMEEKIN et al., 2017; MARQUES et al., 2018; GUZMÁN
919 RAMOS et al., 2021; RIBEIRO et al., 2022), que se constituem em fármacos de
920 uso comum no tratamento de animais de produção e de de companhia
921 (GUIGUÈRE; PRESCOTT; DOWLING, 2013).

922 De fato, a multirresistência bacteriana em animais e humanos representa
923 preocupação emergente no contexto de Saúde Única, considerada problema de
924 ordem global pela Organização Mundial da Saúde - OMS (OMS, 2022). Estima-
925 se que, até 2050, as infecções bacterianas multirresistentes poderão vitimar 10
926 milhões de pessoas/ano, superando a mortalidade pelos diferentes tipos de
927 neoplasias (O'NEILL, 2016), justificando a importância de estudos de vigilância
928 de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos isoladas de animais.

929 Com efeito, faz-se necessário fomentar o uso racional de antimicrobianos
930 nas abordagens terapêuticas em animais, minimizando o risco de infecções
931 multirresistentes (FAR; MARINO, 2001; PURO et al., 2022), adotando, sempre
932 que possível, tratamentos respaldados em testes prévios de sensibilidade
933 microbiana *in vitro* dos patógenos, que podem aumentar as chances de sucesso
934 do tratamento, diminuir a cronicidade da infecção e possibilitar a vigilância
935 epidemiológica de bactérias de origem animal com resistência múltipla aos
936 antimicrobianos (O'NEILL, 2016).

937 A amostragem por conveniência dos cães com ITU na região estudada, a
938 não investigação de exames subsidiários e a evolução dos casos, podem ser
939 considerados fatores limitantes do presente estudo.

940

941 7. CONCLUSÕES

- 942 ✓ Grande variedade de espécies de micro-organismos foi identificada, em
943 cultura pura e/ou em associação, confirmando a natureza polimicrobiana
944 das infecções urinárias em cães;
- 945
- 946 ✓ Enterobactérias - em especial *E. coli* - foi o grupo bacteriano mais
947 frequentemente identificado nas ITU em cães, provavelmente pelo
948 favorecimento de infecções ascendentes pela uretra por bactérias de
949 origem fecal provenientes da região perianal ou do ambiente dos animais;
- 950
- 951 ✓ Foi observado predomínio das ITU em cães estratificados com adultos (>5
952 e ≤10 anos, 51,76%) e velhos (> 10 anos, 31,76%), indicando maior
953 predisposição das infecções urinárias com o envelhecimento dos animais;
- 954
- 955 ✓ Amoxicilina/ácido clavulânico foi o antimicrobiano que apresentou maior
956 eficácia *in vitro* (>70%) diante dos isolados bacterianos nos cães com ITU,
957 para os grupos de micro-organismos onde ele é indicado;
- 958
- 959 ✓ Elevada resistência dos isolados (~30%) foram obtidos dos cães com ITU,
960 principalmente em enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e
961 *Enterococcus* spp;
- 962
- 963 ✓ Elevada multirresistência (~20%) bacteriana foi identificada nos isolados,
964 ressaltando a necessidade do uso racional dos antimicrobianos e dos
965 testes de sensibilidade *in vitro* no tratamento de infecções em animais
966 domésticos, incluindo do trato urinário;

974 8. REFERÊNCIAS

- 975 ALMEIDA, BEATRIZ DE OLIVEIRA. Etiologia polimicrobiana na otite externa canina
976 identificada pela espectrometria de massas e multirresistência bacteriana aos

- 977 antimicrobianos. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu,
978 2023.
- 979 ARMAND-LEFÈVRE, L.; ANDREMONT, A.; RUPPÉ, E. Travel and acquisition of
980 multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Medecine et Maladies Infectieuses* Elsevier
981 Masson SAS, 2018.
- 982 ASLAM, BILAL; BASIT, MADIHA; NISAR, MUHAMMAD ATIF; KHURSHID, MOHSIN;
983 RASOOL, MUHAMMAD HIDAYAT. Proteomics: Technologies and their applications.
984 *Journal of Chromatographic Science*. Oxford University Press, 2017.
- 985 BALL; RUBIN, K. R.; CHIRINO-TREJO, J. E. Antimicrobial resistance and prevalence of
986 canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Teaching Hospital.
987 *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2015.
- 988 BARCELOS, M. M.; MARTINS, L.; GRENFELL, R. C.; JULIANO, L.; ANDERSON, K. L.;
989 DOS SANTOS, M. V.; GONÇALVES, J. L. Comparison of standard and on-plate
990 extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS.
991 *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 50, n. 3, p. 849–857, 2019.
- 992 BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, M. G. Estafilococcias. *Enfermidades pelo*
993 *gênero Pseudomonas*. Em: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. (org.). *Doenças*
994 *Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia*. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, p.
995 300–314, 2016.
- 996 BERTOLINI, A. B. et al. Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by
997 mass spectrometry in flies (*Insecta, Diptera*) captured in the milking environment. *Letters*
998 *in Applied Microbiology*, John Wiley and Sons Inc, 2022.
- 999 BONNETT, B. N.; EGENVALL, A. Age Patterns of Disease and Death in Insured
1000 Swedish Dogs, Cats and Horses. *Journal of Comparative Pathology*, 2010.
- 1001 BYRON, Julie K. Urinary Tract Infection. *Veterinary Clinics of North America - Small*
1002 *Animal Practice*, W.B. Saunders, 2019.
- 1003 CAMARGO, V. E.; BAHR ARIAS, M. V.; PERUGINI, M. R. E. Clinical and microbiological
1004 characteristics of dogs in sepsis in an academic veterinary hospital in the north of
1005 Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 40, n. 11, p. 903–913, 2020.
- 1006 CARVALHO, A. C.; BARBOSA, A. V.; ARAIS, L. R.; RIBEIRO, P. F.; CARNEIRO, V. C.;
1007 CERQUEIRA, A. M. F. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of
1008 *Escherichia coli* from dogs and owners. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 1, p.
1009 150–158, 2016.
- 1010 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI (2020a). Performance
1011 Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing. 30. ed. Wayne, PA.
- 1012 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI (2020b). Performance
1013 Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria isolated from
1014 Animals (CLSI VET 015). 5. ed. Wayne, PA.
- 1015 CONRADO, ALESSANDRO et al. Quando e como valorizar culturas de urina
1016 polimicrobianas no laboratório de microbiologia clínica. *J Bras Patol Med Lab*, v. 46, n.
1017 4, p. 289-294, 2010.
- 1018 DA SILVA, DAVID ATTUY VEY; BRENDENBACH, HOLGER; GRÜTZKE, JOSEPHINE;
1019 DIECKMANN, RALF; SOARES, RODRIGO MARTINS; DE LIMA, JULIA TERESA

- 1020 RIBEIRO; KEID, LARA BORGES; HOFREUTER, DIRK; AL DAHOUK, SASCHA.
1021 MALDI-TOF MS and genomic analysis can make the difference in the clarification of
1022 canine brucellosis outbreaks. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 2020.
- 1023 DENAMUR, ERICK; CLERMONT, OLIVIER; BONACORSI, STÉPHANE; GORDON,
1024 DAVID. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*
1025 *Microbiology*, Nature Research, 2021.
- 1026 DINGLE, TANIS C.; BUTLER-WU, SUSAN M. MALDI-TOF mass spectrometry for
1027 microorganism identification. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2013.
- 1028 DOS SANTOS, WENDEL MOMBAQUE; AROMATARIS, EDOARDO; SECOLI, SILVIA
1029 REGINA; MATUOKA, JESSICA YUMI. Cost-effectiveness of antimicrobial treatment for
1030 inpatients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: A systematic
1031 review of economic evidence. *JB I Database of Systematic Reviews and Implementation*
1032 *Reports* Lippincott Williams and Wilkins, 2019.
- 1033 DUGAR, SIDDHARTH; CHOUDHARY, CHIRAG; DUGGAL, ABHIJIT. Sepsis and septic
1034 shock: Guideline-based management. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* Cleveland
1035 *Clinic Educational Foundation*, 2020.
- 1036 FAR, FABIANE EL; MARINO, CRISTIANE G. J. The Organization of Hospital Infection
1037 Control Committees and Their Importance in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious*
1038 *Diseases*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 5, p. 290-293, 2001.
- 1039 FORRESTER, S. DRU; TROY, GREGORY C.; DALTON, M. NELL; HUFFMAN,
1040 JENNIFER W.; HOLTZMAN, GOLDE. Retrospective Evaluation of Urinary Tract
1041 Infection in 42 Dogs with Hyperadrenocorticism or Diabetes Mellitus or Both Materials
1042 and Methods Criteria for Selection of Cases and Data Collection *J Vet Intern Med*. *J Vet*
1043 *Intern Med*; v. 13, p. 557–560, 1999.
- 1044 GÓMEZ-BELTRÁN, DAVID A.; VILLAR, DAVID; LÓPEZ-OSORIO, SARA; FERGUSON,
1045 DUNCAN; MONSALVE, LAURA K.; CHAPARRO-GUTIÉRREZ, JENNY J. Prevalence
1046 of antimicrobial resistance in bacterial isolates from dogs and cats in a veterinary
1047 diagnostic laboratory in Colombia from 2016–2019. *Veterinary Sciences*, v. 7, n. 4, p. 1–
1048 11, 2020.
- 1049 GONÇALVES, JULIANO LEONEL; TOMAZI, TIAGO; BARREIRO, JULIANA REGINA;
1050 BRAGA, PATRÍCIA APARECIDA DE CAMPOS; FERREIRA, CHRISTINA RAMIRES;
1051 ARAÚJO JUNIOR, JOÃO PESSOA; EBERLIN, MARCOS NOGUEIRA; DOS SANTOS,
1052 MARCOS VEIGA. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine
1053 intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
1054 mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, v. 173, n. 1–2, p. 147–151, 2014.
- 1055 GUIGUÈRE, STEEVE; PRESCOTT, JOHN F.; DOWLING, PATRICIA M. Antimicrobial
1056 Therapy in Veterinary Medicine. 5. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2013.
- 1057 GUZMÁN RAMOS, P. J.; SHIEL, R. E.; FERNÁNDEZ PÉREZ, C.; RÍOS BOETA, A. M.;
1058 PERLADO CHAMIZO, M. R.; BALLESTER AGUADO, J. I.; RUIZ DURO, N.; ORTIZ-
1059 DÍEZ, G. Antimicrobial resistance increased over an 8-year period in Enterobacteriaceae
1060 cultured from canine urine samples. *Journal of Small Animal Practice*, v. 62, n. 4, p. 279–
1061 285, 2021.
- 1062 HALL, J. L.; HOLMES, M. A.; BAINES, S. J. Prevalence and antimicrobial resistance of
1063 canine urinary tract pathogens. *Veterinary Record*, v. 173, n. 22, p. 549, 2013.

- 1064 HARRER, JULIA; DORSCH, ROSWITHA. Bacterial urinary tract infection and subclinical
1065 bacteriuria in the dog: A current review. Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere –
1066 Heimtiere Georg Thieme Verlag, 2020.
- 1067 HERNANDO, E.; VILA, A.; D'IPPOLITO, P.; RICO, A. J.; RODON, J.; ROURA, X.
1068 Prevalence and Characterization of Urinary Tract Infection in Owned Dogs and Cats
1069 From Spain. Topics in Companion Animal Medicine, v. 43, 2021.
- 1070 HOU, TSUNG YUN; CHIANG-NI, CHUAN; TENG, SHIH HUA. Current status of MALDI-
1071 TOF mass spectrometry in clinical microbiology. Journal of Food and Drug Analysis.
1072 Elsevier Taiwan LLC, 2019.
- 1073 INSTITUTO PET BRASIL. Censo Pet IPB: com alta recorde de 6% em um ano, gatos
1074 lideram crescimento de animais de estimação no Brasil. 2022.
- 1075 JANG, J.; HUR, H. G.; SADOWSKY, M. J.; BYAPPANAHALLI, M. N.; YAN, T.; ISHII, S.
1076 Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review.
1077 Journal of Applied Microbiology, Blackwell Publishing Ltd, 2017.
- 1078 JANG, KYOUNG SOON; KIM, YOUNG HWAN. Rapid and robust MALDI-TOF MS
1079 techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications.
1080 Journal of Microbiology, Microbiological Society of Korea, 2018.
- 1081 JANUÁRIO DE LIMA, LEANDRO; FARIAS, MARIA DO CARMO ANDRADE DUARTE.
1082 Interações por Causa Sensível à Atenção Primária na Clínica Pediátrica em Período
1083 Sazonal. Revista Saúde em Foco, v. 7, n. 2, p. 68–85, 2020.
- 1084 JESSER, KELSEY J.; LEVY, KAREN. Updates on defining and detecting diarrheagenic
1085 *Escherichia coli* pathotypes. Current Opinion in Infectious Diseases, v. 33, n. 5, p. 372–
1086 380, 2020.
- 1087 JOHNSTONE, T. A clinical approach to multidrug-resistant urinary tract infection and
1088 subclinical bacteriuria in dogs and cats. New Zealand Veterinary Journal. Taylor and
1089 Francis Ltd., 2020.
- 1090 JOTHA, LUANA; BRANCOLI, DANIEL LUZ; CAVALCANTE, FERNANDA. uso
1091 indiscriminado de antibióticos na clínica veterinária, seleção de bactérias
1092 multirresistentes e risco para a saúde pública – estudo de caso. Revista Multidisciplinar
1093 Em Saúde, v. 2, 2021.
- 1094 KLAUSNER, J. S.; OSBORNE, C. A. Urinary tract infection and urolithiasis. Veterinary
1095 Clinics of North America - Small Animal Practice, 1979.
- 1096 LEMOS, MARIA LEONOR; NUNES, ALEXANDRA; ANCORA, MASSIMO; CAMMÀ,
1097 CESARE; DA COSTA, PAULO MARTINS; OLEASTRO, MÓNICA. *Campylobacter jejuni*
1098 in different canine populations: Characteristics and zoonotic potential. Microorganisms,
1099 v. 9, n. 11, 2021.
- 1100 LI, DANDAN; YI, JIA; HAN, GUOBIN; QIAO, LIANG. MALDI-TOF Mass Spectrometry in
1101 Clinical Analysis and Research. ACS Measurement Science Au, American Chemical
1102 Society, 2022.
- 1103 LING, GERALD V; NORRIS, CAROL R.; FRANTI, CHARLES E.; EISELE, PAMELA H.;
1104 JOHNSON, DEEDRA L.; RUBY, ANNETTE L.; JANG, SPENCER S. Interrelations of
1105 Organism Prevalence, Specimen Collection Method, and Host Age, Sex, and Breed

- 1106 among 8,354 Canine Urinary Tract Infections (1969-1995). J Vet Intern Med, v. 15, p.
1107 341–347, 2001.
- 1108 MACHADO, LETÍCIA; DE OLIVEIRA, MILENA CLEFF; BARBIERI, CLÁUDIA RUGA;
1109 RIBOLDI, CAMILA IMPÉRICO; LEOTTI, VANESSA BIELEFELDT; GONZÁLEZ, FÉLIX
1110 HILÁRIO DÍAZ; VALLE, STELLA DE FARIA; SIQUEIRA, FRANCIELE MABONI;
1111 PÖPPL, ÁLAN GOMES. Clinical and microbiological characterization of subclinical
1112 bacteriuria and sporadic bacterial cystitis in dogs with spontaneous hypercortisolism.
1113 Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, v. 75, 2021.
- 1114 MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-
1115 resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for
1116 acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- 1117 MARQUES, CÁTIA; BELAS, ADRIANA; FRANCO, ANDREIA; ABOIM, CATARINA;
1118 GAMA, LUÍS TELO; POMBA, CONSTANÇA. Increase in antimicrobial resistance and
1119 emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary
1120 tract infection: 16 year retrospective study. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.
1121 73, n. 2, p. 377–384, 2018.
- 1122 MARTIN, REBEKAH M.; BACHMAN, MICHAEL A. Colonization, infection, and the
1123 accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Frontiers in Cellular and Infection
1124 Microbiology, Frontiers Media S.A., 2018.
- 1125 MARTINS, LORRAYNE DE SOUZA A.; MOTTA, RODRIGO G.; MARTINEZ, ANTONIO
1126 C.; ORSI, HENRIQUE; HERNANDES, RODRIGO T.; RALL, VERA L. M.; PANTOJA,
1127 JOSÉ C. F.; NARDI JÚNIOR, GERALDO DE; RIBEIRO, MÁRCIO G. Virulence-encoding
1128 genes related to extraintestinal pathogenic *E. coli* and multidrug resistant pattern of
1129 strains isolated from neonatal calves with different severity scores of umbilical infections.
1130 Microbial Pathogenesis, v. 174, 2023.
- 1131 MCMEEKIN, C. H.; HILL, K. E.; GIBSON, I. R.; BRIDGES, J. P.; BENSCHOP, J.
1132 Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from canine urinary samples
1133 submitted to a New Zealand veterinary diagnostic laboratory between 2005–2012. New
1134 Zealand Veterinary Journal, v. 65, n. 2, p. 99–104, 2017.
- 1135 NALLY, JARLATH E.; MULLEN, WILLIAM; CALLANAN, JOHN J.; MISCHAK, HARALD;
1136 ALBALAT, AMAYA. Detection of urinary biomarkers in reservoir hosts of leptospirosis by
1137 capillary electrophoresis-mass spectrometry. Proteomics - Clinical Applications, v. 9, n.
1138 5–6, p. 543–551, 2015.
- 1139 NOOR, ZAINAB; AHN, SEONG BEOM; BAKER, MARK S.; RANGANATHAN, SHOBA;
1140 MOHAMEDALI, ABIDALI. Mass spectrometry-based protein identification in proteomics-
1141 A review. Briefings in Bioinformatics, Oxford University Press, 2021.
- 1142 OLIN, SHELLY J.; BARTGES, JOSEPH W. Urinary Tract Infections.
1143 Treatment/Comparative Therapeutics. Veterinary Clinics of North America - Small
1144 Animal Practice W.B. Saunders, 2015.
- 1145 O'NEILL, JIM. tackling drug-resistant infections globally: final report and
1146 recommendations. REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, v. 1, p. 1-84, 2016.
- 1147 OVIAÑO, MARINA; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, BELÉN. MALDI-TOF mass spectrometry
1148 in the 21st century clinical microbiology laboratory. Enfermedades Infecciosas y
1149 Microbiología Clínica, Elsevier Doyma, 2021.

- 1150 PIRAS, CRISTIAN et al. Mechanisms of antibiotic resistance to enrofloxacin in
1151 uropathogenic *Escherichia coli* in dog. Journal of Proteomics, v. 127, p. 365–376, 2015.
- 1152 PRESSLER, BARRAK M.; VADEN, SHELLY F.; LANE, INDIA F.; COWGILL, LARRY D.;
1153 DYE, JANICE A. *Candida* spp. Urinary Tract Infections in 13 Dogs and Seven Cats:
1154 Predisposing Factors, Treatment, and Outcome. Journal of the American Animal
1155 Hospital Association, v. 39, p. 263–270, 2003.
- 1156 PURO, VINCENZO; COPPOLA, NICOLA; FRASCA, ANDREA; GENTILE, IVAN;
1157 LUZZARO, FRANCESCO; PEGHETTI, ANGELA; SGANGA, GABRIELE. Pillars for
1158 prevention and control of healthcare-associated infections: an Italian expert opinion
1159 statement. Antimicrobial Resistance and Infection Control, BioMed Central Ltd, 2022.
- 1160 QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; HARTIGAN, P.; FANNING, S.;
1161 FITZPATRICK, E. S. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. 2. ed. UK: Wiley-
1162 Blackwell, 2011.
- 1163 R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna,
1164 Austria. R Foundation for Statistical Computing, 2023. Disponível em: <[https://www.R-](https://www.R-project.org/)
1165 [project.org/](https://www.R-project.org/)>
- 1166 RABELO, RODRIGO CARDOSO. Guia de uso racional de antimicrobianos, Ministério
1167 da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), 1. ed. P. 1-110, 2022.
- 1168 RAMPACCI, ELISA; BOTTINELLI, MARCO; STEFANETTI, VALENTINA; HYATT,
1169 DOREENE R.; SGARIGLIA, ELISA; COLETTI, MAURO; PASSAMONTI, FABRIZIO.
1170 Antimicrobial susceptibility survey on bacterial agents of canine and feline urinary tract
1171 infections: Weight of the empirical treatment. Journal of Global Antimicrobial Resistance,
1172 v. 13, p. 192–196, 2018.
- 1173 REAGAN, KRYSTLE L.; DEAR, JONATHAN D.; KASS, PHILIP H.; SYKES, JANE E.
1174 Risk factors for *Candida* urinary tract infections in dogs and cats. Journal of Veterinary
1175 Internal Medicine, v. 33, n. 2, p. 648–653, 2019.
- 1176 REZENDE, RUBENS BARBOSA; NOGUEIRA, ISADORA MOREIRA COSTA DO
1177 NASCIMENTO. Prevalência e perfil de sensibilidade dos gêneros *Klebsiella* spp. e
1178 *Staphylococcus* spp. isolados da urocultura de pacientes de um laboratório privado de
1179 análises clínicas no município de Conselheiro Lafaiete-MG/Brasil. Research, Society
1180 and Development, v. 11, n. 1, 2022.
- 1181 RIBEIRO, M. G.; LEITE, D. S.; SIQUEIRA, A. K. Enfermidades por *Escherichia coli*. Em:
1182 MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. (org.). Doenças Infeciosas em Animais de
1183 Produção e de Companhia. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 243–273, 2016.
- 1184 RIBEIRO, MÁRCIO GARCIA et al. *Klebsiella*-induced infections in domestic species: a
1185 case-series study in 697 animals (1997–2019). Brazilian Journal of Microbiology, v. 53,
1186 n. 1, p. 455–464, 2022
- 1187 ROBERTS, MADELEINE; WHITE, JOANNA; LAM, AMY. Prevalence of bacteria and
1188 changes in trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from positive
1189 canine urinary samples from an Australian referral hospital over a 5-year period (2013-
1190 2017). Veterinary Record Open, BMJ Publishing Group, 2019.
- 1191 ROUTSI, CHRISTINA et al. De-escalation of antimicrobial therapy in ICU settings with
1192 high prevalence of multidrug-resistant bacteria: A multicentre prospective observational

- 1193 cohort study in patients with sepsis or septic shock. Journal of Antimicrobial
1194 Chemotherapy, v. 75, n. 12, p. 3665–3674, 2020.
- 1195 RUPPÉ, ETIENNE; ANDREMONT, ANTOINE; ARMAND-LEFÈVRE, LAURENCE.
1196 Digestive tract colonization by multidrug-resistant Enterobacteriaceae in travellers: An
1197 update. Travel Medicine and Infectious DiseaseElsevier USA, 2018.
- 1198 SALGADO-CAXITO, MARÍLIA; MORENO-SWITT, ANDREA I.; PAES, ANTONIO
1199 CARLOS; SHIVA, CARLOS; MUNITA, JOSE M.; RIVAS, LINA; BENAVIDES, JULIO A.
1200 Higher prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant enterobacterales in
1201 dogs attended for enteric viruses in brazil before and after treatment with cephalosporins.
1202 Antibiotics, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2021.
- 1203 SCARPELLINI, RAFFAELE; GIUNTI, MASSIMO; PONTIERO, ALESSANDRA; SAVINI,
1204 FEDERICA; ESPOSITO, ERIKA; PIVA, SILVIA. Two cases of bloodstream infections
1205 associated with opportunistic bacterial species (*Enterococcus hirae* and *Enterobacter*
1206 *xiangfangensis*) in companion animals. BMC Veterinary Research, v. 19, n. 1, 2023.
- 1207 SCHUBERT, SÖREN; KOSTRZEWA, MARKUS. MALDI-TOF MS in the microbiology
1208 laboratory: Current trends. Current Issues in Molecular Biology, v. 23, p. 17–20, 2017.
- 1209 SILVA, MARCELLA BRAGA; FERREIRA, FABIENNE ANTUNES; GARCIA, LUIZE NELI
1210 NUNES; SILVA-CARVALHO, MARIA CÍCERA; BOTELHO, LARISSA ALVARENGA
1211 BATISTA; FIGUEIREDO, AGNES MARIE SÁ; VIEIRA-DA-MOTTA, OLNEY. An
1212 evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
1213 for the identification of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections.
1214 Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 27, n. 2, p. 231–235, 2015.
- 1215 SIMJEE, S.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F.; WAGNER, D. D.; ZERVOS, M. J.;
1216 DONABEDIAN, S. M.; ENGLISH, L. L.; HAYES, J. R.; WALKER, R. D. Characterization
1217 of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary
1218 tract infections: Evidence of gene exchange between human and animal enterococci.
1219 Journal of Clinical Microbiology, v. 40, n. 12, p. 4659–4665, 2002.
- 1220 SINDAN. Pesquisa Radar Pet: Brasil conta com a segunda maior população pet do
1221 mundo. 2020.
- 1222 SINGHAL, NEELJA; KUMAR, MANISH; KANAUIA, PAWAN K.; VIRDI, JUGSHARAN
1223 S. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification
1224 and diagnosis. Frontiers in Microbiology, Frontiers Research Foundation, 2015.
- 1225 SIQUEIRA, AMANDA K.; RIBEIRO, MARCIO G.; LEITE, DOMINGOS DA S.; TIBA,
1226 MONIQUE R.; MOURA, CLAUDIA DE; LOPES, MARIA DENISE; PRESTES, NEREU
1227 CARLOS; SALERNO, TATIANA; SILVA, ARISTEU V. DA. Virulence factors in
1228 *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from
1229 feces of healthy dogs. Research in Veterinary Science, v. 86, n. 2, p. 206–210, 2009.
- 1230 SLAMA, THOMAS G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. Crit
1231 Care, v. 12, 2008.
- 1232 TOOMBS-RUANE, LEAH J. et al. Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and
1233 AmpC Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains from Humans and Pets in the
1234 Same Households. Applied and Environmental Microbiology, v. 86, n. 24, 2020.

- 1235 TUMPA, ANDREA; ŠTRITOF, ZRINKA; PINTARIĆ, SELMA. Prevalence and
1236 antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. from urine of dogs and cats in
1237 northwestern Croatia. *Research in Veterinary Science*, v. 151, p. 42–46, 2022.
- 1238 WARETH, GAMAL; NEUBAUER, HEINRICH. The Animal-foods-environment interface
1239 of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity,
1240 resistance development and the current situation. *Veterinary Research*, BioMed Central
1241 Ltd, 2021.
- 1242 WEESE, J. SCOTT et al. International Society for Companion Animal Infectious
1243 Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary
1244 tract infections in dogs and cats. *Veterinary Journal*, v. 247, p. 8–25, 2019.
- 1245 WILLIAMS, BARBARA J.; LING, GERALD V; FRANTI, CHARLES E.; JOHNSON,
1246 DEEDRA L.; RUBY, ANNETTE L. Recurrent and Persistent Urinary Tract Infections in
1247 Dogs: 383 Cases. *J Am Anim Hosp Assoc. J Am Anim Hosp Assoc*, v. 36, p. 484–492,
1248 2000.
- 1249 WINDAHL, ULRICA; HOLST, BODIL S.; NYMAN, ANN; GRÖNLUND, ULRICA;
1250 BENGTSSON, BJÖRN. Characterisation of bacterial growth and antimicrobial
1251 susceptibility patterns in canine urinary tract infections. *BMC Veterinary Research*, v. 10,
1252 n. 1, p. 1–10, 2014.
- 1253 WONG, C.; EPSTEIN, S. E.; WESTROPP, J. L. Antimicrobial susceptibility patterns in
1254 urinary tract infections in dogs (2010-2013). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.
1255 29, n. 4, p. 1045–1052, 2015.
- 1256 WORLD HEALTH ORGANIZATION-OMS (2022). Awareness-raising on Antimicrobial
1257 Resistance: Report of global consultation meetings. Geneva.
- 1258 YOON, EUN JEONG; JEONG, SEOK HOON. Maldi-tof mass spectrometry technology
1259 as a tool for the rapid diagnosis of antimicrobial resistance in bacteria. *Antibiotics*, MDPI
1260 AG, 2021.
- 1261 YOUSEFI, AMIRHOSSEIN; TORKAN, SAAM. Uropathogenic *Escherichia coli* in the
1262 urine samples of Iranian dogs: Antimicrobial resistance pattern and distribution of
1263 antibiotic resistance genes. *BioMed Research International*, 2017.
- 1264 YU, ZHUOLING; WANG, YAO; CHEN, YANYUN; HUANG, MIN; WANG, YANG; SHEN,
1265 ZHANGQI; XIA, ZHAOFEI; LI, GEBIN. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens
1266 isolated from canine urinary tract infections. *Veterinary Microbiology*, v. 241, 2020.
- 1267 ZAPPA, VANESSA. Antimicrobial multiple resistance index, minimum inhibitory
1268 concentrations, and extended-spectrum beta-lactamase producers of *Proteus mirabilis*
1269 and *Proteus vulgaris* strains isolated from domestic animals with various clinical
1270 manifestations of infection. *Semina Ciencias Agrarias*, v. 38, n. 2, p. 775–780, 2017.
- 1271

1272 9. COMITÊ DE ÉTICA



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Identificação e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos principais agentes bacterianos causadores de infecção urinária em cães" **Protocolo CEUA 0052/2021**, a ser conduzido por Natália Paschoal Calobrizi, responsável/orientador Márcio Garcia Ribeiro, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	02/08/2021 a 31/01/2023
Nome Comum / Espécie / Linhagem	NÃO SE APLICA / NÃO SE APLICA /
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Amostras recebidas Laboratório de Microbiologia

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 19/05/2021

JULIANY GOMES QUITZAN
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

1273

1274

1275

1276

1277 **TRABALHO CIENTÍFICO**

1278 Trabalho a ser enviado para a revista *Brazilian Journal of Microbiology*

1279

1280 **NORMAS DA REVISTA:**

1281 Manuscript Submission

1282 Submission of a manuscript implies: that the work described has not been
1283 published before; that it is not under consideration for publication anywhere else;
1284 that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the
1285 responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has
1286 been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there
1287 be any claims for compensation.

1288 Permissions

1289 Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already
1290 been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright
1291 owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such
1292 permission has been granted when submitting their papers. Any material
1293 received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

1294 Online Submission

1295 Please follow the hyperlink “Submit manuscript” on the right and upload all of your
1296 manuscript files following the instructions given on the screen.

1297 Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit
1298 these source files might cause unnecessary delays in the review and production
1299 process.

1300 Title page

1301 Please make sure your title page contains the following information

1302 Title

1303 The title should be concise and informative.

1304 Author information

1305 The name(s) of the author(s)

1306 A concise and informative title

1307 The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state),
1308 country

1309 A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author(s)

1310 If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

1311 If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

1312 For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and
1313 country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

1314 Abstract

1315 Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain
1316 any undefined abbreviations or unspecified references.

1317 Please note: For some articles (particularly, systematic reviews and original
1318 research articles), 250 words may not be sufficient to provide all necessary
1319 information in the abstract. Therefore, the abstract length can be increased from
1320 the 250-word limit (to up to 450 words) if the topic dictates, and to allow full
1321 compliance with the relevant reporting guidelines.

1322 Keywords

1323 Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

1324 Statements and Declarations

1325 The following statements should be included under the heading "Statements and
1326 Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions
1327 that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

1328 Competing Interests: Authors are required to disclose financial or non-financial
1329 interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication.
1330 Please refer to "Competing Interests and Funding" below for more information on
1331 how to complete this section.

1332 Text

1333 Text Formatting

1334 Manuscripts should be submitted in Word.

- 1335 • Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- 1336 • Use italics for emphasis.
- 1337 • Use the automatic page numbering function to number the pages.
- 1338 • Do not use field functions.
- 1339 • Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- 1340 • Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- 1341 • Use the equation editor or MathType for equations.
- 1342 • Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older
1343 Word versions).

1344 Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We
1345 recommend using Springer Nature's LaTeX template.

1346 Abbreviations

1347 Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

1348 Footnotes

1349 Footnotes can be used to give additional information, which may include the
1350 citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely
1351 of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of
1352 a reference. They should also not contain any figures or tables.

1353 Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be
1354 indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values
1355 and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are
1356 not given reference symbols.

1357 Always use footnotes instead of endnotes.

1358 Acknowledgments

1359 Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate
1360 section on the title page. The names of funding organizations should be written
1361 in full.

1362 References

1363 Citation

1364 Reference citations in the text should be identified by numbers in square
1365 brackets. Some examples:

- 1366 1. Negotiation research spans many disciplines [3].
- 1367 2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
- 1368 3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

1369 Reference list

1370 The list of references should only include works that are cited in the text and that
1371 have been published or accepted for publication. Personal communications and
1372 unpublished works should only be mentioned in the text.

1373 The entries in the list should be numbered consecutively.

1374 If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list
1375 (e.g. "<https://doi.org/abc>").

1376 Journal article

1377 Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L
1378 (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in
1379 prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738.
1380 <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

1381 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in
1382 long author lists will also be accepted:

- 1383 Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl*
1384 *J Med* 965:325–329
- 1385 Article by DOI
- 1386 Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine
1387 production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>
- 1388 Book
- 1389 South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London
- 1390 Book chapter
- 1391 Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of
1392 modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- 1393 Online document
- 1394 Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.
1395 <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- 1396 Dissertation
- 1397 Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of
1398 California
- 1399 Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN
1400 List of Title Word Abbreviations, see
- 1401 ISSN.org LTWA
- 1402 If you are unsure, please use the full journal title.
- 1403 Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file
1404 `sn-basic.bst` which is included in the Springer Nature Article Template.
- 1405 Tables
- 1406 • All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- 1407 • Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- 1408 • For each table, please supply a table caption (title) explaining the
1409 components of the table.
- 1410 • Identify any previously published material by giving the original source in
1411 the form of a reference at the end of the table caption.
- 1412 • Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters
1413 (or asterisks for significance values and other statistical data) and included
1414 beneath the table body.
- 1415