

BEATRIZ MARTINS PARRA

**Avaliação dos agentes causadores de infecção urinária em fêmeas
suínas**

São Paulo

2022

BEATRIZ MARTINS PARRA

**Avaliação dos agentes causadores de infecção urinária em fêmeas
suínas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

Coorientadora:

Profa. Dra. Luisa Zanolli Moreno

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4249
FMVZ

Parra, Beatriz Martins
Avaliação dos agentes causadores de infecção urinária em fêmeas suínas / Beatriz Martins Parra. – 2022.
89 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Mücke Moreno.

Coorientadora: Profa. Dra. Luísa Zanolli Moreno.

1. Infecção urinária. 2. Fêmea suína. 3. Isolamento bacteriano. 4. Resistência antimicrobiana. 5. Genes de virulência. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS AGENTES CAUSADORES DE INFECÇÃO URINÁRIA EM FÊMEAS SUÍNAS", protocolada sob o CEUA nº 7300150518 (ID 008262), sob a responsabilidade de **Andrea Micke Moreno** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 11/08/2020.

We certify that the proposal "EVALUATION OF BACTERIAL AGENTS CAUSING URINARY INFECTION IN SOWS", utilizing 200 Swines (200 females), protocol number CEUA 7300150518 (ID 008262), under the responsibility of **Andrea Micke Moreno** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/11/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [10/2020](#) a [08/2022](#)

Área: [Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Suínos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [1 a 6 anos](#)

N: [200](#)

Linhagem: [Linhagens híbridas](#)

Peso: [150 a 300 kg](#)

Local do experimento: Granjas de suínos

Comentário da CEUA: *Não existem óbices éticos para a aprovação.*

São Paulo, 05 de novembro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PARRA, Beatriz Martins.

Título: **Avaliação dos agentes causadores de infecção urinária em fêmeas suínas.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus guias espirituais, por todas as bênçãos alcançadas.

À toda minha família, especialmente aos meus pais, Andrea e Antônio, e ao meu irmão, Cristiano, pelo amor incondicional, educação, apoio e esforços. Vocês são a razão da minha existência.

À minha orientadora, Andrea Micke Moreno, principalmente pela paciência, dedicação, aprendizado, evolução pessoal e amizade durante todos esses anos. Mais uma vez, muito obrigada!

À Luisa Zanolli Moreno, pela orientação, amizade, por toda a transmissão de conhecimento, pela imensa ajuda durante todo o projeto e pelos conselhos que serviram para a minha formação como pessoa e profissional.

Aos meus grandes amigos que, não somente durante a pós-graduação, mas durante todo o período na USP, me ajudaram de alguma forma. Sem vocês o caminho teria sido menos alegre: Carolina Nishioka, Letícia Lopes, Juliana Satie, Juliana Branco, Matheus Cavalini, Felipe Keidy e José Carlos Rosa.

A todos os amigos do Laboratório de Sanidade Suína: Carlos Matajira, Matheus Saliba, Alexandre Sanches, Dona Rose, Andressa Dalmutt, Jéssica Moreira, Bárbara Peres, Vasco Túlio, Carol Oliveira, André Pegoraro e em especial à Rosi e à Paula, pela amizade, cumplicidade e ajuda.

À toda a equipe do VPS, em especial à Vanessa e ao amigo Danival, pelo apoio e prontidão.

A todos os animais que nos cercam e se envolvem em nosso aprendizado. A construção do nosso conhecimento não pode acontecer sem eles. Tratá-los com respeito e de maneira ética é o maior objetivo e o maior legado da nossa profissão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicado às Zoonoses e à Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro do projeto. (processo nº 2018/1795892).

Enfim, obrigada a todos que torceram por mim e que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho de forma única e especial.

RESUMO

PARRA, B.M. **Avaliação dos agentes causadores de infecção urinária em fêmeas suínas**. 2022. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2022.

As infecções urinárias causam grandes prejuízos econômicos à suinocultura, seja com gastos medicamentosos, descarte de matrizes ou mortalidade dos animais. No Brasil, os estudos recentes envolvendo a identificação e caracterização molecular das estirpes bacterianas e fúngicas nas infecções urinárias dos suínos são escassos, bem como avaliações sobre a resistência destes microrganismos aos agentes antimicrobianos. O presente estudo teve por objetivos isolar e identificar as diferentes espécies bacterianas e fúngicas associadas à infecção urinária na espécie suína, realizar o exame anatomopatológico do rim e da bexiga dos animais avaliados, caracterizar os fatores de virulência, e determinar o padrão de resistência a antimicrobianos em estirpes de *Escherichia coli* isoladas. A partir dos 92 animais estudados foi identificada uma ampla variedade de espécies bacterianas em fêmeas com presença e ausência de lesão compatível com quadro de infecção urinária em bexiga e rim. Entre os principais agentes identificados estão *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Corynebacterium amycolatum*. As estirpes de *E. coli* apresentaram diversos fatores de virulência associados ao patotipo ExPEC, e mais de 91% delas foram consideradas multirresistentes. Os resultados obtidos serão de grande importância no controle destas infecções nos sistemas intensivos de produção e na conscientização dos veterinários e produtores sobre o uso consciente de antimicrobianos em produção de suínos.

Palavras-chave: infecção urinária, fêmeas suínas, isolamento, MALDI-TOF MS, lesões.

ABSTRACT

PARRA, B.M. **Evaluation on the agents causing urinary infection in sows.** 2022. 89 p. Thesis (Ph. D) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, 2022.

Urinary infections cause great economic losses to pig farming, whether with antimicrobial costs, disposal of sows or animal mortality. In Brazil, recent studies involving the identification and molecular characterization of bacterial and fungal strains of swine urinary infections are scarce, as well as the assessments of the antimicrobials resistance of these microorganisms. The present study aims to isolate and identify the different bacterial and fungal species associated with swine urinary infection, perform the anatomopathological examination of the kidney and bladder of the evaluated animals, characterize the virulence factors in isolated *Escherichia coli* strains, and determine the antimicrobial resistance patterns of the most frequent bacterial species. From the 92 animals studied, a wide variety of bacterial species was identified in females with the presence and absence of lesions compatible with urinary tract infection in the bladder and kidney. Among the main agents identified are *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae* and *Corynebacterium amycolatum*. *E. coli* strains showed several virulence factors associated with ExPEC pathotype, and more than 91% of them were considered multidrug-resistant. The results obtained will be of great importance in the control of these infections in intensive production systems and in the awareness of veterinarians and producers about the conscious use of antimicrobials in pig production.

Keywords: urinary infections, sows, isolation, MALDI-TOF, injuries.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	12
2.	CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DE PATÓGENOS BACTERIANOS ISOLADOS DO TRATO URINÁRIO DE FÊMEAS SUÍNAS: CULTURA, ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF E EXAME ANATOMOPATOLÓGICO DO RIM E BEXIGA.....	14
2.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.2	OBJETIVOS.....	23
2.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.3.1	MATERIAL.....	23
2.3.2	ISOLAMENTO BACTERIANO	25
2.3.3	IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES POR MALDI-TOF MS.....	25
2.3.4	ANATOMOPATOLÓGICO	26
2.3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
2.4	RESULTADOS	27
2.4.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA NA BEXIGA.	27
2.4.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA NOS RINS.....	34
2.4.3	ASSOCIAÇÕES DE AGENTES OBSERVADAS EM BEXIGA E RINS.....	41
2.4.4	ANATOMOPATOLÓGICO	44
2.5	DISCUSSÃO	49
2.6	CONCLUSÃO	54
3.	CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> : FATORES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.	55
3.1	INTRODUÇÃO	55
3.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	56

3.3	OBJETIVOS	60
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	60
3.4.1	ISOLADOS	60
3.4.2	EXTRAÇÃO DO DNA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	60
3.4.3	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS PARA AS ESTIRPES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	62
3.4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
3.5	RESULTADOS	65
3.5.1	PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS A EXPEC.....	65
3.5.2	PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS PARA AS ESTIRPES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	68
3.6	DISCUSSÃO	71
3.1	CONCLUSÃO	75
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	ANEXO I.....	84
	ANEXO II	87

1. Introdução geral

A carne suína é a mais consumida mundialmente e o Brasil apresenta-se em quarto lugar na produção mundial (USDA, 2019). A produção no país cresce anualmente, com destaque para a região Sul, em que se concentra grande parte da produção nacional (MAPA, 2019). Os dados demonstram que a produção brasileira de carne suína alcançou um total de 4,5 bilhões de toneladas em 2020 (FAO, 2021).

O aumento na produtividade observada pelo setor nos últimos 40 anos está associado a fatores como o desenvolvimento sanitário e genético, otimização da nutrição, do manejo e ao aperfeiçoamento do sistema produtivo. Porém, a maior eficiência do sistema também apresenta relação com aumento na ocorrência de doenças multifatoriais, associada entre outros fatores, à maior suscetibilidade de animais melhorados geneticamente.

Entre essas doenças, destacam-se as infecções das vias urinárias, as quais afetam principalmente fêmeas suínas adultas. O quadro ocorre com maior prevalência em sistemas de criação intensiva e ocasiona perdas econômicas expressivas, sendo os principais custos associados à redução nos índices reprodutivos, gastos com medicamentos e assistência técnica, maior taxa de descarte e mortalidade de fêmeas.

Essas infecções ocorrem em consequência da colonização das vias urinárias por microrganismos patogênicos. Além disso, por se tratar de uma doença multifatorial, condições de manejo, alimentação e instalação também se apresentam como fatores de risco para sua ocorrência. Portanto, práticas de manejo adequadas, higiene e alimentação de qualidade representam formas de prevenção da doença.

Quanto aos patógenos descritos nesses quadros, observa-se que os principais são *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Klebsiella spp.* *Escherichia coli* tem apresentado maior relevância nas infecções urinárias, devido à presença de estruturas denominadas fímbrias, que permitem sua fixação ao trato urinário, favorecendo a colonização dos tecidos. É um agente oportunista que coloniza a microbiota intestinal em suínos, mas, quando tem as ferramentas e condições necessárias, ascende para as vias urinárias causando infecção.

A literatura relacionada aos patógenos que ocasionam infecção urinária em suínos é escassa e pouco atualizada, sendo necessário mais estudos a respeito desse tema. Além disso, é necessário compreender a fisiopatologia e fatores de risco associados à infecção, para prevenir o quadro.

Tendo em vista esta lacuna na pesquisa de agentes infecciosos relacionados a infecções urinária em suínos e seu de potencial impacto em saúde pública, por se tratar muitas vezes de agentes zoonóticos e multirresistentes a antimicrobianos, a proposta deste estudo foi identificar os patógenos presentes no trato urinário em um grupo de fêmeas suínas, com e sem infecção urinária, e caracterizar os isolados de *Escherichia coli* quanto ao padrão de virulência e de resistência a antimicrobianos de uso frequente nessa espécie animal.

2. CAPÍTULO 1: Caracterização de patógenos bacterianos isolados do trato urinário de fêmeas suínas: cultura, espectrometria de massa MALDI-TOF e exame anatomopatológico do rim e bexiga.

2.1 Revisão de literatura

A infecção urinária é definida pela colonização de microrganismos patogênicos nas vias urinárias. A infecção está diretamente ligada ao manejo, alimentação, instalações e condição do animal. Más condições de higiene, problemas no aparelho locomotor, qualidade e quantidade de água ingerida, idade da fêmea e traumatismos são alguns dos fatores de risco para o desenvolvimento da doença (SOBESTIANSKY et al., 2007).

Na suinocultura, as infecções do trato urinário (ITU) se destacam pela alta frequência, e pelos prejuízos financeiros associados. O prejuízo é consequente do impacto negativo nos índices zootécnicos, do acréscimo nos gastos com medicações e da mortalidade de animais. Além disso, a ITU na matriz está entre as principais causas de quedas nos índices reprodutivos, comprometendo o estado de saúde das fêmeas e levando ao aumento no índice de reposição do plantel, sendo apontada como uma das doenças que mais geram perda econômica no rebanho (SOBESTIANSKY, 2007). Portanto, o status sanitário do trato urinário das fêmeas suínas interfere diretamente nos resultados de prolificidade destas, o que influencia o desempenho reprodutivo do plantel.

Essa infecção, na maioria das vezes, é subclínica e os produtores não fazem a conexão entre o aparecimento dessa enfermidade com complicações reprodutivas do rebanho (MEISTER et al., 2006). Sabe-se que para cada porca diagnosticada como positiva para infecção urinária, existem de 2 a 4 que apresentam a enfermidade e não são diagnosticadas (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Quando a infecção está localizada apenas nas vias do trato urinário inferior, o quadro é denominado cistite. Quando há comprometimento também das vias do trato urinário superior, o quadro é denominado pielonefrite. A ITU do trato inferior é mais frequente e pode apresentar ausência de sinais clínicos. Sendo assim, a verificação de microrganismos na urina é um sinal característico de infecção urinária, mesmo sem a presença de manifestações clínicas no animal (BREITFELLNER, 1972; MADEC E DAVID, 1983).

A tríade formada pelo agente etiológico, hospedeiro e meio ambiente influencia no desenvolvimento da enfermidade, sendo a melhoria das condições higiênico sanitárias ligada ao manejo de suma importância para a prevenção de infecção urinária em matrizes suínas, uma vez que a higienização incompleta ou incorreta das instalações favorece a infecção (MERLINI, 2011).

A prevalência de ITU é elevada nos sistemas de criação intensiva e resulta em perdas econômicas expressivas, causadas por efeitos negativos na reprodução, como maior taxa de retorno ao cio, redução no número de leitões desmamados/porca /ano, redução da taxa de fertilidade e maior número de dias não produtivos. Outras consequências são observadas, incluindo aumento da taxa de descarte de matrizes e da taxa de ocorrência de mastite, e aumento nos índices de ocorrência de anestro (SOBESTIANSKY et al., 2007).

Dentre os fatores de risco que predispõem a ocorrência da ITU, apresenta relevância a anatomia da fêmea suína, cujas vias urinárias são anatomicamente desprotegidas, quando comparada às de machos. Além disso, o comprimento uretral é menor e a largura maior, fazendo com que essas vias apresentem maior exposição à contaminação por bactérias oriundas principalmente das microbiotas vulvar e retal (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Tais condições, correlacionadas aos fatores predisponentes, facilitam o aparecimento de um quadro de cistite (DALLA COSTA; SOBESTIANSKY, 1999). Nas criações suínas atuais, devido à intensificação na produção, a vulva das matrizes está constantemente em contato com as fezes, contribuindo para a infecção. Essas fêmeas, quando alojadas em gaiolas, permanecem um longo período sentadas ou deitadas sobre as fezes, facilitando a ascensão desses microrganismos nas vias urinárias (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Estudos apontam que fêmeas gestantes sujeitas à má higiene por mais de cinco dias podem apresentar uma elevada quantidade de bactérias urinárias (SOBESTIANSKY et al., 1999), favorecendo a ocorrência da patologia. Ainda, as fêmeas com doença nos cascos permanecem muito tempo deitadas, devido ao incômodo causado pela dor, o que além de levar ao maior contato com patógenos, também altera a quantidade de ração consumida e a frequência de ingestão de água.

Segundo Sobestiansky et al. (1995), a diminuição na ingestão de água resulta em uma baixa frequência de micção, além de retenção de urina, favorecendo o crescimento bacteriano. A quantidade de água consumida pelas matrizes depende das condições em que os animais se encontram, sendo que a análise de determinantes é fundamental para garantir a ingestão adequada. Esses determinantes incluem: temperatura da água, fluxo nos bebedouros, componentes da água,

palatabilidade, tipo de instalação, temperatura ambiente, fase do ciclo reprodutivo, forma e frequência de arraçoamentos, taxa de umidade das rações e estado de saúde geral dos animais.

Água com pH ácido e alta taxa de nitrito representa um fator de risco à infecção urinária. Não obstante, a composição da ração também pode estar relacionada à ITU, visto que poderá haver aumento na quantidade e frequência de eliminação das fezes, dificultando a higienização das baias e favorecendo a contaminação microbiana.

Sistemas de produção em que o manejo de arraçoamento é realizado pelo menos duas vezes ou mais ao dia incentivam a fêmea a se levantar mais vezes e urinar, diminuindo a ocorrência de desenvolvimento bacteriano (MERLINI; MERLINI, 2011). Realizar um manejo das matrizes de modo a estimular as matrizes a se levantarem várias vezes ao dia, aproveitando os períodos de arraçoamento, detecção de cio, limpeza das instalações, inseminação artificial e outros, favorece o consumo de água e a frequência de micção (KOLLER et al., 2006), sendo recomendado na prevenção de infecção urinária.

Segundo Brito et al. (2004), os principais microrganismos envolvidos com maior frequência nas infecções urinárias são a *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Klebsiella spp.* Dentre eles, a *Escherichia coli* é o de maior relevância apresentando alto grau de associação aos casos de infecção urinária no Brasil.

Em um estudo recente, foram analisadas 300 amostras de urina de matrizes com sinais clínicos de infecção urinária, sendo observado resultado positivo para isolamento de *E. coli* em 98 amostras (32%) (SPINDOLA et al., 2018). Outros estudos indicam que essa bactéria é responsável por aproximadamente 27% das ocorrências

em Minas Gerais (REIS et al., 1992) e 48,13% na região Sul, onde predominam as criações suínas (MENIN et al., 2008).

Outros microrganismos associados à ITU são as espécies do gênero *Streptococcus*. Estas vivem habitualmente na mucosa do trato respiratório superior e no trato urogenital inferior e são sensíveis ao ambiente, sobrevivendo por pouco tempo fora do hospedeiro, mas podem causar infecção urinária como patógenos oportunistas (QUINN et al., 2005). As espécies do gênero *Staphylococcus* também são encontradas nas mucosas do trato respiratório e urogenital, além do trato digestivo. Diferentemente da espécie citada anteriormente, são mais estáveis ao meio ambiente e assim, acabam causando infecções quando associados a uma baixa supressão ou ocorrência de traumas (QUINN et al., 2005).

O gênero *Klebsiella*, por sua vez, está mais relacionado às infecções oportunistas, podendo ser encontrado em diversas regiões anatômicas. A propagação fecal do meio ambiente é um dos fatores mais frequentes para a contaminação por essa bactéria, além de possuir algumas particularidades que permitem invadir os mecanismos de defesa do hospedeiro (QUINN et al., 2005). Este gênero pode colonizar o trato urinário de maneira isolada, ou então associado a outros agentes microbianos. O uso incorreto de antimicrobianos com espectro de ação reduzida, pode estar correlacionado à contaminação simultânea de mais de um microrganismo (SOBESTIANSKY et al., 1995).

Os principais sinais clínicos associados com as vias urinárias são: descarga vulvar (mucoide, muco hemorrágica ou purulenta) normalmente observada após a micção; vestígios de descarga vulvar, em que se verifica um conteúdo ressecado nos lábios vulvares ou em região próxima; e alterações químicas, físicas e bacteriológicas da urina (SOBESTIANSKY et al., 1995).

Verifica-se também aumento na taxa de repetição do cio e queda do apetite das fêmeas lactantes, além de maior mortalidade e redução do ganho de peso na leitegada (MAYRINK, 2005). Sinais clínicos como perda de peso, apatia, anorexia, hipogalaxia, agalaxia, taquicardia, hipertermia, cianose, urina turva, polipneia, ataxia, relutância para se levantar, troca constante dos membros de apoio e alterações na pele também podem ser observados. Em alguns casos, o quadro ocasiona também a morte do animal (BRITO et al., 2004).

O diagnóstico inicial é observado através da análise dos animais no momento da micção, que deve ser realizada diariamente no manejo das fêmeas. As alterações observadas podem incluir dificuldade ao urinar causada pela dor, presença de grânulos na urina, odor característico e aspecto turvo da urina. Além disso, é possível a utilização de fitas reagentes para análise urinária que irão determinar parâmetros como pH, nitrito, proteínas, sangue e sedimentos.

Para um diagnóstico definitivo, deve-se realizar a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC), a identificação dos agentes envolvidos e a realização do antibiograma (MAYRINK, 2005), além da realização do exame anatomopatológico para fins de comparação. Estudos apontam que para a verificação da prevalência da infecção urinária nos suínos, recomenda-se realizar exames de urina em um mínimo de 10% das fêmeas do plantel, observando as manifestações clínicas da infecção urinária e verificando os índices de produtividade das matrizes (DALLA COSTA; SOBESTIANSKY, 1999).

Além disso, é recomendado que as amostras sejam referentes à primeira urina do animal no dia, verificadas nas primeiras horas da manhã e anteriormente à oferta da ração (SOBESTIANSKY et al., 1995; ALBERTON et al., 2000). Durante a noite, o animal costuma ingerir água e urinar com menos frequência, fazendo com que a urina

da manhã esteja mais concentrada e ideal para a realização dos exames (SOBESTIANSKY et al., 1995; ALBERTON et al., 2000).

A infecção urinária apresenta aspectos físicos e químicos individuais que podem auxiliar no diagnóstico. Algumas das características físicas verificadas são alterações de cor, odor e turbidez da urina (PÔRTO et al., 2003). As fêmeas com infecção urinária costumam apresentar uma urina com coloração amarelo escuro (PÔRTO et al., 2003). Por outro lado, alguns estudos também mostraram uma coloração amarelo clara nesses animais (ALBERTON et al., 2000), indicando ser apenas um parâmetro da concentração da urina dependente da quantidade de ingestão de água diária.

A alteração de odor ocorre devido à capacidade da bactéria em transformar nitrato em nitrito, caracterizando um odor amoniacal (ALBERTON et al., 2000; COLES, 1989). Ainda na avaliação física, a turbidez da urina acontece pela presença de células, bactérias, pus ou sangue, precipitação de cristais e sais na bexiga (PÔRTO et al., 2003).

Nos exames químicos da urina, por sua vez, pode-se determinar os valores de pH, densidade e presença de sangue e nitrito na urina utilizando fitas reagentes comerciais (PÔRTO et al., 2003). Na verificação do pH da urina, um valor alcalino representa um indicativo relevante para o diagnóstico de infecção bacteriana (SOBESTIANSKY et al., 1995).

Além disso, pode ser observado presença de proteína na urina de origem fisiológica, sendo necessária a análise de outros parâmetros simultâneos para a confirmação de infecção urinária (SOBESTIANSKY et al., 1999). Também, a proteinúria pode aparecer em consequência do aumento da permeabilidade glomerular (ALBERTON et al., 2000).

Pode-se realizar uma classificação do rebanho quanto ao impacto e prevalência de infecção urinária em três níveis (graus 1, 2 ou 3). A categorização ocorre da seguinte forma: (grau 1) para rebanhos com problema leve, com índices menores de 15%; (grau 2) para rebanhos com problema grave e em evolução, apresentando um índice de 16 a 25%; e (grau 3) para rebanhos com problema crônico e muito grave, com uma taxa de mais de 25% de prevalência (MAYRINK, 2005; DALLA COSTA; SOBESTIANSKY, 1999).

Para diagnóstico diferencial, deve-se descartar quadros de metrite e vaginite, que podem apresentar manifestações clínicas similares à ITU (SILVEIRA et al., 2006). Exames histológicos permitem obter o grau de inflamação do tecido estudado, possibilitando assim um diagnóstico mais preciso. Segundo Nielsen et al. (2019), o exame histológico da bexiga em fêmeas suínas com ITU revela grandes quantidades de bactérias associadas à mucosa epitelial da bexiga.

Há também, estudos experimentais anteriores que mostraram um aumento da gravidade das lesões histológicas nos rins após a infecção urinária em fêmeas suínas (ISLING et al., 2011). Porém, as bactérias ficam localizadas principalmente em áreas discretas na superfície luminal da bexiga, sem apresentar distribuição aleatória no epitélio da bexiga. Entre essas áreas há grandes regiões sem nenhuma bactéria detectável, o que dificulta a localização de áreas colonizadas, tornando necessário cautela na consideração desse tipo de exame.

As condições ambientais e o manejo diário de uma granja contribuem de forma significativa para a prevalência de infecção do trato urinário no rebanho. Assim, o estabelecimento de um programa de controle e prevenção requer uma análise detalhada das condições em que o plantel se encontra. Ainda, é necessário a

realização de exames laboratoriais para definir medidas mais efetivas (SOBESTIANSK et al., 1999).

Segundo Koller et al. (2006), os fatores de risco devem ser minimizados através de medidas como a redução da contaminação vulvar, aumento da ingestão de água e conseqüentemente um aumento das micções diárias, além da utilização de medicamentos indicados para o tratamento de infecção urinária. A implementação de um protocolo de inseminação artificial contribui para a prevenção da transmissão de *A. suis* no momento da cobertura e evitam a ocorrência de cistite causada por esse microrganismo (MAYRINK, 2005). Estudos apontam que o controle através da oferta de ração contendo cloreto de amônia, vitamina C e ácidos orgânicos podem auxiliar na inibição do crescimento de algumas bactérias responsáveis pela infecção urinária, além de aumentar a ingestão hídrica (KOLLER et al., 2006).

Para o tratamento do rebanho, deve-se escolher um antimicrobiano com ação efetiva sobre o microrganismo responsável pela cistite e sem toxicidade para o sistema renal (KOLLER et al., 2006). Para o tratamento individual, deve-se escolher antibióticos de longa ação e é recomendada a realização de um antibiograma para uma melhor acurácia (MAYRINK, 2005; SILVEIRA et al., 2006). A elaboração de um tratamento coletivo é feita quando a taxa de infecção urinária em fêmeas afeta mais de 16% do rebanho (DALLA COSTA; SOBESTIANSKY, 1999).

Nesse capítulo do estudo serão apresentados os resultados das culturas obtidas a partir do trato urinário de fêmeas suínas necropsiadas apresentando ou não quadro histopatológico de cistite e/ou pielonefrite.

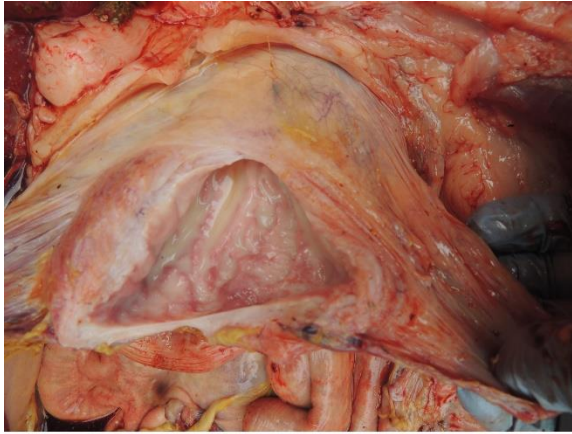
2.2 Objetivos

Isolar e identificar os agentes microbianos presentes em bexiga e rins de fêmeas suínas e avaliar os tecidos por meio do exame anatomopatológico.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Material

Foram avaliadas amostras de trato urinário de 92 fêmeas suínas apresentando morte súbita provenientes de uma propriedade com rebanho de 18.000 matrizes, em ciclo completo, localizada no centro-oeste brasileiro. Ao todo foram analisadas 92 amostras de suabe de bexiga e 46 suabes de rim. As amostras foram coletadas a necropsia, de forma aséptica, após a morte desses animais. Após a coleta, os suabes foram acondicionados em tubos plásticos contendo meio de transporte Stuart e mantidos sob refrigeração (4°C) até a chegada ao laboratório de Sanidade Suína da FMVZ/USP para o processamento. Foram coletados também fragmentos da bexiga e do rim dos animais, para a análise histopatológica.



A



B



C



D

Figura 1 – Exemplos de bexiga avaliadas apresentando diferentes graus de lesão macroscópica (Fonte: Saliba, 2022)

2.3.2 Isolamento bacteriano

As amostras foram semeadas em ágar MacConkey, Chromagar Orientation®, ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e ágar Brucella com 5% sangue de carneiro com hemina e vitamina K (Difco-BBL, Detroit, MI /USA). As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas no caso dos agentes bacterianos e por até 5 dias para os agentes fúngicos. As placas de ágar Brucella com 5% sangue de carneiro foram semeadas em duplicata e incubadas em aerobiose e anaerobiose. As colônias bacterianas isoladas foram semeadas em 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion - Difco-BBL, Detroit, MI /USA) e a partir deste cultivo foi separada uma alíquota para estoque a -86° C (com 30% de glicerol) e uma alíquota foi direcionada a identificação pelo MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*).

2.3.3 Identificação das estirpes por MALDI-TOF MS

Uma alíquota de 1 mL de cada cultivo bacteriano foi utilizada para extração de proteínas para a realização da espectrometria de massa MALDI-TOF. O protocolo descrito por Hijazin et al. (2012) foi utilizado para a extração de proteína ribossomal. Os extratos obtidos foram armazenados a -20°C.

Para leitura pelo MALDI-TOF MS foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, com o auxílio técnico da Dra. Maria Inês Zanoli Sato e sua equipe. Para leitura, 1 uL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1 uL da matrix (ácido α -ciano-4-hidróxido-cinamico). Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX. O

espectrofotômetro foi externamente calibrado através da utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli* (BTS - Bruker Daltonik).

Para a identificação bacteriana foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para cada estirpe com a biblioteca do fabricante. Desta comparação, obteve-se um valor de escore (*log (score) value*). Os critérios para interpretação da fabricante Bruker Daltonik foram utilizados neste estudo como segue: escores ≥ 2.0 foram aceitos para atribuição de espécie, e escores ≥ 1.7 e < 2.0 foram utilizados para identificação de gênero.

2.3.4 Anatomopatológico

Os animais foram submetidos à necropsia logo após a morte. À abertura realizou-se o exame macroscópico das vísceras da cavidade torácica e abdominal, dando-se especial atenção às lesões do trato urinário.

Fragmentos representativos de bexiga e rins foram colhidos e fixados em formol a 10%, por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram desidratados em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram realizados cortes de 5μ , posteriormente corados pelo método de hematoxilina-eosina (H.E.).

2.3.5 Análise estatística

Gráficos do tipo *upset plot*, para a associação de diferentes espécies bacterianas foram feitos com o pacote *Complex Heatmap* (GU; EILS; SCHLESNER,

2016) e diagramas de Venn foram realizados com o pacote *ggVennDiagram* (GAO; YU; CAI, 2021) no software R-Studio (R Core Team, 2020).

2.4 Resultados

2.4.1 Isolamento e identificação microbiana na bexiga.

Dentre as 92 fêmeas coletadas, 78,26% (72/92) foram positivas para isolamento bacteriano e 23,9% (22/92) para isolamento fúngico na bexiga. Das fêmeas positivas, 58,33% (42/72) apresentaram infecção bacteriana ocasionada por mais de uma espécie, classificada como infecção mista, enquanto os demais 41,67% (30/72) apresentaram infecção causada por um único patógeno (Tabela 1). Em relação à infecção fúngica, apenas 9,1% (2/22) apresentaram infecção mista, enquanto 90,9% (20/22) resultaram em uma infecção simples (Tabela 1).

Tabela 1: Características dos isolamentos identificados na bexiga das fêmeas com crescimento microbiano positivo.

	Infecção Bacteriana		Total
	Mista - N (%)	Simple - N (%)	
Bacteriana	42 (58,33)	30 (41,67)	72 (100)
Fúngica	2 (9,1)	20 (90,9)	22 (100)

Dentre as amostras de animais com infecção bacteriana mista, foram identificadas de duas a oito espécies diferentes (Tabela 2). Diferentemente das infecções fúngicas mistas, onde foram identificadas apenas duas espécies simultaneamente (Tabela 2).

Tabela 2: Número de espécies microbianas identificadas na bexiga das fêmeas.

Nº de espécies identificadas	Bacterianas N (%)	Fúngicas N (%)
1	30 (41,7)	20 (90,9)
2	17 (23,6)	2 (9,1)
3	12 (16,7)	0
4	8 (11,1)	0
5	4 (5,5)	0
8	1 (1,4)	0
Total	72 (100)	22 (100)

As Tabelas 3 e 4 apresentam o resultado da identificação bacteriana nas amostras de bexiga. Ao todo, foram isolados e identificados 26 gêneros bacterianos, compreendendo 56 espécies. Dos 26 gêneros, 14 (53,8%) são de bactérias Gram-positivas e 12 (46,2%) são de bactérias Gram-negativas.

A Tabela 5 apresenta o resultado da identificação fúngica nas amostras de bexiga. Foram isoladas 9 espécies fúngicas, distribuídas em 6 gêneros. Destes, o gênero *Candida* compreende 44,4% (4/9) das espécies isoladas.

Tabela 3: Resultado do isolamento de bactérias Gram-negativas em amostras de bexiga.

Família	Gênero	Espécie
<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrofila</i>
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i>	<i>acidovorans</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>alcalifaciens</i>
	<i>Providencia</i>	<i>rettgeri</i>
		<i>rustigianii</i>
		<i>stuartii</i>
	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>
	<i>Wohlfahrtiimonas</i>	<i>chitiniclastica</i>
		<i>baumannii</i>
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>berezinae</i>
		<i>lwoffii</i>
		<i>sp</i>
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
		<i>oleovorans</i>

Tabela 4: Resultado do isolamento de bactérias Gram-positivas em amostras de bexiga.

Família	Gênero	Espécie
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Trueperella</i>	<i>abortisuis</i>
		<i>pyogenes</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>viridans</i>
		<i>infantis</i>
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>
		<i>megaterium</i>
		<i>pumilus</i>
		<i>Exiguobacterium</i> sp
<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>ravenspurgense</i>
<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>frankenforstense</i>
		<i>xerosis</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>casseliflavus</i>
		<i>faecalis</i>
		<i>faecium</i>
		<i>gallinarum</i>
		<i>hirae</i>
		<i>mundtii</i>
		<i>saccharolyticus</i>
		<i>sulfureus</i>
<i>Vagococcus</i>	<i>fluvialis</i>	
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>
		<i>johnsonii</i>
		<i>reuteri</i>
		<i>salivarius</i>
<i>Micrococcaceae</i>	<i>kocuria</i>	<i>rhizophila</i>
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii</i>

		<i>hominis</i>
		<i>hyicus</i>
		<i>saprophyticus</i>
		<i>sciuri</i>
		<i>simulans</i>
		<i>warneri</i>
	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
		<i>dysgalactiae</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>hyointestinalis</i>
		<i>suis</i>

Tabela 5: Resultado do isolamento de fungos em amostras de bexiga.

Família	Gênero	Espécie
		<i>krusei</i>
		<i>lusitaniae</i>
<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>
		<i>rugosa</i>
	<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>
<i>Dipodascaceae</i>	<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>
<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Kodamaea</i>	<i>ohmeri</i>
<i>Sporidiobolaceae</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>mucilaginoso</i>
<i>Trichosporonaceae</i>	<i>Trichosporom</i>	<i>asahii</i>

Dentre os gêneros bacterianos isolados, destaca-se *Escherichia*, que apresentou crescimento em 43 (46,7%) de um total de 92 fêmeas. Outros gêneros que apareceram em grande frequência são *Enterococcus* (18/92 – 19,56%), *Staphylococcus* (15/92 – 16,3%), *Providencia* (11/92 – 11,95%), *Acinetobacter* (8/92 – 8,69%) e *Bacillus* (8/92 – 8,69%) (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição de frequência dos gêneros bacterianos na bexiga das matrizes.

Gênero	Animais Positivos N (%).
<i>Escherichia</i>	43 (46,73%)
<i>Enterococcus</i>	18 (19,56%)
<i>Staphylococcus</i>	15 (16,3%)
<i>Providencia</i>	11 (11,95%)
<i>Acinetobacter</i>	8 (8,69%)
<i>Bacillus</i>	8 (8,69%)
<i>Corynebacterium</i>	6 (6,52%)
<i>Streptococcus</i>	6 (6,52%)
<i>Lactobacillus</i>	6 (6,52%)
<i>Klebsiella</i>	6 (6,52%)
<i>Proteus</i>	5 (5,43%)
<i>Aerococcus</i>	5 (5,43%)
<i>Trueperella</i>	3 (3,26%)
<i>Vagococcus</i>	2 (2,17%)
<i>Serratia</i>	2 (2,17%)
<i>Pseudomonas</i>	2 (2,17%)
<i>Kocuria</i>	2 (2,17%)
<i>Clostridium</i>	2 (2,17%)
<i>Enterobacter</i>	2 (2,17%)
<i>Citrobacter</i>	2 (2,17%)
<i>Wohlfahrtiimonas</i>	1 (1,08%)
<i>Lactococcus</i>	1 (1,08%)
<i>Exiguobacterium</i>	1 (1,08%)
<i>Aeromonas</i>	1 (1,08%)
<i>Brevibacterium</i>	1 (1,08%)
<i>Delftia</i>	1 (1,08%)

Das espécies bacterianas encontradas, as que apresentaram maior frequência de isolamento nas fêmeas são *Escherichia coli* (43/92 – 46,7%), *Providencia rettgeri* (7/92 – 7,6%), *Staphylococcus saprophyticus* (6/92 – 6,5%), *Klebsiella pneumoniae* (6/92 – 6,5%) e *Enterococcus faecium* (6/92 – 6,5%). (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição das espécies bacterianas de maior frequência em bexiga – N (%).

Espécie Bacteriana	Animais Positivos N (%).
<i>Escherichia coli</i>	43 (46,7%)
<i>Providencia rettgeri</i>	7 (7,6%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	6 (6,5%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6 (6,5%)
<i>Enterococcus faecium</i>	6 (6,5%)

Dentre os gêneros fúngicos de maior frequência destacam-se: *Rhodotorula* (13/92 - 14,13%) e *Candida* (6/92 - 6,5%) que apresentaram isolamento em um número maior de fêmeas. Das espécies encontradas, merecem destaque *Rhodotorula mucilaginosa* (13/92 - 14,13%), *Candida lusitanae* (2/92% - 2,17%), *Candida rugosa* (2/92% - 2,17%), e *Geotrichum candidum* (2/92% - 2,17%) (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição da frequência das espécies fúngicas nas amostras de bexiga das matrizes – N (%).

Espécie fúngica	Animais Positivos N (%).
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	13 (14,13%)
<i>Candida lusitaniae</i>	2 (2,17%)
<i>Candida rugosa</i>	2 (2,17%)
<i>Geotrichum candidum</i>	2 (2,17%)
<i>Candida Krusei</i>	1 (1,08%)
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (1,08%)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1 (1,08%)
<i>Trichosporon asahii</i>	1 (1,08%)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1 (1,08%)

2.4.2 Isolamento e identificação microbiana nos rins.

Dentre as 46 fêmeas coletadas, 93,48% (43/46) foram positivas para isolamento bacteriano e 41,3% (19/46) para isolamento fúngico nos rins. Das fêmeas positivas, 88,37% (38/43) apresentaram infecção bacteriana ocasionada por mais de uma espécie, classificada como infecção mista, enquanto os demais 11,63% (5/43) apresentaram infecção causada por um único patógeno (Tabela 9). Em relação à infecção fúngica, apenas 26,32% (5/19) apresentaram infecção mista, enquanto 73,68% (14/19) resultaram em uma infecção simples (Tabela 9).

Tabela 9: Característica das infecções identificadas nos rins de fêmeas com crescimento microbiano positivo.

	Infecção Bacteriana		Total
	Mista - N (%).	Simple - N (%).	
Bacteriana	38 (88,37)	5 (11,63)	43 (100)
Fúngica	5 (26,32)	14 (73,68)	19 (100)

Dentre as amostras de animais com infecção bacteriana mista, foram identificadas de duas a cinco espécies diferentes (Tabela 10). Diferentemente das infecções fúngicas mistas, onde foram identificadas apenas duas espécies simultaneamente (Tabela 10).

Tabela 10: Número de espécies microbianas identificadas nos rins das fêmeas avaliadas.

Nº de espécies identificadas	Bacterianas N (%).	Fúngicas N (%).
1	5 (11,63)	14 (73,68)
2	14 (32,56)	5 (26,32)
3	15 (34,88)	0
4	5 (11,63)	0
5	4 (9,3)	0
Total	43 (100)	19 (100)

As Tabelas 11 e 12 apresentam o resultado da identificação bacteriana. Ao todo, foram isolados e identificados 22 gêneros bacterianos, compreendendo 47 espécies. Dos 22 gêneros, 12 (54,5%) são de bactérias Gram-positivas e 10 (45,5%) são de bactérias Gram-negativas.

A Tabela 13 apresenta o resultado da identificação fúngica. Foram isoladas um total de 10 espécies fúngicas, distribuídas em 6 gêneros. Destes, o gênero *Candida* compreende 50% (5/10) das espécies isoladas.

Tabela 11: Resultado do isolamento de bactérias Gram-negativas em amostras de rins.

Família	Gênero	Espécie
<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>caviae</i>
		<i>veronii</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>sedlakii</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>asburiae</i>
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
		<i>fergusonii</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
		<i>variicola</i>
	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>
		<i>alcalifaciens</i>
		<i>rettgeri</i>
		<i>Stuartii</i>
<i>Wohlfahrtiimonas</i>	<i>chitinoclastica</i>	
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Lwoffii</i>
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>

Tabela 12: Resultado do isolamento de bactérias Gram-positivas em amostras de rins.

Família	Gênero	Espécie
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>europaeus</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>viridans</i>
	<i>Globicatella</i>	<i>sanguinis</i>
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>
		<i>megaterium</i>
		<i>thuringiensis</i>
<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>luteolum</i>
<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>
		<i>amycolatum</i>
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>aurimucosum</i>
		<i>falsenii</i>
		Sp
		<i>vitaeruminis</i>
		<i>xerosis</i>
		<i>faecium</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>mundtii</i>
		<i>saccharolyticus</i>
		<i>sulfureus</i>
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>
		<i>johnsonii</i>
		<i>mucosae</i>
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Luteus</i>
	<i>Rothia</i>	<i>nasimurium</i>
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii</i>
		<i>epidermidis</i>
		<i>equorum</i>
		<i>haemolyticus</i>
		<i>hominis</i>
		<i>hyicus</i>
		<i>saprophyticus</i>
<i>Sciuri</i>		
		<i>warneri</i>

Tabela 13: Resultado do isolamento de fungos em amostras de rins.

Família	Gênero	Espécie
		<i>Catenulata</i>
		<i>Krusei</i>
<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Candida</i>	<i>Lusitaniae</i>
		<i>Parapsilosis</i>
		<i>Rugosa</i>
<i>Filobasidiaceae</i>	<i>Filobasidium</i>	<i>Uniguttulatum</i>
<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Kodamaea</i>	<i>Ohmeri</i>
<i>Sporidiobolaceae</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Mucilaginosa</i>
<i>Tremellaceae</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Diffluens</i>
<i>Trichosporonaceae</i>	<i>Trichosporom</i>	<i>Japonicum</i>

Dentre os gêneros bacterianos isolados, destaca-se *Escherichia*, que apresentou crescimento em 34 (73,91%) de um total de 46 fêmeas. Além deste, outros gêneros que apareceram em maior frequência são *Corynebacterium* (16/46 – 34,78%) e *Staphylococcus* (14/46 – 30,43%) (Tabela 14).

Tabela 14: Distribuição de frequência dos gêneros bacterianos nos rins das matrizes – N (%).

Gênero	Animais Positivos
<i>Escherichia</i>	34 (73,91%)
<i>Corynebacterium</i>	16 (34,78%)
<i>Staphylococcus</i>	14 (30,43%)
<i>Enterococcus</i>	8 (17,39%)
<i>Globicatella</i>	7 (15,2%)
<i>Lactobacillus</i>	6 (13%)
<i>Klebsiella</i>	5 (10,86%)
<i>Providencia</i>	5 (10,86%)
<i>Acinetobacter</i>	4 (8,69%)
<i>Bacillus</i>	3 (6,52%)
<i>Aerococcus</i>	2 (4,34%)
<i>Aeromonas</i>	2 (4,34%)
<i>Clostridium</i>	2 (4,34%)
<i>Rothia</i>	2 (4,34%)
<i>Actinomyces</i>	1 (2,17%)
<i>Brevibacterium</i>	1 (2,17%)
<i>Citrobacter</i>	1 (2,17%)
<i>Enterobacter</i>	1 (2,17%)
<i>Micrococcus</i>	1 (2,17%)
<i>Proteus</i>	1 (2,17%)
<i>Stenotrophomonas</i>	1 (2,17%)
<i>Wohlfahrtiimonas</i>	1 (2,17%)

Das espécies bacterianas encontradas, as que apresentaram maior frequência de isolamento nas fêmeas são *Escherichia coli* (32/46 – 69,5%), *Corynebacterium amycolatum* (7/46 – 15,2%), *Globicatella sanguinis* (7/46 – 15,2%) e *Enterococcus faecium* (5/46 – 10,8%) (Tabela 15).

Tabela 15: Distribuição das espécies bacterianas de maior frequência em amostras de rins.

Espécie Bacteriana	Animais Positivos N (%).
<i>Escherichia coli</i>	32 (69,5%)
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	7 (15,2%)
<i>Globicatella sanguinis</i>	7 (15,2%)
<i>Enterococcus faecium</i>	5 (10,8%)

Dentre os gêneros fúngicos de maior frequência destacam-se: *Rhodotorula* (11/46 – 23,9%) e *Candida* (6/46 - 13%) que apresentaram isolamento em um número maior de fêmeas. Das espécies encontradas, merecem destaque *Rhodotorula mucilaginosa* (11/46 – 23,9%), *Kodamaea ohmeri* (3/46% - 6,52%), *Candida krusei* (2/46% - 4,34%), e *Cryptococcus diffluens* (2/46% - 4,34%) (Tabela 16).

Tabela 16: Distribuição de frequência das espécies fúngicas nos rins das matrizes.

Espécie Fúngica	Animais Positivos N (%).
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	11 (23,9%)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	3 (6,52%)
<i>Candida Krusei</i>	2 (4,34%)
<i>Cryptococcus diffluens</i>	2 (4,34%)
<i>Candida catenulata</i>	1 (2,17%)
<i>Candida lusitaniae</i>	1 (2,17%)
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (2,17%)
<i>Candida rugosa</i>	1 (2,17%)
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	1 (2,17%)
<i>Trichosporon japonicum</i>	1 (2,17%)

2.4.3 Associações de agentes observadas em bexiga e rins.

Tanto em isolados de bexiga quanto em rins houve predominância de alguns gêneros bacterianos, como *Escherichia*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*. As amostras de rim tiveram maior frequência de algumas espécies quando comparadas com as amostras de bexiga, como *Escherichia coli* (69,5% vs. 46,7%) e *Enterococcus faecium* (10,8% vs. 6,5). Para as amostras de bexiga, também houve maior frequência para algumas espécies como *Providencia rettgeri* (7,6% vs. 4,3%) e *Staphylococcus saprophyticus* (6,5% vs. 2,17%). Agentes como *Corynebacterium amycolatum* (15,2% vs. 0%) e *Globicatella sanguinis* (15,2% vs. 0%) foram isolados somente em rins. Em relação aos isolados de fungos, houve predominância da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* em rim e bexiga (23,9% vs. 14,13%, respectivamente) e do gênero *Candida* (13% vs. 6,5%). As associações entre bactérias mais frequentes em bexiga e rim são apresentadas nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

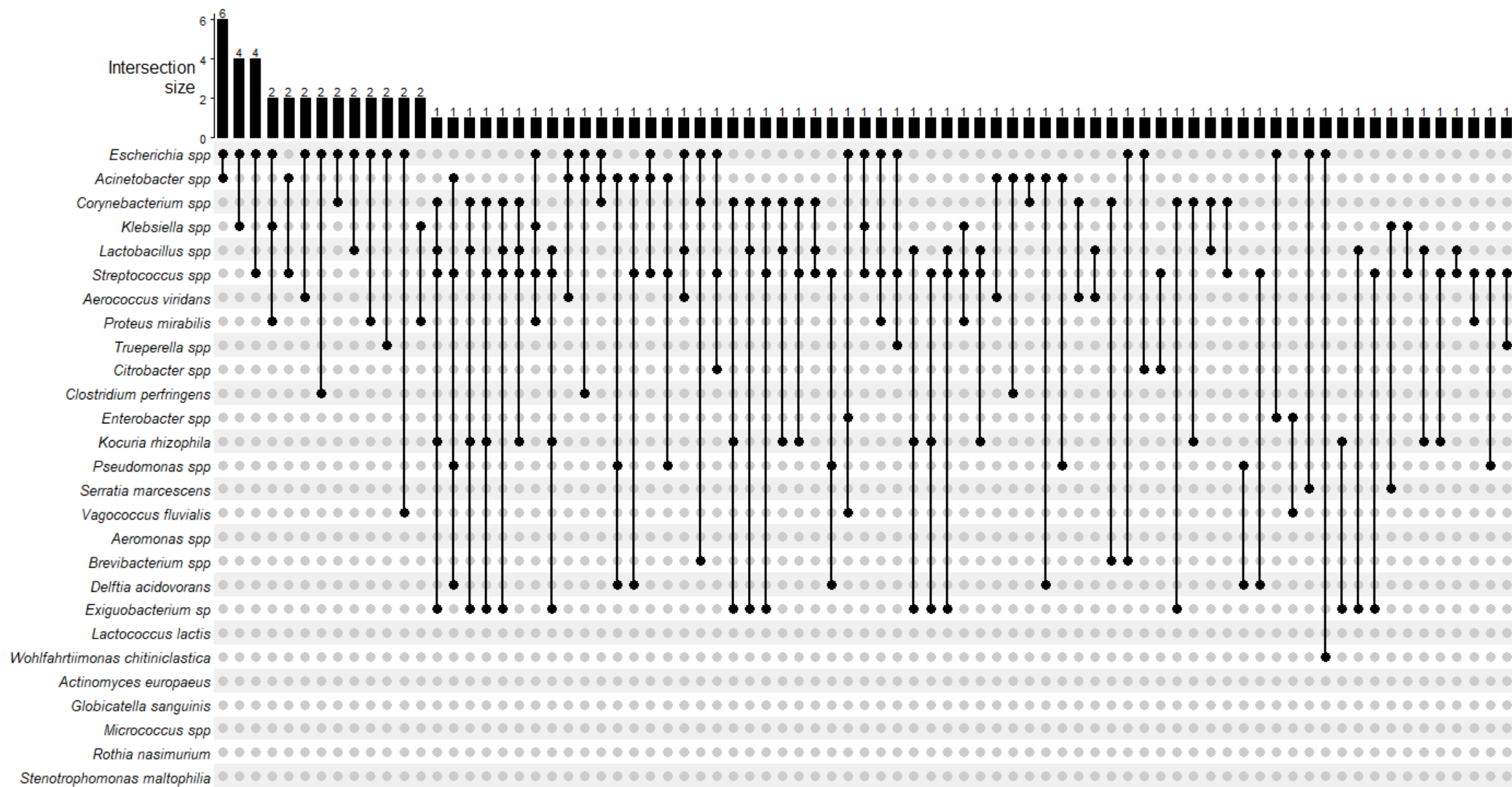


Figura 2: *UpSet plot* para ocorrência de agentes bacterianos em bexigas (n = 42/72). Os números sobre as barras mostram a quantidade de animais nos quais os agentes, indicados pelos pontos preenchidos, foram isolados em associação.

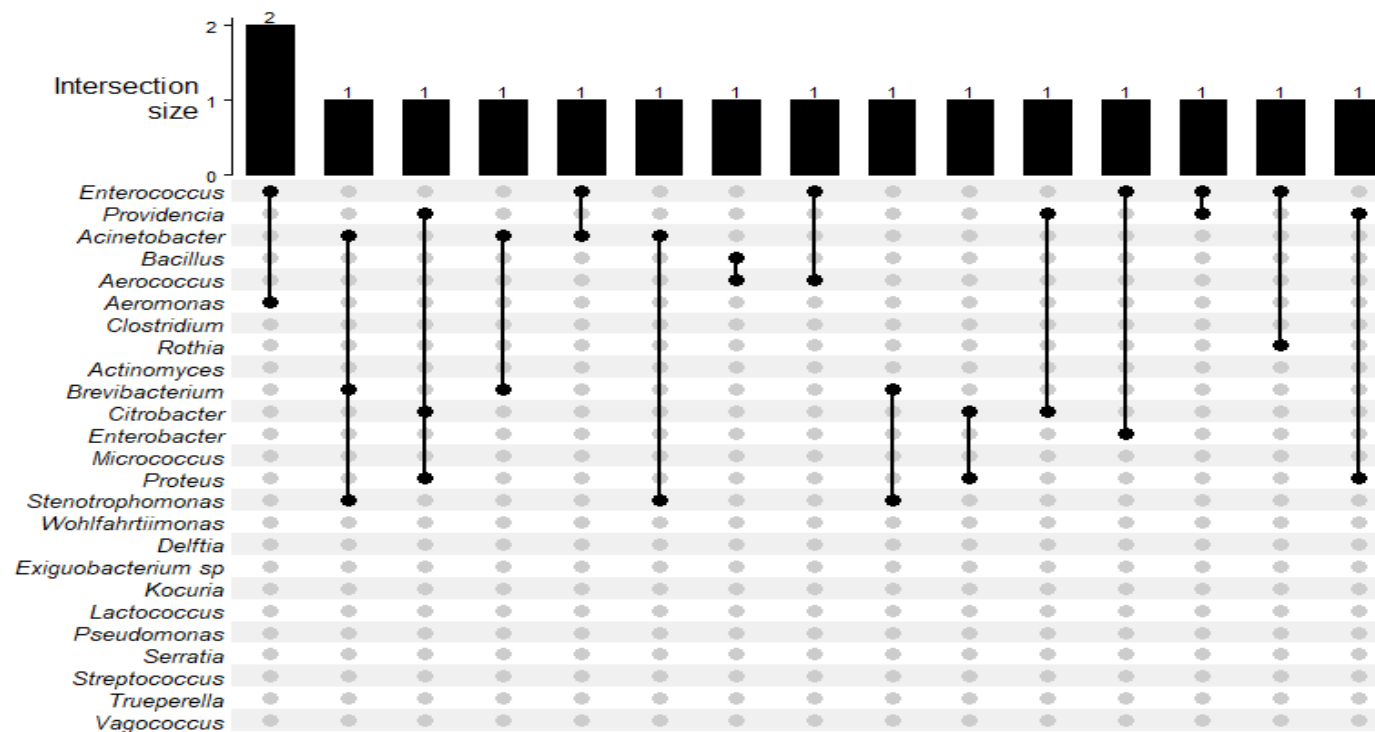


Figura 3: *UpSet plot* para ocorrência de agentes bacterianos em rim (n = 38/43). Os números sobre as barras mostram a quantidade de animais nos quais os agentes, indicados pelos pontos preenchidos, foram isolados em associação.

Os gráficos de *UpSet plot* das figuras 2 e 3 mostram que os isolamentos bacterianos em bexiga apresentaram maior número de associações do que os isolamentos bacterianos em rins. As combinações mais comuns em bexiga foram entre *Escherichia coli* e *Acinetobacter spp*, com 6 animais (8,4%), seguido por *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* (5,6%) e *Escherichia coli* e *Streptococcus spp* (5,6%). Enquanto para o rim, a associação mais frequente foi apenas entre os gêneros *Enterococcus spp.* e *Providencia spp* (4,66%).

2.4.4 Anatomopatológico

Das 92 fêmeas utilizadas no estudo, foi realizado o exame anatomopatológico em 91 amostras de bexiga e 90 amostras de rim (Anexos I e II). As amostras de bexiga apresentando lesão microscópica foram classificadas em aguda e crônica de acordo com a distribuição da lesão (focal, multifocal e difusa), tipo de infiltrado celular e grau de inflamação (leve, moderado e grave). Já as amostras de rim com alterações foram classificadas como apresentando nefrose, nefrite intersticial, e como pielonefrite. Os Gráficos 1 e 2 ilustram as frequências das alterações em bexiga e rim, respectivamente.

Gráfico 1: Frequência das afecções diagnosticadas pelo exame anatomopatológico em bexiga.

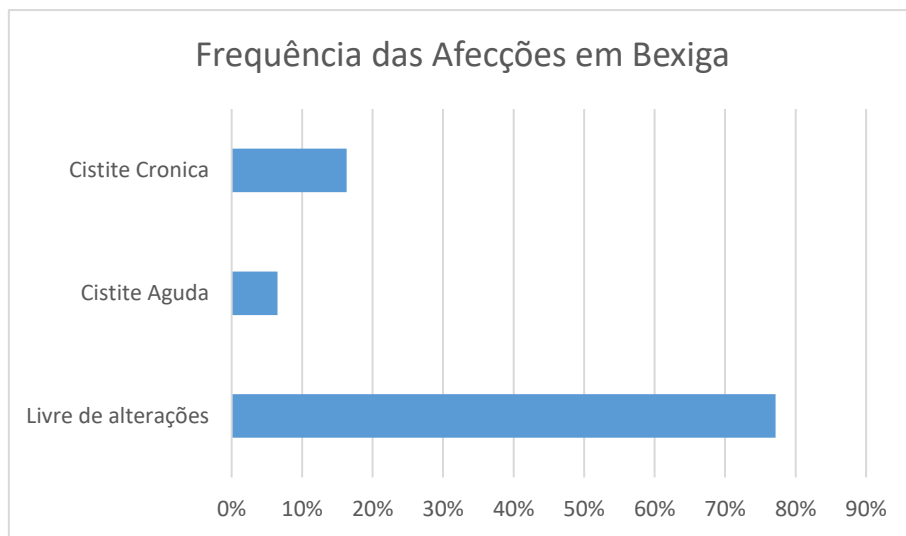
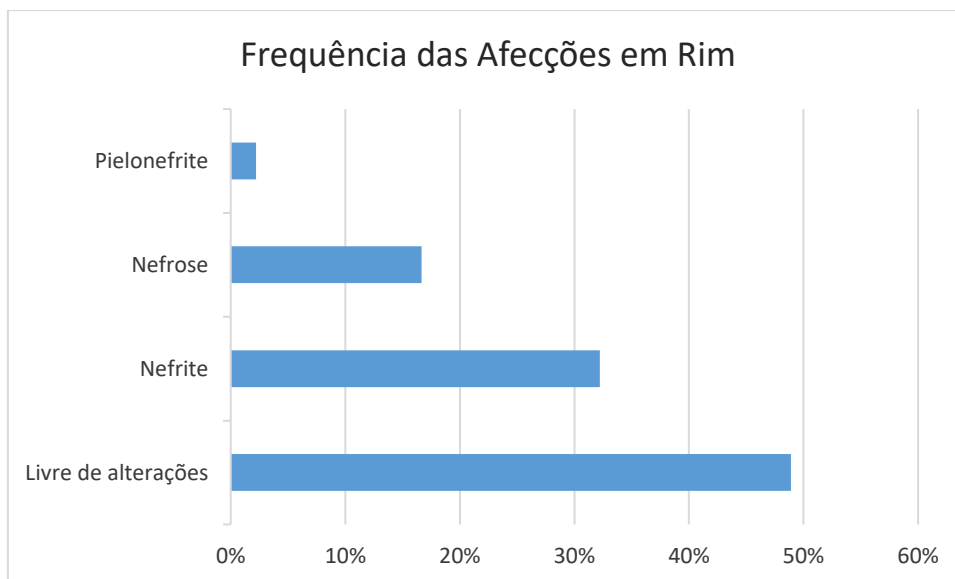


Gráfico 2: Frequência das alterações diagnosticadas pelo exame anatomopatológico em rim.



De acordo com o Gráfico 1, 77% (71/92) das amostras de bexigas estavam livre de alterações histológicas, 16% apresentaram lesões sugestivas de cistite crônica e 7% (6/92) foram diagnosticadas com quadro sugestivo de cistite aguda. Para as alterações histológicas em rim, 49% das amostras estavam livre de alterações histológicas, 32% apresentavam quadro sugestivo de nefrite, 17% quadro sugestivo de nefrose e 2% quadro sugestivo de pielonefrite.

Das 89 espécies de microrganismos isolados e identificados pela espectrometria de massa MALDI-TOF, sendo 79 espécies bacterianas e 10 espécies fúngicas, 36% (32/89) foram isoladas somente em bexiga; 30,3% (27/89) somente em rim e 33,7 (30/89) em ambos os grupos. Analisando as espécies identificadas em bexiga com e sem lesão microscópica, observamos que de um total de 64 espécies identificadas, 17,19% (11/64) foram isoladas somente em bexigas com lesão, 48,44% (31/64) em bexigas sem lesão e 34,37% (22/64) em ambos os grupos. Para as espécies identificadas em rim com e sem lesão microscópica, temos que de um total de 57 espécies identificadas, 35,09% (20/57) foram isoladas somente em rim com lesão, nenhuma espécie bacteriana foi isolada exclusivamente nos rins sem lesão (0/57) e 64,9% (37/57) em ambos os grupos (Figura 4). As Tabelas 17 e 18 mostram os isolados únicos mais frequentes em bexiga e rim e em bexiga sem lesão microscópica e com lesão microscópica, respectivamente.

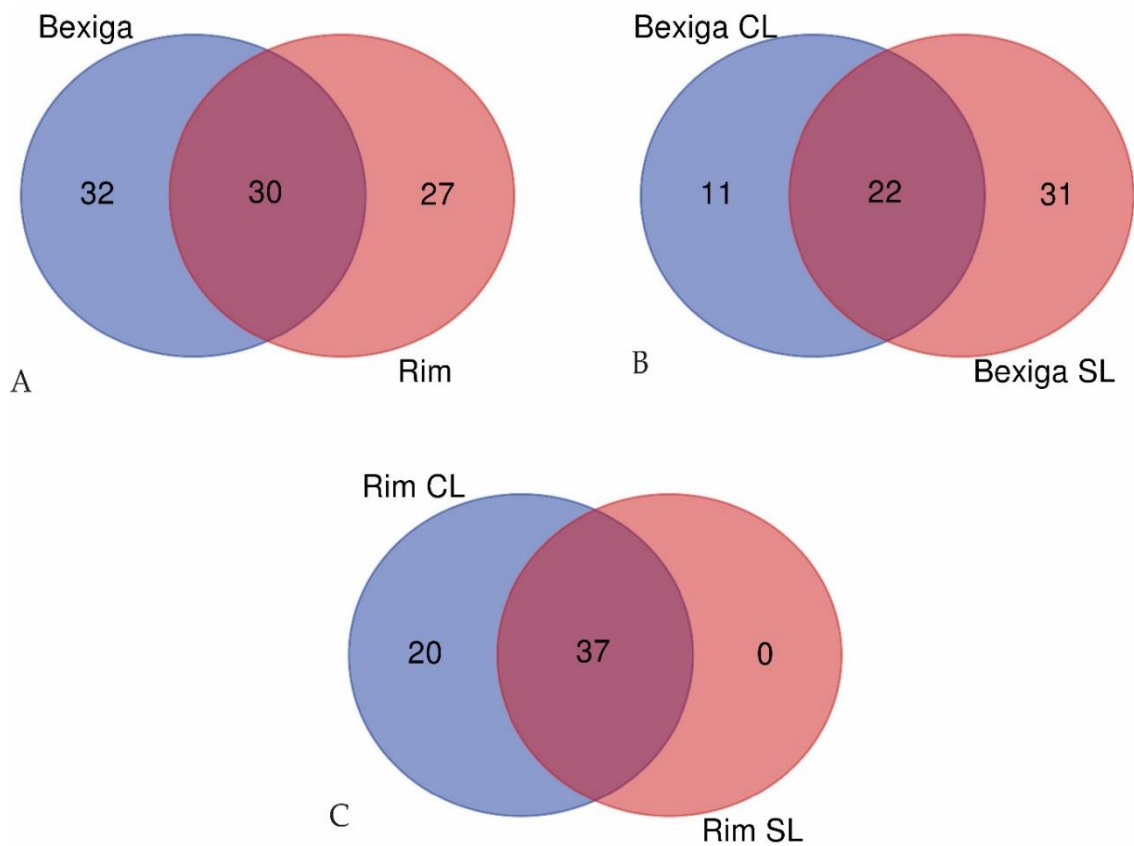


Figura 4: Diagrama de Venn para as espécies bacterianas e fúngicas identificadas pela espectrometria de massa MALDI-TOF para as amostras de rim e bexiga. A-Espécies identificadas em Bexiga e Rim. B – Espécies identificadas em Bexiga com lesão microscópica e sem lesão microscópica. C – Espécies identificadas em Rim com lesão microscópica e sem lesão microscópica.

Tabela 17: Agentes isolados exclusivamente em Bexiga e em Rim.

Agentes únicos em Bexiga	Agentes únicos em Rim
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Globicatella sanguinis</i>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>
<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>Corynebacterium falsenii</i>
<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Corynebacterium vitaeruminis</i>

Tabela 18: Agentes isolados exclusivamente em bexiga sem lesão microscópica (SL) e em bexiga com lesão microscópica (CL).

Agentes únicos em bexiga SL	Agentes únicos em bexiga CL
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Aeromonas hydrofila</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>
<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Streptococcus hyointestinalis</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Trueperella abortusis</i>

2.5 Discussão

No presente estudo, foi possível obter crescimento bacteriano em 78,26% das amostras de bexiga avaliadas e fúngico em 23,9%. Considerando os rins avaliados, obteve-se crescimento bacteriano em 93,48% das amostras e fúngico em 41,3%. O isolamento de mais de uma espécie bacteriana ocorreu em 58,3% das amostras de bexiga e em 88,3% dos rins avaliados. A ocorrência de infecções mistas por espécies fúngicas foi bem inferior, sendo observada em 26,3% das amostras de bexiga e em 9% das amostras de rim.

A presença de diferentes espécies (bacterianas e fúngicas) em associação nas amostras examinadas, apesar da realização da coleta *post mortem* de forma mais asséptica possível, indica que o canal urinário da fêmea suína, pode ser intensamente colonizado por microrganismos cultiváveis, muitos dos quais com reconhecido potencial de virulência. Esses achados confirmam ainda que as infecções do trato urinário nem sempre se devem somente à ação um patógeno isoladamente, mas sim a um provável desequilíbrio da população bacteriana residente.

Bach et al. (2021) descreve resultados semelhantes de isolamento bacteriano em amostras de urina de 16 fêmeas suínas, obtendo isolamento positivo em 87,50% das amostras. De maneira similar, Wentz (1997) isolou colônias bacterianas em 97,4% de 82 amostras de urina examinadas oriundas de fêmeas descartadas por inúmeras razões, sendo essas relacionadas ou não à quadros de infecção urinária.

O perfil de isolamento bacteriano encontrado nas amostras de urina de diversos estudos revela uma rica população de espécies bacterianas, corroborando com nossos achados, onde as espécies *Escherichia coli*,

Staphylococcus saprophyticus e *Klebsiella pneumoniae* foram isoladas com uma maior prevalência em amostras de bexiga.

Escherichia coli é considerada o principal agente etiológico de infecções urinárias em suínos e em outras espécies animais, incluindo humanos. No presente estudo foi isolada em 46,7% das amostras de bexiga e em 69,5% das amostras de rim. Em estudos realizados em diferentes países, resultados similares são descritos, na França foi descrito isolamento de *E. coli* em 58% dos casos de UTI em suínos (MADEC & DAVID, 1983), em Portugal, foi descrito o isolamento da espécie em 34% dos casos (PERESTRELO & PERESTRELO, 1988). Em estudo mais recente realizados no Brasil, VENANCIO et al., (2017) avaliaram 42 amostras de urina com suspeita clínica de infecção urinária, e isolaram *E. coli* em mais de 88% das amostras. *E. coli* foi descrita como parte da microbiota do trato reprodutivo de fêmeas suínas em diversos estudos (BARA et al., 1993; MAES et al., 1999), porém há poucos relatos descrevendo a microbiota do trato urinário dessas fêmeas. Luque et al. (2017) relataram que não há diferenças significativas na colonização por *E. coli* em amostras uretrais e vaginais de porcas.

Outro estudo mostra que, dos agentes bacterianos isolados em urinas coletadas por micção espontânea, foi observado 18,2% de *Staphylococcus spp.* e 42,85% de *E. coli*, principal espécie isolada em infecções urinárias de fêmeas suínas, sugerindo que a ITU presente nas porcas é essencialmente por contaminação fecal (POLO et al., 2013; BRITO et al., 2004).

Ainda, a espécie *Enterococcus faecium*, representativa nos isolados em bexiga e rim no presente estudo, tem sido amplamente estudada nos últimos anos devido a seu potencial de causar infecções graves em seres humanos e a

suas habilidades em disseminar de genes codificadores de mecanismos de resistência a antimicrobianos (MANGALAPPALLIILLATHU et al., 2013). Segundo Lazzaretti et al. (2021), em estudo com o objetivo de realizar o isolamento bacteriano, a fim de identificar os possíveis agentes causadores da infecção urinária em matrizes suínas, foi observada a presença de microrganismos de origem fecal, destacando-se as espécies *E. coli* e *Enterococcus spp*, semelhante aos resultados obtidos nesse estudo.

Entre os isolados obtidos de amostras de rins, foram encontrados gêneros bacterianos de grande importância como *Corynebacterium spp.*, agente já descrito em infecções geniturinárias de porcas e de importância em saúde pública por seu papel em infecções humanas (ZASADA; BACZEWSKA-REJ; WARDAK, 2010; POOR et al., 2017; SCHEIFER et al., 2019). Segundo Maes et al. (1999), *Staphylococcus sp.* e *Corynebactrium sp.* habitam o canal vaginal de fêmeas suínas em condições normais e dessa forma, por estarem presentes na microbiota vaginal, em casos de imunossupressão, manipulação incorreta da pipeta de inseminação ou baixa ingestão de água, pode ocorrer a colonização ascendentes por estes agentes até a bexiga causando ITU (ALBERTON & SOBESTIANSKY, 2012). Segundo estudo realizado por Guimarães (2018), o isolamento bacteriano em fêmeas com cistite teve alta frequência de agentes como *E. coli*, *Corynebacterium sp.*, *Salmonella sp.* e *Enterobacter sp.*

Além dos isolados bacterianos encontrados, observamos o crescimento, em menor proporção, de agentes fúngicos, sendo o gênero *Candida* o de maior frequência e a espécie *Rhodotorula mucilanonosa* a de maior frequência. Apesar de estudos indicarem poucos relatos com agentes fúngicos em infecções urinárias em matrizes suínas, com o avanço de doenças imunossupressoras nos

plantéis, os fungos podem se tornar cada vez mais importantes para a manutenção do nível sanitário e a rentabilidade nos rebanhos (ZLOTOWSKI et al., 2006). Os agentes fúngicos estão presentes na microbiota dos suínos e são comumente encontrados na pele, cavidade oral e intestino. Os animais, ao serem mantidos em constante contato com as fezes, somando à anatomia desfavorecida das fêmeas, disseminam fungos importantes como os do gênero *Candida* (SIDRIM e ROCHA, 2004). Apesar de pouco descrita em literatura em suínos, as espécies de *Rhodoturula* foram descritas como patógenos oportunistas ocasionando dermatite em leões marinhos, galinhas e gatos, e infecções pulmonares e otites em ovinos e bovinos (WIRTH e GOLDANI, 2012).

Histologicamente, a cistite foi encontrada em 22,82% porcas, dado que difere dos achados macroscópicos, que demonstram lesões típicas de cistite em 57,60% das fêmeas (Anexo I). Esses achados são similares aos descritos por Cernat et al. (2021), que relatam que as lesões macroscópicas em bexigas urinárias de fêmeas com quadro de cistite foram 5,6 vezes maiores quando comparados às lesões histológicas de cistite. Esses resultados reforçam os achados em literatura que citam que as bactérias ficam localizadas principalmente em áreas discretas na superfície luminal da bexiga, sem apresentar distribuição aleatória no epitélio da bexiga, sendo que entre essas áreas há grandes regiões sem nenhuma bactéria detectável, o que dificulta a localização de áreas colonizadas, tornando necessário cautela na consideração dos exames histológicos.

Ainda, em consonância nesse mesmo estudo, detectamos *E.coli* como a principal bactéria isolada em fêmeas com lesão histológica de cistite, presente em 71,42% dos animais, sendo que nas fêmeas livre de alterações histológicas

em bexiga, essa frequência foi significativamente menor (38,88%). Da mesma forma, *E. coli* estava presente em maior prevalência em fêmeas com lesões histológicas em rim (71,42%) quando comparadas às fêmeas sem alteração no mesmo (38,88%). Apesar desses dados, quando avaliamos as lesões de bexiga e rim, não encontramos uma correlação significativa entre ambas. Isso se deve ao fato de que as principais lesões encontradas em rins foram classificadas como nefrose (42,85%) ou nefrite (53,38%), sendo que tais quadros podem ter outras causas, não se limitando aos agentes bacterianos.

Alguns agentes bacterianos considerados de grande relevância para a suinocultura foram isolados unicamente de bexigas com lesão histológica como *Trueperella abortusuis*, e *Streptococcus suis*. A espécie *T. abortusuis*, foi inicialmente isolada no Japão de uma porca abortada apresentando placentite necrótica supurativa e broncopneumonia supurativa, mas também foi encontrada no trato urogenital de suínos com alterações clínicas na Alemanha e mais recentemente, a partir do conteúdo estomacal fetal de leitões com mecônio (Azuma et al. 2009). De acordo com Alssahen et al (2020), trata-se de uma espécie bacteriana importante devido às diversas alterações sistêmicas que pode ocasionar e na evidente contribuição em casos de aborto na população suína encontradas nesse mesmo trabalho. Também de caráter sistêmico, *Streptococcus suis* é um importante microrganismo na suinocultura, que desencadeia meningites, septicemias, artrites, endocardites, pneumonia, metrite e morte súbita (DELARCO, 2021).

2.6 Conclusão

A espectrometria de massa MALDI-TOF é um método rápido e de alto rendimento quando empregado na identificação de colônias bacterianas. O intenso crescimento bacteriano das amostras, mesmo com os cuidados adotados durante a coleta, e até mesmo de fêmeas saudáveis, mostra que o canal urinário da fêmea suína é intensamente colonizado por diferentes espécies. O exame histológico pode ser um método diagnóstico útil quando utilizado em conjunto com a identificação de agentes bacterianos, porém deve-se atentar às limitações quanto a dificuldade de encontrar áreas colonizadas. Várias espécies bacterianas apresentaram frequência de isolamento semelhante em fêmeas com lesão histológica e sem lesão histológica, no entanto, espécies de reconhecido potencial de virulência como *Trueperella abortusuis*, e *Streptococcus suis*, foram isoladas somente nas fêmeas com lesão histológica em bexiga urinária.

3. CAPÍTULO 2 - Caracterização das estirpes de *Escherichia coli*: fatores de virulência e perfil de resistência aos antimicrobianos.

3.1 Introdução

Escherichia coli é uma bactéria em forma de bastonete Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É mesófila, com crescimento ótimo a temperaturas entre 37° e 40° C e com tamanho variando de 1,1 a 1,5 µm por 2,0 a 6,0 µm, podendo ou não ser móvel. (SUSSMAN, 1997). É um agente comensal do trato gastrointestinal de diversos mamíferos e aves (SUSSMAN, 1997). Porém, algumas estirpes podem adquirir certos atributos de virulência, conferindo-lhes a capacidade de causar doença em seu hospedeiro. A este comportamento distinto entre as estirpes, presença de tais atributos e conforme o local de infecção, essas estirpes foram classificadas em patotipos (CROXEN; FINLAY, 2010).

E. coli é considerada o principal agente etiológico de infecções urinárias de suínos, respondendo a 58% dos casos na França (MADEC & DAVID, 1983) e a 34% dos casos em Portugal (PERESTRELO & PERESTRELO, 1988), com base em levantamentos epidemiológicos. No Brasil, estudos demonstram a ocorrência de 27% em Minas Gerais (REIS et al., 1992) e 15% no Paraná (BRITO et al., 1997).

Por esse motivo, alguns estudos têm relacionado os fatores de virulência associados às infecções que acometem outros tecidos que não o intestino, como o trato urinário, denominando o patotipo de estirpes de *Escherichia coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC). Porém, visto que *E. coli* é um microrganismo encontrado normalmente na urina de suínos saudáveis, deve-se diferenciar as amostras patogênicas das não patogênicas que se instalam,

multiplicam e desenvolvem a patologia (BRITO et al., 2004). Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que caracterizaram de forma ampla os fatores de virulência de *E. coli* isoladas do trato urinário de fêmeas suínas.

Nesta seção do estudo, as estirpes de *E. coli* isoladas de porcas com e sem infecção urinária foram avaliadas segundo a presença de 29 genes que codificam fatores de virulência associados a ExPEC, e foram avaliadas quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos frequentemente usados em suínos.

3.2 Revisão de literatura

Existem dois grandes grupos para os patótipos de *E. coli*: os que causam infecção no intestino, ou diarreio gênicos; e o grupo das estirpes que causam infecção fora do ambiente intestinal, denominadas *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC).

O grupo diarreio gênico é subdividido nas seguintes classes: EPEC (*E. coli* enteropategênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), e DAEC (*E. coli* de aderência difusa) (CROXEN; FINLAY, 2010). Em suínos, o grupo mais importante entre as amostras diarreio gênicas é o das ETEC, que causa surtos de diarreia neonatal e diarreia pós-desmame (LUPPI, 2017).

O grupo ExPEC é dividido nos patótipos: UPEC (*E. coli* uropatogênica), SEPEC (*E. coli* septicêmica), NMEC (*E. coli* associada à meningite neonatal) e APEC (*E. coli* patogênica de aves) (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; PITOUT, 2012). No cenário de infecções urinárias, é razoável ponderar que as estirpes isoladas desse ambiente sejam relacionadas às UPEC. Os fatores de

virulência codificados pelas por esse grupo são numerosos a variam entre as estirpes - incluem principalmente adesinas e sistemas de captação de ferro que auxiliam na sobrevivência fora do intestino - e diferem daqueles que são expressos por estirpes diarreio gênicas, principalmente pela ausência do sistema de secreção tipo III, presente na maioria dos isolados intestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

No entanto, apenas a presença de um único fator de virulência não confere patogenicidade, mas sim uma combinação de fatores de virulência – adesinas, invasinas, evasinas, sideróforo e toxinas - e os níveis de expressão dos respectivos genes (PITOUT, 2012).

As adesinas são os fatores que permitem a adesão das bactérias em diferentes superfícies. São moléculas proteicas expressas na superfície bacteriana, geralmente formando filamentos – denominados fímbrias - e que reconhecem receptores nas células do hospedeiro (SIRLICI; TRABULSI, 2005). As principais adesinas presentes nas estirpes ExPEC/UPEC são as fímbrias do tipo 1 (*fim*), fímbrias P (*pap*), fímbrias S (*sfa*) e fímbrias F1C (*foc*) (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

As invasinas são proteínas da membrana externa de patógenos Gram-negativos que mediam a invasão das células do hospedeiro (OELSCHLAEGGER, 2001; SIRLICI; TRABULSI, 2005). Entre os principais fatores está o *IbeA*, cujo gene codifica uma proteína importante na invasão de ExPEC na meningite neonatal de humanos e que também está associada à elevada patogenicidade em estirpes aviárias (GERMON et al., 2005; WANG et al., 2011).

Outro grupo importante de fatores de virulência são as evasinas, utilizadas para contornar o as defesas do sistema imune do hospedeiro, como fagocitose,

sistema complemento linfócitos e anticorpos (SIRLICI; TRABULSI, 2005). Como exemplo, determinantes comuns de resistência ao sistema complemento em estirpes de *E. coli* são o antígeno capsular 1 (*kps*) e o gene que confere aumento da resistência sérica (*iss*) (NOLAN et al., 2003; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). O antígeno capsular 1 são estruturas que recobrem a superfície bacteriana e dificultam a fixação do complemento. Já o gene *iss* confere resistência às propriedades líticas do soro e se localiza na membrana externa das bactérias (BIDET; BONARCORSI; BINGEN, 2012).

Os sistemas de aquisição de ferro são essenciais para a sobrevivência das estirpes de *E. coli* fora do ambiente intestinal. A concentração de ferro livre é extremamente baixa nos mamíferos quando fora do intestino, sendo aproximadamente 10^{-25} M no sangue e mais baixa em outros tecidos (FISCHBACH et al., 2006; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). Porém, grande parte das bactérias requerem uma concentração de aproximadamente 10^{-6} M de ferro citoplasmático para seu crescimento (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). Logo, as bactérias, em especial ExPEC, adquiriram diversos fatores para adquirir o ferro de seu hospedeiro, como a produção dos sideróforos, que são moléculas de baixo peso molecular com elevada afinidade por pelo íon férrico (Fe^{3+}) (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). A afinidade do sideróforo da aerobactina pelo ferro, por exemplo, é muito maior do que a da transferrina - molécula utilizada pelos mamíferos para quelar o ferro livre no organismo – fazendo com que as bactérias possuidoras desse sistema tenham vantagem no sequestro desse íon (FISCHBACH et al., 2006; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

As toxinas também são muito importantes para a patogenicidade das estirpes, uma vez que afetam uma variedade de processos celulares fundamentais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Entre os fatores toxigênicos mais comuns em ExPEC estão o fator citotóxico necrotizante (*cnf*), a toxina citoletal distensora (*cdt*), as hemolisinas (*hly*), a citotoxina entero-agregativa EAST-1(*ast*), e as toxinas auto transportadoras secretada (*sat*) e vacuolizadora (*vat*) (JOHNSON; RUSSO, 2005).

Em suínos, Brito et al., (1999) avaliaram estirpes de *E. coli* isoladas de fêmeas com infecção urinária e observaram que o gene *pap* que codifica para a fímbria P, associada com infecções urinárias, esteve presente em 54,8% dessas estirpes. No entanto, fatores de virulência relacionados à colibacilose entérica, como as toxinas termoestáveis e termolábeis (ST e LT) e a verotoxina (VT) foram encontrados em menor proporção (DE BRITO et al., 1999). De maneira similar, Spindola et al., (2018) encontrou elevadas frequências de genes relacionados a infecções extraintestinais em estirpes de *E. coli* isoladas de porcas com infecção urinária, sendo que 78,5% e 58% das estirpes analisadas apresentavam os genes que codificam para as fimbrias do tipo F1C e P, respectivamente, relacionadas às infecções do trato urinário. Ainda, 23% delas apresentavam o fator citotóxico *cnf1* e 98% das estirpes apresentavam fenótipo de multirresistência aos antimicrobianos (SPINDOLA et al., 2018a).

Visto que, no presente estudo, *E. coli* foi intensamente isolada a partir das amostras coletadas do trato urinário, as estirpes obtidas foram submetidas à detecção de genes de virulência considerados importantes para a colonização e infecção do trato urinário e a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos,

3.3 Objetivos

Caracterizar as estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fêmeas com lesão sugestiva de infecção urinária e de fêmeas sem lesões histológicas de acordo com a presença de genes codificadores de fatores de virulência, entre eles: adesinas, invasinas, evasinas, sideróforo e toxinas - e determinar para essas estirpes o perfil de resistência aos antimicrobianos.

3.4 Material e métodos

3.4.1 Isolados

Foram avaliadas 120 estirpes de *E. coli* isoladas de 48 animais com lesão microscópica em bexiga e/ou rim e de fêmeas sem alteração digna de nota.

3.4.2 Extração do DNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para a pesquisa de genes de virulência extra intestinais de *Escherichia coli*, as colônias isoladas tiveram seu DNA extraído de acordo com o protocolo descrito por Boom et al., (1990). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o processamento. Foram avaliados 29 genes que codificam para fatores de virulência associados a ExPEC. Os iniciadores de cada gene e as referências estão descritos no Quadro 1.

Os fragmentos amplificados foram detectados por meio da eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com BlueGreen® (LGC Biotecnologia). As imagens foram capturadas sob iluminação UV pelo sistema Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories). Os fragmentos foram identificados com base no marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

Quadro 1: Iniciadores utilizados para amplificar os genes codificadores de fatores de virulência de *E. coli* relacionados a infecções extra intestinais.

Gene	Sequência de primers (5'-3')	Amplicon (bp)	Referências
<i>papC</i>	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGGCCATATTCACATAA	501	JANBEN, 2001
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA	1177	YAMAMOTO et al., 1995
<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTGAGAGTCCTGCCCTCATTATT	498	YAMAMOTO et al., 1995
<i>sat</i>	TGCTGGCTCTGGAGGAAC TTGAACATTCAGAGTACCGGG	667	EWERS et al., 2007
<i>vat</i>	TCCTGGGACATAATGGTCAG GTGTCAGAACGGAATTG	981	EWERS et al., 2004
<i>iucD</i>	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCCCTCCAGTCCGGAGAAG	602	YAMAMOTO et al., 1995
<i>iss1</i>	GTGGCGAAAAGTAGTAAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	760	HORNE et al., 2000
<i>iss2</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	JOHNSON; WANNEMUEHLER; NOLAN, 2008
<i>lrp2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCCGGCAGCGTTTCTTCT	281	SCHUBERT et al., 1998
<i>fyuA</i>	GCGAC GGGAAGCGA TTTA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	780	SCHUBERT et al., 1998
<i>usp</i>	ACATTCACGGCAAGCCTCAG AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	440	BAUER et al., 2002
<i>neuS</i>	TATAATTAGTAACCTGGGGC GGCGCTATTGAATAAGACTG	927	TSUKAMOTO, 1997
<i>cvi/cva</i>	TCCAAGCGGACCCCTTATAG CGCAGCATAGTTCATGCT	598	EWERS et al., 2007
<i>astA</i>	TGCCATCAACACAGTATATCC TAGGATCCTCAGGTCGCGAGTGACGGC	116	YAMAMOTO; ECHEVERRIA, 1996
<i>itutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	JOHNSON; STELL, 2000
<i>kpsMT-II</i>	GCGCATTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272	JOHNSON; STELL, 2000
<i>kpsMT-III</i>	TCCTCTTGCTATTATCCCCCT AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	392	JOHNSON, 2000
<i>crl</i>	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG CTTCAGATTCAGCGTCGTC	250	MAURER et al., 1998
<i>csgA</i>	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	200	MAURER et al., 1998
<i>afaBC</i>	GCTGGGCAGCAAAGTATAACCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	750	YAMAMOTO et al., 1995
<i>hlyF</i>	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	JOHNSON et al., 2008
<i>iroN</i>	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCCGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	553	JOHNSON et al., 2006

<i>ibeA</i>	TGGAACCCGCTCGTAATATAC CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	342	EWERS et al., 2004
<i>sfa</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	JOHNSON, 2000
<i>focH</i>	ATGCGTAAATATTATCCCCTC GCCACCTGTCTGGATATAGAC	603	KRAG et al., 2009
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	JOHNSON, 2000
<i>cdtB</i>	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA	430	JOHNSON, 2000
<i>afa</i>	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC CCCCTAACGCGCCAGCATCTC	559	JOHNSON, 2000
<i>papE</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	JOHNSON, 2000

3.4.3 Caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos para as estirpes de *Escherichia coli*

A caracterização do perfil de resistência a antimicrobianos foi realizada pelo teste de microdiluição em caldo, conforme os padrões definidos no documento VET01 (CLSI, 2020). Para a preparação do inóculo, as estirpes foram cultivadas em caldo BHI (Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. A turbidez do cultivo foi ajustada com solução salina estéril (0,9%) de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland e confirmada em espectrofotômetro (0,150 a 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada possui aproximadamente 1,0 a 2,0 x 10⁸ UFC/ml, que foi novamente diluída na ordem de 1:1000 em caldo Mueller Hinton II (Difco) de maneira a obter uma concentração final de, aproximadamente, 5,0 x 10⁵ UFC/ml. Posteriormente, 50 µl desta suspensão final foram distribuídos em cada poço da microplaca, que foi selada e incubada a 37°C por 18 horas. Os princípios ativos testados, as concentrações e os pontos de corte usados na avaliação dos resultados são apresentados na Tabela 19 e na Figura 4.

As concentrações inibitórias mínimas foram aferidas visualmente como as menores contrações dos antimicrobianos nos poços sem crescimento bacteriano (sem a formação de botão). Foi utilizada como controle interno a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. As CIM₅₀ e CIM₉₀ foram determinadas conforme prescrito por (SCHWARZ et al., 2010).

Tabela 19- Antimicrobianos selecionados para teste, concentrações testadas e pontos de corte preconizados pela literatura e pelo CLSI.

ATIVO	VARIAÇÃO	S*	I	R
Amoxicilina/ Clavulanato (AUG)	1/0,5-32/64	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
Ampicilina (AMP)	1-64	≤ 8	16	≥ 32
Ceftiofur (TIO)	0,25-8	≤ 2	4	≥ 8
Cefalexina - <i>E. coli</i> – UTI (LEX)	0,5-32	≤ 16	4	≥ 32
Fosfomicina (FOS)	8-512	≤ 64	128	≥ 256
Oxitetraciclina (OXI)	2-32	≤ 4	8	≥ 16
Estreptomicina (STR)	1 - 16			≥ 8
Florfenicol (FFN)	0,5-8	≤ 4	8	≥ 16
Espectinomicina (SPE)	8 - 128	≤ 32	64	≥ 128
Ciprofloxacina (CIP)	1-4	≤ 0,06	0,12 – 0,5	≥ 1
Enrofloxacina (ENO)	0,25-4	≤ 0,12	0,25	≥ 0,5
Marbofloxacina (MAR)	0,06-4	≤ 1	2	≥ 4
Gentamicina (GEN)	0,5-16	≤ 4	8	≥ 16
Neomicina (NEO)	4-16	-	-	≥ 8
Azitromicina (AZI)	4-64	≤ 16	-	≥ 32
Colistina (COL)	1-16	-	-	≥ 4
Sulfametoxazol (SUL)	128-512	≤ 256	-	≥ 512
Trimetoprim/ Sulfametoxazol (STX)	1/9-4/76	≤2/38	-	≥4/76

*S- sensível, I – intermediário, R- resistente

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	-
A	TIO 8	AUG 64/32	AUG 32/16	AUG 16/8	AUG 8/4	AUG 4/2	AUG 2/1	AUG 1/0,5	STR 16	SPE 128	AZI 64	ENO 4
B	TIO 4	AMP 64	AMP 32	AMP 16	AMP 8	AMP 4	AMP 2	AMP 1	STR 8	SPE 64	AZI 32	ENO 2
C	TIO 2	LEX 32	LEX 16	LEX 8	LEX 4	LEX 2	LEX 1	LEX 0,5	STR 4	SPE 32	AZI 16	ENO 1
D	TIO 1	FOS 512	FOS 256	FOS 128	FOS 64	FOS 32	FOS 16	FOS 8	STR 2	SPE 16	AZI 8	ENO 0,5
E	TIO 0,5	MAR 4	MAR 2	MAR 1	MAR 0,5	MAR 0,25	MAR 0,12	MAR 0,06	STR 1	SPE 8	AZI 4	ENO 0,25
F	TIO 0,25	COL 16	COL 8	COL 4	COL 2	COL 1	CIP 4	CIP 2	CIP 1	NEO 16	NEO 8	NEO 4
G	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	GEN 0,5	SUL 512	SUL 256	SUL 128	STX 4/76	STX 2/18	STX 1/9
H	FFN 8	FFN 4	FFN 2	FFN 1	FFN 0,5	OXI 32	OXI 16	OXI 8	OXI 4	OXI 2	POS	POS

Figura 4- Distribuição das diluições de antimicrobianos na microplaca

3.4.4 Análise estatística

O perfil de resistência das espécies isoladas será determinado com base nos pontos de corte disponíveis nos documentos VET01S, M1000S e M45 do CLSI (2020). Para a análise de agrupamento dos perfis de resistência será utilizado o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths), sendo necessária a transformação dos perfis para dados binários. Um dendrograma será construído para cada espécie bacteriana utilizando o coeficiente de “*different values*” e o método de Ward.

A análise de associação entre presença dos genes de virulência e alteração histológica foi realizada com o SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) usando os testes qui-quadrado e exato de Fisher. A significância estatística foi considerada quando os valores de p foram menores que 0,05.

3.5 Resultados

3.5.1 Pesquisa de genes de virulência associados a ExPEC

Um total de 120 estirpes isoladas de 48 animais foram submetidas à pesquisa de genes de virulência relacionados à infecção extra intestinal, sendo 78 em bexiga e 44 em rim. Os genes testados e suas frequências estão apresentados na tabela 11. O gene mais frequente foi *crl*, presente em 117 das 120 estirpes, tanto em fêmeas com lesões microscópicas em bexiga e rins quanto em fêmeas sem alterações, seguido pelos genes *csgA*, *iroN*, *fimH* e *autA*. Em 12,4% (6/48) e 33,3% (24/72) das estirpes de fêmeas com lesão microscópica em bexiga e rim e fêmeas sem alterações, respectivamente, foram detectados pelo menos seis genes de virulência extra intestinais (Gráficos 3 e 4).

Houve diferença significativa para a frequência de alguns genes de virulência entre os grupos com lesão microscópica e sem alteração (Tabela 12). As fêmeas com lesão microscópica em bexiga e/ou rim tiveram maior frequência dos genes *iss2*, *lrp2*, *cvi/cva* e *iss1*. Além disso, alguns genes estavam presentes apenas nos animais sem alterações microscópicas como *vat*, *ibeA*, *neuS* e *papE*.

Gráfico 3- Frequência de genes de virulência em estirpes de *E. coli* isoladas de bexiga.

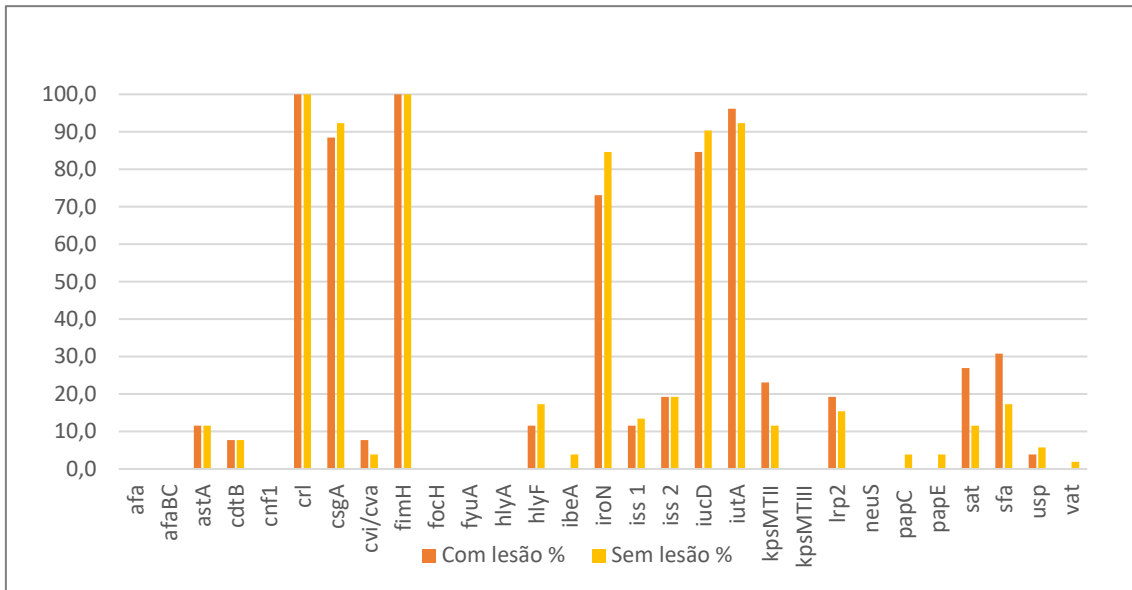


Gráfico 4- Frequência de genes de virulência em estirpes de *E. coli* isoladas de rins.

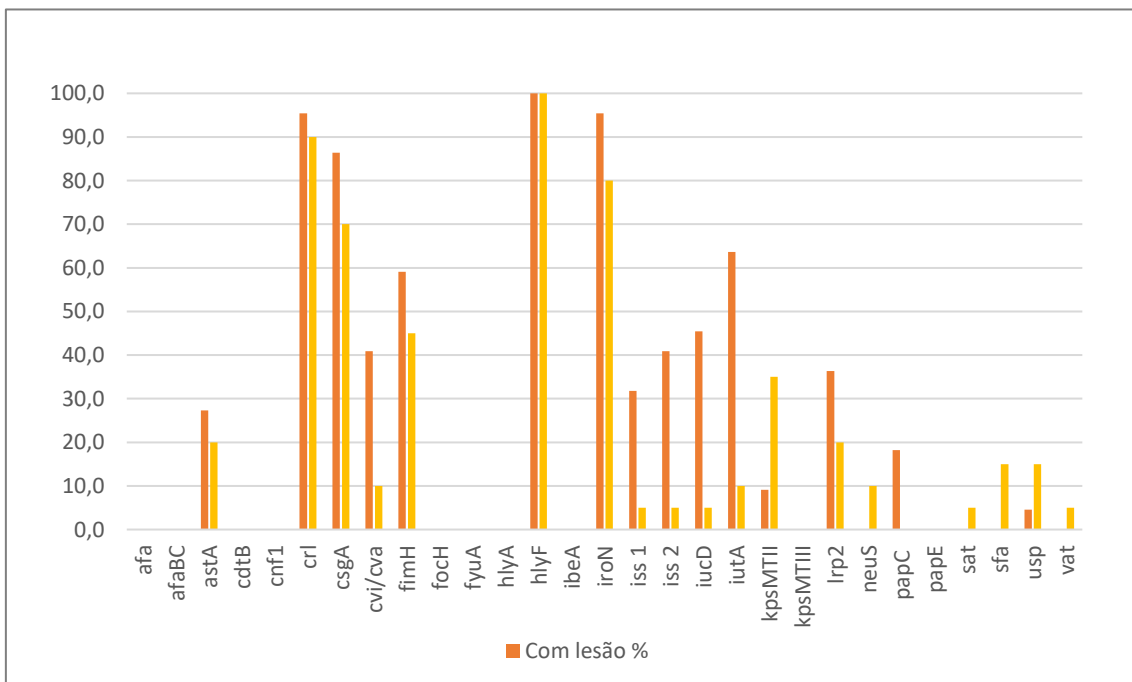


Tabela 20: Frequência de estirpes positivas para os genes codificadores de fatores de virulência para infecção extraintestinal.

Gene	Bexiga			Rim		
	Com lesão N %	Sem lesão N %	p valor	Com lesão N %	Sem lesão N %	p valor
<i>astA</i>	3 11,5	6 11,5	1,0	6 27,3	4 20,0	0.722
<i>cdtB</i>	2 7,7	4 7,7	1,0	0 0,0	0 0,0	1,0
<i>crl</i>	26 100,0	52 100,0	1,0	21 95,5	18 90,0	0.597
<i>csgA</i>	23 88,5	48 92,3	0.680	19 86,4	14 70,0	0.268
<i>cvi/cva</i>	2 7,7	2 3,8	0.597	9 40,9	2 10,0	0.023 ^a
<i>fimH</i>	26 100,0	52 100,0	1,0	13 59,1	9 45,0	0.362
<i>hlyF</i>	3 11,5	9 17,3	0.740	22 100,0	20 100,0	1,0
<i>ibeA</i>	0 0,0	2 3,8	0.549	0 0,0	0 0,0	1,0
<i>iroN</i>	19 73,1	44 84,6	0.222 ^a	21 95,5	16 80,0	0.174
<i>iss 1</i>	3 11,5	7 13,5	1,0	7 31,8	1 5,0	0.047
<i>iss 2</i>	5 19,2	10 19,2	1,0 ^a	9 40,9	1 5,0	0.009
<i>iucD</i>	22 84,6	47 90,4	0.709	10 45,5	1 5,0	0.002 ^a
<i>iutA</i>	25 96,2	48 92,3	0.659	14 63,6	2 10,0	<0.00 ^a
<i>kpsMTII</i>	6 23,1	6 11,5	0.318	2 9,1	7 35,0	0.062
<i>lrp2</i>	5 19,2	8 15,4	0.750	8 36,4	4 20,0	0.241 ^a
<i>papC</i>	0 0,0	2 3,8	0.549	4 18,2	0 0,0	0.108
<i>papE</i>	0 0,0	2 3,8	0.549	0 0,0	0 0,0	1,0
<i>sat</i>	7 26,9	6 11,5	0.110	0 0,0	1 5,0	0.476
<i>sfa</i>	8 30,8	9 17,3	0.174 ^a	0 0,0	3 15,0	0.099
<i>usp</i>	1 3,8	3 5,8	1,0	1 4,5	3 15,0	0.332
<i>vat</i>	0 0,0	1 1,9	1,0	0 0,0	1 5,0	0.476

^a Probabilidade pelo teste de qui-quadrado.

3.5.2 Perfil de resistência aos antimicrobianos para as estirpes de *Escherichia coli*

Foram avaliadas 120 estirpes de *E. coli*, as quais apresentaram elevada frequência de resistência à diversas classes de antimicrobianos (Figura 5, Tabela 12). As estirpes apresentaram maior frequência de resistência para ciprofloxacina (100%), enrofloxacina (85%), oxitetraciclina (83,3%), ampicilina (71,7%), estreptomicina (70%), azitromicina (64,2%) e florfenicol (55,8%). Com exceção da estreptomicina, a classe dos aminoglicosídeos (gentamicina, neomicina e espectinomicina) apresentaram boa ação contra as estirpes de *E. coli*, juntamente com colistina, fosfomicina, cefalexina e o ceftiofur.



Figura 5 – Distribuição das estripes segundo os valores de CIM para cada antimicrobiano

Tabela 21: Distribuição dos valores de CIM, valores de CIM 50, CIM 90 e taxa de resistência identificada entre as estirpes de *E. coli*.

Antimicrobianos	Número de cepas													CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128			
Ampicilina	0	0	0	0	3	19	10	0	2	2	1	83	0	>64	>64	71,7
Amoxicilina/clavulanato (2:1)*	0	0	0	0	0	1	17	18	22	43	16	3	0	32	64	51,7
Ceftiofur	0	0	89	26	3	0	0	0	2	0	0	0	0	≤0,25	0,5	1,7
Cefalexina	0	0	0	0	0	2	30	71	10	4	3	0	0	8	16	5,8
Enrofloxacina	0	0	18	8	13	11	6	64	0	0	0	0	0	>4	>4	85,0
Ciprofloxacina	0	0	0	0	11	6	11	92	0	0	0	0	0	>4	>4	100,0
Marbofloxacina	5	6	8	13	14	8	14	52	0	0	0	0	0	4	>4	55,0
Espectinomina	0	0	0	0	0	0	0	61	27	12	7	10	3	≤8	128	10,8
Florfenicol	0	0	0	2	5	6	13	27	67	0	0	0	0	>8	>8	55,8
Gentamicina	0	0	0	78	14	2	2	5	7	12	0	0	0	≤0,5	16	15,8
Neomicina	0	0	0	0	0	0	110	2	8	0	0	0	0	≤4	≤4	8,3
Oxitetraciclina	0	0	0	0	0	19	1	0	0	2	98	0	0	>32	>32	83,3
Azitromicina	0	0	0	0	0	0	43	19	7	8	8	35	0	8	>64	64,2
Estreptomicina	0	0	0	0	0	9	17	4	6	84	0	0	0	>16	>16	70,0
Fosfomicina	0	0	0	0	0	0	0	113	4	3	0	0	0	≤8	≤8	0,0
Colistina	0	0	0	0	65	51	1	0	0	3	0	0	0	≤1	2	3,3

*Considerando o valor da amoxicilina, barra vermelha indica o ponto de corte para resistência, células de cor laranja indicam a faixa de concentrações avaliada, células em cinza indicam valor > que a concentração anterior.

CIM (µg/ml)	≤128	256	512	>512	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Sulfadimetoxina	45	51	20	4	256,00	512,00	20%
CIM (µg/ml)	≤1/19	2/38	4/76	>4/76	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	92	0	0	28	≤1/9	>4/76	23%

3.6 Discussão

As estirpes de *E. coli* isoladas apresentaram uma alta frequência de genes de virulência extra intestinais pesquisados. Esses fatores são importantes na colonização e na ascensão da bactéria no trato geniturinário (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

Em bexigas, os genes *crl* e *fimH*, que fazem parte do sistema de adesão, foram os mais prevalentes, com o *crl* sendo detectado em 100% das estirpes de fêmeas com e sem lesão microscópica em bexiga. O gene *crl* (*gene de filamento curli*), que faz parte do grupo das adesinas afimbriais, codifica o apêndice *Curli* encontrado na superfície externa da maioria das cepas de *E. coli* e é responsável pela aderência nessas superfícies, além de participar da formação de biofilme (WHITT & SALYERS, 2002). Outra variante do gene *curli*, *csgA*, encontrada em 88,5% e 92,3% das fêmeas com e sem lesão microscópica, respectivamente, agem em conjunto com o gene *crl* para proporcionar estabilidade na secreção de diversos genes, tornando essas cepas mais virulentas. Já o gene *fimH*, pertencente ao grupo das adesinas fimbriais, permitem à adesão das bactérias em diferentes superfícies por moléculas proteicas denominadas fimbrias e que reconhecem receptores nas células do hospedeiro (SIRLICI; TRABULSI, 2005). Em alta frequência também, os genes *iutA*, *iucD* e *iroN* fazem parte do sistema de aquisição de ferro e foram encontrados em 96,2%, 84,6% e 73,1%, respectivamente, nas fêmeas com lesão microscópica em bexiga e em 92,3%, 90,4% e 84,6%, respectivamente, nos animais sem lesão microscópica em bexiga. Esses genes são importantes por auxiliar na sobrevivência da bactéria fora do intestino, permitindo a colonização de outros tecidos, onde a disponibilidade de ferro não é tão alta (DER VARTANIAN et al., 1992). Em rins,

além da alta prevalência dos genes *crl*, *iroN* e *csgA*, encontrados com uma frequência alta em bexigas também, temos o gene *hlyF* que foi encontrado em 100% das estirpes isoladas em rins de fêmeas com e sem lesão microscópica. O gene *hly* (hemolisina), além de lesionar as células hospedeiras, suprime a produção de citocinas e interleucinas, permitindo que a bactéria se estabeleça no organismo hospedeiro. Cepas que não possuem genes que promovem hemólise, conseqüentemente não apresentam citotoxicidade elevada e não são capazes de suprimir citocinas, dificultando assim sua colonização no hospedeiro (HILBERT et al., 2012). Além disso, um estudo sugeriu que *hlyF* é um gene de virulência que proporciona a migração do trato urinário para a corrente sanguínea, podendo causar septicemia (SZEMLAKO et al., 2013). Toxinas como a hemolisina *hlyF* são conhecidamente importantes no estabelecimento de doenças em mamíferos, permitindo a disseminação da bactéria, liberando nutrientes do hospedeiro e incapacitando as células do sistema imune (WILES et al. 2008), porém não há dados aprofundados em relação aos suínos, o que sugere um resultado relevante já que foi encontrado, no presente estudo, em todas as amostras de rins com ou sem lesão microscópica. Os genes *sat* e *vat* que também codificam para toxinas foram encontrados em baixa prevalência em ambos os grupos (bexiga e rim).

Nas amostras de rins, alguns genes como *iutA*, *iucD*, *cvi/cva*, *iss1* e *iss2*, demonstraram uma frequência significativamente maior nas fêmeas com lesão microscópica quando comparado às fêmeas sem lesão microscópica. Os genes *iutA* e *iucD* fazem parte do sistema de aquisição de ferro como mencionado acima e são essenciais na sobrevivência da bactéria em ambientes extra intestinais como o trato urinário superior. Já os genes *iss1* e *iss2* estão

relacionados à maior resistência sérica e quando associados aos genes *iucD* e *iutA*, estão relacionados a elevados níveis de virulência, e mesmo a posse de qualquer um desses genes é suficiente para níveis intermediários de virulência em APEC (TIVENDALE et al., 2004). O gene *cvi/cva* é um marcador de um plasmídeo de virulência e sua frequência significativamente maior nas estirpes de porcas com lesão microscópica em rim indica que essas estirpes podem apresentar uma característica mais invasiva e virulenta. Além disso, esse gene está ligado à capacidade de superar as defesas do hospedeiro (JOHNSON; WANNEMUEHLER; NOLAN, 2008; SIRLICI; TRABULSI, 2005).

Em relação aos perfis de virulência, observou-se que para bexiga, a associação *iutA+iucD+csgA+iroN+fimH+crl* foi muito recorrente, encontrada em 21,79% (17/78) das fêmeas. Quando analisadas separadamente, as amostras de bexiga apresentaram maior variedade de associações de perfis diferentes (15 perfis com genes de virulência associados), quando comparadas às amostras de rim, que demonstraram uma variedade de 4 associações de perfis de virulência. Para os rins, o perfil de virulência mais frequente tinha os genes *iroN*, *hlyF*, *crl* e *csgA* associados em 14,28% (6/42) das fêmeas com amostras de rim. Ainda, quando observado o perfil de virulência presente em ambos os grupos (bexiga e rim), temos a associação dos genes *iutA+iucD+csgA+iroN+fimH+crl* em 14,16% das fêmeas (17/120), assim como os presentes em Bexiga, o que indica a possibilidade da ascensão dessas bactérias do trato urinário inferior para o trato urinário superior. Como a diferença entre os perfis de genes de virulência entre as amostras isoladas de bexiga e rim com e sem lesão microscópica foram baixas, é importante discutir que não somente a presença dos genes virulência e seus níveis de expressão são necessários para que ocorra doença (PITOUT,

2012), mas também as condições do habitat, no caso o trato urinário, com presença associação entre bactérias e consequente desequilíbrio da microbiota, que podem ser importantes para o surgimento clínico da infecção.

As estirpes de *Escherichia coli* testadas apresentaram elevada resistência para alguns antimicrobianos, como ciprofloxacina, estreptomicina, enrofloxacina, oxitetraciclina, azitromicina e ampicilina, com alguns desses sendo frequentemente utilizados na suinocultura (DUTRA et al., 2021), inclusive para o tratamento de infecções do trato urinário. Resultados semelhantes foram encontrados por Spindola et al., (2018), que também encontrou elevada resistência de UPEC à tetraciclina, florfenicol e ampicilina, e corroborando com o estudo atual, foram sensíveis ao ceftiofur, gentamicina, espectinomocina e à amoxicilina + ácido clavulânico. Em contraste, 51,7% das estirpes deste estudo apresentaram resistência à amoxicilina + ácido clavulânico.

Nos últimos anos, a ocorrência de isolados multirresistentes de *E. coli* aumentou de maneira considerável (SCHROEDER et al., 2002). Spindola et al. (2018), observaram um total de 98% dos isolados (182/186) apresentando resistência multidrogas, com maiores níveis de resistência às sulfonamidas, tetraciclina, florfenicol e ampicilina. Os autores demonstraram também que animais doentes representam fontes de bactérias resistentes para animais saudáveis. Resultados posteriores confirmaram que suínos de rebanhos clinicamente afetados podem servir como reservatório de cepas de *E. coli* uropatogênicas e multirresistentes (SPINDOLA et al., 2018).

Das 120 estirpes testadas nesse estudo, 110 (91,6%) foram classificadas como multirresistentes – resistentes a pelo menos um antimicrobiano em no mínimo três classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012). É

importante ressaltar que alguns desses antimicrobianos são considerados de importância crítica em medicina humana, como cefalexina e a ciprofloxacina (WHO, 2018). A terapia antimicrobiana de amplo espectro é geralmente recomendada e considerada no tratamento de infecções urinárias causadas por *E. coli*, porém a sua eficácia depende da suscetibilidade ao patógeno.

3.1 Conclusão

A presença de vários dos genes de virulência testados, alguns em elevada frequência, indica que as estirpes de *E. coli* isoladas do trato urinário de porcas possuem os fatores que caracterizam *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC) e têm potencial para causar infecção. As estirpes isoladas de fêmeas com lesão microscópica em rim apresentaram uma frequência significativamente maior de alguns desses genes em relação às porcas sem lesão, como os genes *iucD*, *iutA*, *cvi/cva*, *iss1* e *iss2*, e que podem servir como marcadores de infecção. Os elevados níveis de resistência observados, com mais de 90% das estirpes sendo classificadas como multirresistentes é um forte indicador do uso indiscriminado de antimicrobianos em suínos.

4. Referências bibliográficas

ALBERTON, G. C. et al. **Doenças dos suínos**: Infecção urinária em fêmeas de produção. Goiania: Cãnone, p. 179-194, 2012.

ALSSAHEN, M. et al. Epidemiological analysis of *Trueperella abortus* isolated from cases of pig abortion of a single farm. **Folia Microbiologica**, v. 65, n. 3, p. 491–496, 29 jun. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12223-019-00753-9>>.

ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 215–237, jun. 2003. Disponível em: <[https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL (ABPA). **Suinocultura**. Disponível em: <<http://www.abpa-br.com.br/setores/suinocultura>>. Acesso em: 30 de agosto de 2020.

AZUMA R, MURAKAMI S, OGAWA A, OKADA Y, MIYAZAKI S, MAKINO T. *Arcanobacterium abortis* sp. isolado da placenta de uma porca após um aborto. *Int J Syst Evol Microbiol* 59. 1469–1473, 2009.

BACH, M. J. Uso racional de antibióticos para tratamento de infecção urinária em porcas. Dissertação mestrado. Palotina, 2021.

BARA, M. R. et al. A study of the microbial flora of the anterior vagina of normal sows during different stages of the reproductive cycle. **Australian veterinary journal**, v. 70, n. 7, p. 256–259, 1993. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L23926195>>.

BAUER, R. J. et al. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN* (*E. coli*). **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 10, p. 1521–4, 15 maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992291>>.

BERNREITER-HOFER, T. et al. The pheno- and genotypic characterization of porcine *Escherichia coli* isolates. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1676, 1 ago. 2021.

BIDET, P.; BONARCORSI, S.; BINGEN, E. Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des *Escherichia coli* extra-intestinaux. **Archives de Pédiatrie**, v. 19, p. S80–S92, nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929693X12712794>>.

BOOM, R. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269651/pdf/jcm00051->

0103.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2017.

BREITENFELNER, G. Aufgewertete bakteriologische Harndiagnostik. **Wiener Medizinischer Wochenschrift**, v.7, p.100-103, 1972.

BRITO, B. G. DE et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 645–652, abr. 2004.

BRITO, B.G.; VIDOTTO, M.C.; TAGLIARI, K.C. Infecções urinárias em granjas de suínos do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 8., 1997, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Curitiba: ABRAVES, 1997. p.267-268. BRITO, B.G. et al. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.65, p.123-132, 1999.

CERNAT, M., SKAMPARDONIS, V., PAPADOPOULOS, G.A. et al. Urinary tract infections in culled sows from Greek herds: prevalence and associations between findings of histopathology, bacteriology and urinalysis. *Porc Health Manag*, 33 (2021).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; 5th ed. **CLSI supplement VET01S**. ISBN 978-1-68440-093-5 CLSI Institute, USA, 2020.

COLES, E. H. **Diagnóstico y patologia en veterinária**. México: Interamericana, 1989.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 7 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro2265>>.

DALLA COSTA, O. A.; SOBESTIANSKY, J. Como controlar a infecção urinária em matrizes suínas em produção. **Instrução Técnica para o Suinocultor**. Embrapa, Concórdia, n. 10, mar. 1999.

DE BRITO, B. G. et al. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary microbiology**, v. 65, n. 2, p. 123–132, 1999.

DER VARTANIAN, M. et al. Role of aerobactin in systemic spread of an opportunistic strain of *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic lambs. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2800–2807, 1992.

DUTRA, M. C. et al. Antimicrobial Use in Brazilian Swine Herds: Assessment of Use and Reduction Examples. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 881, 20 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/4/881>>.

EWERS, C. et al. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary microbiology**, v. 104, n. 1–2, p. 91–101, 30 nov. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530743>>.

EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 297, n. 3, p. 163–76, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374506>>.

FISCHBACH, M. A. et al. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 3, p. 132–138, 14 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nchembio771>>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES. Meat Market Review. Disponível em: <<https://www.fao.org/publications/card/es/c/CB7886EN/>>. Acesso em: 10 de junho de 2022.

GAO, C.-H.; YU, G.; CAI, P. ggVennDiagram: An Intuitive, Easy-to-Use, and Highly Customizable R Package to Generate Venn Diagram. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 7 set. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.706907/full>>.

GERMON, P. et al. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1179–1186, 1 abr. 2005. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27809-0>>.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 15 set. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btw313>>.

GUIMARAES, A., B. Cistite e lesões de casco em matrizes suínas. 2018. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

HIJAZIN, M. et al. Identification of *trueperella* (*Arcanobacterium*) *bernardiae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis and by species-specific PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 457–459, 2012.

HORNE, S. M. et al. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. **Avian diseases**, v. 44, n. 1, p. 179–84, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737659>>.

ISLING, L. K. et al. Pyelonephritis in slaughter pigs and sows: Morphological characterization and aspects of pathogenesis and aetiology. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, 2010.

JANBEN, T. Virulence-associated genes in avian pathogenic (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 371–378, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422104700466>>.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6–7, p. 383–404, out. 2005. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed7&AN=2005395705%5Cnhttp://sfxeu08.hosted.exlibrisgroup.com/sgul?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:10.1016%2Fj.ijmm.2005.07.005&issn=1438-4221&isbn=&volume=295&issue=6-7&spage=383&pages>>.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315217>>.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y. M.; NOLAN, L. K. Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2360–2369, 15 abr. 2008. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02634-07>>.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro818>>.

KRAG, L. et al. Genotypic and phenotypic characterisation of *Escherichia coli* strains associated with porcine pyelonephritis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3–4, p. 318–326, 2 mar. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113508003519>>.

LAZZARETTI R.; ZERBIELLI F.; KUNZ J.; RITTERBUSCH G Relação entre infecção urinária e problemas reprodutivos em matrizes suínas. Simpósio Internacional de Suinocultura, 109 p., 2021.

LUPPI, A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. **Porcine Health Management**, v. 3, n. 1, p. 16, 8 dez. 2017. Disponível em: <<https://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s40813-017-0063-4?site=porcinehealthmanagement.biomedcentral.com>>.

LUQUE, A. T. et al. Vaginal bacterial diversity from healthy gilts and pregnant sows subjected to natural mating or artificial insemination. **Research in Veterinary Science**, p. 143393, jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143393>>.

MADEC, F.; DAVID, F. Les troubles urinaires des troupeaux de truies: diagnostic, incidence et circonstances d, apparition. **Journées Recherche Porcine France**, Paris, v.15, p.431-446, 1983.

MAES, D.; VERDONCK, M.; KRUIF, A. DE. Vaginal microecology and vulvar discharge in swine. **Old Herborn University Seminar Monograph 12**, v. 50, p. 39–50, 1999.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and

pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>>.

MANGALAPPALLI-ILLATHU, A.; DURIEZ, P.; MASSON, L.; DIARRA, M. S.; SCOTT, A.; TIEN, Y.; ZHANG, Y.; TOPP, E. Dynamics of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* during swine manure storage. *Canadian Journal of Microbiology*, v.56, n.8, p. 683–91, 2013.

MAURER, J. J. et al. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian diseases**, v. 42, n. 1, p. 106–18, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9533087>>.

MAYRINK, D. D. Infecção urinária: um resumo das causas e conseqüências e controle. **Boletim Informativo Vacinar**, a. 3, n. 35, fev. 2005.

MEISTER, A.R. **Efeito do cloreto de amônio, ácido cítrico e cloreto de sódio no controle de cistites em porcas**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP: Jaboticabal, 2006.

MENIN, A. et al. Diagnóstico de infecção urinária em fêmeas suínas produtivas em granjas comerciais no sul do Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p.199-206, 2008.

MERLINI, L.S.; MERLINI, N.B. Infecção Urinária em Fêmeas Suínas em Produção – Revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.14, p.65-71, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (MAPA). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 30 de agosto de 2020.

NIELSEN, T. K. et al. A porcine model for urinary tract infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-12, 2019.

NOLAN, L. K. et al. Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. **Veterinary research communications**, v. 27, n. 2, p. 101–10, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12718504>>.

OELSCHLAEGER, T. A. Adhesins as invasins. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 291, n. 1, p. 7–14, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403413>>.

PERESTRELO, R.V.; PERESTRELO, H.V. Contribuição para o estudo da patologia urinária das porcas exploradas intensivamente em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.83, n.488, p.353-367, 1988.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00009/abstract>>.

POLO, L.; ACUNHA ESCOBAR, T.; ZURAVSKI, L.; DOWICH, G.; LUBECK, I.; CRISTINA NICHELLE LOPES, D. Análise Microbiológica de Urina de Porcas em uma Granja Suinícola no Extremo Oeste do Rio Grande do Sul. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 5, n. 2, 14 fev. 2020.

POOR, A. P. et al. Characterization of *Corynebacterium Diphtheriae*, *C. Confusum* and *C. Amycolatum* Isolated from Sows with Genitourinary Infection. **Veterinary Microbiology**, v. 207, n. April, p. 149–152, ago. 2017. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L616887469>>.

PÔRTO, R. N. G. et al. Aspectos físicos químicos e microbiológicos de urina de matrizes suínas descartadas. **Ciência Rural**, v. 33, p. 319-324, 2003.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed: São Paulo, 512 p., 2005.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REIS, R. et al. Infecções urinárias em porcas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**: Belo Horizonte, v. 44, p. 363-376, 1992. SCHEIFER, C. et al. Re-emergence of *Corynebacterium diphtheriae*. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 49, n. 6, p. 463–466, set. 2019.

SCHEIFER, C. et al. Re-emergence of *Corynebacterium diphtheriae*. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 49, n. 6, p. 463–466, set. 2019.

SCHUBERT, S. et al. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infection and immunity**, v. 66, n. 2, p. 480–5, fev. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453599>>.

SCHWARZ, S. et al. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601–604, 24 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350900604X>>.

SIDRIM JJC & ROCHA MFG. 2004. Candidíase, p.266-274. In: Sidrim J.J.C. & Rocha M.F.G. (Eds), *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

SILVEIRA, R. P. et al. Relação entre infecção urinária e problemas puerperais em porcas. Comunicado Técnico, Concórdia, n. 433, dez. 2006.

SIRLICI, M. P.; TRABULSI, L. R. Fatores de virulência: adesão, invasão, sideróforos, evasinas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4. ed. [s.l.] Atheneu, 2005. p. 143–156.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134–163, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2007.0087>>.

SOBESTIANSKY, J. **Doenças dos Suínos**. Infecção urinária em fêmeas em produção. Goiânia: Cânone, p. 127-141, 2007.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e patologia suína**: Goiânia, 2 ed., 1999.

SOBESTIANSKY, J. et al. Infecção urinária de origem multifatorial na fêmea suína em produção. Suinocultura dinâmica. **Periódico Técnico-Informativo**: EMBRAPA, n. 16, 1995.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Patologia e Clínica Suína**. 1 ed., 1993.

SPINDOLA, M. G. et al. Genetic diversity, virulence genotype and antimicrobial resistance of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) isolated from sows. **Veterinary Quarterly**, v. 38, n. 1, p. 79–87, 1 jan. 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01652176.2018.1519321>>.

TIVENDALE, K. A. et al. Association of iss and ITUcA, but Not tsh, with Plasmid-Mediated Virulence of Avian Pathogenic Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6554–6560, 1 nov. 2004. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.72.11.6554-6560.2004>>.

TSUKAMOTO, T. PCR method for detection of K1 antigen and serotypes of Escherichia coli isolated from extraintestinal infection. **Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases**, v. 71, n. 2, p. 125–9, fev. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9077069>>.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 30 de agosto de 2020.

VENANCIO, L. F. B. et al. Microbiological aspects of Escherichia coli in urinary tract infections in sows of commercial farms in Sinop-MT. **Scientific Electronic Archives**, v. 10, n. 6, p. 109–115, 5 dez. 2017.

WANG, J. et al. Characterization of Vaginal Microbiota of Endometritis and Healthy Sows Using High-Throughput Pyrosequencing of 16S rRNA Gene. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 325–330, out. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017305144>>.

WANG, S. et al. Effects of ibeA Deletion on Virulence and Biofilm Formation of Avian Pathogenic Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 279–287, jan. 2011. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00821-10>>.

WENTZ, I. et al. AS INFECÇÕES UTERINAS COMO CAUSA DE REPETIÇÃO DE COBRIGÃO EM PORCÁS. **Comunicado Técnico Embrapa - CT / 112 / EMBRAPA-CNPSA**, p. 1–3, 1986.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) - Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**. 6. ed. [s.l.] WHO, 2018.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, n. 1, p. 11–19, 2008.

WIRTH F & GOLDANI LZ. Epidemiology of *Rhodotorula* : An Emerging Pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012:1–7, 2012.

YAMAMOTO, S. et al. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 85–90, out. 1995. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x>>.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infection and immunity**, v. 64, n. 4, p. 1441–5, abr. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8606115>>.

ZASADA, A. A.; BACZEWSKA-REJ, M.; WARDAK, S. An increase in non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland - molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. e907–e912, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2010.05.013>>.

ZLOTOWSKI P, et al. Muco-cutaneous candidiasis in two pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet J*. 171: 566-569, 2006.

Anexo I

Tabela 22 - Caracterização das amostras de bexiga e resultados da avaliação histopatológica e de isolamentos.

ID	Bexiga	Bexiga	Bactéria	<i>E. coli</i>	Fungo
	Afecções macroscópicas	Diagnóstico morfológico	Positivo	Positivo	Positivo
NUT3	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT6	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT7	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT8	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT9	Lesão macroscópica	Cistite crónica multifocal moderada	1	1	0
NUT12	Sem alteração digna de nota	NT	0	0	0
NUT15	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT16	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT18	Lesão macroscópica	Cistite crónica difusa moderada	0	0	0
NUT25	Sem alteração digna de nota	Cistite crónica difusa moderada	1	1	0
NUT27	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT31	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	1
NUT32	Sem alteração digna de nota	Cistite crónica difusa moderada	1	0	1
NUT33	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT34	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	1
NUT35	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT36	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT38	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT39	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT42	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT43	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	1
NUT44	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT45	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT46	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	1
NUT47	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT48	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	0	0
NUT49	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT50	Lesão macroscópica	Cistite crónica difusa moderada	1	1	1
NUT51	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT52	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT53	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT54	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT55	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	0	0
NUT56	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT57	Lesão macroscópica	Cistite crónica difusa grave	1	0	0
NUT58	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT60	Lesão macroscópica	Cistite aguda difusa moderada	1	1	0

Continuação...

ID	Bexiga	Bexiga	Bactéria	<i>E. coli</i>	Fungo
	Afecções macroscópicas	Diagnóstico morfológico	Positivo	Positivo	Positivo
NUT61	Sem alteração digna de nota	Cistite crônica difusa moderada	1	1	0
NUT62	Sem alteração digna de nota	Cistite crônica focal moderada	1	1	0
NUT63	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT64	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	0	0
NUT65	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT66	Lesão macroscópica	Cistite crônica multifocal moderada	1	1	0
NUT67	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT69	Sem alteração digna de nota	Cistite crônica difusa moderada	1	1	1
NUT70	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	0	0
NUT71	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT72	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	0
NUT73	Sem alteração digna de nota	Cistite aguda multifocal moderada	1	0	1
NUT75	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT76	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT77	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT78	Sem alteração digna de nota	Cistite crônica difusa moderada	1	1	0
NUT79	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	0	0
NUT80	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	0	0
NUT81	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT82	Lesão macroscópica	Cistite aguda difusa moderada	1	1	0
NUT83	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	0
NUT85	Lesão macroscópica	Cistite aguda difusa moderada	1	0	0
NUT87	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	0
NUT88	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	1	0
NUT89	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT91	Lesão macroscópica	Cistite aguda difusa moderada	1	1	1
NUT93	Lesão macroscópica	Cistite crônica multifocal moderada	1	1	1
NUT94	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT95	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT96	Lesão macroscópica	Cistite crônica difusa moderada	1	1	1
NUT97	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT99	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	1
NUT102	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT103	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT104	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	1
NUT106	Sem alteração digna de nota	Cistite crônica difusa moderada	1	1	0
NUT108	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT109	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT110	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	1
NUT112	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	0
NUT114	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT115	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	0	0

Continuação...

ID	Bexiga	Bexiga	Bactéria	<i>E. coli</i>	Fungo
	Afecções macroscópicas	Diagnóstico morfológico	Positivo	Positivo	Positivo
NUT116	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT117	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT119	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT121	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	1
NUT122	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	0	0
NUT123	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	0
NUT124	Lesão macroscópica	livre de alterações	0	0	0
NUT125	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT127	Lesão macroscópica	Cistite aguda difusa moderada	1	1	0
NUT128	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT129	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	0
NUT130	Sem alteração digna de nota	Cistite crônica multifocal moderada	0	0	0
NUT131	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0

Anexo II

Tabela 23 - Caracterização das amostras de rim e resultados da avaliação histopatológica e de isolamentos.

ID	Rim Afecções macroscópicas	Rim Diagnóstico morfológico	Bactéria Positivo	<i>E. coli</i> Positivo	Fungo Positivo
NUT3	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT6	Sem alteração digna de nota	Pielonefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT7	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT8	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT9	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT12	Lesão macroscópica	Nefrose multifocal	1	1	1
NUT15	Sem alteração digna de nota	Nefrose multifocal	NT	NT	NT
NUT16	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT18	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT25	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT27	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT31	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT32	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT33	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT34	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT35	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT36	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT38	Sem alteração digna de nota	Nefrose multifocal	NT	NT	NT
NUT39	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT42	Sem alteração digna de nota	Nefrose multifocal	NT	NT	NT
NUT43	Sem alteração digna de nota	NT	NT	NT	NT
NUT44	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT45	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	1
NUT46	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT47	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT48	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	1	0	0
NUT49	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	0
NUT50	Lesão macroscópica	Nefrose multifocal	1	1	0
NUT51	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT52	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT53	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	1
NUT54	Lesão macroscópica	Nefrose multifocal	1	1	0
NUT55	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	1
NUT56	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT57	Sem alteração digna de nota	Pielonefrite multifocal moderada	1	0	0
NUT58	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT60	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT61	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT62	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT63	Lesão macroscópica	Nefrite multifocal moderada	1	1	0

Continuação...

ID	Rim	Rim	Bactéria	<i>E. coli</i>	Fungo
	Afecções macroscópicas	Diagnóstico morfológico	Positivo	Positivo	Positivo
NUT64	Sem alteração digna de nota	Nefrose difusa	1	1	1
NUT65	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	1
NUT66	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT67	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	1
NUT69	Sem alteração digna de nota	Nefrose multifocal	NT	NT	NT
NUT70	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	1	0	0
NUT71	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	1	1	0
NUT72	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT73	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	1	1	0
NUT75	Lesão macroscópica	Nefrite multifocal moderada	1	0	0
NUT76	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	1	1
NUT77	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT78	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT79	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	0
NUT80	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	1	0	0
NUT81	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	1	1	0
NUT82	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	1	1	0
NUT83	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT85	Lesão macroscópica	Nefrose multifocal	1	0	0
NUT87	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	0
NUT88	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT89	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	0	0
NUT91	Lesão macroscópica	Nefrose multifocal	1	1	0
NUT93	Lesão macroscópica	Nefrite multifocal moderada	1	1	1
NUT94	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT95	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT96	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	1
NUT97	Sem alteração digna de nota	Nefrose multifocal	NT	NT	NT
NUT99	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT102	Sem alteração digna de nota	NT	NT	NT	NT
NUT103	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT104	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT106	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT108	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	1
NUT109	Lesão macroscópica	Nefrose multifocal	1	1	1
NUT110	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT112	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT114	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	1
NUT115	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	1	1	1
NUT116	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	1
NUT117	Sem alteração digna de nota	Nefrose multifocal	1	1	0

Continuação...

ID	Rim	Rim	Bactéria	<i>E. coli</i>	Fungo
	Afecções macroscópicas	Diagnóstico morfológico	Positivo	Positivo	Positivo
NUT119	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	1
NUT121	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	1	1	0
NUT122	Lesão macroscópica	livre de alterações	1	0	1
NUT123	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT124	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	0
NUT125	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	0	0	0
NUT127	Lesão macroscópica	Nefrose multifocal	1	1	0
NUT128	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT
NUT129	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT130	Sem alteração digna de nota	Nefrite multifocal moderada	NT	NT	NT
NUT131	Sem alteração digna de nota	livre de alterações	NT	NT	NT