



Universidade Estadual de Londrina

ANA CAROLINA PEREIRA

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS CERATITES ULCERATIVAS EM CÃES

LONDRINA
2018

ANA CAROLINA PEREIRA

**ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS CERATITES ULCERATIVAS
EM CÃES**

Produtos apresentados ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, do Departamento de Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza

LONDRINA
2018

ANA CAROLINA PEREIRA

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS CERATITES ULCERATIVAS EM CÃES

Produtos apresentados ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, do Departamento de Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Lucienne Garcia Pretto Giordano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 23 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por todas as conquistas obtidas até hoje, e por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida. Pessoas que me apoiam e me ajudam a crescer, tanto pessoal, como profissionalmente.

Agradeço à minha irmã Adriane e ao meu cunhado Wanderley, pois sem eles não estaria onde estou hoje e não teria tido tantas oportunidades. Todo o apoio, ajuda, confiança e carinho foram fundamentais para a minha formação até hoje.

Agradeço à minha mãe, que mesmo tão longe, a sinto sempre tão perto.

Agradeço à minha irmã Andressa Diniz, que está sempre tão presente e me ajudando de todas as maneiras possíveis, cuidando para que nunca falte nada.

Agradeço à minha sobrinha/irmã Mariana Pereira, por ser minha companheira nos momentos de distração, e por me fazer esquecer pelo menos por alguns instantes imprevistos que aparecem em nossas vidas.

Agradeço ao Thiago Guerreiro, por ser o melhor parceiro que eu poderia ter escolhido, presente em todas as importantes etapas da minha formação, obrigada pelo carinho, apoio, compreensão e incentivo nos momentos mais difíceis.

Agradeço especialmente à minha orientadora Professora Mirian Siliane Batista de Souza, pela orientação durante o Mestrado, e não só durante o Mestrado, mas sim desde a graduação e Residência. Obrigada por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, desde a teoria, até a prática. Além da ajuda e dedicação em tempo integral ao nosso projeto.

Agradeço à Professora Márcia Regina Eches Perugini, por se disponibilizar a fazer as análises no Laboratório, contribuindo muito para tornar esse projeto possível. Além de sempre estar disposta a esclarecer dúvidas e orientar da melhor forma possível. E aos seus estagiários e orientados, que auxiliaram em todo o processo.

Agradeço à Professora Lucienne Garcia Pretto Giordano, que de prontidão aceitou dar continuidade às análises fúngicas, além de contribuir com seu conhecimento e orientação para o desenvolvimento do nosso trabalho. Agradeço também à Eliana Celia Pereira, sempre muito solícita em receber as amostras e realizar as análises, assim como as demais pessoas da equipe do Laboratório.

Agradeço a todos que ajudaram nesse projeto de forma direta e indireta, e possibilitaram sua realização, desde a coleta do material até a finalização dos resultados.

O meu singelo e simples muito obrigado a todos vocês.

PEREIRA, Ana Carolina. **Estudo microbiológico das ceratites ulcerativas em cães**. 2018. 48 fl. Produtos do Curso de Pós-graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Foram apresentados dois produtos finais, separados em capítulos, ao Programa de Pós-graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias. O primeiro capítulo é uma revisão da literatura nas normas da revista “Clínica Veterinária”, intitulado “Aspectos clínicos e microbiológicos da ceratite ulcerativa em cães – revisão da literatura”. O capítulo 2 é um projeto de pesquisa formatado nas normas da revista “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia” (ABMVZ), intitulado “Estudo microbiológico das ceratites ulcerativas em cães”. Entre as doenças oculares em cães, a ceratite ulcerativa ocorre com maior frequência e pode estar associada à agentes bacterianos ou fúngicos. É uma afecção que requer atenção e tratamento imediato, pois a progressão é rápida e pode se tornar uma ameaça à visão do animal. O conhecimento prévio dos agentes envolvidos e da sua sensibilidade aos antimicrobianos são fundamentais para a instituição da terapia adequada de forma rápida, com o intuito de evitar progressão da lesão e o desenvolvimento de complicações. O objetivo desse estudo foi identificar os microrganismos presentes com maior frequência na córnea de cães com ceratite ulcerativa, e sua respectiva sensibilidade aos antimicrobianos mais utilizados na rotina de oftalmologia veterinária, no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, Paraná. Observou-se crescimento bacteriano em 72,3% (20/36) das amostras. Das culturas fúngicas realizadas, em apenas uma houve crescimento de leveduras (1/36). Os resultados evidenciaram que 52,5% dos isolados foram bactérias gram-positivas, e 47,5% bactérias gram-negativas. A espécie predominante foi *Staphylococcus intermedius group* (20%), seguida de *Pseudomonas aeruginosa* (17,5%). No antibiograma, a neomicina foi o antimicrobiano mais eficaz contra o gênero *Staphylococcus*, apresentando eficácia de 87,5%, seguido da gentamicina, com 80% de sensibilidade. As bactérias gram-negativas foram sensíveis principalmente à moxifloxacina, ciprofloxacina, neomicina e gentamicina, variando a sensibilidade de 83,3% a 85,7%. Observou-se alta porcentagem de resistência bacteriana à tetraciclina, tanto no grupo de gram-positivas, como no grupo de gram-negativas, chegando à 60%. Dos 40 isolados bacterianos, seis foram bactérias com perfis de resistência incomum na medicina veterinária, entre elas, quatro *Staphylococcus* spp. MRSP (*Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina), uma *Pseudomonas aeruginosa* CR (resistente aos carbapenêmicos) e uma *Klebsiella pneumoniae* ESBL (produtora de betalactamase de espectro estendido). Esse resultado indica a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade frente aos fármacos antimicrobianos, além do seu uso de forma mais racional.

Palavras-chave: córnea, cultura, oftalmologia veterinária, úlcera.

PEREIRA, Ana Carolina. **Microbiological study of ulcerative keratitis in dogs**. 2018. 48p. Dissertation – Professional Master's Degree in Veterinary Clinics – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Two final products separated in chapters were presented to the Postgraduate Program Professional Master's Degree in Veterinary Clinics. The first chapter is a literature review within the norms of the journal "Clínica Veterinária", entitled "Clinical and microbiological aspects of ulcerative keratitis in dogs – Literature Review". Chapter 2 is a research project formatted within the norms of the "Brazilian Archive of Veterinary Medicine and Zootechnics" (ABMVZ), entitled "Microbiological study of ulcerative keratitis in dogs". Amongst ocular diseases in dogs, ulcerative keratitis tends to occur more frequently and might be associated with bacterial or fungal agents. This condition requires immediate attention and treatment, as the progression is rapid and may impair the vision of the animal. Prior knowledge of the agents most likely to be involved as well as their sensitivity to antimicrobials, are essential for the institution of the appropriate therapy in a prompt way, thus avoiding injury progression and the development of complications. The aim of this study was to identify the microorganisms present in the cornea of dogs with ulcerative keratitis and their sensibility to the most commonly used antimicrobials in the routine of the veterinary ophthalmology at the Veterinary Hospital of the State University of Londrina, in Londrina, Parana. Bacterial growth was observed in 72.3% (20/36) of the samples. Only one of the fungal cultures presented yeast growth (1/36). The results showed that 52.5% of the isolates were gram-positive and 47.5% were gram-negative bacteria. The predominant species was *Staphylococcus intermedius* group (20%), followed by *Pseudomonas aeruginosa* (17.5%). Neomycin was the most effective antimicrobial against the genus *Staphylococcus* in the antibiogram, showing efficacy of 87.5% - followed by gentamicin, with 80% sensitivity. Gram-negative bacteria was mainly susceptible to moxifloxacin, ciprofloxacin, neomycin and gentamicin, varying its sensitivity from 83.3% to 85.7%. A high percentage of bacterial resistance to tetracycline was observed in both gram-positive and gram-negative groups, reaching indexes of 60%. Of the 40 bacterial isolates, six samples profiled unusual resistance in veterinary medicine, four of which being *Staphylococcus* spp. MRSP (methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*), *Pseudomonas aeruginosa* CR (resistant to carbapenems), and a *Klebsiella pneumoniae* ESBL (producer of extended spectrum betalactamase). This result indicates the need to determine the sensitivity profile of antimicrobial drugs, in addition to a more rational use.

Key-words: cornea, culture, veterinary ophthalmology, ulcer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2 – ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS CERATITES ULCERATIVAS EM CÃES

- Figura 1.** A- Imagem fotográfica da fluoresceína em tiras de papel (Drogavet®, Brasil). B e C – Imagens fotográficas da realização do exame de fluoresceína, utilizando o corante em tiras de papel..... 24
- Figura 2.** Imagem fotográfica do exame de fluoresceína positivo em um cão com ceratite ulcerativa..... 24
- Figura 3.** Imagem fotográfica da colheita de amostra de uma úlcera de córnea com *swab*..... 25
- Figura 4.** Imagem fotográfica de um tubo com meio de transporte *ágar Stuart* (Absorve®)..... 25

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS CERATITES ULCERATIVAS EM CÃES

Tabela 1. Frequência de agentes isolados da córnea de cães com ceratite ulcerativa, atendidos pelo Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário de Londrina, no período de outubro de 2017 a abril de 2018..... 27

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias gram-positivas isoladas da córnea de cães com ceratite ulcerativa, atendidos pelo Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário de Londrina, no período de outubro de 2017 a abril de 2018..... 28

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas da córnea de cães com ceratite ulcerativa, atendidos pelo Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário de Londrina, no período de outubro de 2017 a abril de 2018..... 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPÍTULO 1 – ASPECTOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA CERATITE ULCERATIVA EM CÃES – REVISÃO DA LITERATURA

mm mililitro

CAPÍTULO 2 – ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS CERATITES ULCERATIVAS EM CÃES

CAMP Christie, Atkins e Munch-Petersen

CE Ceará

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CR resistente aos carbapenêmicos

EPM meio produzido pela Escola Paulista de Medicina

ESBL betalactamase de espectro estendido

MILI motilidade, indol e lisina

MRSP *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina

SP São Paulo

TSC *Tryptic Soy Broth*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – ASPECTOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA CERATITE ULCERATIVA EM CÃES – REVISÃO DA LITERATURA.....	10
RESUMO.....	11
INTRODUÇÃO	12
ANATOMIA DA CÓRNEA	12
FISIOPATOGENIA DA CERATITE ULCERATIVA	13
MICROBIOTA RESIDENTE X PATOGÊNICA	14
TERAPIA ANTIMICROBIANA	14
MICROORGANISMOS ENVOLVIDOS NAS CERATITES ULCERATIVAS	16
CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO 2 – ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS CERATITES ULCERATIVAS EM CÃES	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	38
ANEXO A – Aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	39
ANEXO B – Instruções para submissão de artigos – Revista Clínica Veterinária.....	41
ANEXO C – Instruções para submissão de artigos- Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	43

CAPÍTULO 1

ASPECTOS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DA CERATITE ULCERATIVA EM CÃES – REVISÃO DA LITERATURA

Aspectos clínicos e microbiológicos da ceratite ulcerativa em cães – revisão da literatura

Ana Carolina Pereira¹, Mirian Siliane Batista de Souza²

¹Aluna do Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina.

E-mail: anacarolina-p@hotmail.com

²Docente do Departamento de Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina

A ceratite ulcerativa é a doença ocular que ocorre com maior frequência em cães. O uso de antibacterianos tópicos é a base do tratamento, com intuito de prevenir e tratar as infecções frequentemente associadas à essa condição. A realização de cultura e antibiograma das úlceras de córnea colaboram com o direcionamento da terapia antimicrobiana. No entanto, devido ao fato de ser uma afecção que requer tratamento imediato, deve-se iniciar a terapia com antimicrobianos de amplo espectro de ação de forma empírica antes dos resultados desses exames. O conhecimento prévio dos microrganismos mais provavelmente envolvidos nas infecções e da sua sensibilidade aos antimicrobianos são fundamentais para a instituição de um tratamento apropriado, para que se evitem demais complicações.

Unitermos: oftalmologia veterinária, córnea, úlcera, cultura bacteriana.

Clinical and microbiological aspects of ulcerative keratitis in dogs - literature review

Ulcerative keratitis is the ocular disease that occurs most frequently in dogs. The use of topical antibacterials is the basis of the treatment, in order to prevent and treat infections most commonly associated with this condition. The performance of culture and antibiogram of corneal ulcers collaborate with the direction of antimicrobial therapy. However, due to the fact that it is an illness that requires immediate treatment, therapy with antimicrobial of broad spectrum of action of empirical form must be initiated before exam results. Prior knowledge of the microorganisms most likely to be involved in infections and their sensitivity to antimicrobials are keen to establishing appropriate treatment, thus avoiding further complications.

Uniterms: veterinary ophthalmology, cornea, ulcer, bacterial culture.

Aspectos clínicos y microbiológicos de la ceratitis ulcerativa en perros - revisión de la literatura

La ceratitis ulcerativa es la enfermedad ocular que ocurre con mayor frecuencia en perros. El uso de antibacterianos tópicos es la base del tratamiento, con la intención de prevenir y tratar las infecciones, frecuentemente asociadas. La realización de cultivo y antibiograma de las úlceras de córnea, colaboran en dirigir la terapia antimicrobiana, pero debido al hecho de ser una afeción que requiere tratamiento inmediato, se debe iniciar la terapia con antimicrobianos de amplio espectro de acción de forma empírica, resultados. El conocimiento previo de los microorganismos más probablemente implicados en las infecciones, su sensibilidad a los antimicrobianos, y los antimicrobianos más eficaces, son fundamentales para la instauración de un tratamiento apropiado, y así evitar complicaciones.

Unitermos: oftalmología veterinaria, córnea, úlcera, cultivo bacteriano.

Introdução

Entre as doenças oculares, a ceratite ulcerativa está presente de forma rotineira na clínica veterinária. Devido às diversas causas que podem desencadear essa afecção, é considerada a doença ocular mais comum em cães^{1,2}. Muitas vezes está associada a agentes bacterianos e mais raramente a fungos. A perda do epitélio da córnea que acontece nessa afecção, favorece a invasão corneal por microrganismos patogênicos, e, portanto, é uma condição que necessita que o tratamento seja instituído de forma rápida e eficaz^{3,4}.

O tratamento, visa prevenir ou eliminar as infecções já instaladas, e assim, impedir a progressão da destruição de camadas da córnea ainda não comprometidas, além de controlar a dor associada e fornecer o suporte necessário para que a cicatrização ocorra¹. O tratamento, com uso de antimicrobianos deve ser iniciado assim que diagnosticada a doença, pois se ela se tornar infectada, seu processo de cicatrização será retardado, impedindo que aconteça de forma adequada, o que ocasionará a piora do quadro clínico⁵.

A realização tanto de cultura bacteriana, como de cultura fúngica, e o antibiograma, contribuem para determinar os agentes envolvidos e os antimicrobianos mais eficazes para cada caso. É importante o conhecimento prévio dos organismos mais frequentemente associados a essa afecção, e sua sensibilidade aos antimicrobianos, para a instituição do tratamento correto, com o intuito de evitar progressão da lesão e o desenvolvimento de complicações⁶.

Anatomia da córnea

A córnea é a parte anterior da túnica fibrosa do globo ocular, e está localizada em seu eixo central. Sua espessura pode variar entre 0,45 a 0,65 mm, e é dividida em cinco camadas: o filme lacrimal, o epitélio corneal, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio⁷.

O filme lacrimal não é uma camada histologicamente visível, mas participa da proteção e nutrição da córnea, portanto considerada funcionalmente a camada mais externa⁷. O epitélio é estratificado, pavimentoso, não queratinizado, formado por diversas células em camadas, aderidas a uma membrana basal. O estroma é composto por fibrócitos, ceratócitos, colágeno e substância fundamental, correspondendo a 90% da espessura total da córnea⁸. A membrana de Descemet é a membrana basal do endotélio, trata-se de uma estrutura fina e elástica. O endotélio tem a espessura de uma célula e se localiza posteriormente à membrana de Descemet⁴.

A córnea é totalmente transparente e avascular, trata-se de um tecido innervado por fibras nervosas sensoriais e autonômicas, sendo o tecido mais sensível do organismo⁹. Ela se mantém transparente por não ter pigmentos, e não possuir vasos sanguíneos ou linfáticos. Além do fato das fibras colágenas do estroma serem altamente organizadas, e do epitélio ser não queratinizado¹⁰.

Há ainda, um mecanismo necessário à manutenção da sua transparência, que é responsável por manter o seu estado de desidratação, chamado de estado de deturgescência. Esse mecanismo ocorre pela ação de bombas de Na⁺/K⁺, presentes tanto no endotélio, como no epitélio, por meio do bombeamento contínuo de líquidos intersticiais para remoção do excesso de fluido¹⁰.

É nutrida pelos vasos do limbo e pelo fluido da câmara anterior¹¹. O limbo é a zona de transição entre a córnea e a esclera, ele tem ação importante nos processos inflamatórios, por meio dele, células inflamatórias e vasos sanguíneos penetram na córnea, para estimular a formação de um novo epitélio corneal nas ceratites ulcerativas¹².

Fisiopatogenia da ceratite ulcerativa

A ceratite ulcerativa, também conhecida por úlcera de córnea, consiste na inflamação da córnea associada à perda do epitélio corneal, e pode ou não, estar associada à perda de quantidades variáveis do estroma subjacente. Pode ser classificada em superficial, profunda e descemetocel¹³. Os sinais clínicos incluem dor, fotofobia, blefaroespasma, epífora, secreção ocular, hiperemia conjuntival, edema e neovascularização em córnea, e uveíte secundária^{4,14}.

Nas ceratites ulcerativas superficiais há casos em que apenas o epitélio corneal é lesionado, e há casos em que há também perda do estroma anterior. Úlceras profundas, envolvem mais da metade da espessura da córnea, e podem decorrer de traumas, ou de intercorrências durante o processo de cicatrização de úlceras superficiais. Descemetocel são lesões profundas, que acometem o epitélio e o estroma, levando à exposição da membrana de Descemet¹⁵.

As causas podem ser diversas, como trauma (abrasão, corpos estranhos), exposição química, infecção (bacteriana, fúngica, viral), anormalidades ciliares (distiquíase, triquíase, cílios ectópicos), palpebrais (entrópio), e do filme lacrimal (alterações qualitativas e quantitativas)^{10,15}.

Após uma lesão na córnea, durante as primeiras 24 horas ocorre migração celular para a área lesionada, seguida de mitose celular, que se inicia três a quatro dias após a lesão, com o objetivo de reposição das células epiteliais⁴. Após três a seis dias, desenvolve-se vascularização, com a função de levar aporte sanguíneo e células de defesa até a lesão¹⁶.

O endotélio é responsável por nutrir todas as camadas e por remover seus detritos, além de fornecer novas células para membrana de Descemet, pois é a única camada que não tem capacidade de regeneração espontânea quando lesionada¹⁴.

Na ceratite ulcerativa, as fibras colágenas do estroma, as quais possuem um espaçamento regular entre elas que mantém a transparência corneal, sofrem um desarranjo e perdem sua organização, levando a opacificação da córnea. Isso ocorre devido a presença de edema corneal, que se caracteriza pelo excesso de líquido internamente ao estroma, o que por sua vez, leva à separação e desorganização das fibras de colágeno¹⁰.

O edema de córnea acontece por falha na ação das bombas de Na⁺/K⁺, e resulta na perda da transparência da córnea, por uma coloração cinza-azulada e aumento da sua espessura¹⁷.

Afecções da córnea associadas a agentes bacterianos são frequentes em cães e menos frequente em gatos⁴. A defesa da córnea contra invasões bacterianas é formada pela integridade das suas barreiras anatômicas, juntamente com o sistema imune. O epitélio da córnea é uma das primeiras barreiras que impedem a entrada de microrganismos, portanto a ruptura dessa camada, como ocorre na ceratite ulcerativa, pode favorecer a invasão bacteriana¹⁴.

Se a invasão bacteriana ocorrer, e não for controlada de forma rápida, processos inflamatórios crônicos irão desencadear uma cascata de liberação enzimática. Esta, por sua vez, poderá degradar o colágeno estromal, resultando em degradação do tecido sadio, e levando a uma aparência gelatinosa do estroma, chamado de “*melting*” ou ceratomalácia, podendo progredir para perfuração ocular^{18,19}. Essas enzimas degradativas são proteases e collagenases, produzidas pelas próprias células do organismo, com a função de remoção de células desvitalizadas e detritos da córnea, mas podem também ser produzidas por alguns microrganismos, como bactérias do gênero *Pseudomonas*, que produzem diversas enzimas que facilitam a sua penetração, multiplicação e manutenção na córnea²⁰.

A resposta inflamatória induzida pela ceratite, desencadeia mecanismos que levam à uveíte reflexa. Isso ocorre devido à quebra de barreiras hematóculares, com aumento da permeabilidade vascular da úvea, e participação de mediadores químicos da inflamação, que por sua vez são responsáveis por sinais como miose, dor, hiperemia conjuntival e redução da pressão intraocular¹⁵.

Microbiota residente x patogênica

Devido ao fato da superfície ocular ser rica em nutrientes, diversos microrganismos são encontrados nela, os quais formam a microbiota ocular²¹. Esses microrganismos podem se tornar patogênicos à partir do momento em que há lesão na córnea²². A microbiota ocular normal de cães vem sendo estudada há alguns anos, e os estudos indicam que os microrganismos isolados e as taxas de prevalência variam de acordo com a localização geográfica, clima, técnica de coleta de material, tratamentos prévios e tipo de afecção^{3,23,24}.

Acredita-se que seja a fonte de bactérias que causam infecção, na maior parte das ceratites ulcerativas. Mas para a infecção ser estabelecida, há influência do sistema imunológico, da virulência da bactéria envolvida e da presença de agentes oportunistas^{6,24}.

A microbiota do saco conjuntival pode ser dividida em organismos residentes e patógenos oportunistas. Os residentes consistem em organismos não invasivos, considerados habitantes normais da conjuntiva e da córnea caninas, eles geralmente são isolados de amostras da superfície ocular em grande número. Estes, inibem o crescimento de agentes patogênicos pela competição nutricional, pelo espaço ocupado, e, pela secreção de substâncias ativas que inibem a microbiota transitória. São importantes para proteção ocular contra a infecção, e quando inibidos por alguma doença ou pela aplicação prolongada de antibióticos e/ ou corticosteroides, os patógenos oportunistas podem se expandir e desenvolver infecções^{3,25}.

Fungos também são componentes da microbiota ocular de pequenos animais em situações normais, e apesar de serem isolados com menor frequência que bactérias, a invasão do estroma corneal por fungos comensais, ou a introdução desses através de um corpo estranho vegetal, também podem ocorrer⁷.

Ao coletar amostras para cultura a partir da superfície ocular, para isolamento dos microrganismos envolvidos, deve-se estar ciente de que o modo de coleta, armazenamento e transporte de amostras são essenciais para o diagnóstico correto. Também deve-se levar em consideração que o uso de corantes na forma de colírios para diagnóstico das úlceras de córnea antes da coleta de amostras, pode inibir o crescimento de microrganismos, devido à presença de conservantes como veículo²⁶. Além disso, meio de transporte incorreto ou tempo prolongado antes da inoculação no meio de cultura, podem levar à falha do diagnóstico²⁷.

Terapia antimicrobiana

A ceratite ulcerativa após infectada tem seu processo de cicatrização retardado, o que pode levar ao desencadeamento de complicações, como endoftalmite, glaucoma, perfuração da córnea e perda da visão^{5,8}. Essa evolução ocorre devido ao envolvimento bacteriano, pois há liberação de enzimas proteolíticas e toxinas. Portanto, a terapia antimicrobiana tópica deve ser iniciada assim que o diagnóstico for estabelecido, visando a prevenção e/ ou eliminação das infecções bacterianas^{14,24}.

No entanto, em alguns casos, a presença de cepas resistentes aos antimicrobianos disponíveis torna o tratamento difícil, passando ser uma ameaça à visão²⁸. O surgimento de microrganismos com resistência cada vez maior aos antimicrobianos deve-se ao fato de muitos casos serem tratados de maneira errônea, na maioria das vezes com a droga e

a frequência de administração inadequados, o que resulta em um crescimento excessivo de bactérias patogênicas, leveduras e fungos¹.

A realização de cultura e antibiograma é indicada, e irá auxiliar na determinação da terapia a ser mantida ou instituída, principalmente nos casos complicados e quando a cicatrização não ocorrer como esperada. Pelo fato de o tratamento ser iniciado antes dos resultados dos exames, o conhecimento dos organismos mais comumente isolados e a eficiência dos antibacterianos é fundamental para a instituição do tratamento mais adequado de forma empírica e precoce⁶.

A citologia da córnea pode ser realizada utilizando a coloração de Gram, o que pode colaborar de maneira rápida para determinar a presença de bactérias gram-positivas, gram-negativas, ou fungos, e, conseqüentemente, direcionar a terapia antimicrobiana inicial¹³. Para tal exame, deve-se coletar material da porção da córnea afetada utilizando-se uma espátula de Kimura estéril, a parte oposta à região de corte de uma lâmina de bisturi ou um *swab* estéril, após instilação prévia de colírio anestésico¹⁸.

O diagnóstico precoce e o tratamento apropriado são fundamentais para uma recuperação bem-sucedida¹. A terapia medicamentosa pode, algumas vezes, ser combinada com o tratamento cirúrgico, o que é indicado em úlceras profundas, ou nos casos em que o tratamento médico não está atingindo o efeito desejado, levando ao aumento da extensão e/ ou profundidade da úlcera^{29,30}.

Os fatores a serem considerados para associação do tratamento cirúrgico são profundidade da ulceração, progressão da lesão, presença de infecção ou ceratomalácia, doenças concomitantes (anormalidades ciliares, palpebrais ou do filme lacrimal, doenças sistêmicas) e estado geral de saúde do paciente³⁹.

O tratamento cirúrgico tem como objetivo fornecer suporte e proteção para que a cicatrização ocorra, entre eles podem ser citados tarsorrafia, recobrimento de terceira pálpebra, ceratotomia, ceratectomia, recobrimentos conjuntivais, enxertos de conjuntiva pediculados, implantes de membranas biológicas, transplante de córnea. Sempre associados com terapia tópica e uso de colar elisabetano, devido ao desconforto gerado pela afecção, evitando autotraumatismos^{4,5,15,16}.

A frequência de aplicação dos colírios antimicrobianos varia de acordo com o tipo e estágio da úlcera. Quadros com progressão rápida ou "*melting*", devem receber aplicações a cada hora. Úlceras profundas requerem aplicações a cada três a quatro horas, enquanto que para lesões superficiais, instilações a cada seis horas são suficientes, com o objetivo de prevenir infecções³⁹. No caso de infecções já instaladas, a frequência deve aumentar conforme o grau de contaminação^{18,19}.

Antibacterianos sistêmicos são indicados na presença de perfuração de todas as camadas da córnea, quando há suspeita de endoftalmite, e ainda, quando não for possível manter a frequência indicada do tratamento tópico³⁹. A via subconjuntival, tem indicação nas infecções graves, ou quando a terapia local não pode ser adequadamente utilizada¹⁵.

As classes de antimicrobianos mais utilizadas e disponíveis na forma de colírios são aminoglicosídeos e quinolonas. Há também os disponíveis na forma de pomadas oftálmicas, como polimixina B, bacitracina, cloranfenicol e tetraciclina¹⁹. Há ainda, a opção de manipulação na forma de solução oftálmica, entre eles amicacina, neomicina, norfloxacina e azitromicina.

O cloranfenicol possui amplo espectro de atuação, é bacteriostático, mas apresenta atividade reduzida contra *Pseudomonas* spp.¹⁹. Entre os aminoglicosídeos, a tobramicina é o mais utilizado, tem o espectro de ação direcionado principalmente para as bactérias gram-negativas. Do grupo das quinolonas, a ciprofloxacina, ofloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina possuem amplo espectro de ação, sendo eficazes também contra

Pseudomonas spp. Eles também são indicados em lesões que acometem camadas mais profundas da córnea, com risco de perfuração e presença de “melting”¹⁹.

Além da terapia antimicrobiana, ciclopégicos, como atropina e tropicamida, são indicados para alívio do espasmo ciliar, aliviando a dor decorrente da contração da musculatura ciliar na uveíte reflexa¹⁵.

O uso de inibidores de colagenases e proteases são recomendados, principalmente na presença de ceratomalácia, objetivando reduzir a progressão da ulceração estromal, acelerar a reparação epitelial e reduzir a cicatriz formada. As substâncias mais utilizadas são N-acetilcisteína, soro sanguíneo, EDTA e tetraciclina¹².

Entre os fármacos indicados para tratamento das ceratites micóticas, estão natamicina, miconazole, nistatina, anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e flucitosina. Os antifúngicos de uso sistêmico têm sido adaptados para uso ocular. Inicialmente, a frequência de instilação deve ser a cada uma hora, espaçando-se as aplicações posteriormente. Requerem tratamento prolongado, principalmente devido ao fato de os agentes antifúngicos serem fungistáticos, com duração de 21 dias, ou até resolução do quadro. Devem ser associados a antibioticoterapia de amplo espectro^{15,40}.

Microrganismos envolvidos nas ceratites ulcerativas

Alguns estudos realizados tanto no Brasil, como em outros países, com o objetivo de avaliar a presença de microrganismos presentes nos olhos de cães com ceratite ulcerativa, apresentaram resultados semelhantes e demonstraram que na grande maioria das culturas realizadas há crescimento bacteriano, variando de 70% a 100%^{33,34,36}.

As bactérias isoladas do saco conjuntival de animais hígidos podem ser as mesmas isoladas de ulcerações corneais, sendo principalmente dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Proteus*³. Outros estudos mostraram que a microbiota predominante no saco conjuntival de olhos saudáveis pode ser do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*^{3,31,32}.

As bactérias gram-positivas predominam, estando presentes em 78% a 93,1% dos casos. Dentre as bactérias isoladas, as do gênero *Staphylococcus* aparecem em primeiro lugar, seguido dos grupos *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas*^{32,33,34}. Esses resultados diferem apenas de um trabalho realizado em Valinhos, no qual as bactérias gram-negativas foram encontradas em maior quantidade, em 48% das amostras, enquanto que 42% eram gram-positivas. *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada em quase 33% das amostras do grupo gram-negativas, o que chama bastante atenção, devido a sua patogenicidade⁴¹.

Em cães e gatos é incomum a associação de fungos em lesões na córnea, podendo ser vista com maior frequência em humanos e cavalos². São considerados patógenos oportunistas, principalmente quando há um defeito no epitélio corneal, possibilitando sua invasão na córnea. A forma mais comum de entrada é por meio de traumas, particularmente, na presença de matéria orgânica, vegetal ou terra. O uso prolongado de antimicrobianos e/ou corticosteróides também é um fator predisponente, devido à diminuição dos mecanismos de defesa do hospedeiro e da microbiota residente, considerada uma proteção contra microrganismos patogênicos^{35,36}.

Fungos fazem parte da microbiota conjuntival de pequenos animais, mas são menos frequentemente isolados. Em um estudo realizado em 2007, os autores mostraram que 22% das culturas fúngicas foram positivas em cães, e 40% em gatos⁷. Outros autores encontraram taxas mais baixas, 10% em cães, e 26% em gatos³.

Fusarium e *Aspergillus* são os fungos isolados com maior frequência em ceratites micóticas, as quais podem ser ulcerativas ou não ulcerativas³⁷. *Candida albicans*, *Aspergillus* e *Alternaria* também foram citados como fungos mais comumente isolados⁵.

Outros, previamente relatados em cães com ceratite micótica, foram *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Curvularia*, *Hormoglyphiella*, *Pseudallescheria* e *Scedosporium*^{3, 38}.

Alguns autores relatam que os microrganismos da superfície ocular também podem sofrer influência com a idade do animal, de acordo com a raça, e se vive em ambiente externo ou interno²³.

Considerações finais

A seleção dos antimicrobianos no tratamento de ceratite ulcerativa deve ser baseada na identificação dos microrganismos envolvidos e sua sensibilidade antimicrobiana. No entanto, na maioria das vezes, essas informações não podem ser obtidas devido ao fato do tratamento ter que ser instituído de imediato. Portanto, o estudo dos prováveis agentes, sua sensibilidade, e antimicrobianos mais eficazes, se faz de grande importância.

Referências

- 1 – OLLIVIER, F.J. Bacterial corneal diseases in dogs and cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, n.3, p.193-198, 2003.
- 2 - GILGER, B.C. Diseases and surgery of the canine cornea. In: GELLAT K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p.690-752.
- 3 - GERDING, P.A.; KAKOMA, I. Microbiology of the canine and feline eye. **Veterinary Clinics of North America (Small Animal Practice)**, v.20, p.615-625, 1990.
- 4 - SLATTER, D. H. **Fundamento de Oftalmologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005.
- 5 - GELATT, K.N. **Essentials of veterinary ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- 6 - GERDING, P.A.; MCLAUGHLIN, S.A.; TROOP, M.W. Cytology of normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, p.242-244, 1988.
- 7- SAMUELSON, D.A. Ophthalmic anatomy. In: **Veterinary Ophthalmology**. Eds. Gelatt, K.K. Gainesville, FL: Blackwell, 2007.
- 8- NELSON, D.L.; MacMILLAN, A.D. Doenças da córnea. In: KIRK, R.W. **Atualização terapêutica veterinária**. São Paulo, Ed. Manole, 1988. p.808-817.
- 9 - DASTJERDI, M.H.; DANA, R. Corneal nerve alterations in dry eye-associated ocular surface disease. **International Ophthalmology Clinics**, v. 49, n. 1, p. 11-20, 2009.
- 10 - GALERA, P.D.; LAUS, J.L.; ORIÁ, A. P. Afecções da túnica fibrosa. In: LAUS, J.L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009. p. 69-93.
- 11 - JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 488.
- 12 - BROOKS, D.E. **Oftalmologia para veterinários de equinos**. São Paulo: Roca, 2005. p. 144.

- 13 - BENTLEY, E. Ceratite ulcerative. In: MILLER, P. E.; TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos: Manual de especialidades caninas e felinas – Oftalmologia**. 1.ed. Barueri, SP: Manole, 2009. p. 55-64.
- 14 - WHITLEY, R.D. Canine and feline primary ocular bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America (Small Animal Practice)**, v.30, p.1151-1167, 2000.
- 15 - LAUS, J.L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2009.
- 16- SEVERIN, G.A. **Manual de oftalmologia veterinária**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1991.
- 17 - TURNER, S.M. **Oftalmologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.370.
- 18 - NASISSE, M.P. Canine ulcerative keratitis. **Compendium Continuing Education**, v.7, n.9, p.686-701, 1985.
- 19 - KERN, T.J. Ulcerative keratitis. **Veterinary Clinics of North America (Small Animal Practice)**, v.20, p.643-666, 1990.
- 20 - SAMPAIO, G.R. **Oftalmologia: doenças corneanas em pequenos animais**. Lavras: UFLA/ FAEPE, p.136. 2007.
- 21- ARMSTRONG, R. A. The microbiology of the eye. **Ophthalmic Physiological Optics**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 429-441, 2000.
- 22- PELCZAR, M.J., JR, CHAN E.C.S.; RIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos E Aplicações**. Makron Books, São Paulo, 1996.
- 23- WHITLEY, R.D.; GILGER, B.C. Diseases of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p.635-671.
- 24 - MOORE, C.P.; NASISSE, M.P. Clinical microbiology. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 259-290.
- 25 - GASKIN, J.M. Microbiology of the canine feline eye. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 10, p. 303–316, 1980.
- 26 - WARD, D.A. **Veterinary Ophthalmology**. 3ed. Philadelphia. PA. Lippincott Williams & Wilkins. p.336-354, 1999.
- 27 - MASSA, K.L.; MURPHY, C.J.; HARTMANN, F.A.; MILLER, P.E.; KORSOWER, C.S.; YOUNG, K.M. Usefulness of aerobic microbial culture and cytologic evaluation of corneal specimens in the diagnosis of infectious Ulcerative keratitis in animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215, p.1671-1674, 1999.
- 28 - WADA, S.; Hobo, S.; Niwa, H. Ulcerative keratitis in throughbred racehorses in Japan from 1997 to 2008. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, p.99-105, 2010.

- 29 - WILKIE, D.A.; WHITTAKER, C. Surgery of the cornea. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 27, p.1067-1107, 1997.
- 30 - ASGHARI, A.; GHARACHORLOU, A. Assessing the Role of Proper Administration of Antibiotics in the Treatment of Corneal Ulcers in Dog. **Advances in Environmental Biology**, v.5, n.8, p.2084-2086, 2011.
- 31 - ANDRADE, A. L.; STRINGHINI, G.; BONELLO, F.L.; MARINHO, M.; PERRI, S. H. V. Microbiota conjuntival de cães sadios da cidade de Araçatuba (SP). **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.65, p. 323-326, 2002.
- 32- PRADO, M. R.; BRITO, E. H. S.; GIRÃO, M.D.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from corneal ulcers of dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1024-1029, 2006.
- 33- LIN, C.T.; PETERSEN-JONES, S.M. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from corneal ulcers of dogs in Taiwan. **Journal of Small Animal Practice**, v.48, p. 271-271, 2007.
- 34 - WANG, L.; PAN, Q.; ZHANG, L.; XUE, Q.; CUI, J.; QI, C. Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. **Veterinary Ophthalmology**, v.11, p.145–149, 2008.
- 35 - GAARDER, J.E.; REBHUN, W.C.; BALL, M.A. *et al.* Clinical appearances, healing patterns, risk factors, and outcomes of horses with fungal keratitis: 53 cases (1978–1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.213, p.105–112, 1998.
- 36 - ZACARIAS JUNIOR, A.; FREITAS, J.C.; ZACARIAS, F.G.S. *et al.* Investigação da microbiota bacteriana e associações de risco em cães com afecções oculares externas atendidos em Bandeirantes, Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.33, suplemento 2, p.3243-3250, 2012.
- 37 - JOHNS, K.J.; O'DAY, D.M. Pharmacologic management of keratomycoses. **Survey Ophthalmology**, v.33, n.3, p.178–188, 1988.
- 38 - RAMPAZZO, A.; KUHNERT, P.; HOWARD, J. *et al.* *Hormoglyphiella aspergillata* keratomycosis in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v.12, p.43–47, 2009.
- 39- HARTLEY, C. Treatment of Corneal Ulcers: What are the Medical Options? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, p.384, 2010.
- 40 – OLIVEIRA, P.R.; RESENDE, S.M.; OLIVEIRA, F.C.; OLIVEIRA, A.C. Ceratite fúngica. **Arquivo brasileiro de oftalmologia**, v.64, p.75-79, 2001.
- 41 - MORALES, A.; VALINHOS, M.A.R.; SALVADEGO, M.; LEVY, C.E. Microbiological and clinical aspects of corneal ulcers in dogs – 530. In proceedings of **34th World Small Animal. Veterinary Congress**, 2009 - São Paulo, Brazil.

CAPÍTULO 2

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DA CERATITE ULCERATIVA EM CÃES

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DAS CERATITES ULCERATIVAS EM CÃES

MICROBIOLOGICAL STUDY OF ULCERATIVE KERATITIS IN DOGS

A.C. Pereira^{1*}, G.L. Bernardes², M.R.E. Perugini³, L.G.P. Giordano⁴, M.S.B. Souza⁵

¹ Aluna de pós-graduação Universidade Estadual de Londrina – anacarolina-p@hotmail.com

² Aluna de pós-graduação Universidade Estadual de Londrina

³ Professora Doutora Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas - Universidade Estadual de Londrina

⁴ Professora Doutora do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Universidade Estadual de Londrina

⁵ Professora Doutora Departamento de Clínicas Veterinárias - Universidade Estadual de Londrina

RESUMO

Entre as doenças oculares em cães, a ceratite ulcerativa ocorre com maior frequência. Pode estar associada a agentes bacterianos ou fúngicos, e trata-se de uma afecção que requer atenção e tratamento imediato, pois a progressão é rápida e pode se tornar uma ameaça à visão. O conhecimento prévio dos agentes mais provavelmente envolvidos e da sua sensibilidade aos antimicrobianos, são fundamentais para a instituição da terapia adequada de forma rápida, com o intuito de evitar progressão da lesão e o desenvolvimento de complicações. O objetivo desse estudo foi identificar os microrganismos presentes com maior frequência na córnea de cães com ceratite ulcerativa, e sua respectiva sensibilidade aos antimicrobianos mais utilizados na rotina de oftalmologia veterinária, no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, Paraná. O estudo foi realizado no período de outubro de 2017 a abril de 2018, e foram incluídos 32 cães com ceratite ulcerativa, dos quais foram adquiridas 36 amostras da córnea utilizando *swab*, para isolamento bacteriano e fúngico, e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana. Observou-se crescimento bacteriano em 72,3% das amostras. Das culturas fúngicas realizadas, em apenas uma houve crescimento de leveduras. Os resultados evidenciaram que 52,5% dos isolados foram bactérias gram-positivas, e 47,5% bactérias gram-negativas. A espécie predominante foi *Staphylococcus intermedius group* (20%), seguida de *Pseudomonas aeruginosa* (17,5%). No antibiograma, a neomicina foi o antimicrobiano mais eficaz contra o gênero *Staphylococcus*, apresentando eficácia de 87,5%, seguido da gentamicina, com 80% de sensibilidade. As bactérias gram-negativas foram sensíveis principalmente à moxifloxacina, ciprofloxacina, neomicina e gentamicina, variando a sensibilidade de 83,3% a 85,7%. Observou-se alta porcentagem de resistência bacteriana à tetraciclina, tanto no grupo de gram-positivas, como no grupo de gram-negativas, chegando à 60%. Dos 40 isolados bacterianos, seis foram bactérias com perfis de resistência incomum na medicina veterinária, destas, quatro *Staphylococcus spp. MRSP* (*Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina), uma *Pseudomonas aeruginosa CR* (resistente aos carbapenêmicos) e uma *Klebsiella pneumoniae* ESBL (produtora de betalactamase de espectro estendido). Esse resultado, indica a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias isoladas dos olhos de cães com ceratite ulcerativa, frente aos fármacos antimicrobianos, além do seu uso mais racional. Neomicina e gentamicina foram os antimicrobianos que apresentaram melhor ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas simultaneamente.

Palavras-chave: córnea, cultura, oftalmologia veterinária, úlcera.

ABSTRACT

Amongst ocular diseases in dogs, ulcerative keratitis tends to occur more frequently and might be associated with bacterial or fungal agents. This condition requires immediate attention and treatment, as the progression is rapid and may impair the vision of the animal. Prior knowledge of the agents most likely to be involved as well as their sensitivity to antimicrobials, are essential for the institution of the appropriate therapy in a prompt way, thus avoiding injury progression and the development of complications. The aim of this study was to identify the microorganisms present in the cornea of dogs with ulcerative keratitis and their sensibility to the most commonly used antimicrobial in the routine of the veterinary ophthalmology at the Veterinary Hospital of the State University of Londrina, in Londrina, Parana. Thirty-two dogs with ulcerative keratitis were included in the study, from which 36 corneal samples were obtained using swab for bacterial and fungal isolation and antimicrobial susceptibility assessment. Bacterial growth was observed in 72.3% of the samples. Only one of the fungal cultures presented yeast growth. The results showed that 52.5% of the isolates were gram-positive and 47.5% were gram-negative bacteria. The predominant species was *Staphylococcus intermedius* group (20%), followed by *Pseudomonas aeruginosa* (17.5%). Neomycin was the most effective antimicrobial against the genus *Staphylococcus* in the antibiogram, showing efficacy of 87.5%- followed by gentamicin, with 80% sensitivity. Gram-negative bacteria was mainly susceptible to moxifloxacin, ciprofloxacin, neomycin and gentamicin, varying its sensitivity from 83.3% to 85.7%. A high percentage of bacterial resistance to tetracycline was observed in both gram-positive and gram-negative groups, reaching indexes of 60%. Of the 40 bacterial isolates, six samples profiled unusual resistance in veterinary medicine, four of which being *Staphylococcus* spp. MRSP (methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*), a *Pseudomonas aeruginosa* CR (resistant to carbapenems), and a *Klebsiella pneumoniae* ESBL (producer of extended spectrum betalactamase). This result indicates the need to determine the sensitivity profile of antimicrobial drugs, in addition to a more rational use. Neomycin and gentamicin were the antimicrobials that showed the best action against gram-positive and gram-negative bacteria, simultaneously.

Key-words: cornea, culture, veterinary ophthalmology, ulcer.

INTRODUÇÃO

A ceratite ulcerativa é considerada a doença ocular mais comum em cães, estando muito presente na rotina clínica, devido às diversas causas que podem desencadear essa afecção (Ollivier, 2003; Gilger, 2007). Pode estar associada a agentes bacterianos e mais raramente fúngicos, pois a perda do epitélio da córnea, que acontece na ceratite ulcerativa, favorece a invasão corneal por microrganismos patogênicos

A terapia, de forma geral, visa prevenir ou eliminar infecções já instaladas, e assim, impedir a progressão da destruição das camadas da córnea ainda não comprometidas, evitar as possíveis complicações, além de controlar a dor associada e fornecer o suporte necessário para que a cicatrização ocorra (Ollivier, 2003). O tratamento com uso de antimicrobianos deve ser iniciado assim que diagnosticada a úlcera pois, se ela se tornar infectada, seu processo de cicatrização é retardado, impedindo que aconteça de forma adequada, o que ocasiona a piora do quadro clínico (Gelatt, 2000). Portanto, a úlcera de córnea é uma condição em que se necessita instituir o tratamento de forma rápida e eficaz (Gerding e Kakoma, 1990; Slatter, 2005).

A realização tanto de cultura bacteriana, como de cultura fúngica, e o antibiograma contribuem para determinar os agentes envolvidos, bem como colaboram na escolha dos antimicrobianos mais eficazes para cada caso. Mas devido ao fato das úlceras de córnea poderem ter progressão rápida e se tornarem graves, passando a ser potenciais ameaças à visão, a terapia com antimicrobianos deve ser iniciada antes dos resultados desses exames. Portanto, é essencial o conhecimento prévio de tais informações, para direcionar a terapia a ser instituída (Gerding *et al.*, 1988).

Considerando a importância do tratamento adequado da ceratite ulcerativa, o presente estudo teve por objetivo identificar os microrganismos presentes com maior frequência na córnea de cães com essa afecção e determinar a sensibilidade aos antimicrobianos mais utilizados na rotina de oftalmologia veterinária no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina .

MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina, protocolo 321.2017.90, em 11 de abril de 2017.

Foram incluídos neste estudo 32 cães atendidos pelo serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, e diagnosticados

com ceratite ulcerativa, no período de outubro de 2017 a abril de 2018. Trinta e seis amostras foram obtidas, 28 de cães com úlcera de córnea unilateral, e quatro de cães com úlcera de córnea bilateral, as quais foram utilizadas para a realização de exame microbiológico, além do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

O diagnóstico foi realizado utilizando-se o corante fluoresceína em tiras de papel impregnadas com o mesmo (Drogavet®, Brasil) (Fig.1). Foi considerada úlcera de córnea toda área corada pela fluoresceína (Fig.2).

O colírio Fluoresceína (fluoresceína sódica 1%, Allergan®, Irlanda) apresenta em sua composição um veículo conservante, o tiomersal (Netto e Pereira, 1998). Pelo risco de inibir o crescimento de agentes bacterianos e fúngicos, optou-se pelo uso da fluoresceína em tiras de papel, para que isso não interferisse nos resultados.

Figura 1. A- Imagem fotográfica da fluoresceína em tiras de papel (Drogavet®, Brasil). B e C – Imagens fotográficas da realização do exame de fluoresceína, utilizando o corante em tiras de papel.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 2. Imagem fotográfica do exame de fluoresceína positivo em um cão com ceratite ulcerativa.



Fonte: Arquivo pessoal.

Posteriormente ao diagnóstico e exame oftalmológico de rotina, os animais receberam uma gota de colírio anestésico no olho afetado (armazenado em temperatura ambiente),

contendo cloridrato de tetracaína e cloridrato de fenilefrina (Allergan®, Irlanda), sem limpeza prévia, apenas se houvesse grande quantidade de secreção ocular limpava-se com solução fisiológica estéril e gaze.

Em seguida, foi realizada a coleta de amostra para exame microbiológico. Foi utilizada uma haste flexível com ponta de algodão estéril (*swab*), umedecido com solução fisiológica estéril, que foi passada sobre a lesão para colheita do material a ser analisado, sem tocar quaisquer estruturas ao redor (Fig.3). Esse *swab* foi introduzido em meio de transporte com *ágar Stuart* (*Absorve*®) (Fig.4) e transportado para o setor de Microbiologia do Laboratório de Habilidades Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, onde foram realizados os isolamentos bacterianos.

Figura 3. Imagem fotográfica da colheita de amostra de uma úlcera de córnea com *swab*.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 4. Imagem fotográfica de um tubo com meio de transporte *ágar Stuart* (*Absorve*®).



Fonte: Arquivo pessoal.

No laboratório os *swabs* foram removidos do tubo contendo *ágar Stuart*® e reintroduzidos em um meio de cultura líquido, o Caldo Soja Tripticaseína (*Tryptic Soy Broth-TSB*®), e incubados a 37°C (+/- 2), por 16 a 24 horas. Posteriormente, o caldo foi subcultivado em placas contendo *ágar MacConkey*® (*Merck Sharp & Dohme*), *ágar Sangue*

Columbia® (*Merck Sharp & Dohme*), e ágar Cromogênico® para uropatógenos (*bioMérieux BRASIL*), e incubados a 37°C por 24 horas.

As colônias foram identificadas utilizando-se metodologia padronizada por Jorgensen *et al.* (2015). Para identificação dos bacilos gram-negativos que cresceram no ágar *MacConkey*, foram utilizados EPM, MILI (motilidade, indol e lisina), Citrato, Arginina de-hidrolase e Ornitina descarboxilase.

As colônias que foram isoladas em ágar Sangue e ágar Cromogênico, foram analisados inicialmente por exame microscópico. Os cocos gram-positivos foram submetidos ao teste de produção de catalase. Aqueles que apresentaram teste positivo, foram avaliados quanto à capacidade de fermentar manitol, degradar ácidos nucleicos por meio da inoculação em ágar DNase, resistir à ação de polimixina e novobiocina, produzir pigmento amarelo, e causar hemólise em ágar Sangue.

Para as colônias que não produziram catalase, foram realizados os testes de hidrólise da esculina, crescimento em caldo NaCl 6,5%, teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen) e sensibilidade à bacitracina, para diferenciação de *Streptococos* e *Enterococos*. Quando necessário, os isolados foram identificados por metodologia automatizada *Vitek*® 2 (*bioMérieux Brasil*), de acordo com recomendações do fabricante.

A sensibilidade a antimicrobianos foi determinada por disco difusão de acordo com padronização do Clinical Laboratory Standards International (CLSI, 2017). Os antimicrobianos testados nesse estudo foram aqueles mais comumente utilizados para o tratamento dessa afecção na medicina veterinária e que estão disponíveis em formulação oftálmica, como gentamicina, amicacina, tobramicina, neomicina, ciprofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, tetraciclina, azitromicina e cloranfenicol. Além dos antimicrobianos utilizados para determinar perfil de susceptibilidade e resistência bacteriana, como oxacilina, imipenem e meropenem.

As culturas fúngicas foram realizadas no setor de Microbiologia do Laboratório de Habilidades Farmacêuticas, em parceria com o Laboratório de Micologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Estadual de Londrina. Para sua realização, foi coletada amostra com *swab* estéril umedecido com solução fisiológica estéril, o qual foi utilizado para semeadura em duplicata em ágar *Sabouraud* Dextrose. As placas foram incubadas a 25°C por até 30 dias, e a 37 °C por até 7 dia. A identificação fúngica foi realizada pela avaliação das características morfológicas das colônias e utilizando o método de coloração Panótico Rápido.

Os dados foram tabulados com o auxílio informático do *Microsoft Office Word*® e

Microsoft Office Excel® para posterior análise estatística descritiva.

RESULTADOS

Foram coletadas 36 amostras, destas, 26 (72,3%) apresentaram crescimento bacteriano e 10 (27,7%) tiveram resultado negativo. Em 15 amostras foi isolado um único microrganismo, em nove amostras foram isolados dois microrganismos diferentes, e em duas amostras foram isolados três e quatro agentes bacterianos, respectivamente. Totalizando 40 isolados bacterianos.

Quase metade das bactérias isoladas pertencia ao grupo das gram-negativas (47,5%), enquanto que 52,5% foram classificadas como gram-positivas (Tab.1). A espécie isolada em maior porcentagem foi *Staphylococcus intermedius group* (20%), seguida de *Pseudomonas aeruginosa* (17,5%).

Tabela 1. Frequência de agentes isolados da córnea de cães com ceratite ulcerativa, atendidos pelo Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário de Londrina, no período de outubro de 2017 a abril de 2018.

AGENTE	NÚMERO DE ISOLADOS / TOTAL	%
GRAM-POSITIVO		
<i>Staphylococcus intermedius group</i>	8 / 40	20
<i>Staphylococcus sp.</i>	7 / 40	17,5
<i>Streptococcus sp.</i>	5 / 40	12,5
<i>Enterococcus spp.</i>	1 / 40	2,5
Sub-total	21 / 40	52,5
GRAM-NEGATIVO		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7 / 40	17,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4 / 40	10,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 / 40	7,5
<i>Escherichia coli</i>	2 / 40	5,0
<i>Serratia spp.</i>	2 / 40	5,0
<i>Proteus mirabilis</i>	1 / 40	2,5
Sub-total	19 / 40	47,5
Total	40	100%

Entre as bactérias gram-positivas, as do gênero *Staphylococcus spp.* foram isoladas com maior frequência, representando 71,43% do grupo, e 37,5% do total. *Staphylococcus intermedius group* foi a espécie desse gênero identificada com maior frequência, representando 53,3%. As demais bactérias gram-positivas isoladas foram *Streptococcus spp.*,

representando 23,8% do grupo, e *Enterococcus* spp., com somente um isolado.

Do grupo das gram-negativas, foram observadas em maior ocorrência bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp, cada um representando 36,84% e 21,05% do grupo, respectivamente. Os demais do grupo (42,1%) foram as enterobactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp. e *Proteus mirabilis*.

No antibiograma, o fármaco que mostrou eficácia contra a maior proporção de *Staphylococcus* spp. foi a neomicina, com 87,5% de sensibilidade (Tab.2). Em 12,5% das bactérias, ele mostrou eficácia intermediária, e nenhuma resistência foi obtida. Enquanto que 50% do gênero apresentou resistência à tetraciclina. Os níveis de resistência obtidos à ciprofloxacina, ofloxacina e moxifloxacina foram similares, variando de 36,3% a 37,5%.

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias gram-positivas isoladas da córnea de cães com ceratite ulcerativa, atendidos pelo Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário de Londrina, no período de outubro de 2017 a abril de 2018.

Antimicrobiano	<i>Staphylococcus</i> spp.				<i>Streptococcus</i> spp.			
	S (%)	R (%)	I (%)	Nº amostras testadas	S (%)	R (%)	I (%)	Nº amostras testadas
Amicacina	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	80	6,7	13,3	15	-	-	-	-
Neomicina	87,5	0	12,5	8	0	100	0	2
Tobramicina	62,5	25	12,5	8	0	100	0	2
Ciprofloxacina	63,7	36,3	0	11	-	-	-	-
Ofloxacina	62,5	37,5	0	8	100	0	0	2
Moxifloxacina	62,5	37,5	0	8	100	0	0	2
Tetraciclina	50	50	0	14	20	60	20	5
Cloranfenicol	78,6	21,4	0	14	100	0	0	5
Azitromicina	71,4	28,6	0	7	100	0	0	2

S: sensível; R: resistente; I: intermediário.

Para o gênero *Streptococcus* os antimicrobianos ofloxacina, moxifloxacina, cloranfenicol e azitromicina tiveram 100% de eficácia. Já a tetraciclina mostrou apenas 20% de eficácia. Além de 20% de eficácia intermediária e 60% de resistência.

Nenhum antimicrobiano se mostrou 100% eficaz contra as bactérias gram negativas (Tab.3). Estas, apresentaram maior resistência à tetraciclina e ao cloranfenicol, 43,7% e 37,5% respectivamente. Foram sensíveis principalmente à moxifloxacina, ciprofloxacina,

neomicina e gentamicina, variando a sensibilidade de 83,3% à 85,7%.

Foram isoladas seis bactérias com perfis de resistência incomum na medicina veterinária, quatro *Staphylococcus* spp. MRSP (*Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina), uma *Pseudomonas aeruginosa* CR (resistente aos carbapenêmicos) e uma *Klebsiella pneumoniae* ESBL (produtora de betalactamase de espectro estendido).

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas da córnea de cães com ceratite ulcerativa, atendidos pelo Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário de Londrina, no período de outubro de 2017 a abril de 2018.

Gram-negativas				
Antimicrobiano	S (%)	R (%)	I (%)	Nº amostras testadas
Amicacina	77,8	16,7	5,5	18
Gentamicina	83,3	16,7	0	18
Neomicina	84,6	15,4	0	13
Tobramicina	64,3	28,6	7,1	14
Ciprofloxacina	83,3	16,7	0	18
Ofloxacina	71,4	28,6	0	14
Moxifloxacina	85,7	14,3	0	14
Tetraciclina	43,7	43,7	12,6	16
Cloranfenicol	50,0	37,5	12,5	8
Azitromicina	-	-	-	-

S: sensível; R: resistente; I: intermediário.

Pseudomonas aeruginosa demonstraram diferentes níveis de resistência aos antibióticos testados, que variaram de 14,3%, para ciprofloxacina, a 60%, para tetraciclina. Uma das bactérias isoladas apresentou resistência a oito antimicrobianos estudados. A maior sensibilidade obtida foi à ciprofloxacina, com 85,7%.

Das culturas fúngicas realizadas, em apenas uma houve crescimento de levedura.

DISCUSSÃO

Devido ao fato da superfície ocular ser rica em nutrientes, diversos microrganismos são encontrados nela, os quais formam a microbiota ocular (Armstrong, 2000). Esta vem sendo estudada há alguns anos, e os estudos indicam que os microrganismos isolados e as taxas de prevalência variam de acordo com a localização geográfica, clima, técnica de coleta de

material, tratamentos prévios e tipo de afecção (Gerding e Kakoma, 1990; Whitley e Gilger, 1999; Moore e Nasisse, 1999).

Acredita-se que essa microbiota seja a fonte de bactérias que causam infecção na maior parte das ceratites ulcerativas. Tal informação pode ser confirmada conforme resultados do atual trabalho, o qual encontrou *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* envolvidas na maior parte das ceratites ulcerativas estudadas, as quais tratam-se de bactérias encontradas na superfície ocular de olhos saudáveis (Gerding *et al.*, 1988; Moore e Nasisse, 1999).

Segundo Slatter (2005), as bactérias isoladas do saco conjuntival de animais hígidos podem ser as mesmas isoladas de ulcerações corneais, são principalmente dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Proteus*. Estudos mostram que na superfície ocular de gatos clinicamente normais, há predominantemente espécies de bactérias gram-positivas, a maioria pertencendo ao gênero *Staphylococcus* (Espinola e Lilenbaum, 1996). Essa condição, também, é observada na superfície ocular de cães clinicamente normais (Kudirkiene *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Resultados similares foram vistos nos olhos de cães com úlcera de córnea, demonstrando que a prevalência de bactérias gram-positivas do gênero *Staphylococcus*, permanece também nesses casos (Prado *et al.*, 2005; Lin e Petersen-Jones, 2007; Wang *et al.*, 2008).

Em um trabalho com gatos com ceratite ulcerativa, em Taiwan, 58,7% dos casos apresentaram crescimento bacteriano (Lin e Petersen-Jones, 2008). Em trabalhos realizados em cães com úlcera de córnea, a porcentagem de culturas bacterianas positivas variou de 71 a 100%. Prado *et al.* (2006); Lin e Petersen-Jones (2007); Wang *et al.* (2008) e Morales *et al.* (2009), obtiveram 100% (em Fortaleza, CE, Brasil), 71% (em Taiwan, China), 93,1% (em Beijing, China) e 74,4% (em Valinhos, SP, Brasil) de culturas positivas, respectivamente. Esses resultados se aproximam do resultado do presente trabalho, o qual obteve crescimento bacteriano em 72,3% das amostras.

A prevalência de bactérias gram-positivas pode ser vista em diversos estudos, assim como relatado por Prado *et al.* (2006) e Lin e Petersen-Jones (2007), que obtiveram taxas de 80,7% e 78%, respectivamente, em cães com úlcera de córnea. Kurdirkiene *et al.* (2006) e Zacarias Junior *et al.* (2012) encontraram bactérias gram-positivas em 71% e 76%, respectivamente, em cães com doenças oculares externas. O atual estudo também constatou prevalência de gram-positivas, mas com porcentagem menor, de 52,5%.

Já Morales *et al.* (2009), encontraram bactérias gram-negativas em mais da metade das amostras testadas, totalizando 48,43%, enquanto que em 42,18% foram encontradas bactérias

gram-positivas, e nas demais, fungos. A bactéria isolada com maior frequência foi a *Pseudomonas Aeruginosa* (32,8%), e quanto aos fungos, *Candida* sp. e *Rhodotorula Rubra* foram isolados. Estes resultados diferem dos obtidos por outros autores citados anteriormente, em que *Staphylococcus* spp. predominaram.

No presente trabalho, *Staphylococcus intermedius group* foi o agente predominante, presente em 20% dos casos, assim como relatado por Prado *et al.* (2006) e Wang *et al.* (2008). Entretanto, em menor porcentagem quando comparado com esses trabalhos, sendo 35,5% e 30,5%, respectivamente. A segunda espécie isolada em maior porcentagem foi *Pseudomonas aeruginosa* (17,5%), e isso tem uma grande relevância clínica devido a patogenicidade desse microrganismo.

Lin e Petersen-Jones (2007) obtiveram 70,5% das culturas bacterianas com apenas um microrganismo isolado, e 29,5% com dois ou três microrganismos presentes. Prado *et al.* (2006) encontraram resultados similares, uma única espécie de bactéria foi encontrada em 63,6% das amostras, e duas ou mais espécies foram encontradas em 36,4%. Já no trabalho desenvolvido por Morales *et al.* (2009), uma espécie de bactéria foi isolada em quase 80% das culturas realizadas. O atual estudo identificou uma espécie em 57,7% das culturas, essa taxa é menor que a dos demais estudos, mas ainda representa a maioria das amostras com um único microrganismo isolado, nas demais amostras, foram isolados dois ou mais microrganismos, chegando ao máximo de quatro diferentes espécies de bactérias em uma mesma amostra.

A neomicina foi o antimicrobiano que apresentou melhor eficácia contra *Staphylococcus* spp., seguido da gentamicina. Ambos demonstraram ter ação satisfatória também contra gram-negativas. Visto a eficácia contra *Staphylococcus* spp., que são os agentes predominantes do grupo das gram-positivas, e também contra gram-negativas, pode-se considerar o uso da neomicina e da gentamicina como antimicrobianos de escolha para início do tratamento de forma empírica em cães com ceratite ulcerativa.

Contrastando com Prado *et al.* (2006) e com Lin e Petersen-Jones (2007), foi obtido 36,3% de resistência à ciprofloxacina por *Staphylococcus* spp., enquanto que nos trabalhos citados, esse valor foi inferior, 0% e 10,4% respectivamente, indicando não ser uma boa opção terapêutica.

Assim como visto no trabalho realizado por Morales *et al.* (2009), nesse estudo, *Staphylococcus* spp. também apresentaram resistência à tetraciclina em 50% dos casos. Lin e Petersen-Jones (2007), encontraram resistência ainda maior a esse antimicrobiano, em 72,9%.

As bactérias encontradas na atual pesquisa com perfil de resistência incomum na medicina veterinária, são bactérias consideradas multirresistentes. Bactérias MRSP são

resistentes à oxacilina, o que significa que são resistentes a todos os antibacterianos da classe beta-lactâmicos (Bond e Loeffler, 2012). Microrganismos CR representam resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos. E bactérias ESBL, por sua vez, são produtoras de β -lactamases, capazes de inativar penicilinas, cefalosporinas, entre outros antimicrobianos (Silva e Lincopan, 2012; Sfaciotte *et al.*, 2014).

Morales *et al.* (2009), citaram em seu estudo duas bactérias com perfil multirresistente, uma *Escherichia coli* ESBL, e uma *Pseudomonas aeruginosa* resistente à todos os antimicrobianos testados, exceto polimixina. No atual trabalho, uma das *Pseudomonas aeruginosa* isoladas, foi resistente aos oito antimicrobianos tópicos estudados para aquela amostra, entre eles tetraciclina, neomicina, tobramicina, gentamicina, amicacina, ciprofloxacina, ofloxacina e moxifloxacina, identificada como um importante desafio terapêutico.

A presença de bactérias com perfil multirresistente deve receber especial atenção. Microrganismos com esses perfis de resistência são importantes agentes de infecções hospitalares humanas. O uso indiscriminado dos antibacterianos na medicina veterinária e na medicina humana, gera o desenvolvimento de resistência bacteriana, tanto em animais, como no homem. A resistência cada vez maior a esses fármacos aumenta a dificuldade da escolha empírica dos antimicrobianos a serem usados na rotina clínica.

Em cães e gatos é incomum a associação de fungos em lesões na córnea, podendo ser vista com maior frequência em humanos e cavalos (Gilger, 2007). São considerados patógenos oportunistas, principalmente quando há um defeito no epitélio corneal, possibilitando sua entrada na córnea (Andrews, 2003). A forma mais comum de entrada é por meio de traumas, particularmente na presença de matéria orgânica, vegetal ou terra (Thomas, 2003). O uso prolongado de antimicrobianos e/ou corticosteróides também é um fator predisponente, devido à diminuição dos mecanismos de defesa do hospedeiro e da microbiota residente, considerada uma proteção contra microrganismos patogênicos (Gaarder *et al.*, 1998).

Segundo Samuelson *et al.* (1984), fungos fazem parte da microbiota conjuntival de pequenos animais, mas são menos frequentemente isolados. Em seu estudo, 22% das culturas fúngicas (11/50) foram positivas em cães, e 40% em gatos (10/25). Já Gerding e Kakoma (1990), encontraram taxas mais baixas, 10% em cães (5/50), e 26% em gatos (13/50). Em contrapartida, a presente pesquisa isolou levedura em apenas uma amostra (1/36), representando 2,7%.

Fusarium e *Aspergillus* são os fungos isolados com maior frequência em ceratites

micóticas, as quais podem ser ulcerativas ou não ulcerativas (Johns e O'Day, 1988). Gelatt (2003) citou *Candida albicans*, *Aspergillus* e *Alternaria* como fungos mais comumente isolados. Outros, previamente relatados em cães com ceratite micótica, foram *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Curvularia*, *Hormographiella*, *Pseudallescheria* e *Scedosporium* (Gerding e Kakoma, 1990; Rampazzo *et al.*, 2009).

A variação entre os resultados, tanto bacteriológicos, como micológicos, pode ser explicada pelas diferentes localizações geográficas, devido aos variados tipos de clima, assim como estações do ano. Wang *et al.* (2008) observaram que a estação do ano foi um fator significativo que influenciou a presença, ou ausência, de microrganismos bacterianos no saco conjuntival de cães normais, em Pequim, China. O número de isolados bacterianos foi menor no inverno (35,8%) quando comparado com as demais estações (primavera 45,8%, outono 47,5%, verão 57,5%).

Ceratites com envolvimento de fungos tem sido relatadas em humanos em diversos países, mas principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Fatores ambientais, como chuva, vento e umidade, podem determinar variações sazonais na frequência de isolamento e tipos de fungos isolados (Jones, 1980).

O atual estudo foi realizado em Londrina, Paraná, região de clima subtropical, e as coletas das amostras foram feitas principalmente durante as estações primavera e verão. A variação desses fatores entre os diversos trabalhos publicados, pode contribuir para que haja diferença entre os resultados, assim como na interpretação dos mesmos.

Segundo Prado *et al.* (2006), o método de coleta do material também pode interferir. Esses mesmos autores desenvolveram uma pesquisa, em que foi utilizada uma espátula para raspagem da córnea como técnica de coleta das amostras, e obtiveram 100% de culturas positivas, enquanto que nos outros estudos citados, utilizou-se swab estéril para a coleta de material da córnea, assim como nesse trabalho, e a frequência de culturas positivas variou de 58,7% a 93,1%. Portanto, o tipo e a forma de coleta de amostras pode interferir no número de resultado positivos.

CONCLUSÕES

As bactérias isoladas dos olhos de cães com ceratite ulcerativa com maior frequência foram *Staphylococcus intermedius group* e *Pseudomonas aeruginosa*. Neomicina e gentamicina foram os antimicrobianos que apresentaram melhor ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, simultaneamente, podendo ser considerados como antimicrobianos de escolha para início do tratamento de forma empírica em cães com ceratite

ulcerativa. Já a tetraciclina, demonstrou ser o antimicrobiano menos eficaz, com alta taxa de resistência.

Foram identificados microrganismos multirresistentes aos fármacos antibacterianos, indicando a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias isoladas dos olhos de cães com ceratite ulcerativa, frente a esses fármacos, além do seu uso mais racional.

Uma baixa taxa de isolamento fúngico foi obtida quando comparada aos demais estudos. Novas pesquisas são necessárias para avaliar e comparar as diferentes formas de coleta de amostras, além de outros fatores que pode interferir nos resultados.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, S.E. Corneal fungal disease in small animals. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v.18, p.186–192, 2003.

ARMSTRONG, R. A. The microbiology of the eye. *Ophthalmic Physiological Optics*, Oxford, v. 20, n. 6, p. 429-441, 2000.

BOND, R.; LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J Small Anim Pract*, v.53 n.3, p.147– 154, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27. ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

ELAD, D., PERL, S., YAMIN, G., BLUM, S., DAVID, D.; Disseminated pseudallescheriosis in a dog, *Medical Mycology*, v.48, n.4, p.635–638, 2010.

ESPINOLA, M. B.; LILENBAUM, W. Prevalence of bacteria in the conjunctival sac and on the eyelid margin of clinically normal cats. *Journal of Small Animal Practice*, v.37, p. 364-366, 1996.

GAARDER, J.E.; REBHUN, W.C.; BALL, M.A. *et al.* Clinical appearances, healing patterns, risk factors, and outcomes of horses with fungal keratitis: 53 cases (1978–1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.213, p.105–112, 1998.

- GELATT, K.N. Essentials of veterinary ophthalmology. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- GERDING, P.A.; MCLAUGHLIN, S.A.; TROOP, M.W. Cytology of normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, v.193, p.242-244, 1988.
- GERDING, P.A.; KAKOMA, I. Microbiology of the canine and feline eye. *Vet Clin North Am (Small Anim Pratt)*, v.20, p.615-625, 1990.
- GILGER, B.C. Diseases and surgery of the canine cornea. In: GELATT K.N. *Veterinary Ophthalmology*. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p.690-752, 2007.
- JOHNS, K.J.; O'DAY, D.M. Pharmacologic management of keratomycoses. *Surv Ophthalmol.*, v.33, n.3, p.178–188, 1988.
- JONES, D.B. Strategy for the initial management of suspected microbial keratitis. In: BARRAQUER, J.I.; BINDER, P.S.; BUXTON, J.N.; FINE, M.; JONES, D.B.; LAIBSON, P.R. et al (eds). *Symposium on Medical and Surgical Diseases of the Cornea. Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology*. Mosby: St Louis, p.86–119, 1980.
- JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; CARROLL, K.C.; LANDRY, M.L.; FUNKE, G.; RICHTER, S.S.; WARNOCK, D.W. *Manual of clinical microbiology*. 11. ed. ASM Press, Washington, DC, 2015.
- KERN, T.J. Ulcerative keratitis. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, v.20, p.643-666, 1990.
- KURDIRKIENE, E.; ZILINSKAS, H.; SIUGZDAITE, J. Microbial flora of the dog eyes. Lithuania. *Veterinarija ir zootechnika*, v.34, n.56, p.18-21, 2006.
- LIN, C.T.; PETERSEN-JONES, S.M. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from corneal ulcers of dogs in Taiwan. *Journal of Small Animal Practice*, v.48, p. 271-271, 2007.
- LIN, C.T.; PETERSEN-JONES, S.M. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from cats with ulcerative keratitis in Taiwan. *Journal of Small Animal Practice*, v.49, p.80–83, 2008.
- MOORE, C.P.; NASISSE, M.P. Clinical microbiology. In: GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. 3. Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams& Wilkins, p. 259-290, 1999.

MORALES, A.; VALINHOS, M.A.R.; SALVADEGO, M.; LEVY, C.E. Microbiological and clinical aspects of corneal ulcers in dogs – 530. In proceedings of 34th World Small Animal Veterinary Congress, 2009 - São Paulo, Brazil.

NETTO, A.A.; PEREIRA, F.J. Avaliação da contaminação bacteriana de produtos oftálmicos. Rev. Bras. Oftal., vol.57, n.10, p.775-780, 1998.

OLIVEIRA, C.H.; REBECHI, M.; QUAGLIARA, P.C. Sensibilidade ao timerosal e seu uso em colírios no Brasil. Rev. bras. alerg. imunopatol., p.26, 2006.

OLLIVIER, F.J. Bacterial corneal diseases in dogs and cats. Clinical Techniques in Small Animal Practice, v.18, n.3, p.193-198, 2003.

PRADO, M.R.; ROCHA, M.F.G.; BRITO, M.D.G. et al. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. Veterinary Ophthalmology, v.8, p. 33-37, 2005.

PRADO, M.R.; BRITO, E.H. S.; GIRÃO, M.D. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from corneal ulcers of dogs. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 58, n. 6, p. 1024-1029, 2006.

RAMPAZZO, A.; KUHNERT, P.; HOWARD, J. *et al.* *Hormographiella aspergillata* keratomycosis in a dog. Veterinary Ophthalmology, v.12, p.43–47, 2009.

SAMPAIO, G.R. Oftalmologia: doenças corneanas em pequenos animais. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 136. 2007.

SAMUELSON, D.A.; ANDRESEN, T.L.; GWIN, R. M. Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats. J Am Vet Med Assoc, v.184, p.1240-1242, 1984.

SFACIOTTE, R.A.P; BORDIN, J.T.; VIGNOTO, V.K.C. *et al.* Descrição de cepas bacterianas multirresistentes isoladas de cães. Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ., v.1, p.78, 2014.

SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. Bras Patol Med Lab, v.48, n.2, p.91-99, 2012.

SLATTER, D. Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. 2.ed. Philadelphia, PA: Saunders, 1990.

SLATTER, D. H. Fundamento de Oftalmologia Veterinária. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 686.

THOMAS, P.A. Fungal infections of the cornea. *Eye*, v.17, p.852–862, 2003.

WANG, L.; PAN, Q.; ZHANG, L. et al. Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. *Vet. Ophthalmol*, v.11, p.145–149, 2008.

WHITLEY, R.D.; GILGER, B.C. Diseases of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. 3. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, p.635-671, 1999.

WHITLEY, R.D. Canine and feline primary ocular bacterial infections. *Vet Clin North Am (Small Anim Pratt)*, v.30, p.1151-1167, 2000.

ZACARIAS JUNIOR, A.; FREITAS, J.C.; ZACARIAS, F.G.S. et al. Investigação da microbiota bacteriana e associações de risco em cães com afecções oculares externas atendidos em Bandeirantes, Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.33, suplemento 2, p. 3243-3250, 2012.

ANEXOS

ANEXO A

Aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 51/2017

Londrina, 02 de Maio de 2017.

Prezada Professora,

Certificamos que o projeto intitulado: "**Estudo Microbiológico das Ceratites Ulcerativas em Cães**" protocolo CEUA nº **321.2017.90** sob a responsabilidade de **Mirian Siliane Batista de Souza**, 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), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA); foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **11/04/2017**.

O Objetivo do projeto identificar os microorganismos presentes na córnea de cães com ceratite ulcerativa, e sua sensibilidade aos antibióticos mais utilizados na oftalmologia veterinária determinar os microorganismos mais comumente isolados nessa afecção, além dos antibióticos mais eficazes, para fornecer ao clínico de pequenos animais maior embasamento e informações que são determinantes na escolha da melhor terapia antimicrobiana a ser instituída. Grau de Invasividade=1

Vigência do Projeto	02/05/2017 a 02/05/2018
Espécie/linhagem	Cão / Variável
Nº de animais	30
Peso/Idade	Variável
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Córnea

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza

Responsável pelo projeto

Departamento de Clínica Veterinária/ Centro de Ciências Agrárias/ CCA / UEL. Clínica Veterinária e Diretor do Centro de Ciências Agrárias/Uel.

ANEXO B

Instruções para submissão de artigos – Revista Clínica Veterinária

Instruções para submissão de artigos – Clínica Veterinária



Instruções aos autores

Revista Clínica Veterinária / Redação
Rua dr. José Elias 222 CEP 05083-030
São Paulo - SP
cvredacao@editoraguara.com.br

Indexações:

ISI Web of Knowledge - Zoological Record
Latindex
CAB Abstracts

Artigos científicos inéditos, como trabalhos de pesquisa, revisões de literatura e relatos de caso, enviados à redação são avaliados pela equipe editorial. Em face do parecer inicial, o material é encaminhado aos consultores científicos. A equipe decidirá sobre a conveniência da publicação, de forma integral ou parcial, encaminhando ao autor sugestões e possíveis correções.

Relatos de casos são utilizados para apresentação de casos de interesse, quer seja pela raridade, evolução inusitada ou técnicas especiais, que são discutidas detalhadamente.

Revisões são utilizadas para o estudo aprofundado de informações atuais referentes a um determinado assunto, a partir da análise criteriosa dos trabalhos de pesquisadores de todo o meio científico, publicados em periódicos de qualidade. Uma revisão deve apresentar no máximo até 15% de seu conteúdo provenientes de livros e no máximo 20% de artigos com mais de dez anos de publicação.

Trabalhos de pesquisa são utilizados para apresentar resultados, discussões e conclusões de pesquisadores que exploram fenômenos ainda não completamente conhecidos ou estudados. Nesses trabalhos, o bem-estar animal deve sempre receber atenção especial.

Para a primeira avaliação, os autores devem enviar pela internet (cvredacao@editoraguara.com.br) um arquivo texto (.doc) com o trabalho, acompanhado de imagens digitalizadas em formato .jpg. As imagens digitalizadas devem ter, no mínimo, resolução de 300 dpi na largura de 9cm. Se os autores não possuem imagens digitalizadas, devem encaminhar pelo correio ao nosso departamento de redação cópias das imagens originais (fotos, slides ou ilustrações – acompanhadas de identificação de propriedade e autor). Devem ser enviadas também a identificação de todos os autores do trabalho (nome completo por extenso, RG, CPF, endereço residencial com cep, telefones e e-mail). Além dos nomes completos, devem ser informadas as instituições às quais os autores estejam vinculados, bem como seus títulos no momento em que o trabalho foi escrito.

Todos os artigos, independentemente da sua categoria, devem ser redigidos em língua portuguesa e acompanhados de versões em língua inglesa e espanhola de: título, resumo (de 700 a

800 caracteres) e unitermos (3 a 6). Os títulos devem ser claros e ser grafados em letras minúsculas – somente a primeira letra da primeira palavra deve ser grafada em letra maiúscula. Os resumos devem ressaltar o objetivo, o método, os resultados e as conclusões, de forma concisa, dos pontos relevantes do trabalho apresentado. Os unitermos não devem constar do título. Devem ser dispostos do mais abrangente para o mais específico (eg, "cães, cirurgias, abscessos, próstata). Verificar se os unitermos escolhidos constam dos "Descritores em Ciências de Saúde" da Bireme (<http://decs.bvs.br/>). Revisões de literatura não devem apresentar o subtítulo "Conclusões". Sugere-se "Considerações finais".

Não há especificação para a quantidade de páginas, dependendo esta do conteúdo explorado. Os assuntos devem ser abordados com objetividade e clareza, visando o público leitor – o clínico veterinário de pequenos animais.

Utilizar fonte arial tamanho 10, espaço simples e uma única coluna. As margens superior, inferior e laterais devem apresentar até 3cm. Não deixar linhas em branco ao longo do texto, entre títulos, após subtítulos e entre as referências.

No caso de todo o material ser remetido pelo correio, devem necessariamente ser enviados, além de uma apresentação impressa, uma cópia em CD-rom.

Imagens como fotos, tabelas, gráficos e ilustrações não podem ser cópias da literatura, mesmo que seja indicada a fonte. Devem ser utilizadas imagens originais dos próprios autores. Imagens fotográficas devem possuir indicação do fotógrafo e proprietário; e quando cedidas por terceiros, deverão ser obrigatoriamente acompanhadas de autorização para publicação e cessão de direitos para a Editora Guará (fornecida pela Editora Guará). Quadros, tabelas, fotos, desenhos, gráficos deverão ser denominados figuras e numerados por ordem de aparecimento das respectivas chamadas no texto. Imagens de microscopia devem ser sempre acompanhadas de barra de tamanho e nas legendas devem constar as objetivas utilizadas.

Evitar citar comentários que constem das introduções de trabalhos de pesquisa para não incorrer em apud's. Procurar se restringir ao "Material e

métodos" e às "Conclusões" dos trabalhos. Sempre buscar pelas referências originais consultadas por esses autores.

As referências serão indicadas ao longo do texto apenas por números sobrescritos ao texto, que corresponderão à listagem ao final do artigo – autores e datas não devem ser citados no texto. Esses números sobrescritos devem ser dispostos em ordem crescente, seguindo a ordem de aparecimento no texto, e separados apenas por vírgulas (sem espaços). Quando houver mais de dois números em sequência, utilizar apenas hífen (-) entre o primeiro e o último dessa sequência, por exemplo cão^{1,2,6-10,13}. A apresentação das referências ao final do artigo deve seguir as normas atuais da ABNT 2002 (NBR 10520). Utilizar o formato v. para volume, n. para número e p. para página. Não utilizar "et al" – todos os autores devem ser relacionados. Não abreviar títulos de periódicos. Sempre utilizar as edições atuais de livros – edições anteriores não devem ser utilizadas. De modo geral, não serão aceitos apud's, somente sendo utilizados para literatura não localizada e obras antigas de difícil acesso. As citações de obras da internet devem seguir o mesmo procedimento das citações em papel, apenas com o acréscimo das seguintes informações: "Disponível em: <<http://www.xxxxxx>>. Acesso em: dia de mês de ano." Somente utilizar o local de publicação de periódicos para títulos com incidência em locais distintos, como, por exemplo: Revista de Saúde Pública, São Paulo e Revista de Saúde Pública, Rio de Janeiro. De modo geral, não são aceitas como fontes de referência periódicos ou sites não indexados.

Não utilizar SID, BID e outros. Escrever por extenso "a cada 12 horas", "a cada 6 horas" etc.

Com relação aos princípios éticos da experimentação animal, os autores deverão considerar as normas do SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório).

Informações referentes a produtos utilizados no trabalho devem ser apresentadas em rodapé, com chamada no texto com letra sobrescrita ao princípio ativo ou produto. No rodapé devem constar o nome comercial, fabricante, cidade e estado. Para produtos importados, informar também o país de origem, o nome do importador/distribuidor, cidade e estado.

ANEXO C

Instruções para submissão de artigos – Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é consentido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de Publicação on-line do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Committee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

▪ **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

▪ **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

▪ **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês na forma impessoal.

Formatação do texto

▪ O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.

▪ Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

▪ **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

▪ **Autores e Afiliação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.

▪ **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

▪ **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco e no mínimo duas*.

* na submissão usar somente o *Keyword* (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto *keyword* (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

▪ **Introdução.** Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

▪ **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA.** (verificar o Item Comitê de Ética).

▪ **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

✓ **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

✓ **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota:

✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

▪ **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

▪ **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

▪ **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

▪ **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

▪ A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);

✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);

✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);

✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- *Comunicação pessoal.* Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6a ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação:

SOMENTE PARA ARTIGOS NACIONAIS

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.

OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade. SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

▪ **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.

Recursos e diligências:

▪ No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.

▪ No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.