

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS
ISOLADAS EM CERATITES ULCERATIVAS DE CÃES**

Pamella Almeida Freire Casemiro

Médica Veterinária

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS
ISOLADAS EM CERATITES ULCERATIVAS DE CÃES**

Discente: Pamella Almeida Freire Casemiro

Orientador: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

2023

C337a Casemiro, Pamela Almeida Freire
Avaliação do perfil de resistência de bactérias isoladas em ceratites ulcerativas de cães : CAPÍTULO 2. Prevalência e resistência bacteriana em isolados de ceratites ulcerativas em cães. / Pamela Almeida Freire Casemiro. -- Jaboticabal, 2023
56 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Paola Castro Moraes
Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Cão. 2. Córnea. 3. Microorganismos. 4. Agentes antimicrobianos. 5. Saúde pública.
I. Título.

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

Esta dissertação será capaz de auxiliar em pesquisas futuras sobre os padrões de incidência bacteriana e o perfil de resistência à antimicrobianos em quadros de ceratites ulcerativas de olhos caninos.

O estudo abrangeu diversos estágios de evolução da enfermidade, possibilitando desta maneira o aprofundamento das informações sobre a incidência e resistência bacteriana de bactérias que são capazes de produzir infecção neste quadro.

As informações obtidas nesta dissertação possibilitam a elaboração de prescrições mais assertivas quanto ao uso de agentes antimicrobianos e, conseqüentemente, pode minimizar o desenvolvimento da resistência antimicrobiana que ocorre em nível mundial, na saúde humano e veterinária.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM CERATITES ULCERATIVAS DE CÃES

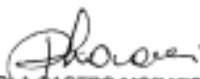
AUTORA: PAMELLA ALMEIDA FREIRE CASEMIRO

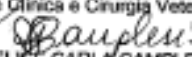
ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

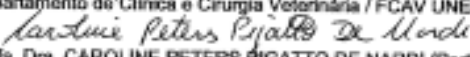
COORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

COORIENTADOR: ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias,
área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal


Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal


Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI (Participação Presencial)
Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP

Jaboticabal, 02 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Pamella Almeida Freire Casemiro, nascida no município de Buritama, estado de São Paulo, aos vinte e três dias do mês de janeiro de 1995. Ingressou no curso de Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - FMVA/UNESP em 2015, foi membro titular do Conselho da Biblioteca, membro suplente e titular da Congregação e obteve o título de Bacharel em Medicina Veterinária em dezembro de 2020. Entre os anos 2020 e 2022, participou do Programa Residência Multiprofissional em Área da Saúde do Ministério da Educação, com ênfase em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, no Hospital Veterinário “Luís Quintiliano de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - FMVA/UNESP. Ingressou em março de 2022 como aluna regular no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP, nível de Mestrado, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes e coorientação dos Profs. Drs. Alexandre Lima de Andrade e Marita Vedovelli Cardozo.

EPÍGRAFE

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda no meio da tristeza!”

- João Guimarães Rosa

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Alcides Ap. Freire Casemiro e Mácia Sueli de Almeida Casemiro, meu irmão, Anderson Almeida Freire Casemiro, que são os alicerces da minha vida e não poupam esforços por acreditarem nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira passaram por mim durante esta jornada e compartilharam comigo muito além de tempo, histórias, abraços, palavras, que dividiram comigo um pedaço desta colcha de retalhos que é a vida.

Grata à esta Universidade, a Capes e aos dois hospitais veterinários que tive o orgulho de atender, “Luís Quintiliano de Oliveira” e “Governador Laudo Natel”, a Unesp se fez casa em todos estes anos, e me acolheu oferecendo muito além de aprendizado, ensinamentos e elos para a vida toda.

À minha orientadora, professora Paola Castro Moraes, que além de acolher, mostrou-me o tipo de pessoa devo ser para me tornar uma boa educadora, eu vou ser grata uma vida toda pelo cuidado e empatia, pela paciência e amor, continue tocando a alma das pessoas, fazendo o bem e mostrando as pessoas como acreditar nelas mesmas.

Ao professor, coorientador, Alexandre Lima de Andrade, que teve a gentileza de me cativar aos olhos, e me ensinou tão pacientemente a beleza da oftalmologia, o senhor é um exemplo e espero um dia poder despertar em outros a mesma paixão pela profissão que o senhor despertou em mim.

À professora Marita Vedovelli Cardozo, que aceitou me coorientar nessa jornada e não mediu esforços para que as coisas dessem certo, com quem aprendo diariamente e quem me ensinou uma nova paixão, a microbiologia, quem acredita em mim e me apoia independentemente da ideia, um ser humano incrível, por quem agradeço ao universo por ter colocado no meu caminho.

Ao Instituto biológico, Vanessa e Alessandra, que foram importantes e presentes, responsáveis por pilotar um aparelho mágico, mas acima disto, compreensivas e amorosas, fica fácil aprender e se apaixonar pela microbiologia quando se esbarra em pessoas assim.

Ao Romário, a Mareliza e o pessoal do laboratório, por me acolherem e ensinarem pacientemente os caminhos a quais seguir, se tornando amigos queridos.

Ao Gabriel, Guilherme, Ariadne, Jaqueline, Larissa e Carlos Eduardo, que foram minha família quando eu pensava que era uma peça de canto de um quebra cabeça, e que tanto fizeram por mim.

Aos residentes do Setor da Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais e do Setor de Microbiologia Veterinária da FMVA/UNESP, em especial ao Lucas, Leonardo, Júlia, Jordana, Ana Carolina e Fabíola, que compraram a ideia e me ajudaram com tanto carinho e esforço, consolidando e criando laços de amizade.

À Cinthya e Laís, a equipe de pós-graduandas do Serviço de Oftalmologia Veterinária da FCAV/UNESP, que me ensinam todos os dias mais sobre oftalmologia, vida e sonhos, que bom que Deus nos juntou nesse momento, eu tenho muito orgulho de vocês.

As minhas amigas de vida, Poliana, Grazielle, Ana Laura, Nathany, aos que a medicina veterinária me trouxe, Juliana, Thaís, Beatriz, Júlia, Vanessa, Laís, Fernanda e as meninas da EssaKana, que juntas são o meu esteio, por me lembrarem todos os dias de alguma forma que eu consigo, por não medirem esforços para me fazer crer em mim mesma e por dividirem a vida comigo, vocês são incríveis.

À minha família, meus pais, Márcia Sueli Almeida Casemiro (Bombom) e Alcides Aparecido Freire Casemiro (Amigo), ao meu irmão Anderson Almeida Freire Casemiro (Tu) e a família linda que ele construiu, por estarem presentes, entenderem que a distância é parte desta minha jornada, por me apoiarem no sonho da carreira acadêmica sem medir esforços e por serem à luz da minha vida.

E por fim, mas não menos importante, a Manu, que foi incrível de todas as maneiras que um gato pode ser, que foi o motivo inicial para ter meus olhos voltados para a oftalmologia veterinária e conseqüentemente por me fazer viver os sonhos de hoje; ei garota, eu te espero em uma próxima vida.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
LISTA DE FIGURAS.....	v
CAPÍTULO 1. Considerações Gerais	6
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. Córnea.....	7
2.2. Ceratites ulcerativas em cães.....	8
2.3. Microbiota ocular e tratamento em quadros de ceratite ulcerativa	10
2.4. Resistência bacteriana	11
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo Geral.....	13
3.2. Objetivos Específicos	13
4. REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2. Prevalência de microrganismos em ceratites ulcerativas e o perfil de resistência em relação aos agentes antimicrobianos disponíveis.....	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Aspectos Éticos.....	22
2.2. Obtenção das amostras	22
2.3. Cultivo, Isolamento e identificação por MALDI-TOF.....	22
2.4. Teste de disco difusão.....	23
3. RESULTADOS	25
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS.....	36
APÊNDICE.....	40

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do perfil de resistência de bactérias isoladas em ceratites ulcerativas de cães**", protocolo nº 3392/22, sob a responsabilidade da Profª Drª Paola Castro Moraes, 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 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 15 de junho de 2022.

Vigência do Projeto	01/07/2022 a 07/03/2024
Espécie / Linhagem	Cães
Nº de animais	100 animais
Peso / Idade	Variado
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Rotina do Setor de Oftalmologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel

Jaboticabal, 15 de junho de 2022.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM CERATITES ULCERATIVAS DE CÃES

RESUMO – Ceratite ulcerativa é um quadro ocular comum em cães que pode resultar em diminuição ou perda total da visão quando não são tratadas adequadamente. O uso inadvertido de antimicrobianos é um risco a saúde única por incitar a resistência e multirresistência bacteriana. Portanto, a cultura, o isolamento, a identificação e a avaliação da susceptibilidade antimicrobiana são essenciais para o tratamento adequado. O objetivo desse estudo foi identificar microrganismos presentes em olhos caninos acometidos por ceratites ulcerativas, e verificar o perfil de resistência aos fármacos antimicrobianos disponíveis. Para tanto as amostras foram colhidas, identificadas por MALDI-TOF e submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana por disco difusão. Foram avaliados 88 cães acometidos por ceratites ulcerativas, destes, 50% (44/88) eram fêmeas e 50% (44/88) machos, com idades entre 6 meses e 14 anos; sendo 74,48% (50/83) braquicefálicos. Dos 88 olhos avaliados, 90,90% (80/88) tiveram cultura positiva, em que 11,33% (10/88) das amostras isolaram-se mais de uma espécie de bactéria. De todas as amostras foram identificadas (90), as Gram-positivas corresponderam à 63,33% (57/90) e as Gram-negativas 36,66% (33/90), predominando o gênero *Staphylococcus*, 35,55% (32/90) e *Pseudomonas aeruginosa*, 15,55% (14/90). *Staphylococcus* spp. apresentando resistência a penicilina (89,29%), a sulfadiazina e trimetropim (60,71%) e a tetraciclina (67,86%), enquanto a doxiciclina (88,89%), a cefotaximina (85,71%), o cloranfenicol (82,14%) e a gentamicina e o moxifloxacino (78,57%), corresponderam a maior taxa de sensibilidade. *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível (100%) à gentamicina e ao imipenem, e resistência (8,33%) norfloxacino, ciprofloxacino e cefepima. Da mesma maneira a família Enterobacteriaceae mais sensíveis a amicacina e gentamicina (88,89%), ao imipenem (88,24%) e ao levofloxacino (87,50%) com uma resistência acentuada em relação a amoxicilina com clavulanato (50%) e a cefazolina (47,06%). Evidenciando multirresistência das estirpes em 23,33 % (21/90) do isolados. As espécies mais comumente isoladas em quadros de ceratite ulcerativa de cães são *Staphylococcus pseudintermedius* e a *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto diversas são as espécies isoladas nesse acometimento, demonstrando uma diversidade da microbiota ocular capaz de promover infecção. Há alta taxa de resistência e multirresistência associada ao quadro de ceratite ulcerativa, principalmente, a amoxicilina, a ampicilina, a penicilina, a sulfadiazina e trimetropim e a tetraciclina, no entanto, positivamente, essas cepas apresentaram sensibilidade a antimicrobianos usados comumente na oftalmologia veterinária, como a doxiciclina, tobramicina e gentamicina.

Palavras-chave: Cão, córnea, microrganismos, antimicrobianos e Saúde pública.

EVALUATION OF THE RESISTANCE PROFILE OF BACTERIA ISOLATED IN ULCERATIVE KERATITIS IN DOGS

ABSTRACT – Ulcerative keratitis is a common eye condition in dogs that can result in decreased or total loss of vision when not treated properly. The inadvertent use of antimicrobials is a unique health risk as it encourages bacterial resistance and multidrug resistance. The aim of this study was to identify microorganisms present in canine eyes affected by ulcerative keratitis, and to verify the profile of resistance to available antimicrobial drugs. For this purpose, the samples were collected, identified by MALDI-TOF and submitted to the antimicrobial susceptibility test by disc diffusion. Eighty-eight dogs affected by ulcerative keratitis were evaluated, of which 51.81% (43/88) were female and 48.19% (40/88) male, aged between 6 months and 14 years; being 60.24% (50/88) brachycephalic. Of the 83 eyes evaluated, 90.36% (75/88) had a positive culture. Of all the samples identified (90), the Gram-positive corresponded to 63.33% (57/90) and the Gram-negative 36.66% (33/90), predominating the genus *Staphylococcus*, 35.55% (32/90) and *Pseudomonas aeruginosa*, 15.55% (14/90). *Staphylococcus* spp. showing resistance to penicillin (89.29%), sulfadiazine and trimethoprim (60.71%) and tetracycline (67.86%), while doxycycline (88.89%), cefotaxime (85.71%), chloramphenicol (82.14%) and gentamicin and moxifloxacin (78.57%) corresponded to the highest sensitivity rate. *Pseudomonas aeruginosa* was sensitive (100%) to gentamicin and imipenem, and resistant (8.33%) to norfloxacin, ciprofloxacin and cefepime. Likewise, the Enterobacteriaceae family was more sensitive to amikacin and gentamicin (88.89%), imipenem (88.24%) and levofloxacin (87.50%) with a marked resistance to amoxicillin with clavulanate (50%) and cefazolin (47.06%). Showing multidrug resistance of the strains in 23.33% (21/90) of the isolates. The species most commonly isolated in cases of ulcerative keratitis in dogs are *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa*, however there are several species isolated in this condition, demonstrating a diversity of the ocular microbiota capable of promoting infection. There is a high rate of resistance and multidrug resistance associated with ulcerative keratitis, mainly amoxicillin, ampicillin, penicillin, sulfadiazine and trimethoprim and tetracycline, however, positively, these strains showed sensitivity to antimicrobials commonly used in veterinary ophthalmology, such as doxycycline, tobramycin and gentamicin.

Keywords: antimicrobial, dog, cornea, microorganisms and One Health.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. Considerações Gerais	6
CAPÍTULO 2. Prevalência de microrganismos em ceratites ulcerativas e o perfil de resistência em relação aos agentes antimicrobianos disponíveis.....	20
Figura 1. (H1) Distribuição das diferentes espécies bacterianas isoladas no hospital veterinário “Governador Laudo Natel, Jaboticabal – SP” (H2) Distribuição das diferentes espécies bacterianas isoladas no hospital veterinário “Luis Quintiliano de Oliveira, Araçatuba – SP”	28
Figura 2. (A) Perfuração ocular em cão atendido no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel, Jaboticabal - SP”. (B) Colônias de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , pelo método de estriamento por esgotamento em placa com Brain Heart Infusion Ágar. (C) Fotomicrografia da coloração de Gram, cocos agrupados, <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> . (D) Teste de disco difusão do <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	30
Figura 3. Distribuição de susceptibilidade dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. em teste de disco difusão em relação aos princípios antimicrobianos testados.	31
Figura 4. Distribuição de sensibilidade da família Enterobacteriaceae (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Cronobacter</i> sp.) em teste de disco difusão em relação aos princípios antimicrobianos disponíveis.....	32

CAPÍTULO 1. Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Ocorrências oculares são capazes de levar à injúria reversível ou irreversível do sistema visual, entre elas, evidencia-se a ceratite ulcerativa, quadro emergencial capaz de promover dor e perda da acuidade visual dos cães. Os cães portadores da síndrome ocular dos braquicefálicos são predispostos ao desenvolvimento da ceratite ulcerativa devido a alterações anatômicas comumente encontradas, as quais são de etiologia conhecida, como o macrobléfaro, a presença de alterações palpebrais (entrópio e ectrópio), anormalidades ciliares (distiquíase, triquíase e cílio ectópico) e a presença de prega nasal exuberante.

O tratamento das ceratites ulcerativas envolve o uso obrigatório de agentes antimicrobianos, uma vez que a microbiota ocular é capaz de promover infecção do leito da lesão, e assim evitar ou retardar a progressão da doença para casos graves de ceratomalácia e/ou perfuração ocular. Contudo, o uso indiscriminado de antimicrobianos ou a não realização de cultura para a identificação do microrganismo e avaliação da suscetibilidade antimicrobiana podem contribuir com surgimento de resistência bacteriana em inúmeras doenças.

Além disso, tais consequências podem ser amplificadas e intensificadas com uso indevido e excessivo dos princípios ativos disponíveis no mercado, os quais são rotineiramente prescritos na medicina humana e veterinária. Observa-se também a crescente identificação de cepas multirresistentes, presentes até mesmo em infecções simples, sendo ameaça à saúde humana e veterinária, o que torna desafiador o tratamento de qualquer acometimento clínico e oftálmico. Sendo assim, é de extrema importância compreender a prevalência e o perfil de resistência dos microrganismos antes da prescrição medicamentosa, de modo que esta seja adequada e assertiva para cada caso.

Dessa forma, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a prevalência dos microrganismos em olhos de cães acometidos por ceratite ulcerativa, em diversos estágios de evolução, e o perfil de resistência diante dos princípios antimicrobianos disponíveis na medicina veterinária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Córnea

A córnea é uma das estruturas que compõe a túnica fibrosa do olho, é transparente por conta da ausência de vasos sanguíneos, pigmentação e queratinização epitelial. Ela possui uma rede de colágeno estromal extremamente organizada e fibras colágenas de pequeno diâmetro, que também contribuem com a transparência (GOLDMAN et al., 1968; WHITLEY; HAMOR, 2021). A principal função da córnea está intimamente relacionada com a refração da luz, cuja transparência permite que a luz atravesse com qualidade e quantidade suficiente para a formação da imagem junto a retina (WHITLEY; HAMOR, 2021). Histologicamente, ela é composta por quatro camadas, sendo elas o epitélio corneano, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (NAUTSCHER et al., 2016).

O epitélio é do tipo pavimentoso, estratificado escamoso e não queratinizado, composto por células basais, aladas e escamosas; e em carnívoros ele é menos espesso que em herbívoros (MILLER, 2017; NAUTSCHER et al. 2016). Abaixo dele, há a membrana basal, uma estrutura que permite a adesão do epitélio ao estroma pela presença de hemidesmossomos e fibras colágenas (MEEKINS, 2021). O epitélio possui um conjunto de proteínas como as citoqueratinas, que são essenciais para a manutenção da integridade epitelial (SUNDSTRÖM, 1994), além de possuir um ciclo constante de renovação, onde a proliferação de células na camada basal e a migração centrípeta de células tronco do limbo substituem as células que descamam na superfície (CENEDELLA; FLESCHNER, 1990).

O estroma, por sua vez, compreende a maior parte da espessura total da córnea, constituído por água, fibrilas de colágenos do tipo I e tipo V, ceratócitos, nervos e componentes da matriz extracelular como os proteoglicanos e glicosaminoglicanos (MAGGS et al., 2017; KIERSZENBAUM, TRES., 2019). O estroma permanece em relativo estado de desidratação, a deturgência, esse processo ocorre devido à alta afinidade dos glicosaminoglicanos pela água (NAUTSCHER et al., 2016; WHITLEY; HAMOR, 2021). O epitélio e o endotélio são as estruturas responsáveis por esse processo; quando íntegros, são capazes de utilizar de

mecanismos como, bombas fisiológicas e canais especializados, as aquaporinas, para realizar a remoção da água no estroma através da movimentação de íons (ARNDT et al., 2001; KARASAWA et al., 2011; NAUTSCHER et al., 2016; WHITLEY; HAMOR, 2021).

As fibras colágenas presentes no estroma são principalmente as do tipo I e V, e o espaçamento das fibrilas é um dos principais fatores para a manutenção da transparência corneana (MEEKINS, 2021). Os ceratócitos, são as células responsáveis pela formação e manutenção das lamelas de colágeno da matriz extracelular no estroma, produzindo um conglomerado de glicoproteínas, sulfato de condroitina e sulfato de queratan, os quais proporcionam a característica hidrofílica desta porção da córnea (KIERSZENBAUM; TRES, 2019).

Na camada mais profunda, a membrana de Descemet e o endotélio formam uma linha fina e densa (FAMOSE et al. 2014), a membrana é uma estrutura de propriedades elásticas (MEEKINS, 2021). O endotélio então, é a camada mais interna da córnea, constituído por uma camada unicelular e tem como principal função a manutenção da deturgência. As células do endotélio possuem numerosas organelas como as mitocôndrias e os retículos endoplasmático liso e rugoso, que são responsáveis pela produção energética; elas são nutridas pelo humor aquoso, enquanto outras porções da córnea são nutridas pelo filme lacrimal, atmosfera, e capilares provenientes do limbo e da conjuntiva (MEEKINS, 2021).

A inervação da córnea é um fator importante para a manutenção da estrutura bem como para a proteção contra possíveis traumas, uma vez que ela é uma barreira do organismo em relação ao ambiente (BURTON, 1992). Do nervo trigêmeo (V par de nervo craniano) saem ramificações nervosas como, os troncos nervosos estromais da córnea, plexo nervoso sub-epitelial e sub-basal (CHANG-LING, 1989; MARFURT 2001). Perdas estruturais podem ser provocadas por lesões, traumas e infecções, sendo a ceratite ulcerativa uma das principais afecções que afetam a córnea em diferentes proporções.

2.2. Ceratites ulcerativas em cães

As ceratites ulcerativas são ocorrências comumente observadas na prática clínica da oftalmologia veterinária. Elas consistem na perda da camada epitelial da córnea e de porções variáveis do estroma, provocando desconforto ocular intenso, com a possibilidade de perda visual temporária ou permanente do paciente, se não for reconhecida e tratada (ACOSTA et al., 2014; O'NEILL et al., 2017). Alguns fatores predisponentes podem estar correlacionados a etiologia das ceratites ulcerativas, como idade, obesidade e raça, bem como a doenças sistêmicas associadas, além de anormalidades palpebrais (entrópio e ectrópio), lagoftalmia, anormalidades ciliares (triquíases, distiquíases e cílios ectópicos) ceratoconjuntivite seca, corpos estranhos e/ou traumas (CHIDAMBARAM et al., 2007; WHITLEY; HAMOR, 2021; JAMES-JENKS et al., 2023).

As úlceras são classificadas de acordo com a perda tecidual que elas apresentam, desta maneira, a ceratite ulcerativa pode ser superficial, estromal, ceratomalácea, descemetocelose e perfuração ocular (WHITLEY; HAMOR, 2021).

A ceratite ulcerativa superficial ocorre quando há perda do epitélio corneano, quadro clínico capaz de gerar dor intensa, devido a maior densidade de nervos que existem nessa camada da córnea. São danos simples que geralmente cicatrizam em até sete dias, salvo complicações como infecção bacteriana ou defeito epitelial corneano espontâneo crônico (HEIDI et al., 2013; BELKNAP, 2015).

A ceratites estromais cursam com a perda do epitélio e porções variáveis do estroma, que de acordo com a porcentagem de perda estromal, podem ser intermediárias ou profundas, usualmente a ocorrência delas advém de uma progressão da ceratite ulcerativa superficial comumente acompanhadas por infecção bacteriana. (TSVETANOVA et al. 2021; SUTER et al. 2018). Esses quadros demandam tratamento imediato, assertivo e exaustivo para controlar o quadro e prevenir as complicações (WHITLEY; HAMOR, 2021). São úlceras que podem evoluir negativamente para um quadro de queratomalácia, que usualmente acontece devido a degradação acentuada da matriz extracelular estromal e desequilíbrio enzimático entre as proteases, como as collagenases, elastases, metaloproteinases, catepsinas e os inibidores de proteinases, as quais atuam em corrigir ínfimas opacidades ocasionadas por desorganização quando necessária, mantendo-a transparente (OLLIVIER et al. 2015; GUYONNET et al., 2020). Alguns microrganismos são capazes

de promover esse quadro por produzirem e liberarem estas mesmas enzimas (MATSUMOTO et al. 2004).

A descemetocelose, por sua vez, é uma lesão profunda da córnea, onde há perda total de epitélio e estroma corneano. Desta maneira, expõe a membrana de descemet, que apesar de ser resistente e elástica pode se romper, com a iminência de perfuração corneana (HEIDI et al., 2013). A característica hidrofóbica da membrana de Descemet não permite que ocorra impregnação dessa camada pelo corante de fluoresceína, o que auxilia no reconhecimento dessa condição clínica durante o exame oftalmológico, em que se evidencia uma fina membrana de aspecto escurecido no fundo do defeito corneano, ou como uma bolha projetada para o meio externo devido à pressão intraocular (SLATTER, 2005; SAMPAIO et al., 2017).

A ocorrência de uma lesão de espessura total causa a perfuração ocular, provocando então a perda de humor aquoso, redução ou colapso da câmara anterior, perda do diâmetro pupilar, sinequia anterior e prolapso de íris. Tais alterações são considerados quadros graves, os quais podem evoluir para endoftalmite e perda permanente da visão do animal (AMORIM et al., 2018).

2.3. Microbiota ocular e tratamento em quadros de ceratite ulcerativa

A microbiota ocular, assim como a microbiota de outras regiões do corpo (VANGRINSVEN, 2021; SUCHODOLSKI, 2022), consiste em um conjunto de microrganismos que vivem de maneira comensal, sendo importantes para a manutenção da integridade ocular bem como evitar o crescimento excessivo de outros microrganismos considerados patogênicos (ARMSTRONG, 2000).

A presença desse conjunto de bactérias depende de diversos fatores, entre eles, localização geográfica, clima, locais de amostragem, tratamento prévio com antimicrobiano e estágio evolutivo do agravo (PRADO et al., 2005; TOLAR et al 2006; SUTER et al., 2018). O potencial da microbiota em promover a contaminação do leito da ceratite ulcerativa depende de condições como o estado imunológico do paciente, a virulência e a presença de outros agentes (WHITLEY, 2021; JAMES-JENKS et al., 2023); uma vez que a córnea em condições normais, é capaz de prevenir a infecção por mecanismos anatômicos, imunológicos e microbiológicos (LEDBETTER et al.,

2013). Tendo essa discussão como base, sugere-se que a infecção das úlceras corneais resulta da presença da microbiota ocular (AUTEN et al., 2019).

Diversas são as causas que podem influenciar a infecção pela microbiota ocular, como também a prevalência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, destacando o *Staphylococcus* spp., o *Streptococcus* spp. e o *Bacillus* spp. (PRADO et al., 2005; HINDLEY et al., 2016; TSVETANOVA et al., 2021) e a *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente; sendo o *Staphylococcus* spp. e a *Pseudomonas aeruginosa* as espécies mais prevalentes (VERDENIUS et al., 2022). Tais observações são visualizadas inclusive em oftalmopatias humanas (FREITAS. et al. 2022). No entanto, a presença de bactérias Gram-negativas comensais de outros locais, como por exemplo, o trato intestinal também é descritas e comumente associado com quadros graves desse acometimento (TSVETANOVA et al., 2021)

Quando a infecção se inicia, para um tratamento bem-sucedido é necessário o uso apropriado do antimicrobiano, que deve ser escolhido baseado na cultura e em testes de suscetibilidade a antibióticos (LEDBETTER et al., 2013; Whitley; Hamor 2021). Contudo, no período entre a coleta da amostra e a disponibilidade dos resultados, a conduta clínica adotada é a administração de um antimicrobiano de amplo espectro para possível controle da infecção. Entretanto, o uso de antimicrobianos ineficazes podem contribuir para a evolução de quadros complexos de difícil manejo que, quase sempre, incitam o surgimento de resistência bacteriana (PAPICH et al., 2013).

A abordagem clínica e a prescrição de antimicrobianos podem variar, sendo a monoterapia antimicrobiana a conduta escolhida para os casos de úlceras simples e superficiais. O uso combinado com mais de um princípio ativo ocorre quando há quadros de lesões ulcerativas graves, ou seja, com sinais aparentes de infecção (GUYONNET et al., 2020).

2.4. Resistência bacteriana

A resistência bacteriana aos princípios ativos existentes é um problema e uma preocupação recorrente na oftalmologia veterinária, face à diversidade de bactérias patogênicas e não patogênicas, e o impacto na saúde única. Por isso, o

monitoramento do perfil de resistência é de extrema importância, uma vez que serve como indicador epidemiológico e terapêutico no controle das infecções e das ceratites ulcerativas, além de prevenirem diversas situações de riscos, como a infecção por bactérias multirresistentes ao homem (SOIMALA et al., 2020).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos ocorre em escala mundial e, em sua maioria, devido aos variados mecanismos de mutações genéticas das bactérias, representando um risco importante na resolução de quadros de infecções sistêmicas (VENTOLA. 2015). Por certo, vários são os fatores capazes de contribuir com a resistência bacteriana entre patógenos oculares, como, prescrição empírica de antibióticos e exposição curta e repetida a antimicrobianos, que são identificados como contribuintes para a resistência de patógenos oculares e por alterar a microbiota ocular (DAVE. 2013).

MEDICINA INTEGRATIVA

Sendo assim, observa-se que a suscetibilidade aos antimicrobianos do gênero *Staphylococcus* é variável, e comumente podemos observar que cepas resistentes são selecionadas após o uso de antimicrobianos sem a utilização de cultura e antibiograma, porque são capazes de promover um frequente desenvolvimento e rápida disseminação de resistência. É possível observar cepas de *Staphylococcus* sp. resistentes a diversos princípios ativos, bem como a poliximixina B e cefalotina (Jeremy et al., 2020), e conferir inclusive altas taxas de resistência a fluorquinolonas como a ciprofloxacina (FREITAS et al., 2022).

Em um estudo humano, a taxa de resistência de *S. aureus* isolados é ainda mais alarmante, conferindo alta resistência *in vitro* a diversos princípios como azitromicina, ciprofloxacina e metilicina, e menores taxas a outros antimicrobianos como a tobramicina, clindamicina, cloranfenicol, trimetropim e tetraciclina (THOMAS et al., 2019). Em concordância a estes resultados, outro estudo evidenciou que microrganismos Gram-positivos que foram submetidos a teste com a vancomicina se apresentaram sempre susceptível ao antimicrobiano, enquanto os Gram-negativos foram sensíveis da mesma maneira a amicacina (FREITAS et al., 2022).

Em estudo de Thomas et. al (2019) o monitoramento de resistência bacteriana em superfícies oculares observou altos níveis de resistência a antimicrobianos que são comumente usados, principalmente entre os isolados de *Staphylococcus* sp. onde pouco menos da metade eram resistentes a metilicina. Em análise à resistência de

diversos antimicrobianos, observou-se que aproximadamente dois em cada cinco isolados de *Staphylococcus* sp. e aproximadamente três em cada quatro isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) ou *Staphylococcus coagulase negativa* resistentes a meticilina (MRCoNS) foram resistentes *in vitro* a três ou mais classes de antibióticos.

O surgimento de cepas de *Pseudomonas* sp. resistentes a fluorquinolonas também tem sido uma constante preocupação tanto na medicina humana como na veterinária. Oldenburg e colaboradores (2013) constataram que a proporção de organismos resistentes se elevou de 19% para 52% em dois anos, e notaram que a cada ano, há um aumento de duas vezes nas chances da obtenção de um isolado de *Pseudomonas* sp. resistente a fluorquinolonas.

Mesmo que ocorram semelhanças entre as investigações, ainda assim há diferenças consideráveis na prevalência e susceptibilidades bacterianas em todo o mundo, inclusive diferenças entre regiões geográficas em um mesmo país (PRADO, 2005; AUTEN et al., 2020). Sendo assim, uma avaliação direcionada das populações locais ou regionais é importante para que se possa determinar os agentes e a susceptibilidade antimicrobiana dos microrganismos, visto que o uso indiscriminado de princípios ativos pode comprometer a terapia farmacológica adotada, independente da ocorrência e da gravidade de cada caso (HEWITT et al., 2020).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Isolar e identificar microrganismos coletados de ceratites ulcerativas de cães e determinar perfil de susceptibilidade destes aos princípios antimicrobianos disponíveis para o uso veterinário.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar e identificar os microrganismos presentes em ceratites ulcerativas de cães;

- Determinar o perfil de resistência dos microrganismos encontrados a antimicrobianos disponíveis e utilizados na medicina veterinária;
- Correlacionar a incidência da úlcera de córnea com as raças e idades; (gráfico)
- Avaliar a correlação entre o perfil microbiano e as diferentes regiões geográficas amostradas, Araçatuba-SP e Jaboticabal-SP.

4. REFERÊNCIAS

- Acosta L, Castro M, Fernandez M, Oliveres E, Gomez-Demmel E, Tartara L. (2014) Treatment of corneal ulcers with platelet rich plasma. **Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia**. 89:48–52.
- Alkatan HM, Al-essa RS (2019) Challenges in the diagnosis of microbial keratitis: A detailed review with update and general guidelines. **Saudi Journal of Ophthalmology**. 33:268-276.
- Almubrad T, Akhtar S. (2012) Ultrastructure features of camel cornea–collagen fibril and proteoglycans. **Veterinary Ophthalmology**. 15:36–41.
- Armstrong RA (2000) The microbiology of the eye. **Ophthalmic Physiological Optics**. 20:429-441.
- Auten CR, Urbanz JL, Dees DD (2020) Comparison of bacterial culture results collected via direct corneal ulcer vs. conjunctival fornix sampling in canine eyes with presumed bacterial ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**. 23:135-40.
- Bag S, Saha B, Mehta O, Anbumani D, Kumar N et al. (2016) An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. **Scientific Reports**. 6:1-9.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology** 45:493-496.
- Burton H. (1992) Somatic sensation from the eye. In: Adler's Physiology of the Eye, 9th edn. (ed. Hart Jr WM) Mosby Year Book, St. Louis, 71–100
- Cabrera-Aguas M, Khoo P, George CRR, Lahra MM, Watson SL (2020) Antimicrobial resistance trends in bacterial keratitis over 5 years in Sydney, Australia. **Clinical and Experimental Ophthalmology**. 48:183-191.
- Chang-Ling T. (1989) Sensitivity and neural organisation of the cat cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 30: 1075–1082
- Chidambaram J. (2007) Recent advances in the diagnosis and management of bacterial keratitis. **International Ophthalmology Clinics**. 47:1–6.

China B, Pirson V, Mainil J (1996) Typing of Bovine Attaching and Effacing Escherichia coli by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. **Applied and environmental microbiology**. 62:3462-3465.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2023). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. (CLSI document VET01-A4). CLSI, Wayne, PA.

Dave SB, Toma HS, Kim SJ. (2023) Changes in ocular flora in eyes exposed to ophthalmic antibiotics. **Ophthalmology**. 120:937-941.

De Freitas CS, Mesquita MO, Sasaki MSK, Azevedo AZ, Veloso, AWCA. et al. (2022) Trends in the epidemiological and microbiological profiles of infectious keratitis in southeastern Brazil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**.

Doughty MJ. (2003) A physiological perspective on the swelling properties of the mammalian corneal stroma. **Contact Lens & Anterior Eye**. 26: 117–129.

Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C (2012) Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. **Indian Journal of Medical Research**. 135:389-96.

Famose F. (2014) Assessment of the use of spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) for evaluation of the healthy and pathological cornea in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**. 17(1):12-22.

Freiwald A, Sauer S (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature protocols**. 4:732-742.

Guyonnet A, Desquillet L, Faure J, Bourguet A, Donzel E et al. (2020) Outcome of medical therapy for keratomalacia in dogs. **Jornal Small Animal Practice**. 61:253 8.

Hewitt JS, Allbaugh RA, Kenne DE, Sebbag L (2020) Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates From Dogs With Ulcerative Keratitis in Midwestern United States. **Frontiers in veterinary science**. 7:583965.

Hindley KE, Groth AD, King M (2015) Bacterial isolates, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics of bacterial keratitis in dogs presenting to referral practice in Australia. **Veterinary Ophthalmology**. 19:418-26.

James-Jenks EM, Pinard CL, Charlebois PR, Monteith G. (2023) Evaluation of corneal ulcer type, skull conformation, and other risk factors in dogs: A retrospective study of 347 cases. **The Canadian Veterinary Journal**. 64(3):225-234.

- Kafarnik C, Fritsche J, Reese S. (2008) Corneal innervation in mesocephalic and brachycephalic dogs and cats: assessment using in vivo confocal microscopy. **Veterinary Ophthalmology**. 11(6):363-7. 2014)
- Kumar R, Yadav BR, Singh RS (2010) Genetic determinants of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus isolates from milk of mastitic crossbred cattle. **Current Microbiology**. 60:379-86.
- Ledbetter EC, Gilger BC (2013) Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: **Veterinary Ophthalmology**, fifth Edition. (Gelatt K.N.) Wiley-Blackwell, Iowa, p, 976-1049.
- Leis ML, Costa MO (2019) Initial description of the core ocular surface microbiome in dogs: bacterial community diversity and composition in a defined canine population. **Veterinary Ophthalmology**. 22:337-44.
- Marfurt C, Murphy C, Floraczek JL. (2001) Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 42: 2242–2251.
- Matsumoto K. (2004) Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. **Journal of Biological Chemistry**. 385(11):1007-1016.
- Maurice DM. (1957) The structure and transparency of the cornea. **The Journal of Physiology**. 136: 263–286.5.
- Mckeever, JM, Ward DA, Hendrix DVH (2021) Comparison of antimicrobial resistance patterns in dogs with bacterial keratitis presented to a veterinary teaching hospital over two multi-year time periods (1993-2003 and 2013-2019) in the Southeastern United States. **Veterinary Ophthalmology**. 24:653-658.
- Meek KM, Fullwood NJ. (2001) Corneal and scleral collagens—amicroscopist's perspective. **Micron** 32: 261–272.
- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. (2000) Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**. 38:1032 5.
- O'Neill DG, Lee MM, Brodbelt DC, Church DB, Sanchez RF. (2007) Corneal ulcerative disease in dogs under primary veterinary care in England: epidemiology and clinical management. **Canine Genetics and Epidemiology**. 4:1– 12.

- Oldenburg CE, Lalitha P, Srinivasan M, Rajaraman R, Ravindran M et al. (2013) Emerging moxifloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis isolates in South India. **Ophthalmology Epidemiology**. 20:155- 8.
- Ollivier FJ (2003) Bacterial corneal diseases in dogs and cats. **Clinical Techniques Small Animal Practice**. 18:193-8.
- Ollivier FJ, Gilger BC, Barrie KP, et al. (2007) Proteinases of the cornea and preclear tear film. **Veterinary Ophthalmology**. 10(4):199-206.
- Papich MG (2013) Antimicrobials, susceptibility testing, and minimum inhibitory concentrations (MIC) in veterinary infection treatment. The Veterinary Clinics of North America. **Small Animal Practice**. 43:1079-1089.
- Pedler C. (1962) The fine structure of the corneal epithelium. **Experimental Eye Research**. 1: 286–289
- Prado MR, Rocha MFG, Brito EHS. et al. (2005) Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Veterinary Ophthalmology**. 8:33-37.
- Rogers, Callie M. Scott, Erin M. Sarawichitr, Benjamin; Arnold, Carolyn; Suchodolski, Jan S.; Clegg, Simon (2020). Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in ophthalmologically normal dogs prior to and following treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. **PLOS ONE**, v.15, n.6, e0234313
- Soimala T, Lübke-Becker A, Hanke D, Eichhorn I, Feßler AT, Schwarz S, et al. (2020) Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from ocular surfaces of dogs and cats suffering from ophthalmological diseases. **Veterinary Microbiology**. 244:108687.
- Suchodolski JS. (2022) Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**. 50 Suppl 1:6-17.
- Sundström BE, Stigbrand TI. (1994) Cytokeratins and tissue polypeptide antigen. **The International Journal of Biological Markers**. 9(2):102-108.
- Suter A, Voelter K, Hartnack S, Spiess BM, Pot SA. (2018) Septic keratitis in dogs, cats, and horses in Switzerland: Associated bacteria and antibiotic susceptibility. **Veterinary Ophthalmology**. 21(1):66-75.

Thomas RK, Melton R, Asbell PA (2019) Antibiotic resistance among ocular pathogens: current trends from the ARMOR surveillance study (2009-2016). **Clinical Optometry**. 11:15-26.

Tolar EL, Hendrix DV, Rohrbach BW, Plummer CE, Brooks DE, Gelatt KN. (2006) Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with bacterial keratitis: 97 cases (1993– 2003) **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 228(1):80-85.

Towner, KJ., Alobot DCS, Curran R, Webster CA, Humphreys H. (1998). Development and evaluation of a PCR-based immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**. 47:607–613.

Tsvetanova A, Powell RM, Tsvetanov KA, Smith KM, Gould DJ. (2021) Melting corneal ulcers (keratomalacia) in dogs: A 5-year clinical and microbiological study (2014–2018). **Veterinary Ophthalmology**. 24(3):265-278

Vangrinsven E, Fastrès A, Taminiau B, Frédéric B, Daube G, Clercx C. (2021) Variations in facial conformation are associated with differences in nasal microbiota in healthy dogs. **BMC Veterinary Research**. 17(1):361.

Ventola CL (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**. 40:277-283.

Whitley RD, Hamor RE (2021) Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera in *Veterinary Ophthalmology*. Sixth Edition. (Ed. by Kirk N. Gelatt, Gil Ben-Shlomo, Brian C. Gilger, Diane V.H. Hendrix, Thomas J. Kern, and Caryn E. Plummer). **Wiley-Blackwell**. Hoboken.1082-1172.

CAPÍTULO 2. Prevalência e resistência bacteriana em isolados de ceratites ulcerativas em cães.

Pamella Almeida Freire Casemiro^{1*}, Alexandre Lima de Andrade², Marita Vedovelli Cardozo³, Romário Alves Rodrigues⁶, Jaqueline Alves da Silva¹, Márcia Marinho⁵, Alessandra Figueiredo de Castro Nassar⁴, Vanessa Castro⁴, Ivan Ricardo Martinez Padua¹, Paola Castro Moraes¹

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV, UNESP, Jaboticabal, Brasil.

²Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal, FMVA-UNESP, Araçatuba, Brasil.

³Departamento de Ciências Biomédicas e Saúde, UEMG, Passos, Brasil

⁴Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal- Laboratório de Bacteriologia Geral. Instituto Biológico, São Paulo, Brasil

⁵ Departamento Produção e Saúde Animal, FMVA, UNESP, Araçatuba, Brasil.

⁶Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde única, FCAV, UNESP, Jaboticabal, Brasil.

* Autor correspondente. Endereço de e-mail: pamella.casemiro@unesp.br

Resumo: RESUMO – Ceratite ulcerativa é um quadro ocular comum em cães que pode resultar em diminuição ou perda total da visão quando não são tratadas adequadamente. O uso inadvertido de antimicrobianos é um risco a saúde única por incitar a resistência e multirresistência bacteriana. Portanto, o isolamento e a identificação dos microrganismos, e a avaliação da susceptibilidade antimicrobiana são essenciais para o tratamento adequado. O objetivo desse estudo foi identificar microrganismos presentes em olhos caninos acometidos por ceratites ulcerativas, e verificar o perfil de resistência aos fármacos antimicrobianos disponíveis. Para tanto as amostras foram colhidas, identificadas por MALDI-TOF e submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana por disco difusão. Foram avaliados 88 cães acometidos por ceratites ulcerativas, destes, 50% (44/88) eram fêmeas e 50% (44/88) machos, com idades entre 6 meses e 14 anos; sendo 74,48% (50/83) braquicefálicos. Dos 88 olhos avaliados, 90,90% (80/88) tiveram cultura positiva, em que 11,33% (10/88) das amostras isolaram-se mais de uma espécie de bactéria. De todas as amostras foram identificadas (90), as Gram-positivas corresponderam à 63,33% (57/90) e as Gram-negativas 36,66% (33/90), predominando o gênero *Staphylococcus* spp., 35,55% (32/90) e *Pseudomonas aeruginosa*, 15,55% (14/90). *Staphylococcus* spp. apresentando resistência a penicilina (89,29%), a sulfadiazina e trimetropim (60,71%) e a tetraciclina (67,86%), enquanto a doxiciclina (88,89%), a cefotaximina (85,71%), o cloranfenicol (82,14%) e a gentamicina e o moxifloxacino (78,57%), corresponderam a maior taxa de sensibilidade. *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível (100%) à gentamicina e ao imipenem, e resistência (8,33%) norfloxacino, ciprofloxacino e cefepima. Da mesma maneira a família Enterobacteriaceae mais sensíveis a amicacina e gentamicina (88,89%), ao imipenem (88,24%) e ao levofloxacino (87,50%) com uma resistência acentuada em relação a amoxicilina com clavulanato (50%) e a cefazolina (47,06%). Evidenciando multirresistência das estirpes em 23,33 % (21/90) do isolados. As espécies mais comumente isoladas em quadros de ceratite ulcerativa de cães são *Staphylococcus pseudintermedius* e a *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto diversas são as espécies isoladas nesse acometimento, demonstrando uma diversidade da microbiota ocular capaz de promover infecção. Há alta taxa de resistência e multirresistência associada ao quadro de ceratite ulcerativa, principalmente, a amoxicilina, a ampicilina, a penicilina, a sulfadiazina e trimetropim e a tetraciclina, no entanto, positivamente, essas cepas apresentaram sensibilidade a antimicrobianos usados comumente na oftalmologia veterinária, como a doxiciclina, tobramicina e gentamicina.

Palavras-chave: Cão, córnea, microrganismos, antimicrobianos e One health.

1. INTRODUÇÃO

Diversas doenças são capazes de acometer a saúde ocular dos cães, como conjuntivites, glaucoma, uveítes, catarata. As ceratites ulcerativas, também são um importante motivo da perda da acuidade visual em cães.¹⁻⁷ As ceratites ulcerativas podem estar relacionadas a diversos fatores de predisposição (raça, idade e peso) e etiologias, como doenças sistêmicas, anormalidades palpebrais, alterações ciliares, diminuição da produção e qualidade lacrimal, traumas e presença de corpos estranhos.⁸⁻¹⁴

A superfície ocular, semelhantemente a outras partes do corpo, possui uma microbiota que vive em harmonia,¹⁵ que pode variar devido à diversos fatores, como localização geográfica, clima, tratamento prévio com antimicrobiano e estágio evolutivo da enfermidade.¹⁶⁻¹⁸ Da mesma maneira, o potencial da microbiota de proporcionar a contaminação da úlcera de córnea depende de fatores como estado imunológico do paciente, virulência do agente microbiano e presença de outros patógenos.^{19,20}

Ainda assim, existe concordância sobre existir uma prevalência maior de bactérias Gram-positivas em relação as bactérias Gram-negativas na microbiota ocular,^{16, 20-22} sendo o isolado mais comum *Staphylococcus* sp.,^{21,23} seguido por outras bactérias como *Streptococcus* spp. e *Bacillus* spp..^{16,24} Outra anuência da literatura é o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*, principal bactéria Gram-negativa frequentemente isolada em olhos caninos.^{18,21,24} Desta forma, a literatura tem evidenciado a importância dos microrganismos comensais na ocorrência dessas infecções, e a tendência da evolução do agravo para casos graves.²¹

O tratamento da ceratite ulcerativa envolve o uso de agentes antimicrobianos,^{25,26} assim a identificação do agente etiológico é um fator essencial para a eficácia do tratamento.²⁴ O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos associado a falta de exames microbiológicos, bem como a defasagem da identificação dos microrganismos tem contribuído para resistência bacteriana.²⁷⁻²⁹ Consequentemente, o aparecimento de cepas multirresistentes têm se tornado comum na medicina humana e veterinária, dificultando o tratamento de pacientes críticos, e sendo também um problema crescente e desafiador à Saúde Única.³⁰⁻³⁵

Assim, objetivou-se com esse estudo identificar os microrganismos presentes em cães com ceratite ulcerativa em diversos estágios de evolução, bem como caracterizar fenotipicamente os isolados bacterianos e avaliar a resistência bacteriana frente aos principais antimicrobianos disponíveis para o uso veterinário.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos Éticos

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal – SP, e aprovado pelo protocolo 3392/22.

2.2. Obtenção das amostras

As amostras para a realização deste estudo foram obtidas por meio de *swab* estéril, em região de saco conjuntival de cães, mantido em meio de transporte Stuart.

Estes pacientes eram provenientes da rotina de atendimentos em serviço especializado de oftalmologia veterinária dos hospitais veterinários nas cidades de Araçatuba-SP (FMVA) e Jaboticabal-SP (FCAV) da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Como critério de inclusão, selecionaram-se pacientes com presença de ceratite ulcerativa confirmada pelo teste de tingimento da fluoresceína, de diferentes graus de progressão (superficial, estromal, descemetocel, ceratomalácia ou perfuração ocular), além de presença de sinais de envolvimento bacteriano (exsudato mucopurulento, infiltrado celular estromal e/ou progressão do quadro).

2.3. Cultivo, Isolamento e identificação por MALDI-TOF

No laboratório de Microbiologia Veterinária, as amostras foram transferidas para meio Brain Heart Infusion Broth (Kasvi®) e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, as colônias foram submetidas ao teste morfotintorial diferencial de Gram e

microscopia. A confirmação da espécie das amostras foi realizada por meio da técnica de espectrofotometria de massa, com o equipamento MALDITOF Biotyper (Bruker Daltonics). O protocolo utilizado para preparo das bactérias para realização da técnica foi de acordo com o estabelecido por Freiwald e Sauer (2008 e 2009). Para realização da técnica, foi necessária a prévia purificação das amostras, utilizando-se etanol 100% (PA), ácido fórmico 70% e acetonitrila pura.

Em seguida, uma alíquota de cada amostra previamente purificada, foi transferida para a placa alvo “BC” de aço polido “MSP 96” (Microflex LT, Bruker Daltonics/ BD, Alemanha, EUA) e, após a 1 minuto para rápida secagem, foi adicionada a matriz [ácido ciano-4- hidroxicinâmico (HCCA)]. Posteriormente, os espectros de massa resultantes foram analisados e comparados com os espectros de referência. A identificação bacteriana quanto ao gênero e espécie foi analisada de acordo com valores em escores: se o valor do escore resultante fosse entre 2.300-3.000, indicava que a amostra possuía alta probabilidade de ser a espécie identificada; valores entre 2.000- 2.299, a identificação do gênero foi segura e a espécie, provável; valores entre 1.700- 1.999, somente a identificação do gênero foi provável; e valores entre 0,000-1.699, sugere que a identificação não foi confiável, pois indica provável contaminação da amostra.

2.4. Teste de disco difusão

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo método de disco difusão estabelecido por Bauer et al. (1966). Os inóculos foram preparados em tubos contendo 3 mL de solução salina 0,85%, e ajustado quando a turbidez por espectrofotometria “BioPhotometer Plus, OD600nm” a 0,1 a 0,2 nm. Posteriormente, esse inóculo foi semeado com auxílio de um swab estéril em placas contendo Mueller-Hinton Ágar (Kasvi®) e logo após, foram adicionados nessa placa os discos contendo os princípios ativos de antimicrobianos selecionados (Quadro 1). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e, posteriormente, os halos de inibição foram medidos e classificados como sensíveis, resistentes ou de sensibilidade intermediária, utilizando os parâmetros adotados pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023).

Quadro 1. Classificação dos antimicrobianos selecionados para a realização do teste de disco difusão

Classe	Sub-Classe	Agentes antimicrobianos
Aminoglicosídeos		Amicacina
		Gentamicina
		Neomicina
		Tobramicina
Cefalosporinas	1° Geração	cefadroxila
		Cefalexina
		Cefalotina
		Cefazolina
	2° Geração	Cefoxitina
	3° Geração	Ceftiofur
		Ceftriaxona
		Cefotaxima
4° Geração	Cefepima	
Carbapnem		Imipenem
Penicilina		Ampicilina
		Amoxicilina
		Amoxicilina com clavulanato de potássio
		Oxalacina
		Penicilina G
Cloranfenicol		Cloranfenicol
Lincosamina		Clindamicina
Fluorquinolonas	2° Geração	Ciprofloxacino
		Enrofloxacino
		Norfloxacino
		Ofloxacino
	3° Geração	Levofloxacino
		Moxifloxacino
Inibidores de folato		Sulfadiazina e Trimetopim
Tetraciclina		Doxiciclina
		Tetraciclina
Polimixina		Polimixina B
Nitroimidazólicos		Metronidazol

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram previamente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como todos os dados testados apresentaram distribuição não-paramétricas, utilizou-se o teste de Wilcoxon para o teste de hipóteses.

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para testar similaridade dos grupos com e sem tratamento prévio em relação as espécies de Bactérias identificadas. Ademais, também se utilizou a PCA para analisar a similaridade dos grupos de animais de cada cidade (Jaboticabal e Araçatuba) com relação as espécies de bactérias. A PCA é um dimensionamento gráfico no qual o agrupamento dos indivíduos dos grupos amostrais é feito por similaridade. Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa de software R® (versão 4.2.2, 2022), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

Foram avaliados 88 cães acometidos por ceratites ulcerativas (88 olhos). Desses, 50% (44/88) eram machos e 50,00% (44/88) eram fêmeas, com idades entre seis meses e 14 anos. Os cães braquicefálicos (67,05%) representaram a maior parte da população estudada (59/88), sendo a raça Shih-tzu (66,10%) a mais frequentemente observada (39/59) (Apêndice 1.). E nesses animais, a gravidade da infecção apresentou significância estatística quando testada a hipótese de que dependendo da raça (braquicefálico e não braquicefálico) a infecção nos animais braquicefálicos apresentaram quadros de maior gravidade (p valor = 0,01). No entanto, não houve significância estatística quando relacionada a faixa de idade dos animais (p valor = 0,89) e a gravidade da infecção.

Durante o exame oftalmológico dos cães, notaram-se quadros de ceratites ulcerativas em diversos estágios de evolução e, dos 88 olhos avaliados e amostras coletadas, 90,90% (80/88) tiveram cultura positiva, enquanto em 9,10% (8/88), não se observou crescimento. Das amostras que apresentaram cultura positiva, 11,33% (10/88) apresentaram mais de uma espécie de crescimento bacteriano, totalizando assim 90 espécies diferentes isoladas.

De todas as amostras identificadas (90), as bactérias Gram-positivas corresponderam à 63,33% (57/90) e as Gram-negativas 36,67% (33/90), predominando o gênero *Staphylococcus* spp., 35,55% (32/90) e a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, 14,44% (13/90) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de microrganismos bacterianos em relação ao tipo de ceratite ulcerativa.

Ceratites (n)		Superficial	Estromal	Descemetocel	Ceratomalácia	Perfuração ocular
Bactérias (n)						
Gram-positivas (57)	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	9	4	2	3	3
	<i>Staphylococcus delphini</i>	3				1
	<i>Staphylococcus hominis</i>	1				
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2		1		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2				
	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2		2	2
	<i>Enterococcus irae</i>			1		
	<i>Enterococcus avium</i>	1				1
	<i>Streptococcus canis</i>	1	1		1	
	<i>Streptococcus minor</i>	1	1			
	<i>Micrococcus luteus</i>	2				1
	<i>Bacillus cereus</i>	1	2			
	<i>Corinebacterium auriscanis</i>		1			
	<i>Aerococcus viridans</i>					1
	<i>Glutamicibacter creatinolyticus</i>					1
	Gram-negativas (33)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	4	1	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		3	1		1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>		1	1			
<i>Enterobacter cancerogenus</i>						1
<i>Eschechia coli</i>		2	1			3
<i>Proteus mirabilis</i>		1			1	
<i>Cronobacter sp.</i>		1				

Destaca-se a diferença entre o perfil epidemiológico das bactérias presentes nessas lesões entre as duas cidades avaliadas (Figura 1.), onde, os isolados de *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus spp.* foram vistos apenas em Jaboticabal, e mesmo que nas duas localidades tenha sido isolado *Pseudomonas aeruginosa* e *enterococcus spp.*, as estirpes foram isoladas mais comumente em Jaboticabal, igualmente as cepas de *Enterococcus sp.*, enquanto os isolados de *E. coli* foram observados na cidade de Araçatuba.

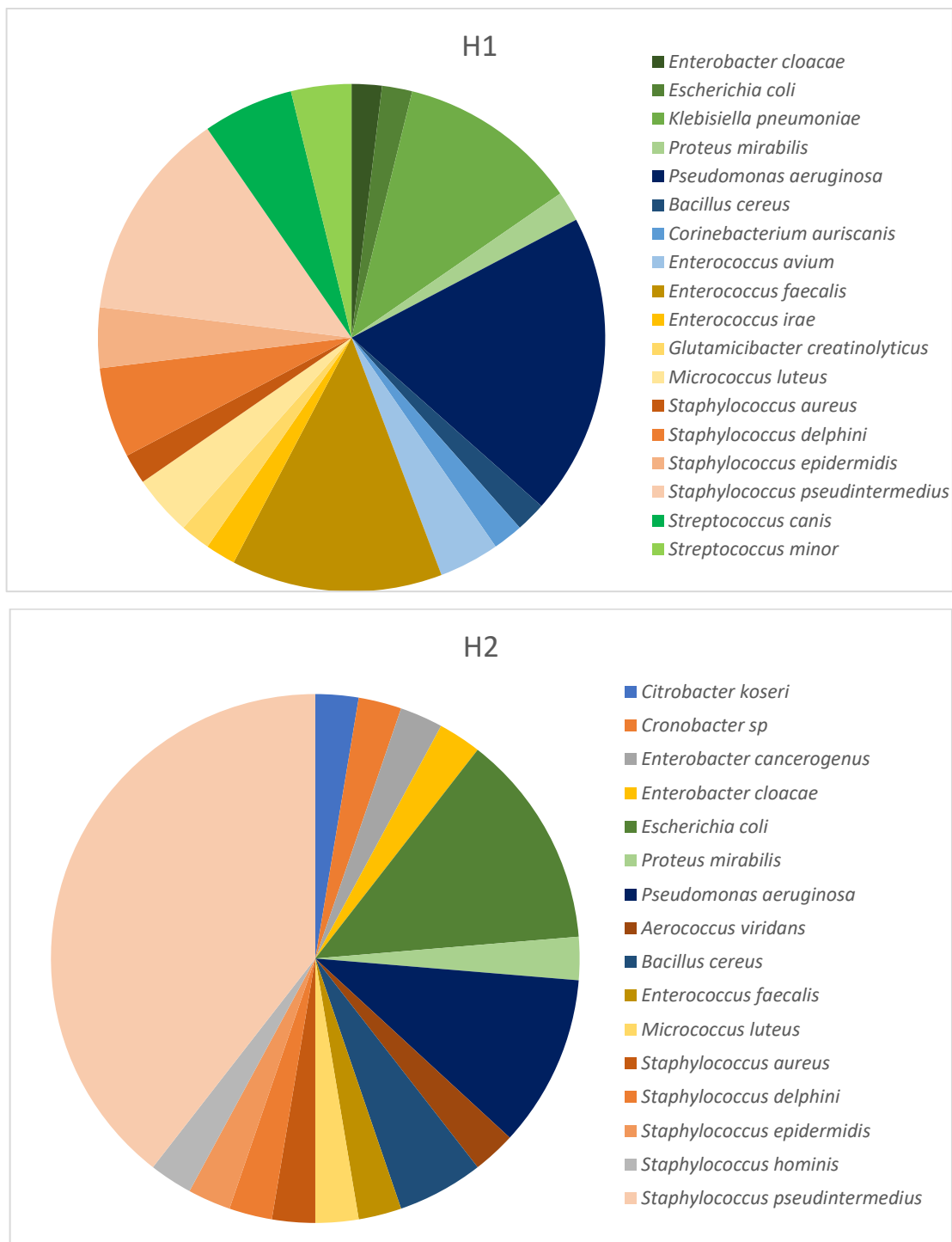


Figura 1. (H1) Distribuição das diferentes espécies bacterianas isoladas no hospital veterinário “Governador Laudo Natel, Jaboticabal – SP” (H2) Distribuição das diferentes espécies bacterianas isoladas no hospital veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira, Araçatuba – SP”

No entanto, em análise (PCA) podemos verificar que as espécies de bactérias encontradas nos de animais das cidades de Jaboticabal e Araçatuba apresentam similaridade, como demonstrado em Figura 2., onde podemos observar que a intersecção das elipses dos grupos de animais de Jaboticabal (H1 – Groups 1) e Araçatuba (H2 - Groups 2), indicando similaridade nas espécies de bactérias isoladas nas cidades.

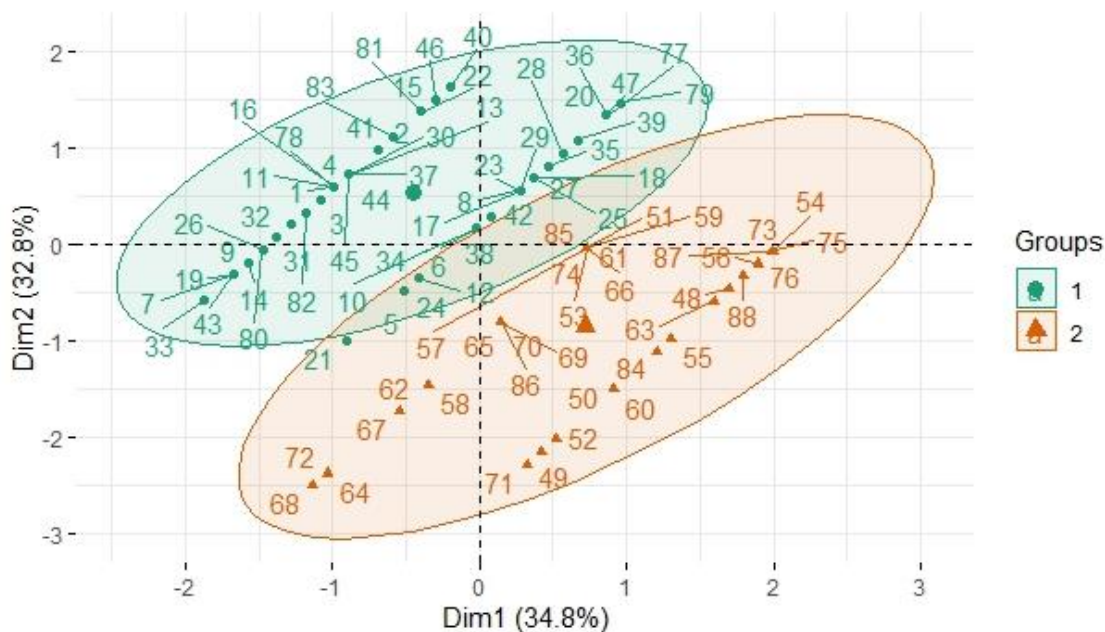


Figura 2. Figura 2. Gráfico da principal componente análise (PCA). As elipses nas cores verde e vermelha representam os grupos de animais da cidade de Jaboticabal (grupo 1 verde) e cidade de Araçatuba (grupo 2 vermelho). Os números representam animais dos grupos amostrais.

Dos isolados do gênero *Staphylococcus*, a espécie *Staphylococcus pseudintermedius* foi o mais prevalente, isolado em 68,75% (22/32) dos casos (Figura 3), seguido por *Staphylococcus delphini*, 12,50% (4/32), *Staphylococcus epidermidis* 9,38% (3/32), *Staphylococcus aureus* 6,25% (2/32) e *Staphylococcus hominis* 3,13% (1/32) dos isolados.

Quanto ao teste de disco difusão para o gênero *Staphylococcus*, foram observados os seguintes resultados: a penicilina (89,29%), a sulfadiazina e trimetropim (60,71%) e a tetraciclina (67,86%) corresponderam aos maiores percentuais de resistência, enquanto a doxiciclina (88,89%), a cefotaximina (85,71%),

o cloranfenicol (82,14%) a gentamicina e o moxifloxacino (78,57%) obtiveram a maior taxa de sensibilidade (Figura 3). De todas as espécies identificadas nesse gênero, 50% (14/28) apresentaram multirresistência, principalmente em relação as penicilinas, tetraciclinas e as fluorquinolonas.

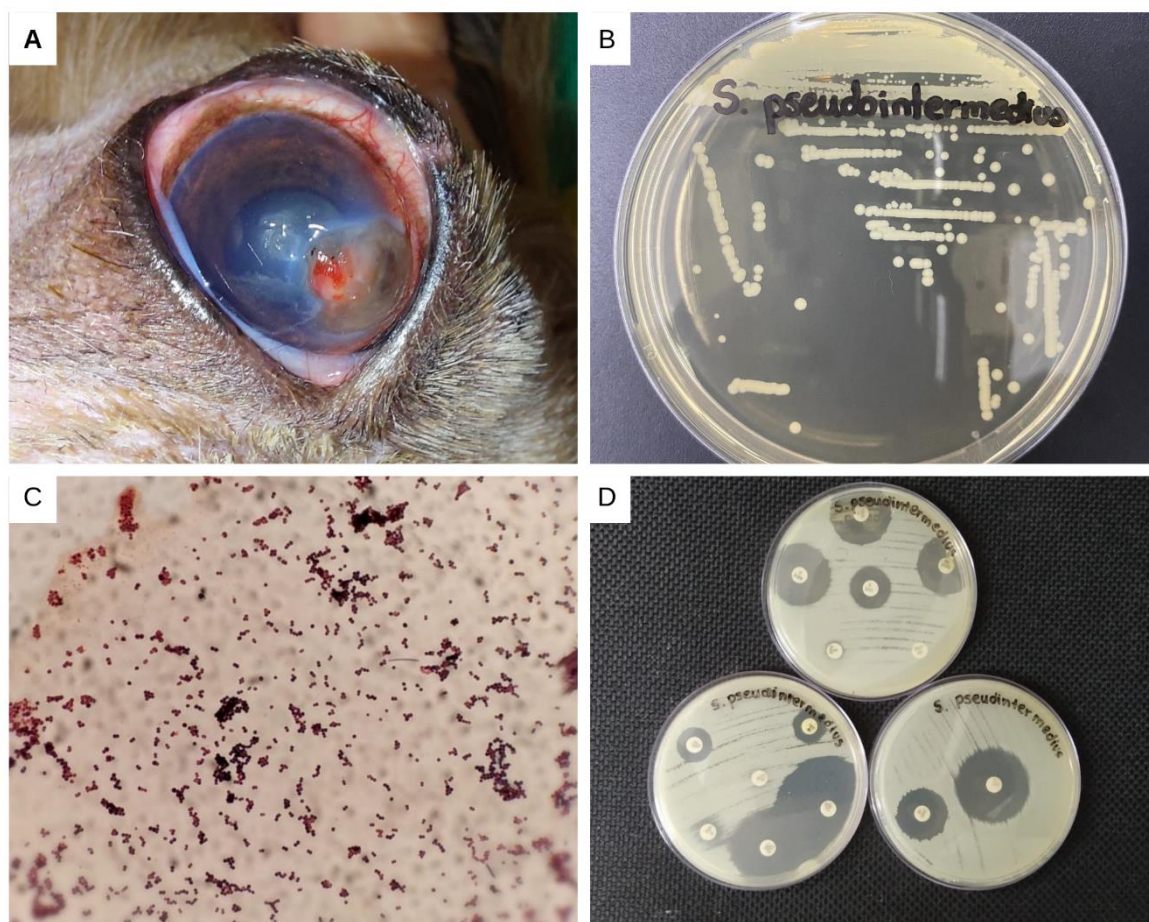


Figura 3. (A) Perfuração ocular em cão atendido no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel, Jaboticabal - SP”. (B) Colônias de *Staphylococcus pseudintermedius*, pelo método de estriamento por esgotamento em placa com Brain Heart Infusion Ágar. (C) Fotomicrografia da coloração de Gram, cocos agrupados, *Staphylococcus pseudintermedius*. (D) Teste de disco difusão do *Staphylococcus pseudintermedius*.

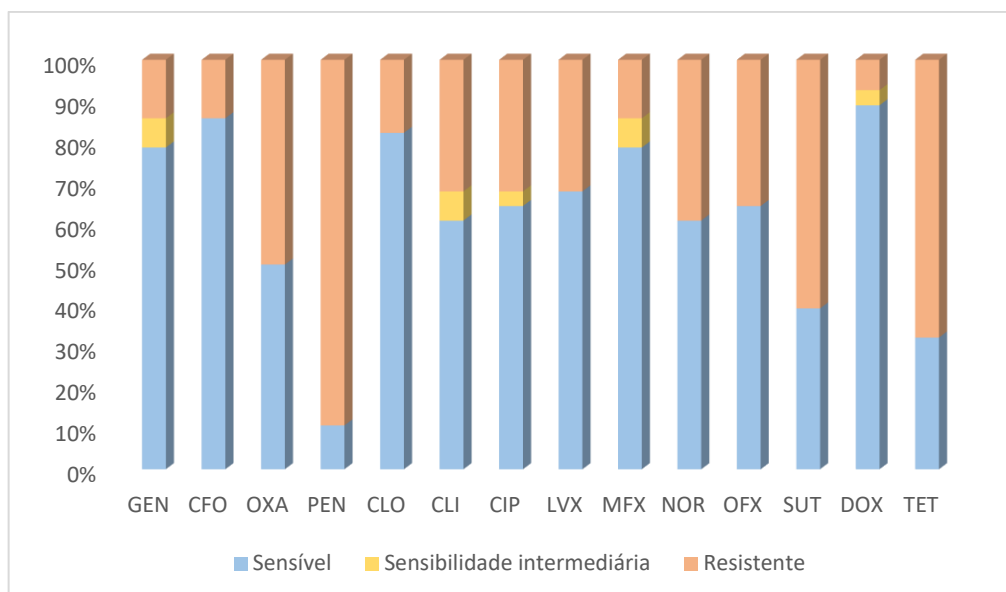


Figura 4. Distribuição de susceptibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. de lesões ulcerativas em teste de disco difusão em relação aos princípios antimicrobianos testados.

GEN: gentamicina; CFO; cefoxitina, OXA; oxacilina, PEN: penicilina; CLO; cloranfenicol, CLI; clindamicina CIP; ciprofloxacino, LVX; levofloxacino MFX; moxifloxacino, NOR; norfloxacino, OFX; ofloxacino. SUT; sulfadiazina e trimetropim, DOX; doxiciclina, TET; tetraciclina.

Por sua vez, a *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível à gentamicina e ao imipenem, e apresentou índice de 77,78% de sensibilidade intermediária ao enrofloxacino, 25% a tobramicina e 18,18% levofloxacino, sendo 8,33% resistente aos princípios ativos norfloxacino, ciprofloxacino e cefepima.

Da família Enterobacteriaceae (Figura 5.), as bactérias isoladas foram *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter cancerogenus* e *Cronobacter* sp., sendo essas, mais sensíveis a amicacina e gentamicina (88,89%), imipenem (88,24%) e levofloxacino (83,33%) com uma resistência acentuada em relação a ampicilina (66,67%) amoxicilina com clavulanato (50%) e a cefoxitina (47,06%). Destas 38,88% (7/18), foram consideradas bactérias multirresistentes.

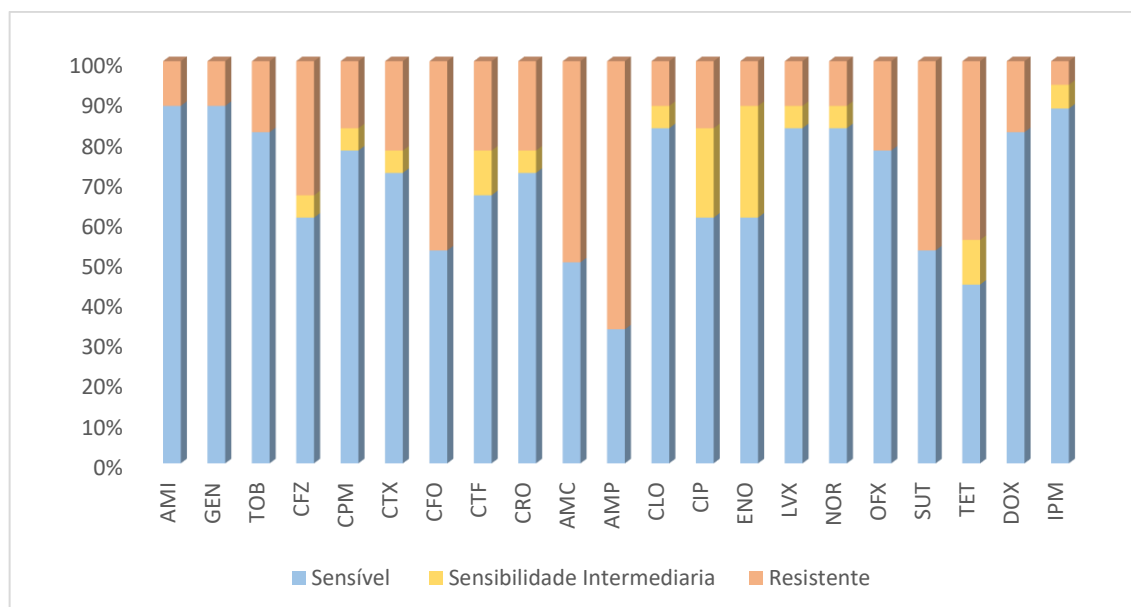


Figura 5. Distribuição de sensibilidade da família Enterobacteriaceae (*klebsiella pneumoniae*, *proteus mirabilis*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* e *Cronobacter* sp.) em teste de disco difusão em relação aos princípios antimicrobianos disponíveis.

AMI; amicacina, GEN: gentamicina; TOB; tobramicina, CFZ; cefazolina, CPM; cefepima, CTX; cefotaxima, CFO; ceftiofur, CTF; ceftiofur, CRO ceftriaxona, AMC; amoxicilina com clavulanato de potássio, AMP; ampicilina, CLO; cloranfenicol, CIP, ciprofloxacino, ENO; enrofloxacina, LVX; levofloxacino, OFX; ofloxacino, SUT; sulfadiazina e trimetropim, DOX; doxiciclina, TET; tetraciclina. IPM; imipenem.

4. DISCUSSÃO

Considerando que a raça é um fator predisponente para o desenvolvimento de ceratite ulcerativa, devido as alterações faciais desses animais, o presente estudo observou que de todos os animais avaliados, os cães pertencentes a raças braquicefálicas apresentaram maior incidência do acometimento e gravidade do quadro. Destaca-se nesse estudo, a presença de cães da raça Shih-tzu, com o maior número de representantes acometidos dentre os animais que foram avaliados. A incidência de animais braquicefálicos é condizente com a literatura, uma vez que esses possuem alterações significativas em região periocular e ocular, sendo representantes comuns em estudos anteriores, onde a maior parte da população estudada compreendeu animais com as mesmas características faciais.^{13,18,21,40,41} A medida do índice craniofacial não foi realizada nesse estudo, entretanto, para a

distribuição dos animais e classificação de raças braquicefálicas foi utilizada a classificação de raças citada por Packer e colaboradores.⁴⁰

Em relação a prevalência bacteriana, mesmo que ocorra diferenças dos isolados entre as regiões de origem das amostras, nesse estudo, observou-se similaridade dentre os achados bacterianos, em que há maior prevalência de bactérias Gram-positivas em relação as Gram-negativas,^{16,18,21} tendo como o maior representante o gênero *Staphylococcus* sp., seguido pela espécie *Pseudomonas aeruginosa*, que em geral correspondem aos achados de estudos anteriores como agentes causadores de infecções em casos de ceratite ulcerativa.^{5,20,42} A presença *Staphylococcus* sp. é esperada, uma vez que esta é a bactéria mais comumente isolada de olhos caninos, saudáveis ou doentes, compondo dessa maneira a microbiota residente dos olhos.^{16,18}

A presença de bactérias não comumente isoladas na microbiota ocular, como as pertencentes da família Enterobacteriaceae foi um diferencial, no entanto, também está presente em outros estudos e comumente associada a casos graves deste acometimento ocular.¹⁸ Sabe-se que este grupo bacteriano é comensal do trato intestinal dos animais,⁴³ e comumente podem estar associadas a doenças do trato urinário.^{44,45} Portanto, sugere-se que a infecção possa ocorrer devido aos hábitos de higiene desses animais⁴⁶ e que por comunicação, entre a cavidade oral e nasal e por conseguinte a comunicação entre o a cavidade nasal e o olho por meio do ducto nasolacrimal seja a rota de infecção, no entanto, necessita-se de mais estudos.

Ao observamos a prevalência e resistência bacteriana de cada região, conseguimos então estabelecer o tratamento de maneira mais adequada para cada localidade. O método de cultura para a identificação microbiana e o teste de disco difusão para a observação dos padrões de resistência, são considerados adequados para uma prescrição assertiva.⁴⁷ Sabe-se, no entanto, que este é um processo que demanda tempo, então é de conhecimento geral que existe uma maior tendência de resistência em relação aos antimicrobianos tópicos que são prescritos empiricamente, como já foi demonstrado com o cloranfenicol em estudos humanos e veterinários.^{5,21,48} Da mesma maneira, o uso desenfreado dos antimicrobianos pertencentes a classe das fluoroquinolonas está associado a um rápido aumento da resistência a antibióticos entre as bactérias.^{1,42}

No presente estudo, os isolados de *Staphylococcus* spp. apresentaram alta frequência de resistência diante a penicilina, a sulfadiazina e trimetopim, e a tetraciclina. No entanto, assim como a variação bacteriana, a resistência também tende a variar em diferentes regiões, uma vez que o uso sob cada localidade é diferente. Outros estudos em diferentes lugares do mundo observaram diferentes padrões de resistência, como a tetraciclina, fluorquinolonas e a oxacilina.^{18, 49, 50} No entanto, nesse estudo, *Staphylococcus* spp. foram sensíveis a gentamicina, princípio ativo disponível para a utilização oftálmica, e desta maneira de importância clínica.

Nesse estudo, os isolados da família Enterobacteriaceae foram agrupados, e dessa maneira observou-se que dos antimicrobianos testados, nenhum apresentou 100 % de sensibilidade, demonstrando inclusive resistência bacteriana acentuada no que se refere aos princípios ativos como a ampicilina, amoxicilina com clavulanato e cefoxitina. Desta família, *Klebsiella pneumoniae* foi o agente mais comumente isolado. Estudo de Zhang e colaboradores⁵¹ demonstraram que os isolados dessa espécie bacteriana, foram extremamente resistentes a amoxicilina-clavulanato e sulfametoxazol-trimetoprim, apoiando esse estudo que também encontrou alta taxa de estirpes multirresistente isoladas.

Ressalta-se que os isolados de *P. aeruginosa*, bactéria comumente encontrada na microbiota ocular,²¹ com diversos mecanismos de resistência intrínseca⁵²⁻⁵⁴ apresentaram neste estudo, sensibilidade intermediária e resistência a princípios ativos pertencentes a classe das Fluorquinolonas, como: levofloxacino, ciprofloxacino e norfloxacino, antimicrobianos importantes para o controle de infecções decorrentes desta bactéria, caracterizando desta maneira um importante sinalizador a saúde única nesta região. Na mesma direção, Tsvetanova e colaboradores,¹⁸ também observaram 4,5% de resistência dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em relação a enrofloxacina, assim como a total sensibilidade a gentamicina, princípios ativos comercializados em fórmula oftálmica.

Estudos ao longo dos anos demonstraram um aumento da taxa de multirresistência ao decorrer do tempo, a resistência bacteriana é uma preocupação na medicina humana e veterinária.^{5; 21, 55} Observou-se ainda assim que cerca de 23,33% das amostras isoladas em ceratites ulcerativas de cães, apresentavam multirresistência. Na maioria dos casos, a multirresistência está associada a

superbactérias,⁶⁰ neste estudo, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Klebsiella pneumoniae*, bactérias essas que são comensais, do olho e do trato intestinal dos animais respectivamente. No entanto, estas estão comumente associadas com infecções hospitalares de alto risco, ⁵⁶⁻⁶¹ presentes em hospitais veterinários e humanos, e sendo desafiador para o tratamento.

Como limitação, os pontos de cortes utilizados nesse estudo foram provenientes do Clinical and Laboratory Standards Institute que não estão disponíveis para a definição de resistência a antibióticos aplicados topicamente e devido a isso os dados de administração sistêmica foram os utilizados em nosso estudo. O uso destes pontos de corte é controverso,⁶² uma vez que se entende que as concentrações de antimicrobianos no tecido corneano, aplicados topicamente serão iguais ou maiores do que as concentrações séricas após administração sistêmica. Sendo assim, a resistência in vitro das bactérias a um antimicrobiano pode ser superado pela presença do princípio ativo em alta concentrações na superfície da córnea, por isso, é possível que a suscetibilidade dos isolados estejam sendo subestimados.²¹

5. CONCLUSÃO

Este estudo conclui que as espécies mais comumente isoladas em quadros de ceratite ulcerativa de cães são *Staphylococcus pseudintermedius* e a *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto diversas são as espécies que podem ser isoladas nesse acometimento, demonstrando uma diversidade da microbiota ocular capaz de promover infecção. Observamos uma alta taxa de resistência e multirresistência associada ao quadro de ceratite ulcerativa, principalmente, a amoxicilina, a ampicilina, a penicilina, a sulfadiazina e trimetropim e a tetraciclina. Positivamente, essas cepas apresentaram sensibilidade a antimicrobianos usados comumente na oftalmologia veterinária, como a doxiciclina, tobramicina e gentamicina. Os resultados desse estudo demonstram o quanto é essencial a identificação precoce e observação dos padrões de resistência para um tratamento assertivo e diminuir a chance da resistência bacteriana.

6. REFERÊNCIAS

1. Sandmeyer LS, Bauer BS, Mohaghegh Poor SM, et al. Alterations in conjunctival bacteria and antimicrobial susceptibility during topical administration of ofloxacin after cataract surgery in dogs. *Am J Vet Res.* 2017;78:207-214.
2. Komáromy AM, Bras D, Esson DW, et al. The future of canine glaucoma therapy. *Vet Ophthalmol.* 2019;22:726-740.
3. Bandinelli MB, Viezzer Bianchi M, Wronski JG, et al. Ophthalmopathologic characterization of multicentric or metastatic neoplasms with an extraocular origin in dogs and cats. *Vet Ophthalmol.* 2020;23:814-827.
4. Urban-Chmiel R, Balicki I, Świąder K, et al. The in vitro efficacy of eye drops containing a bacteriophage solution specific for *Staphylococcus* spp. isolated from dogs with bacterial conjunctivitis. *Ir Vet J.* 2020;73:21.
5. Hewitt JS, Allbaugh RA, Kenne DE, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with ul[1]cerative keratitis in Midwestern United States. *Front Vet Sci.* 2020;7:583965.
6. Cebrian P, Escanilla N, Lowe RC, et al. Corneo-limbo-conjunctival transposition to treat deep and perforating corneal ulcers in dogs: A review of 418 eyes and corneal clarity scoring in 111 eyes. *Vet Ophthalmol.* 2021;24:48-58.
7. Jeong Y, Kang S, Shim J, Lee E, Jeong D, Park S, Lee S, Kim SA, Seo K. The feasibility of clinical evaluation for anterior uveitis through spectral-domain optical coherence tomography in dogs. *Vet Ophthalmol.* 2022;25:111-121.
8. Kirschner SE. Persistent corneal ulcers. What to do when ulcers won't heal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1990;20:627-42.
9. Famose F. Assessment of the use of spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) for evaluation of the healthy and pathological cornea in dogs and cats. *Vet Ophthalmol.* 2014;17:12-22.
10. Packer RM, Hendricks A, Tivers MS et al. Impact of Facial Conformation on Canine Health: Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome. *PLoS One.* 2015;28;10:e0137496.
11. Krecny M, Tichy A, Rushton J, et al. A retrospective survey of ocular abnormalities in pugs: 130 cases. *J Small Anim Pract.* 2015;56:96-102.
12. O'Neill DG, Lee MM, Brodbelt DC, et al. Corneal ulcerative disease in dogs under primary veterinary care in England: epidemiology and clinical management. *Canine Genet Epidemiol.* 2017;4:5.
13. Iwashita H, Wakaiki S, Kazama Y, et al. Breed prevalence of canine ulcerative keratitis according to depth of corneal involvement. *Vet Ophthalmol.* 2020;23:849-855.
14. Dulaurent T, Dulaurent AM, Mathieson I, et al. Ectopic cilia in 112 dogs: A multicenter retrospective study. *Vet Ophthalmol.* 2022;25:186-190.
15. Sebbag L, Soler EA, Allbaugh RA, et al. Impact of acute conjunctivitis on ocular surface homeostasis in dogs. *Vet Ophthalmol.* 2020;23:828-833.
16. Prado MR, Rocha MF, Brito EH, et al. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Vet Ophthalmol.* 2005;8:33-7.

17. Hindley KE, Groth AD, King M, et al. Bacterial isolates, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics of bacterial keratitis in dogs presenting to referral practice in Australia. *Vet Ophthalmol.* 2016;19:418-26.
18. Tsvetanova A, Powell RM, Tsvetanov KA, et al. Melting corneal ulcers (keratomalacia) in dogs: A 5-year clinical and microbiological study (2014–2018). *Vet Ophthalmol.* 2021;24:265-278.
19. WHITLEY, 2021;
20. Suter A, Voelter K, Hartnack S, et al. Septic keratitis in dogs, cats, and horses in Switzerland: Associated bacteria and antibiotic susceptibility. *Vet Ophthalmol.* 2018;21:66-75.
21. Verdenius CY, Broens EM, Slenter IJM, et al. Corneal stromal ulcerations in a referral population of dogs and cats in the Netherlands (2012-2019): Bacterial isolates and antibiotic resistance. *Vet Ophthalmol.* 2023;6.
22. James-Jenks EM, Pinard CL, Charlebois PR, et al. Evaluation of corneal ulcer type, skull conformation, and other risk factors in dogs: A retrospective study of 347 cases. *Can Vet J.* 2023;64:225-234.
23. Farghali HA, AbdElKader NA, AbuBakr HO, et al. Corneal Ulcer in Dogs and Cats: Novel Clinical Application of Regenerative Therapy Using Subconjunctival Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma. *Front Vet Sci.* 2021;8:641265.
24. Hamzianpour N, Adams VJ, Grundon RA, et al. Assessment of the inter-rater agreement of corneal cytology and culture findings in canine ulcerative keratitis. *J Small Anim Pract.* 2022;63:188-196.
25. Papich MG. Antimicrobials, susceptibility testing, and minimum inhibitory concentrations (MIC) in veterinary infection treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2013;43:1079-89.
26. Guyonnet A, Desquilbet L, Faure J, et al. Outcome of medical therapy for keratomalacia in dogs. *J Small Anim Pract.* 2020;61:253-258.
27. McKeever JM, Ward DA, Hendrix DVH. Comparison of antimicrobial resistance patterns in dogs with bacterial keratitis presented to a veterinary teaching hospital over two multi-year time periods (1993-2003 and 2013-2019) in the Southeastern United States. *Vet Ophthalmol.* 2021;24:653-658.
28. Fonseca JD, Mavrides DE, Graham PA, et al. Results of urinary bacterial cultures and antibiotic susceptibility testing of dogs and cats in the UK. *J Small Anim Pract.* 2021;62:1085-1091.
29. Yaovi AB, Sessou P, Tonouhewa ABN, et al. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria amongst dogs in Africa: A meta-analysis review. *Onderstepoort J Vet Res.* 2022;89:e1-e12.
30. Oldenburg CE, Lalitha P, Srinivasan M, et al. Emerging moxifloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis isolates in South India. *Ophthalmic Epidemiol.* 2013;20:155-8.
31. Oteo J, Bou G, Chaves F, et al. Microbiological methods for surveillance of carrier status of multiresistant bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35:667-675.
32. Iannino F, Salucci S, Di Donato G, et al. *Campylobacter* and antimicrobial resistance in dogs and humans: "One health" in practice. *Vet Ital.* 2019;55:203-220.

33. Thomas RK, Melton R, Asbell PA. Antibiotic resistance among ocular pathogens: current trends from the ARMOR surveillance study (2009-2016). *Clin Optom (Auckl)*. 2019;11:15-26.
34. de Sousa T, Hébraud M, Dapkevicius MLNE, et al. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 2021;22:12892.
35. Freitas CS, Mesquita MO, Sasaki MSK, et al. Trends in the epidemiological and microbiological profiles of infectious keratitis in southeastern Brazil. *Arq Bras Oftalmol*. 2023;86:345-352.
36. Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc*. 2009;4:732-42.
37. Sauer S, Freiwald A, Maier T, et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One*. 2008;3:e2843.
38. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45:493-6.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2023. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. CLSI, Wayne, PA.
40. Packer RM, Hendricks A, Burn CC. Impact of facial conformation on canine health: corneal ulceration. *PLoS One*. 2015;10:e0123827.
41. Costa J, Steinmetz A, Delgado E. Clinical signs of brachycephalic ocular syndrome in 93 dogs. *Ir Vet J*. 2021;74:3.
42. Jinks MR, Miller EJ, Diaz-Campos D, et al. Using minimum inhibitory concentration values of common topical antibiotics to investigate emerging antibiotic resistance: A retrospective study of 134 dogs and 20 horses with ulcerative keratitis. *Vet Ophthalmol*. 2020;23:806-813.
43. Vega-Manriquez XD, Ubiarco-López A, Verdugo-Rodríguez A, et al. Pet dogs potential transmitters of pathogenic *Escherichia coli* with resistance to antimicrobials. *Arch Microbiol*. 2020;202:1173-1179.
44. Hernando E, Vila A, D'Ippolito P, et al. Prevalence and Characterization of Urinary Tract Infection in Owned Dogs and Cats From Spain. *Top Companion Anim Med*. 2021;43:100512.
45. Blondeau JM, Fitch SD. In Vitro Killing of Canine Urinary Tract Infection Pathogens by Ampicillin, Cephalexin, Marbofloxacin, Pradofloxacin, and Trimethoprim/Sulfamethoxazole. *Microorganisms*. 2021;9:2279.
46. Harvey ND, Craigon PJ, Shaw SC, et al. Behavioural Differences in Dogs with Atopic Dermatitis Suggest Stress Could Be a Significant Problem Associated with Chronic Pruritus. *Animals (Basel)*. 2019;9:813.
47. Ollivier FJ. Bacterial corneal diseases in dogs and cats. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2003;18:193-8.
48. Tolar EL, Hendrix DV, Rohrbach BW, et al. Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with bacterial keratitis: 97 cases (1993-2003). *J Am Vet Med Assoc*. 2006;228:80-5.
49. Kang MH, Chae MJ, Yoon JW, et al. Resistance to fluoroquinolones and methicillin in ophthalmic isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from companion animals. *Can Vet J*. 2014;55:678-82.

50. Wang Z, Guo L, Li J, et al. Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence factors of isolates of *staphylococcus pseudintermedius* from healthy dogs and dogs with keratitis. *Front Vet Sci.* 2022;9:903633.
51. Zhang Z, Zhang L, Dai H, et al. Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Complex From Clinical Dogs and Cats in China: Molecular Characteristics, Phylogroups, and Hypervirulence-Associated Determinants. *Front Vet Sci.* 2022;9:816415.
52. ang Z, Raudonis R, Glick BR, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37:177-192.
53. Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin Exp Optom.* 2018;101:162-171.
54. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat.* 2019;44:100640.
55. Keller RL, Hendrix DV. Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis (1993--2004). *Equine Vet J.* 2005;37:207-11.
56. Sista RR, Oda G, Barr J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in ICU patients. *Anesthesiol Clin North Am.* 2004;22:405-35.
57. Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *J Chemother.* 2017;29:2-9.
58. Yamasaki S, Shigemura K, Osawa K, et al. Genetic analysis of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from UTI patients in Indonesia. *J Infect Chemother.* 2021;27:55-61.
59. Bassetti M, Echols R, Matsunaga Y, et al. Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label, multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21:226-240.
60. Parmanik A, Das S, Kar B, Bose A, Dwivedi GR, Pandey MM. Current Treatment Strategies Against Multidrug-Resistant Bacteria: A Review. *Curr Microbiol.* 2022 Nov 3;79(12):388.
61. Santana JA, Paraguassu AO, Santana RST, et al. Risk Factors, Genetic Diversity, and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* spp. Isolates in Dogs Admitted to an Intensive Care Unit of a Veterinary Hospital. *Antibiotics (Basel).* 2023;12:621.
62. Romanowski EG, Mah FS, Yates KA, et al. The successful treatment of gatifloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis with Zymar (gatifloxacin 0.3%) in a NZW rabbit model. *Am J Ophthalmol.* 2005;139:867-77.

APÊNDICE

Tabela complementar: Relação de dados coletados dos pacientes avaliados no estudo.

Identificação da Amostra	Sexo	Idade	Raça	Diagnóstico	Olho	Tratamento prévio	Tipo de tratamento	Cidade	Identificação por Maldi-tof	
									Espécie bacteriana 1	Espécie bacteriana 2
1	Macho	14 anos	Fox Paulistinha	Melting	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	Fêmea	9 anos	Sharpei	Descemetoccele	OD	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
3a	Macho	14 anos	SRD	Melting	OE	Tobramicina	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
4	Macho	10 meses	Shih-tzu	Melting	OD	Tobramicina e ciprofloxacino	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
5	Macho	1 a 5 meses	Shih-tzu	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Enterococcus avium</i>	
6	Fêmea	1a 6 meses	Shih-tzu	C. U. Superficial	OD	Tobramicina	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
7	Fêmea	1a 6 meses	Shih-tzu	Melting	OE	Tobramicina	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Enterococcus faecalis</i>	
8	Fêmea	11 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
9a	Macho	1 anos	Shih-tzu	Perfuração Ocular	OD	Sulfadiazina e trimetopim	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus avium</i>
10	Fêmea	12 anos	Lhasa-Apso	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
11	Fêmea	14 anos	Lhasa-Apso	Perfuração Ocular	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
12	Macho	10 anos	Golden	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Enterococcus faecalis</i>	
13	Macho	8 anos	Pequinês	Perfuração Ocular	OE	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Sem crescimento</i>	
15	Macho	2 anos	Shih-tzu	Descemetoccele	OD	Tobramicina	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Enterococcus irae</i>	
17	Macho	6 meses	Pug	Perfuração Ocular	OD	Ciprofloxacina		Jaboticabal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	

Tabela complementar: Relação de dados coletados dos pacientes avaliados no estudo.

Identificação da Amostra	Sexo	Idade	Raça	Diagnóstico	Olho	Tratamento prévio	Tipo de tratamento	Cidade	Identificação por Maldi-tof	
									Espécie bacteriana 1	Espécie bacteriana 2
18	Macho	14 anos	Shih-tzu	Perfuração Ocular	OD	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
19	Macho	12 anos	SRD	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
21	Fêmea		SRD	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Sem crescimento</i>	
22	Macho	11 anos	Pug	Ceratite ulcerativa intermediária	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Enterococcus faecalis</i>	
23	Fêmea	12 anos	SRD	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
24	Fêmea	2 anos	Springer Spaniel	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Bacillus cereus</i>	
25	Fêmea	7 anos	Shih-tzu	Perfuração Ocular	OE	Moxifloxacino	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
26 a	Macho	10 anos	Golden	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus delphini</i>
27	Fêmea	7 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Enterococcus faecalis</i>	
28	Macho	9 anos	Boxer	C. U. Superficial	OD	Tobramicina	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Sem crescimento</i>	
29 a	Macho	7 anos	Shih-tzu	Ceratite ulcerativa intermediária	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus canis</i>
30	Macho	6 anos	SRD	C. U. Superficial	OD	Tobramicina	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Sem crescimento</i>	
31	Macho	13 anos	Beagle	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Staphylococcus delphini</i>	
32	Fêmea	4 anos	SRD	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
33	Macho	11 anos	Rottwailer	Ceratite ulcerativa intermediária	OE	Moxifloxacino	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Sem crescimento</i>	

Identificação da Amostra	Sexo	Idade	Raça	Diagnóstico	Olho	Tratamento prévio	Tipo de tratamento	Cidade	Identificação por Maldi-tof	
									Espécie bacteriana 1	Espécie bacteriana 2
34	Macho		Shih-tzu	Perfuração Ocular	OD	Gatifloxacino	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Glutamicibacter creatinolyticus</i>	
35	Fêmea	13 anos	Shih-tzu	Perfuração Ocular	OE	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
36 a	Fêmea	13 anos	Pinscher	Ceratite ulcerativa intermediária	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Corinebacterium auriscanis</i>
37	Fêmea	13 anos	SRD	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
38	Fêmea	11 anos	SRD	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Staphylococcus aureus</i>	
39	Fêmea	8 anos	Boxer	C. U. Superficial	OD	Gatifloxacino e Cloranfenicol	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
40	Macho	8 anos	Shih-tzu	Ceratite ulcerativa profunda	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Sem crescimento</i>	
41	Fêmea	6 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
42	Macho	6 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
43 a	Fêmea	10 anos	SRD	Ceratite ulcerativa intermediária	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Streptococcus minor</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
44	Fêmea		Shih-tzu	Perfuração ocular	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Staphylococcus delphini</i>	
45	Macho	1 ano	Pitbull	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Micrococcus luteus</i>	
46	Macho	8 anos	Shih-tzu	Perfuração ocular		Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Enterococcus faecalis</i>	

Tabela complementar: Relação de dados coletados dos pacientes avaliados no estudo.

Identificação da Amostra	Sexo	Idade	Raça	Diagnóstico	Olho	Tratamento prévio	Tipo de tratamento	Cidade	Identificação por Maldi-tof	
									Espécie bacteriana 1	Espécie bacteriana 2
47	Fêmea		SRD	Perfuração Ocular	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Sem crescimento</i>	
48	Fêmea	5 anos	Shih-tzu	Ceratite ulcerativa intermediária	OD	Tobramicina	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Sem crescimento</i>	
49	Macho	11 anos	SRD	Melting	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Streptococcus canis</i>	
50a	Macho		Shih-tzu	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus minor</i>
51	Macho	10 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus delphini</i>	
52	Macho	8 meses	SRD	C. U. Superficial	OE	neomicina e polimixina	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Cronobacter sp</i>	
56	Macho	14 anos	Basset Hound	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Enterobacter cloacae</i>	
58	Macho	4 anos	Shih-tzu	Ceratite ulcerativa profunda	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
59	Fêmea	11 anos	Lhasa-Apso	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
60 a	Fêmea	6 anos	poodle	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
61	Fêmea	2 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus hominis</i>	
62	Macho	13 anos	Shih-tzu	Ceratite ulcerativa intermediária	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
64	Fêmea	6 anos	Maltês	Ceratite ulcerativa intermediária	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Escherichia coli</i>	
65	Macho	10 anos	Lhasa-Apso	Perfuração ocular	OD	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	

Tabela complementar: Relação de dados coletados dos pacientes avaliados no estudo.

Identificação da Amostra	Sexo	Idade	Raça	Diagnóstico	Olho	Tratamento prévio	Tipo de tratamento	Cidade	Identificação por Maldi-tof	
									Espécie bacteriana 1	Espécie bacteriana 2
66	Fêmea	10 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Escherichia coli</i>	
67	Macho	1 ano	Poodle	Descemetocele	OE	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
68	Fêmea	6 anos	Pug	Perfuração ocular	OD	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Araçatuba	<i>Escherichia coli</i>	
70	Fêmea	11 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus aureus</i>	
72	Fêmea	7 anos	Shih-tzu	Ceratite ulcerativa profunda	OD	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Araçatuba	<i>Bacillus cereus</i>	
73	Fêmea	11 anos	Pequinês	Descemetocele	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
75	Macho	4 anos	Lhasa-Apso	Ceratite ulcerativa intermediária	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
78	Fêmea	9 anos	Shih-tzu	Ceratite ulcerativa profunda	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Enterococcus faecalis</i>	
81	Fêmea	7 anos	Shih-tzu	perfuração ocular	OD	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Araçatuba	<i>Aerococcus viridans</i>	
82	Macho	8 meses	Pug	Ceratite ulcerativa intermediária	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
83	Macho	5 anos	Shih-tzu	Ceratite ulcerativa intermediária	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	
84	Fêmea	9 anos	Labrador	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Citrobacter koseri</i>	
85	Fêmea	13 anos	Poodle	Ceratite ulcerativa intermediária	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Bacillus cereus</i>	
86	Macho	2 anos	Bulldog Francês	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
89	Macho	14 anos	Poodle	Ceratite ulcerativa intermediária	OD	Ofloxacino	tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	

Tabela complementar: Relação de dados coletados dos pacientes avaliados no estudo.

Identificação da Amostra	Sexo	Idade	Raça	Diagnóstico	Olho	Tratamento prévio	Tipo de tratamento	Cidade	Identificação por Maldi-tof	
									Espécie bacteriana 1	Espécie bacteriana 2
90	Macho	18 anos	Yorkshire	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
91	Macho	8 meses	Shih-tzu	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
51J	Fêmea		SRD	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
52J	Fêmea	4 anos	Shih-tzu	Ceratite ulcerativa intermediária	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
53J	Fêmea	9 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Streptococcus canis</i>	
54J	Fêmea	7 anos	Shih-tzu	Perfuração Ocular	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Escherichia coli</i>	
55J	Fêmea	4 anos	Shih-tzu	Melting	OE	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Jaboticabal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
56J	Fêmea	3 anos	Shih-tzu	Melting	OD	Moxifloxacino	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Micrococcus luteus</i>	
57J	Fêmea	7 anos	Shih-tzu	Descemetoccele	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Jaboticabal	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
93	Macho	2 anos	SRD	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Micrococcus luteus</i>	
94	Fêmea	6 anos	Shih-tzu	Descemetoccele	OD	Sem tratamento prévio	Intervenção cirúrgica	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
96	Macho	14 anos	Lhasa Apso	Ceratite ulcerativa intermediária	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
98	Macho	5 anos	Shih-tzu	C. U. Superficial	OD	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
100	Macho	6 anos	Lhasa Apso	C. U. Superficial	OE	Sem tratamento prévio	Tratamento clínico	Araçatuba	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

C.U.* Ceratite ulcerativa

OD* Olho direito

OE* Olho esquerdo