RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/06/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AÇÃO ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LANTERNA ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DA CÓRNEA CANINA

Laís Fernanda Sargi
Médica Veterinária

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AÇÃO ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LANTERNA ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DA CÓRNEA CANINA

Discente: Laís Fernanda Sargi
Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Coorientadora: Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo

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

2024

S245a

Sargi, Laís Fernanda
Ação antibacteriana in vitro de lanterna ultravioleta e riboflavina contra microrganismos patogênicos da córnea canina / Laís Fernanda Sargi. -- Jaboticabal, 2024
39 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Paola Castro Moraes
Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Oftalmologia Veterinária. 2. Cirurgia de córnea. 3. Riboflavina. 4. Anti-infecciosos. 5. Fototerapia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AÇÃO ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LANTERNA ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DA CÓRNEA CANINA

AUTORA: LAÍS FERNANDA SARGI
ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES
COORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Cirurgia Veterinária, pela Comissão Examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
MARITA VEDOVELLI CARDOZO
Data: 03/12/2024 11:18:43-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

gov.br Documento assinado digitalmente
RENATA MARIA MONCAO DA SILVA
Data: 06/12/2024 06:34:22-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. RENATA MARIA MONÇÃO DA SILVA (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Centro Universitário de Excelência (UNEX) - Feira de Santana/BA

gov.br Documento assinado digitalmente
LILIAN CRISTINA MAKINO
Data: 03/12/2024 13:22:42-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. LILIAN CRISTINA MAKINO (Participaçao Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / FCAVR UNESP Registro

gov.br Documento assinado digitalmente
CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI
Data: 09/12/2024 06:49:58-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI (Participaçao Virtual)
Departamento de Microbiologia e Saúde Animal / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - Matão/SP

gov.br Documento assinado digitalmente
ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Data: 06/12/2024 18:35:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

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

Jaboticabal, 03 de dezembro de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Laís Fernanda Sargi, nascida no Município de Jaboticabal, São Paulo, no dia vinte e seis do mês de novembro de 1993. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná em 2012. Realizou estágios na área de clínica cirúrgica de pequenos animais durante a graduação na instituição de origem, na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" no Câmpus de Jaboticabal, SP e Botucatu, SP. Obteve o título de Médica Veterinária em 2016. Entre os anos de 2017 e 2018, em nível de especialização *lato sensu*, participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária da Universidade de Franca (UNIFRAN), São Paulo, especializando-se na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", FCAV - Câmpus de Jaboticabal, em 2021. Atualmente é aluna regular do Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Cirurgia Veterinária, nível doutorado, na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", FCAV - Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes com ênfase em oftalmologia de pequenos animais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro à vida, que me presenteou por ter chegado até aqui, por ter me dado os pais, Edna Maria Curci e Jairo Sargi e meu padrasto Luís Beraldo; os três sempre estão dispostos a me apoiar em todos os meus passos. Agradeço ao meu noivo Victor Mattos, por estar presente, me ouvindo e me apoiando, obrigado pelo carinho e companheirismo. Em lembrança a minha avó que mesmo não estando aqui hoje, a carrego sempre comigo.

Agradeço à professora Paola Castro Moraes, minha orientadora que esteve sempre presente agindo e buscando a melhor forma de resolver tudo, obrigado pela ajuda.

Agradeço à professora Marita Vedovelli Cardozo, pela coorientação e por me acolher nessa jornada e não medir esforços para que as coisas dessem certo.

Agradeço ao Romário, por me acolher no Laboratório de Microbiologia Veterinária e me ensinar pacientemente os caminhos a seguir e ser meu braço direito na execução do presente trabalho.

Agradeço à equipe de atendimento de oftalmologia veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (HV) - Unesp - Câmpus de Jaboticabal especialmente ao professor Ivan, a Cinthya, a Pamella e a Larissa que sempre estiveram presentes em todos os momentos, e além de colegas de trabalho se tornaram meus amigos, obrigada pela amizade. E por último, e não menos importante, a Gabriela Madruga que esteve comigo em todos os momentos de angustia e de aflição, sempre me encorajando a explorar o assunto da minha tese de doutorado.

Agradeço à CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil. Código de financiamento 01.

EPÍGRAFE

“Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar. ”

Chico Xavier

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ii
RESUMO.....iii
ABSTRACT.....i
LISTA DE FIGURAS.....v
CAPÍTULO 1. Considerações Gerais 1
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 2
2.1. Anatomia da córnea 2
2.2. Cicatrização da da córnea.....4
2.3. Ceratites ulcerativas e "melting" corneano 6
2.4. " cross-linking".....9
3. OBJETIVOS 10
4. REFERÊNCIAS 10
CAPÍTULO 2. Efficacy of the combination of ultraviolet-A light and riboflavin in reducing microorganisms isolated from canine corneas: An *in vitro* study.....15
1. INTRODUCTION 16
2. MATERIALS AND METHODS.....17
2.1. Pathogen selection.....17
2.2. Riboflavin preparation and dilution 18
2.3. Bacterial Suspension in Riboflavin Solution 19
2.4. UVA Irradiation and Exposure Time..... 19
2.5. "Time-kill curve".....20
2.6. Statistical Analysis.....20
3. RESULTS 21
3. DISCUSSION 23
4. CONCLUSION.....27
5. REFERENCES 28
APPENDIX A – Curves of Antibacterial Effect of Riboflavin Photoactivated by UVA Light on Microorganisms of Canine Ulcerative Keratitis……36
APPENDIX B – "Boxplots" Illustrating the Variation in Antibacterial Activity of Riboflavin Photoactivated on Microorganisms of Canine Ulcerative Keratitis…37

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

unesp 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 da eficácia antibacteriana de uma lanterna UV associada a riboflavina em microrganismos patogênicos da córnea canina"**, protocolo nº 2275/2024, sob a responsabilidade da Prof.ª Dr.ª 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 17 de abril de 2024.

Vigência do Projeto	01/05/2024 a 13/12/2024
Espécie / Linhagem	Não se aplica
Nº de animais	Não se aplica
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

Jaboticabal, 17 de abril de 2024.

Helena C D Brito

Dr.ª Helena Cristina Delgado Brito
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br

AÇÃO ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LANTERNA ULTRAVIOLETA E RIBOFLAVINA CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DA CÓRNEA CANINA

RESUMO – Este estudo propôs avaliar a atividade antimicrobiana em isolados bacterianos clínicos provenientes de cães com ceratites ulcerativas, empregando a lanterna ultravioleta a 365nm, valor comparável ao utilizado no PACK-CXL. Amostras de *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus canis* foram coletadas de casos de ceratite ulcerativa canina. Soluções de riboflavina nas concentrações de 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4% e 0,8% em Mueller-Hinton Broth (MHB) foram preparadas, inoculadas e expostas à luz ultravioleta (365 nm) a uma distância de 3 cm por 15 e 30 minutos. O efeito antimicrobiano foi avaliado pelo método de curva de morte microbiana (time-kill curve). Os dados foram transformados em logaritmo, e a normalidade e homogeneidade foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A análise estatística incluiu o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn corrigido pelo método de Bonferroni. Os resultados mostraram que *S. pseudintermedius* não apresentou crescimento nas concentrações de 0,4% e 0,2% em 32 horas e nas concentrações de 0,05% e 0,4% em 64 horas com exposição à luz UVA. Reduções significativas foram observadas nas concentrações de 0,4%, 0,2% e 0,1%, começando 8 horas após a exposição. Para *S. canis*, reduções significativas foram observadas na concentração de 0,4% após 32 horas (15UVA) e 16 horas (30UVA), mas essas reduções foram insuficientes para inibir o crescimento bacteriano. *K. pneumoniae* apresentou crescimento reduzido na concentração de riboflavina de 0,2%. *P. aeruginosa* não apresentou resposta às concentrações testadas. A análise comparativa entre 15UVA e 30UVA não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as quatro cepas bacterianas testadas ($p > 0,05$). Conclui-se que a combinação de riboflavina com radiação UVA apresenta um efeito antimicrobiano significativo contra *S. pseudintermedius*, variando conforme a concentração e o tempo de exposição. Em contrapartida, *P. aeruginosa* demonstrou resistência ao tratamento em todas as condições testadas. Já os efeitos sobre *K. pneumoniae* e *S. canis* mostraram-se variáveis, indicando uma resposta limitada, dependente da concentração e do tempo de exposição.

Palavras-chave: cão, ceratite ulcerativa, ceratomalácia, "crosslinking"

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTION OF ULTRAVIOLET LANTERN AND RIBOFLAVIN AGAINST PATHOGENIC MICROORGANISMS OF CANINE CORNEA

ABSTRACT – This study aimed to evaluate the antimicrobial activity in clinical bacterial isolates from dogs with ulcerative keratitis, using ultraviolet light at 365 nm, a value comparable to that used in PACK-CXL. Samples of *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Streptococcus canis* were collected from cases of canine ulcerative keratitis. Riboflavin solutions at concentrations of 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, and 0.8% in Mueller-Hinton Broth (MHB) were prepared, inoculated, and exposed to ultraviolet light (365 nm) at a distance of 3 cm for 15 and 30 minutes. The antimicrobial effect was evaluated using the time-kill curve method. The data were log-transformed, and normality and homogeneity were assessed using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Statistical analysis included the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test corrected using the Bonferroni method. The results showed that *S. pseudintermedius* exhibited no growth at concentrations of 0.4% and 0.2% after 32 hours, and at 0.05% and 0.4% after 64 hours of UVA exposure. Significant reductions were observed at concentrations of 0.4%, 0.2%, and 0.1%, starting 8 hours after exposure. For S. canis, significant reductions were observed at a concentration of 0.4% after 32 hours (15UVA) and 16 hours (30UVA), but these reductions were insufficient to inhibit bacterial growth. *K. pneumoniae* exhibited reduced growth at the riboflavin concentration of 0.2%. *P. aeruginosa* showed no response to the tested concentrations. Comparative analysis between 15UVA and 30UVA did not show any statistically significant differences across the four bacterial strains tested ($p > 0.05$). It is concluded that the combination of riboflavin with UVA radiation presents a significant antimicrobial effect against *S. pseudintermedius*, varying with concentration and exposure time. In contrast, *P. aeruginosa* demonstrated resistance to treatment under all tested conditions. The effects on *K. pneumoniae* and *S. canis* were variable, indicating a limited response dependent on concentration and exposure time.

Keywords: dog, ulcerative keratitis, keratomalacia, cross-linking

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2. Avaliação da eficácia antibacteriana de lanterna UVA associada a riboflavina em microrganismos patogênicos da córnea canina.....16

Figura 1. Schematic drawing of the methodology of this study. A) Preparation of riboflavin concentration and dilution, positive and negative control B) Time-kill curve: Elisa plates were evaluated at pre-exposure (T0), exposed to UVA flashlight irradiation four wells at a time for designated periods (15 and 30-minute) and incubated for post-exposure analysis in hours at times 2 (T2), 8 (T8), 16 (T16), 32 (T32) and 64 (T64). UVA light with a wavelength of 365 nm in the wells of the Elisa plate containing Mueller-Hinton Broth, bacterial sample and riboflavin at concentrations of 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1% and 0.5% and 0.025%, negative and positive controls. C and D) Plate microdilution, decimal serial dilution: at each evaluation time, the tested concentrations were diluted for bacterial counting (CFU)/mL..... 20

Figura 2. Antibacterial effect of Riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from the Lantern (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), during 15 (T15) and 30 (T30) minutes in *Staphylococcus pseudintermedius*, exposed to light at T0, T2, T8, T16, T32, and T64.....21

Figura 3. Antibacterial effect of Riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from the Lantern (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), during 15 (T15) and 30 (T30) minutes in Streptococcus canis, exposed to light at T0, T2, T8, T16, T32, and T64.....24

Figura 4. "Boxplot" exibindo a variação das médias do efeito antibacteriano da luz ultravioleta A (UVA) durante 15 e 30 minutos fotoativada por diferentes concentrações de riboflavina em *Staphylococcus pseudintermedius* (A), *Pseudomonas aerugninosa*(B), *Klebisiella pneumoniae* (C) e *Streptococos canis* (D) expostas à luz UVA por até 64 horas.....25

APPENDIX A – Curves of Antibacterial Effect of Riboflavin Photoactivated by UVA Light on Microorganisms of Canine Ulcerative Keratitis

Figura A1: Antibacterial effect of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from the Lantern (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), during 15 (T15) and 30 (T30) minutes in *Pseudomonas aeruginosa*, with exposure times T0, T2, T8, T16, T32, and T64.....36
Figura A2: Antibacterial effect of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from the Lantern (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), during 15 (T15) and 30 (T30) minutes in *Klebsiella pneumoniae*, with exposure times T0, T2, T8, T16, T32, and T64 37
APPENDIX B – "Boxplots" Illustrating the Variation in Antibacterial Activity of Riboflavin Photoactivated on Microorganisms of Canine Ulcerative Keratitis
Figura B1: "Boxplot" illustrating the variation in mean antibacterial activity of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from a flashlight (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), after 15 minutes (T15) and 30 minutes (T30) against *Staphylococcus pseudintermedius*. Light exposure times include T0, T2, T8, T16, T32, anT64.....38
Figura B2: "Boxplot" illustrating the variation in mean antibacterial activity of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from a flashlight (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), after 15 minutes (T15) and 30 minutes (T30) against *Streptococcus canis*. Light exposure times include T0, T2, T8, T16, T32, and T64 38
Figura B3: "Boxplot" illustrating the variation in mean antibacterial activity of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from a flashlight (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), after 15 minutes (T15) and 30 minutes (T30) against *Pseudomonas aeruginosa*. Light exposure times include T0, T2, T8, T16, T32, and T64.....39
Figura B4: "Boxplot" illustrating the variation in mean antibacterial activity of riboflavin at different concentrations, photoactivated by ultraviolet A light from a flashlight (CU6 Nitecore®, Guangdong, China), after 15 minutes (T15) and 30 minutes (T30) against *Klebsiella pneumoniae*. Light exposure times include T0, T2, T8, T16, T32, and T64 39

CAPÍTULO 1. Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Ocorrências oculares são capazes de ocasionar injúria reversível ou irreversível do sistema visual. Entre elas, evidencia-se a ceratite ulcerativa, quadro emergencial que causa dor e perda da acuidade visual dos cães. A úlcera de córnea caracteriza-se pela perda de continuidade do epitélio da córnea que resulta na exposição do estroma subjacente (WHITLEY; HAMOR, 2021). A ceratomalácia ("melting corneano") ocorre quando há desequilíbrio entre a atividade da colagenase e da anticolagenase, processo que leva à liquefação do tecido estromal da córnea, o que resulta na destruição do tecido lamelar da córnea, normalmente associado à infecção bacteriana. Cães braquicefálicos apresentam elevada predisposição ao desenvolvimento de ceratite ulcerativa, devido a características anatômicas específicas dessas raças, como macroblefaro, lagoftalmia, alterações palpebrais (entrópio e ectrópio), anormalidades ciliares e deficiência quantitativa ou qualitativa do filme lacrimal. Essas condições aumentam a exposição e a vulnerabilidade da córnea, elevando o risco de lesões oculares (WHITLEY; HAMOR, 2021).

A investigação da microbiota bacteriana associada a úlceras de córnea em cães desempenha um papel crucial na compreensão e no tratamento eficaz dessa condição clínica. Entre as bactérias frequentemente identificadas nestes casos, destacam-se o *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. (HEWITT et al., 2020; VERDENIUS et al., 2023). A distinção entre as características das bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus* spp., e as gram-negativas, como *Pseudomonas* spp. e *Klebsiella* spp., é essencial para direcionar abordagens terapêuticas específicas, tendo em vista as diferenças na estrutura de suas paredes celulares e nas respostas aos tratamentos.

Em pacientes em que o tratamento clínico não é responsivo ou há perda significativa do estroma da córnea, a intervenção cirúrgica é necessária, entretanto pode resultar em cicatrizes significativas da córnea (SOONTORNVIPART et al., 2003).

Atualmente, a terapia fotodinâmica não cirúrgica pode ser empregada como coadjuvante no tratamento de ceratomalácia em cães. Este procedimento envolve a

exposição à luz ultravioleta (UVA) por meio de um sistema chamado "cross-linking", combinado com a aplicação tópica de riboflavina na córnea, promovendo a formação de ligações covalentes entre as fibras de colágeno e a inativação de patógenos por meio da fotossensibilização da riboflavina (POT et al., 2015; SUTER et al., 2022). O “cross-linking” de colágeno na córnea, utilizado para fortalecer sua estrutura, resulta na morte bacteriana através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a exposição à luz ultravioleta. A riboflavina atua como fotossensibilizador, gerando ROS que induzem estresse oxidativo nas bactérias, causando danos irreversíveis às células, comprometendo a integridade da membrana celular, peroxidação lipídica, lesões no DNA e, por fim, levando à morte bacteriana (SHARMA et al., 2019). No entanto, devido ao elevado custo do equipamento, sua aplicação na oftalmologia veterinária ainda não é uma realidade disseminada.

Recentemente, foi publicado estudo utilizando lanterna ultravioleta e riboflavina para realizar “cross-linking”, como método alternativo e econômico ao aparelho. O estudo demonstrou ótimo resultado no qual a cicatrização da córnea foi alcançada em 17 de um total de 21 olhos (LEMBO et al., 2018). Até o momento não há dados publicados sobre a eficiência da lanterna UVA (Nitecore Chameleon CU6®, Guangdong, China) para as principais cepas bacterianas envolvidas nas ceratites ulcerativas de cães. A hipótese deste estudo é sugerir um método alternativo, econômico e efetivo para ser utilizado no tratamento do ”melting” corneano.

5. CONCLUSION

The results indicate that the combination of riboflavin and UVA radiation can effectively reduce the count of *S. pseudintermedius*, especially at concentrations of 0.4% and 0.2% during 32 hours with 15-minute exposure, and at concentrations of 0.05% and 0.4% during 64 hours with 30-minute exposure. However, *P. aeruginosa* was resistant to the treatment, and the effects on *K. pneumoniae* and *S. canis* were variable, with some concentrations showing significant reductions but insufficient to

completely inhibit bacterial growth. Further studies on the efficacy of using the flashlight for stromal collagen effects are warranted.

6. REFERENCES

1. O'Neill DG, Lee MM, Brodbelt DC, Church DB, Sanchez RF. Corneal ulcerative disease in dogs under primary veterinary care in England: epidemiology and clinical management. Canine Genet Epidemiol. 2007;4:1–12. doi: 10.1186/s40575-017-00455

2. Ekapopphan D, Srisutthakarn A, Moonarmart W, Buddhirongawatr R, Bangphoomi N. Identification and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from severe corneal ulcers of dogs in Thailand. J Vet Med Sci. 2018;80(8):1259-1265. doi: 10.1292/jvms.18-0062

3. Verdenius CY, Broens EM, Slenter IJM, Djajadiningrat-Laanen SC. Corneal stromal ulcerations in a referral population of dogs and cats in the Netherlands (2012-2019): Bacterial isolates and antibiotic resistance. Vet Ophthalmol. doi:10.1111/vop.13080. 2023

4. Hewitt JS, Allbaugh RA, Kenne DE, Sebbag L. Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates From Dogs With Ulcerative Keratitis in Midwestern United States. Front Vet Sci. 2020; 7:583965. doi:10.3389/fvets.2020.583965

5. Tolar EL, Hendrix DVH, Rohrbach BW, Plummer CE, Brooks DE, Gelatt KN. Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with bacterial keratitis: 97 cases (1993–2003). J Am Vet Med Assoc. 2006; 228(1):80-85. doi: 10.2460/javma.228.1.80

6. Prado MR, Rocha MF, Brito EH, Girão MD, Monteiro AJ, Teixeira MF, Sidrim JJ. 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(1):33–37. doi: 10.1111/j.1463-5224.2005.04061.x

7. Tsvetanova A, Powell RM, Tsvetanov KA, Smith KM, Gould DJ. Melting corneal ulcers (keratomalacia) in dogs: A 5-year clinical and microbiological study (2014-2018). Vet Ophthalmol. 2021; 24(3):265-278. https://doi.org/10.1111/vop.12885

8. Martin de Bustamante M.G., Good K.L., Leonard B.C., Hollingsworth S.R., Edwards S.G., Knickelbein K.E., Cooper A.E., Thomasy S.M., Maggs D.J. Medical management of deep ulcerative keratitis in cats: 13 cases. J Feline Med Surg. 2019;21(4):387–393. doi:10.1177/1098612X18770

9. Whitley RD, Hamor RE. Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: Veterinary Ophthalmology. 6th ed. Gelatt KN, Ben-Shlomo G, Gilger BC, Hendrix DVH, Kern TJ, Plummer CE, editors. Wiley-Blackwell; Hoboken; 2021. p. 1082-1172.

10. Papich MG. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2013; 43(5):1091-1107. doi:10.1016/j.cvsm.2013.04.006

11. Dorbandt DM, Moore PA, Myrna KE. Outcome of conjunctival flap repair for corneal defects with and without an acellular submucosa implant in 73 canine eyes. Vet Ophthalmol. 2015; 18(2):116-122. doi:10.1111/vop.12193

12. Costa D, Leiva M, Sanz F, Espejo V, Esteban J, Vergara J, Díaz C, Huguet E, Cairó M, Ríos J, Peña MT. A multicenter retrospective study on cryopreserved amniotic membrane transplantation for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog. Vet Ophthalmol. 2019; 22(5):695-702. doi:10.1111/vop.12643

13. Soontornvipart K, Tuntivanich N, Kecova H, Raušer P. Conjunctival pedicle graft in dogs and cats: a retrospective study of 88 cases. Acta Vet Brno. 2003; 72(1):63-69. doi:10.2754/avb200372010063

14. Pot SA, Gallhöfer NS, Matheis FL, Voelter-Ratson K, Hafezi F, Spiess BM. Corneal collagen cross-linking as treatment for infectious and noninfectious corneal melting in cats and dogs: results of a prospective, nonrandomized, controlled trial. Vet Ophthalmol. 2014; 17(4):250-260. doi:10.1111/vop.12090

15. Spiess BM, Pot SA, Florin M, Hafezi F. Corneal collagen cross-linking (CXL) for the treatment of melting keratitis in cats and dogs: a pilot study. Vet Ophthalmol. 2014; 17(1):1-11. doi:10.1111/vop.12027

16. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. Am J Ophthalmol. 2003;135(5):620-627. doi:10.1016/s0002-9394(02)02220-1

17. Famose F. Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in eight dogs. Vet Ophthalmol. 2014; 17(5):358-367. doi:10.1111/vop.12085

18. Famose F. Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in ten cats. Vet Ophthalmol. 2015; 18(2):95-104. doi:10.1111/vop.12112

19. Zibura AE, Cullen MA, Rutledge H, Lassalle L, Salmon JH, Gilger BC, Westermeyer HD. Optimizing corneal riboflavin administration in ex vivo horse, dog, rabbit, and pig samples for use in corneal collagen cross-linking. Vet Ophthalmol. 2020; 23(5):840-848. doi: 10.1111/vop.1280

20. Suter A, Schmitt S, Hübschke E, Kowalska M, Hartnack S, Pot S. The bactericidal effect of two photoactivated chromophore for keratitis-corneal crosslinking protocols (standard vs. accelerated) on bacterial isolates associated with infectious keratitis in companion animals. BMC Vet Res. 2022; 18(1):317. doi:10.1186/s12917-022-03397-z.

21. Martins S.A., Combs J.C., Noguera G., Camacho W., Wittmann P., Walther R., Cano M., Dick J., Behrens A. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) *in vitro* for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci.2008; 49(8):3402–3408. doi:0.1167/iovs.07-1592.

22. Alio JL, Abbouda A, Valle DD, Del Castillo JM, Fernandez JA. Corneal cross-linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported cases. J Ophthalmic Inflamm Infect. 2013; 3(1):47. doi:10.1186/1869-5760-3-47

23. Sharma A, Sharma R, Chander J, Nirankari VS. *In vitro* antimicrobial efficacy of riboflavin, ultraviolet-A radiation, and combined riboflavin/ultraviolet-A radiation on ocular pathogens. Taiwan J Ophthalmol. 2023; 13(1):21-27. doi: 10.4103/tjo.tjo_28_21

24. Mundt JM, Rouse L, Van den Bossche J, Goodrich RP. Chemical and biological mechanisms of pathogen reduction technologies. Photochem Photobiol. 2014; 90:957-964. doi: 10.1111/php.12311

25. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 2004; 3:43, 650. doi: 10.1039/B311900A

26. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, Ruane PH, Platz MS, Martin CB, Ravanat JL, Cadet J, Goodrich RP. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. Photochem Photobiol. 2004; 80:15-21. doi:10.1562/2003-12-23-RA-

27. Tabibian D, Richoz O, Hafezi F. PACK-CXL: Corneal Cross-linking for Treatment of Infectious Keratitis. J Ophthalmic Vis Res. 2015; 10(1):77–80. doi:10.4103/2008-322X.156122

28. Lembo JA, Sapienza J, Wolfer J, Allgoewer I. A rapid and cost-effective method for corneal cross-linking for treatment of canine keratomalacia. In: Annual Scientific

Meeting Of The American College Of Veterinary Ophthalmologists; September 2018; Minneapolis, Minnesota.

29. Blondeau JM, Borsos S, Blondeau LD, Blondeau BJ. *In vitro* killing of *Escherichia co*li, *Staphylococcus pseudintermedius*, and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat. Vet Microbiol. 2012;155(2-4):284-290. doi:10.1016/j.vetmic.2011.08.015

30. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2020. Available from: https://www.R-project.org/.

31. Large TP, Mack S, Villiers E, Oliver J. *In vitro* susceptibility of canine corneal bacterial pathogens to three cross-linking protocols. Vet Ophthalmol. 2023;26:134-142. doi: 10.1111/vop.13425

32. Makdoumi K, Mortensen J, Crafoord S. Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. Cornea. 2010;29(12):1353-1358. doi: 10.1097/ICO.0b013e3181d36e01

33. Wang Z, 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. doi: 10.3389/fvets.2022.903633

34. Abbouda A, Abicca I, Alio JL. Infectious Keratitis Following Corneal Crosslinking: A Systematic Review of Reported Cases: Management, Visual Outcome, and Treatment Proposed. Semin Ophthalmol. 2014;1-7. doi: 10.3109/08820538.2014.96217

35. Hobden JA. *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. DNA Cell Biol. 2002;21(5-6):391-396. doi:10.1089/10445490260099674

36. O'Callaghan R, Caballero A, Tang A, Bierdeman M. *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis: Protease IV and PASP as Corneal Virulence Mediators. Microorganisms. 2019;7(9):281. doi:10.3390/microorganisms7090281

37. C Chee SP, Jap A. Endogenous endophthalmitis. Curr Opin Ophthalmol. 2001;12(6):464–470. doi:10.1097/00055735-200112000-00012

38. Kling S, Hufschmid FS, Torres-Netto EA, Randleman JB, Willcox M, Zbinden R, Hafezi F. High Fluence Increases the Antibacterial Efficacy of PACK Cross-Linking. Cornea. 2020;39(8):1020-1026. doi:10.1097/ICO.0000000000002335

39. Makdoumi K, Bäckman A. Photodynamic UVA-riboflavin bacterial elimination in antibiotic-resistant bacteria. Clin Exp Ophthalmol. 2016;44(7):582-586. doi: 10.1111/ceo.12737

40. Shen J, Liang Q, Su G, Zhang Y, Wang Z, Liang H, Baudouin C, Labbé A. Effect of Ultraviolet Light Irradiation Combined with Riboflavin on Different Bacterial Pathogens from Ocular Surface Infection. J Biophys. 2017;2017:3057329. doi:10.1155/2017/3057329

41. Pomakova DK, Hsiao CB, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Keynan Y, Russo TA. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumonia*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(6):981–989. doi:10.1007/s10096-011-1396-6

42. Bäckman A, Makdoumi K, Mortensen J, Crafoord S. The efficiency of cross-linking methods in eradication of bacteria is influenced by the riboflavin concentration and the irradiation time of ultraviolet light. Acta Ophthalmol. 2014;92(7):656–661. doi:10.1111/aos.12301