

Microbiota conjuntival de cães saudáveis da cidade de Araçatuba (SP)

Conjunctival microbiota of healthy dogs in Araçatuba city (SP)

Alexandre Lima de Andrade¹
Graciele Stringhini²
Fábio Luis Bonello²
Márcia Marinho³
Sílvia Helena Venturoli Perri³

RESUMO

Objetivo: Identificar os microrganismos da conjuntiva ocular de cães clinicamente saudáveis na região de Araçatuba (SP), no verão e no inverno. **Métodos:** Foram utilizados quarenta cães, machos e fêmeas, com idade variando entre 2 e 5 anos. Após limpeza ocular com água tratada, foram realizadas colheitas de material do saco conjuntival inferior com auxílio de “swabs” estéreis, para posterior isolamento e identificação de bactérias aeróbicas, anaeróbicas e fungos. **Resultados:** As bactérias de maior ocorrência foram o *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus β-haemolyticus*. O fungo de maior ocorrência foi *Penicilium* sp. **Conclusão:** Pôde-se concluir que houve variação da microbiota conjuntival normal em função da estação do ano. Dos microrganismos isolados, o único que apresentou diferença estatística significativa quanto à incidência sazonal foi o *Staphylococcus β-haemolyticus*, que foi isolado apenas no inverno.

Descritores: Conjuntiva/microbiologia; *Staphylococcus*/isolamento e purificação; Estações do ano; Cães

INTRODUÇÃO

A conjuntiva atua como barreira natural à entrada de microrganismos, sejam patogênicos ou não, e tem a função de proteção mecânica do bulbo ocular. Sendo a membrana mais exposta do organismo, mantém relação direta com o meio externo⁽¹⁻³⁾. Pode ser comparada a um nódulo linfático evertido, constituindo-se em mecanismo de defesa bem desenvolvido, o que facilita uma rápida resposta à invasão microbiana. Ainda, a atividade de troca de células, que se dá a cada 5 a 7 dias, inibe a invasão de microrganismos que ali residem⁽⁴⁾.

A população microbiana normal da superfície ocular interfere na invasão de microrganismos por privá-los de nutrientes, além de secretar substâncias com propriedades antimicrobianas⁽⁵⁻⁶⁾. A destruição da flora ocular normal por uso prolongado de antimicrobianos tópicos pode resultar em crescimento excessivo de bactérias, leveduras ou fungos, que podem tornar-se patogênicos⁽⁷⁾. Estes agentes originam-se principalmente da pele e trato respiratório superior e são relativamente constantes, não variando com as mudanças no conteúdo microbiano da atmosfera que os cercam⁽⁸⁾.

Assim como outras espécies, os cães estão vulneráveis a sofrerem injúrias externas e, dependendo do grau e intensidade do trauma, podem ocorrer processos inflamatórios superficiais corneanos e conjuntivais, bem como lesões graves a estruturas da túnica vascular e nervosa do globo ocular⁽⁹⁾. Com a perda de continuidade do epitélio, bactérias e/ou fungos podem se instalar de forma oportunista, colonizando e infectando o estroma

¹ Professor Assistente do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista - Campus de Araçatuba (SP).

² Acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista - Campus de Araçatuba (SP) Bolsista do PIBIC - CNPq.

³ Professora Assistente Doutora do Departamento de Apoio, Produção e Sanidade Animal do Curso de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista - Campus de Araçatuba (SP).

Endereço para correspondência: Rua Clóvis Pestana, 793 - Araçatuba (SP) CEP 16050-680.
E-mail: landrade@fmva.unesp.br

Recebido para publicação em 05.06.2001
Aceito para publicação em 12.12.2001

Nota Editorial: Pela análise deste trabalho e por sua anuência sobre a divulgação desta nota, agradecemos aos Drs. Marinho Jorge Scarpi e Paulo Sérgio de Moraes Barros.

corneano⁽¹⁰⁾. Vários estudos independentes da microbiota ocular em cães clinicamente normais, realizados em diferentes partes do mundo, apresentam resultados similares entre si, sendo que as bactérias Gram positivas são as que mais ocorrem⁽⁸⁾. No entanto, há que se considerar que não se trata de matéria que dispensa novas e originais investigações, principalmente porque a mesma pode variar em função da sazonalidade e região geográfica.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo identificar os microrganismos da conjuntiva ocular de cães clinicamente sadios na região de Araçatuba (SP), no verão e no inverno.

MÉTODOS

Foram utilizados 40 cães (26 machos e 14 fêmeas), com ou sem raça definida, com idade entre 2 e 5 anos, oriundos do atendimento médico-hospitalar do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” do Curso de Medicina Veterinária - FOA - UNESP - Campus de Araçatuba (SP), durante o ano de 2000. Previamente à colheita, os cães foram avaliados por meio de exame físico, para exclusão de alterações sistêmicas concorrentes com a execução da proposta, e submetidos a exame oftalmológico de rotina. Quanto a este último, os olhos foram avaliados com auxílio de biomicroscopia em busca de alterações oculares, principalmente as de cunho infeccioso.

Foram constituídos 2 grupos experimentais (n=40), sendo cada um deles subdividido em 2 subgrupos (n=20), a saber:

- GRUPO I: constituído de 20 cães, com colheitas programadas durante o verão.
- GRUPO II: constituído de 20 cães, com colheitas programadas durante o inverno.

Após contenção adequada do animal e limpeza das pálpebras do olho direito com algodão e água filtrada, foram colhidas amostras com auxílio de “swabs” (Bac-Swab – DME) de algodão hidrófilo estéril. Os mesmos foram pressionados direta e levemente no saco conjuntival inferior, através de movimentos rotatórios, tomando-se o cuidado para que não entrassem em contato com o tarso palpebral e pálpebras. As colheitas em cada animal foram realizadas a partir de três “swabs”, com a finalidade de se isolar bactérias aeróbicas, bactérias anaeróbicas e fungos.

Para o isolamento de bactérias aeróbicas, os “swabs” foram introduzidos em tubos contendo 5,0 ml de “Brain Heart Infusion Broth” (BHI), como pré-cultivo, e incubados a 37°C por 18 horas. Em seguida, as culturas foram repicadas em placas de Petri contendo Ágar Sangue e MacConkey, e incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o crescimento das colônias nos diferentes meios, elas foram submetidas a testes bioquímicos para a identificação⁽¹¹⁻¹²⁾.

Posteriormente à identificação primária das bactérias, observou-se tamanho, morfologia e características individuais de cada colônia bacteriana, através dos seguintes procedimentos: método de Gram, crescimento em ágar MacConkey, teste da catalase, teste da oxidase, teste de motilidade e teste de oxidação-fermentação⁽¹¹⁾.

Após a identificação da bactéria quanto ao seu gênero, foram realizados testes bioquímicos para a identificação da sua espécie. Para tal empregou-se os seguintes testes: produção de ácido sulfúrico, citrato de Simons, coagulase, glicose-gás, hemólise, indol, uréia, lisina, LTD (lactose-trealose-dextrose), manitol salt ágar, motilidade e sensibilidade à polimixina novobiocina. Para identificação das colônias sem crescimento em meio MacConkey, utilizou-se o meio Hugay.

Para o isolamento de microrganismos anaeróbicos, os “swabs” foram semeados em placas de Petri contendo Ágar Sangue e incubados a 37°C em jarra de anaerobiose, durante 24 a 48 horas. Das colônias que cresceram, foram preparadas lâminas com posterior coloração pelo método de Gram. Tais colônias também foram submetidas a testes bioquímicos⁽¹¹⁾.

Quanto à análise das colônias isoladas, utilizou-se os mesmos testes realizados para bactérias aeróbicas na identificação primária e do gênero.

Para o isolamento de fungos, os “swabs” foram semeados em tubos contendo Ágar Sabouraud. Uma classificação inicial foi dada pela análise morfológica das colônias, separando-as segundo apresentação de hifas, parte germinativa e conídios. Foram então, confeccionadas lâminas a partir das colônias, que foram coradas por métodos específicos conforme técnicas preconizadas por Carter (1988).

Para o exame microscópico direto do fungo, utilizou-se métodos de coloração, tais como: azul algodão, Gram, azul de metileno, PAS (Periodic Acid-Schiff), Giemsa e impregnação por sais de prata.

Após 4 semanas sem qualquer traço de crescimento fúngico, os tubos foram descartados como “negativos”. Algumas colônias puras necessitaram de repiques em placa de Petri contendo ágar Sabouraud acrescido de antibiótico (estreptomomicina 1% e penicilina G potássica 0,5%) para um melhor crescimento e, então, correta identificação.

No que se refere à análise estatística, foi empregado o Teste Exato de Fisher com nível de significância de 5%, para verificar a associação entre respostas (presença ou ausência do microrganismo) e estações do ano (inverno e verão).

RESULTADOS

A microbiota conjuntival de cães no verão e no inverno, nas condições aqui descritas constituiu-se de bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus* sp, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter cloacae*, conforme ilustra a Tabela 1. Quanto à sazonalidade pôde-se observar diferença estatística apenas quanto ao agente *Staphylococcus β-haemolyticus*, que foi isolado apenas no inverno.

No que se refere aos fungos isolados, encontraram-se agentes comuns à microbiota da de estruturas anatômicas expostas, como: *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Dermatium* sp., *Cladosporium* sp e *Curvularia* sp. Foram isolados ainda,

Tabela 1. Frequência de bactérias aeróbicas e anaeróbicas isoladas da conjuntiva ocular de 20 cães clinicamente sadios no verão, e 20 cães clinicamente sadios no inverno, da região de Araçatuba (SP) oriundos do atendimento do hospital veterinário "Luiz Quintiliano de Oliveira" - UNESP - Araçatuba

Bactérias	Inverno		Verão	
	n	%	n	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	95,0	20	100,0
<i>Staphylococcus β-haemolyticus</i> *	6	30,0	0	0,0
<i>Bacillus</i> sp	2	10,0	1	5,0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	10,0	1	5,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0,0	2	10,0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	0	0,0	2	10,0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0,0	1	5,0
<i>Staphylococcus hemolítico coagulase +</i>	0	0,0	1	5,0

* associação significativa entre presença ou não do microrganismo e estação do ano, p<0,05

Chrisosporum sp, *Mucor* sp, *Pullularia* sp, *Trichophyton verrucosum*, no inverno e *Penicillium* sp e *Dermatium* sp, no verão, conforme descrito na Tabela 2.

DISCUSSÃO

Poucos são os estudos referentes à microbiota conjuntival dos olhos normais de cães na literatura^(8,13-16). No entanto, as afecções oculares com participação de microrganismos potencialmente patogênicos nesta espécie são frequentes.

A microbiota conjuntival mantém-se estável em animais clinicamente sadios, isentos de afecções oculares ou sistêmicas. Com isto, conhecê-la em todas as espécies é necessário, principalmente na vigência de infecções oculares refratárias a tratamentos. A destruição desta microbiota normal por uso prolongado de antimicrobianos tópicos pode resultar em crescimento excessivo de bactérias e/ou fungos⁽⁷⁾.

A microbiota ocular de equinos pode variar em função da sazonalidade e região geográfica, tendo já sido demonstrado que alguns agentes prevalecem no inverno e outros no verão^(9,13). De modo geral, o mesmo fora observado nesta investigação (Tabelas 1 e 2). No entanto, segundo Costa et al. (1989)⁽¹⁴⁾, esta variação deve-se ainda ao método de colheita, de cultivo, tipo de "swab" e fase reprodutiva dos animais. Não se objetivou aqui isolar os agentes da conjuntiva ocular de cães sadios considerando-se estes aspectos, e sim determiná-los em uma amostra de animais de determinada região em diferentes estações do ano, a exemplo do que fora reportado na literatura consultada^(8,13-15).

A microbiota conjuntival de cães no verão e no inverno, nas condições aqui descritas constituiu-se de bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus* sp, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter cloacae*^(14,16). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos da microbiota ocular de outras espécies^(9-10,12,17-18).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp foram isoladas na conjuntiva ocular normal de

gatos^(8,15). As mesmas também foram identificadas nesta experimentação, o que corrobora com resultados obtidos na identificação da microbiota ocular de equinos⁽¹²⁾, e com o isolamento destes agentes obtidos de amostras de abscessos estromais secundários a traumas nesta mesma espécie^(10,18-21).

O *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e o *Staphylococcus epidermidis* são agentes saprófitas da flora da pele de cães. Tais bactérias foram encontradas nos olhos da maioria dos cães utilizados nesta avaliação.

Dos agentes isolados no verão e no inverno pôde-se observar diferença estatística apenas quanto ao agente *Staphylococcus β-haemolyticus*, que foi isolado apenas no inverno. Provavelmente, tal bactéria seja constituinte da microbiota conjuntival de cães que foram estudados em outras regiões; no entanto, a identificação das mesmas deu-se apenas quanto ao gênero^(14,21), fato este, que não ocorreu nesta experimentação, onde também se determinou a espécie dos agentes bacterianos isolados. Em equinos, a microbiota ocular externa pode variar em função da estação do ano, sendo que o *Staphylococcus* spp e *Corynebacterium* spp prevalecem no inverno e, *Staphylococcus* spp e *Bacillus* spp no verão⁽⁹⁾.

No que se refere aos fungos isolados, encontraram-se agentes comuns à microbiota da de estruturas anatômicas expostas, como: *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Dermatium* sp, que são agentes esperados no isolamento na conjuntiva ocular normal de cães, em função do contato direto do ar com esta estrutura anatômica⁽¹⁻³⁾. Outros fungos de ocorrência menor, mas com citações na microbiota conjuntival de equinos, em

Tabela 2. Frequência de fungos isolados da conjuntiva ocular de 20 cães clinicamente sadios no verão, e de 20 cães clinicamente sadios no inverno, da região de Araçatuba (SP) oriundos do atendimento do hospital veterinário "Luiz Quintiliano de Oliveira" - UNESP - Araçatuba, no inverno e verão

Fungos (*)	Inverno		Verão	
	n	%	n	%
<i>Chrisosporum</i> sp	2	10,0	0	0,0
<i>Mucor</i> sp	2	10,0	0	0,0
<i>Pullularia</i> sp	2	10,0	0	0,0
<i>Trichophyton verrucosum</i>	2	10,0	0	0,0
<i>Dermatium</i> sp	1	5,0	2	10,0
<i>Fusarium</i> sp	1	5,0	2	10,0
<i>Hormodendrum</i> sp	1	5,0	0	0,0
<i>Mycelia sterilia</i>	1	5,0	1	5,0
<i>Rhizopus</i> sp	1	5,0	0	0,0
<i>Penicillium</i> sp	0	0,0	4	20,0
<i>Aspergillus</i> sp	0	0,0	2	10,0
<i>Cladosporidium</i> sp	0	0,0	2	10,0
<i>Aerobasidium</i> sp	0	0,0	1	5,0
<i>Curvularia</i> sp	0	0,0	1	5,0
<i>Dermaciacea</i> sp	0	0,0	1	5,0
<i>Grothidium</i> sp	0	0,0	1	5,0
<i>Trichoderma</i> sp	0	0,0	1	5,0
<i>Trichosporum</i> sp	0	0,0	1	5,0

(*) associações não significativas entre presença ou não dos microrganismos e estação do ano p>0,05

condições semelhantes com as daqui adotadas⁽¹³⁾, foram também isolados nesta investigação. Quanto a estes, podemos citar: *Cladosporium* sp e *Curvularia* sp que apresentaram uma frequência maior do que a observada em outros estudos; apesar de serem tipicamente saprófitas, podem assumir patogenicidade em condições traumáticas oculares⁽¹³⁾.

Embora a frequência de ceratites micóticas seja maior em eqüinos do que em cães e gatos, espécies de *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp têm sido isoladas da conjuntiva de cães e gatos, sendo as duas primeiras as mais freqüentes em ceratites fúngicas⁽¹⁵⁾. No trabalho ora descrito, tais agentes foram encontrados em olhos clinicamente sadios.

Foram ainda isolados *Chrisosporum* sp, *Mucor* sp, *Pullularia* sp, *Trichophyton verrucosum*, no inverno e *Penicillium* sp, *Dermatium* sp, no verão, agentes ainda não descritos em outros estudos⁽¹³⁻¹⁴⁾. Tal fato pode estar relacionado com as altas temperaturas que são registradas na região de Araçatuba (mesmo no inverno), que podem favorecer o crescimento destes agentes. Quanto à ocorrência dos fungos, não foi observada diferença estatística nas estações do ano estudadas (Tabela 2). Vale ressaltar ainda, que o fato de umedecer a região periocular com água filtrada no ato de limpeza dos olhos como fora descrito, é possível que tenha ocorrido a transferência de conídios da margem palpebral para o fundo de saco e que os agentes isolados pertençam flora da pele, e não da conjuntiva ocular, embora Samuelson et al. (1984) e Costa et al. (1989), não tivessem aventado tal possibilidade utilizando o mesmo procedimento de colheita⁽¹³⁻¹⁴⁾.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e com as condições aqui adotadas, pode-se concluir que:

1. Das bactérias isoladas neste estudo houve predominância de: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus β -haemolyticus*;
2. Dos fungos isolados neste estudo, os mais freqüentes no verão foram: *Penicillium* sp, *Dermatium* sp, *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp e *Cladosporidium* sp;
3. No inverno, houve predominância dos fungos *Chrisosporum* sp, *Mucor* sp, *Pullularia* sp e *Trichophyton verrucosum*;
4. Dos microrganismos isolados, o único que apresentou diferença estatística significativa quanto à incidência sazonal (inverno e verão) foi o *Staphylococcus β -haemolyticus*.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Assistente Doutor Gilson Machado D'Antônio do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Fa-

culdade de Odontologia de Araçatuba (SP) - UNESP pelo auxílio técnico na identificação dos fungos isolados neste trabalho.

ABSTRACT

Purpose: To identify the microorganisms of the ocular conjunctiva in healthy dogs in Araçatuba (SP) city, in summer and winter. **Methods:** Forty dogs, male and female, age ranging from 2 to 5 years were used. After ocular wash, samples were collected from the inferior conjunctival sac in order to isolate and identify anaerobic, aerobic bacteria and fungi. **Results:** *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus β -haemolyticus* and *Penicillium* sp. were the most frequently observed microorganisms. **Conclusion:** There was ocular conjunctiva microbiota variation between the studied seasons. *Staphylococcus β -haemolyticus* was observed only during the winter.

Keywords: Conjunctiva/microbiology; *Staphylococcus*/isolation & purification; Seasons; Dogs

REFERÊNCIAS

1. Riss RC. Equine Ophthalmology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1981.
2. Lavach JD. Large Animal Ophthalmology. St. Louis: Mosby; 1990.
3. Slatter D. Fundamentals of veterinary ophthalmology. 2ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1990. 630p.
4. Reed WP, Williams RC. Bacterial adherence: first steps in the pathogenesis of certain infections. J Chronic Dis 1978;31:67-72.
5. Fredrickson AG. Behavior of mixed cultures of microorganisms. Annu Rev Microbiol 1977;31:63-87.
6. Hsu C, Wiseman GM. Antibacterial substances from staphylococci. Can J Microbiol 1967;13:947-55.
7. Eichenbaum JD, Lavach JD, Severin GA, Paulsen ME. Immunology of the ocular surface. Comp Cont Educ Pract Vet 1987;9:1101-9.
8. Gaskin JM. Microbiology of the canine and feline eye. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1980;10:303-16.
9. Whitley RD, Moore CP. Microbiology of the equine eye in health and disease. Vet Clin North Am Large Anim Prac 1984;6:451-66.
10. Moore CP, Heller N, Majors LJ, Whitley RD, Burgess EC, Weber J. Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. Am J Vet Res 1988;49:773-7.
11. Carter GR. Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária. São Paulo: Roca; 1988.
12. Pisani EHR. Microbiota conjuntival normal de eqüinos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1993.
13. Samuelson DA, Andresen TL, Gwin KN. Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs and cats. J Vet Med Assoc 1984;184:1240-2.
14. Costa M, Cardoso MI, Fernandes JCT. Flora bacteriana aeróbica conjuntival de cães clinicamente normais. Arq Fac Vet UFRGS 1989;17:53-7.
15. Gerding Junior PA, Kakoma I. Microbiology of the canine and feline eye. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1990;20:615-25.
16. Sturion DJ, Pardo RB, Shiozawa MM, Palu AB, Malucelli Neto LR, Nakata RT, et al. Estudo da Microbiota de cães - Dados parciais. In: XX Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais. 1999 Ago 8-11. Anais. Águas de Lindóia, Brasil; 1999. p.37.
17. Bistner SI, Roberts SR, Anderson RP. Conjunctival bacteria: clinical appearances can be deceiving. Mod Vet Pract 1969;50:45-7.
18. Hustington PJ, Coloe PJ, Bryden JD, Macdonald F. Isolation of *Moraxella* sp from horses with conjunctivitis. Aust Vet J 1987;64:118-9.
19. Rebhun WC. Corneal stromal abscesses in the horses. J Am Vet Res 1982;49:677-9.
20. Rebhun WC. Corneal stromal infections in horses. Comp Cont Educ Pract Vet 1992;14:363-71.
21. McLaughlin SA, Gilger BC, Whitley RD. Infectious keratitis in horses: evaluation and management. Comp Cont Educ Pract Vet 1992;14:372-80.