



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL

DANIELLE ANTONELLI MOTTA SGRIGNOLI

**PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA DE *STAPHYLOCOCCUS*
PSEUDINTERMEDIUS ISOLADO DE CÃES COM CERATOCONJUNTIVITE SECA**

Presidente Prudente - SP
2019

DANIELLE ANTONELLI MOTTA SGRIGNOLI

PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA DE *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* ISOLADO DE CÃES COM CERATOCONJUNTIVITE SECA

Tese, apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia e Saúde animal.

Orientador: Dr. Rogério Giuffrida

636.089 77 Sgrignoli, Danielle Antonelli Motta
S774u Perfil de sensibilidade microbiana de *Staphylococcus
psedintermedius* isolado de cães com ceratoconjuntivite
seca / Danielle Antonelli Motta Sgrignoli. – Presidente
Prudente, 2019.
54f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2019.
Bibliografia.
Orientador: Rogério Giuffrida

1. *Staphylococcus pseudintermedius*. 2.
Sensibilidade Microbiana. 3. Oftalmopatias. 4. Olho
seco. I. Título.

DANIELLE ANTONELLI MOTTA SGRIGNOLI

PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA DE *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* ISOLADO DE CÃES COM CERATOCONJUNTIVITE SECA

Tese, apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia e Saúde animal.

Presidente Prudente, 25 de setembro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Giuffrida
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Silvia Maria Caldeira Franco Andrade
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Cecilia Laposy Santarem
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches
Universidade Santo Amaro
São Paulo-SP

Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva
Universidade Estadual de Feira de Santana

DEDICATÓRIA

Dedico à Deus este trabalho por me capacitar. Ao meu esposo pelo seu amor e carinho com que esteve ao meu lado em todos os momentos da execução me apoiando, ajudando e confortando. Aos meus filhos por compreender as minhas ausências.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Jesus, por estar ao meu lado durante toda a minha vida, pelos seus ensinamentos e incomparável modelo de existência.

Agradeço ao meu marido por estar ao meu lado em tantos acontecimentos que ocorreram durante o percurso desta pesquisa, me apoiando em todos os momentos e sempre acreditando em mim. Eterna gratidão por tudo que tem feito por mim e por nossa família.

Agradeço aos meus filhos Sabrina, Sarah, Rafael e Julia por serem bênçãos em minha vida, e me ensinarem o mais perfeito amor.

Agradeço aos meus pais, por me apoiar durante toda minha vida.

Agradeço em especial ao meu orientador, Professor Dr. Rogério Giuffrida, que não mediu esforços em todos os momentos solicitados.

Agradeço à Professora Dra. Silvia Franco Andrade pela total ajuda, apoio e conhecimento durante toda a realização deste trabalho.

Agradeço o Prof. Marcus Vinicius, pela contribuição na realização desta pesquisa.

Agradeço a Profa. Sueli Fumie, e ao Doutorando Caio Ferreira de Oliveira, da Faculdade Estadual de Londrina, pela imensa colaboração na realização dos testes.

Agradeço a Aline Répik por toda colaboração na coleta dos materiais, e pelo aprendizado no laboratório.

Agradeço a Danielle Alves e aos alunos do curso de Medicina Veterinária envolvidos no projeto, pela contribuição na coleta dos materiais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço aos proprietários e animais, por acreditar e depositar confiança em nossa pesquisa.

“Sem a presença de Deus nosso criador, nada tem sentido”.

RESUMO

Perfil de sensibilidade microbiana de *Staphylococcus pseudintermedius* isolado de cães com ceratoconjuntivite seca

A ceratoconjuntivite seca (CCS) ou doença do olho seco é uma condição inflamatória que acomete a superfície ocular dos cães, reduzindo o componente aquoso do filme lacrimal. Dentre as possíveis complicações, destacam-se as infecções secundárias por agentes bacterianos endógenos que se multiplicam em razão das alterações do microambiente ocular. O *Staphylococcus pseudintermedius* é um coco Gram-positivo produtor da enzima plasma-coagulase, sendo o principal agente oportunista envolvido nas infecções oculares secundárias a CCS. O presente estudo dividiu-se em dois artigos. O primeiro artigo avaliou 50 cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* isolados de 25 cães com ceratoconjuntivite seca confirmada por meio de teste lacrimal de Schirmer (TLS), teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL) e teste da Lissamina verde (TLV) e fluoresceína (TF). Adicionalmente, procedeu-se a avaliação de escores clínicos e citopatológicos de esfregaços superficiais dos olhos dos animais. As cepas isoladas foram testadas quanto a sensibilidade para cálculo do índice de múltipla resistência a antimicrobianos (IMR), expressão de fatores de virulência (produção das enzimas urease, gelatinase, dnase, hemolisina) e gene associado à produção de biofilmes (icaA). Constatou-se diferenças significativas entre escores de secreção, entre animais com olhos colonizados por cepas urease-positivas e urease-negativas. Apenas 3 (6%) das cepas apresentaram presença do gene icaA. Verificou-se que 24 (48%) linhagens de *S. pseudintermedius* manifestaram IMR igual ou superior à 0,3 e correlação negativa entre o resultado TLS e o TRFL e o IMR. O segundo artigo avaliou o perfil de sensibilidade de 20 cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* isoladas de swabs de secreção ocular dos olhos de 60 cães com ceratoconjuntivite seca confirmada pelo teste lacrimal de Schirmer (TLS) e Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL). Os testes de sensibilidade foram baseados no método de disco-difusão. Adicionalmente, procedeu-se o D teste para avaliar o fenótipo de resistência induzida a clindamicina pela eritromicina e calculou-se o índice de múltipla resistência agregado (IMRA). Foram observadas proporções baixas de resistência para Cefalexina (1/20 = 5%) e Imipenem (0/20 = 0%), intermediárias para Clindamicina (5/20 = 25%), Cloranfenicol (6/20 = 30%), Eritromicina (6/20 = 30%), Gentamicina (7/20 = 35%) e Vancomicina (3/20 = 15%) e altas para Ofloxacina (10/20 = 50%), Penicilina G (10/20 = 50%) e Tetraciclina (12/20 = 60%). Sete das 20 amostras (35%) foram positivas no D-teste. O IMRA foi de 0,325. Quatro cepas apresentaram padrão de resistência idêntico, caracterizado por sensibilidade somente frente a Imipenem, Cefalexina e Vancomicina. A resistência global frente aos antimicrobianos revelou predominância de cepas resistentes nos olhos de animais. Este resultado é reforçado pela detecção de três cepas resistentes a sete classes de antimicrobianos, sendo sensíveis somente a Imipenem, Cefalexina e Vancomicina, podendo caracterizar riscos de transmissão zoonótica de agentes multirresistentes dos cães para humanos. Os resultados indicam que olhos dos cães com CCS podem ser secundariamente colonizados por cepas resistentes à antimicrobianos comumente indicados para uso oftálmico, reforçando a necessidade de avaliar a sensibilidade *in vitro* de *S. pseudintermedius* para respaldar o regime terapêutico.

Palavras-chave: Oftalmopatias. Olho seco. Resistência Bacteriana. Sensibilidade Bacteriana. *Staphylococcus pseudintermedius*.

ABSTRACT

Microbial sensitivity profile of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs with keratoconjunctivitis sicca

Keratoconjunctivitis sicca (KCS) or dry eye disease is an inflammatory condition that affects the ocular surface of dogs, reducing the aqueous component of the tear film. Possible complications include infections by endogenous bacterial agents that multiply due to changes in the ocular microenvironment. *Staphylococcus pseudintermedius* is a Gram-positive coagulase producer of the plasma coagulase enzyme and is the main opportunistic agent involved in ocular infections secondary to CCS. The present study was divided into two articles. The first article evaluated 50 strains of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from 25 dogs with dry keratoconjunctivitis confirmed by Schirmer's tear test (TLS), tear film rupture test (TRFL) and green Lissamine (TLV) and fluorescein (TF) test. Additionally, clinical and cytopathological scores of superficial eye smears were evaluated. The isolated strains were tested for sensitivity to calculate multiple antimicrobial resistance (IMR) index, expression of virulence factors (production of urease, gelatinase, dnase, hemolysin) and gene associated with biofilm production (*icaA*). Significant differences were found between secretion scores between animals with eyes colonized by urease-positive and urease-negative strains. Only 3 (6%) of the strains presented presence of the *icaA* gene. Twenty-four (48%) strains of *S. pseudintermedius* showed an IMR equal to or greater than 0.3 and a negative correlation between TLS and TRFL and IMR. The second article evaluated the sensitivity profile of 20 strains of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from eye secretion swabs of 60 dogs with dry keratoconjunctivitis confirmed by the Schirmer tear test (TLS) and Tear Film Break Test (TRFL). Sensitivity tests were based on the disc diffusion method. In addition, the D test was performed to evaluate the phenotype of clindamycin-induced resistance by erythromycin and the aggregate multiple resistance index (IMRA) was calculated. Low resistance ratios for Cephalexin (1/20 = 5%) and Imipenem (0/20 = 0%), intermediate for Clindamycin (5/20 = 25%), Chloramphenicol (6/20 = 30%), Erythromycin, were observed. (6/20 = 30%), Gentamycin (7/20 = 35%) and Vancomycin (3/20 = 15%) and high for Ofloxacin (10/20 = 50%, Penicillin G (10/20 = 50%) Tetracycline (12/20 = 60%) Seven of the 20 samples (35%) were positive on the D-test IMRA was 0.325 Four strains showed identical resistance pattern, characterized by sensitivity only to Imipenem, Cephalexin and Vancomycin Global resistance to antimicrobials revealed predominance of resistant strains in animal eyes This result is reinforced by the detection of three strains resistant to seven classes of antimicrobials, being sensitive only to Imipenem, Cephalexin and Vancomycin and may characterize risks of zoonotic transmission. of multiresistant agents from dogs to humans. The results indicate that eyes of dogs with CCS may be secondarily colonized by antimicrobial resistant strains commonly indicated for ophthalmic use, reinforcing the need to evaluate the in vitro sensitivity of *S. pseudintermedius* to support the therapeutic regimen.

Keywords: Ophthalmopathies. Dry eye. Bacterial resistance. Bacterial Sensitivity. *Staphylococcus pseudintermedius*.

SUMÁRIO

| | | |
|---|---|----|
| 1 | ARTIGO 1..... | 10 |
| 2 | ARTIGO 2..... | 23 |
| | ANEXO 1- ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (ARTIGO 1) | 40 |
| | ANEXO 2- CIÊNCIA RURAL (ARTIGO 2) | 49 |

Influência dos fatores de virulência de *Staphylococcus pseudintermedius* nos exames clínicos, oftálmicos e citológicos dos olhos de cães com ceratoconjuntivite seca.

Influence of virulence factors of *Staphylococcus pseudintermedius* on clinical, ophthalmic and cytological examinations of the eyes of dogs with keratoconjunctivitis sicca.

Danielle Antonelli Motta Sgrignoli¹, Caio Ferreira de Oliveira², Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues³, Sueli Fumie Yamada Ogatta⁴, Aline Ferreira Repik⁵, Danielle Alves⁶, Luís Felipe Zulim⁷, Silvia Franco Andrade⁸, Rogerio Giuffrida⁸

¹Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Unoeste, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

²Doutorando do Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

³Prof. Dr. do Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional e Ciências da Saúde da UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil

⁴Prof. Dr. do Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

⁵ Acadêmica do curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

⁶Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Unoeste, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

⁷Docente do curso de Medicina veterinária da Unoeste, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

⁸Prof. Dr. do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Unoeste, (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

*Correspondence: rgiuffrida@unoeste.br

Resumo

O presente estudo avaliou 50 linhagens de *Staphylococcus pseudintermedius* isoladas de 25 cães com ceratoconjuntivite seca (CCS) confirmada por meio de teste lacrimal de Schirmer (TLS), teste de ruptura do filme lacrimal (TRFL), teste da Lissamina verde (TLV) e fluoresceína (TF). Adicionalmente, procedeu-se a avaliação de escores clínicos e citopatológicos de esfregaços superficiais dos olhos dos animais. As cepas isoladas foram testadas quanto a sensibilidade para cálculo do índice de múltipla resistência a antimicrobianos (IMR), expressão de fatores de virulência (produção das enzimas

urease, coagulase, gelatinase, dnase, hemolisina) e gene associado à produção de biofilmes (icaA) Constatou-se diferenças significativas entre escores de secreção, entre animais com olhos colonizados por cepas urease-positivas e uease-negativas. Apenas 3 (6%) das cepas apresentaram presença do gene icaA. Verificou-se que 24 (48%) linhagens de *S. pseudintermedius* manifestaram $IMR \geq 0,3$ e correlação negativa entre o resultado TLS e o TRFL e o IMR. Conclui-se que linhagens resistentes de *S. pseudintermedius* apresentam capacidade de colonizar os olhos com CCS com mais frequência do que cepas sensíveis.

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*. Fatores de virulência. Gene associado a produção de biofilmes. Olho seco. Cães.

Abstract

The presente study evaluated 50 isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from 25 dogs with dry keratoconjunctivitis (KCS) confirmed by Schirmer's tear test (STT) tear film rupture test (BUT) and green lysamine test (GLT) and fluorescein (FT). Additionally, clinical and cytopathological scores of superficial eye smears were evaluated. The isolated strains were tested for sensitivity to calculate the multiple antimicrobial resistance (MAR) index, expression of virulence factors (production of urease, gelatinase, coagulase, dnase, hemolysin) and gene associated with biofilm production (icaA). Significant differences were observed between secretion scores, between animals with eyes colonized by urease-positive and uease-negative strains. Only 3 (6%) of the strains presented presence of the icaA gene. Twenty-four (48%) strains of *S. pseudintermedius* showed an MAR equal to or greater than 0.3 and a negative correlation between STT and BUT and MAR. It was concluded that resistant steains of *S. pseudintermedius* are able to colonize the eye with KCS more frequently than sensitive strains.

Keywords: *Staphylococcus pseudinternedius*. Virulence factors. Gene associated with biofilm production. Dry eye. Dogs

1. Introdução

O gênero *Staphylococcus* constitui um grupo de cocos anaeróbios facultativos Gram-positivos, comuns em humanos e animais. São microrganismos mesófilos com crescimento ótimo a temperatura entre 35-37°C, e desenvolvem-se rapidamente na maioria dos meios nutritivos após 24 horas de incubação (Quinn et al., 2011).

As principais espécies patogênicas expressam a enzima coagulase, capaz de converter fibrinogênio em fibrina. As espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos incluem *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subespécie *coagulans*, *S. hyicus* e *S. lutrae*. *Staphylococcus* coagulase-negativos são patógenos relativamente de menor impacto que geralmente causam infecções oportunistas em hospedeiros comprometidos (Quinn et al., 2011; Bannoehr e Guardabassi, 2012).

S. pseudintermedius pertence a um complexo similar fenotipicamente conhecido como Grupo *intermedius*, que também inclui as espécies *S. intermedius* e *S. delphini* (Bannoehr e Guardabassi, 2012). Devido à falta de testes fenotípicos confiáveis e testes comerciais disponíveis, a identificação de rotina de *S. pseudointermedius* em laboratórios de diagnóstico é confusa, contudo, as outras espécies do grupo *Staphylococcus intermedius* são virtualmente inexistentes em cão. Desta forma, tem sido proposto que todos os isolados caninos sejam classificados como *S. pseudointermedius*, a não ser que se comprove o contrário através de genotipagem (Bannoehr and Guardabassi, 2012).

S. pseudintermedius é frequentemente isolada de olhos de cães, atuando como oportunista em diversas situações. A bactéria pode estar associada a blefarite primária em cães com quadro de piodermite juvenil, e infecções secundárias à ceratoconjuntivite seca, determinando sinais clínicos como hiperemia conjuntival, secreção purulenta e desconforto ocular que varia de leve a moderado (Hindley et al., 2016). Nos últimos anos, estudos têm demonstrado o papel de cepas multirresistentes nas infecções oculares de cães, incluindo espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivas que podem agravar os quadros de CCS (Kang et al., 2014).

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou olho seco, é uma oftalmopatia inflamatória crônica, degenerativa, comum em cães e humanos caracterizada por uma diminuição na camada aquosa do filme lacrimal (quantitativo) e/ou uma deficiência na camada lipídica ou mucina (qualitativa) causando um processo inflamatório progressivo, principalmente

nas glândulas lacrimais, córnea e conjuntiva, geralmente de origem imunomediada (Williams, 2008). Podemos destacar ainda outras causas como algumas doenças virais (cinomose), fármacos (sulfonamidas), doenças metabólicas (hipotireoidismo) e remoção da glândula da terceira pálpebra que podem induzir CCS (Dodi, 2015). Os sinais clínicos iniciais consistem em secreção mucoide a mucopurulenta, conjuntivite bacteriana, blefarite, hiperemia, quemose, prurido (especialmente na fase crônica) ceratite, seguida de vascularização, pigmentação, queratinização e úlceras de córnea (Wilkie, 1996; Maggs, 2008).

O presente trabalho tem como objetivo, avaliar fatores de virulência e resistência microbiana a múltiplos antimicrobianos em linhagens de *S. pseudintermedius* isolados de cães com CCS.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente – SP. O estudo foi conduzido conforme as normas de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo: 3050) da UNOESTE e da ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology – Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research*).

Foram incluídos na pesquisa 25 cães sem predileção racial, etária e sexual, com presença de um ou mais sinais oculares característicos de CCS, incluindo opacidade, secreção, conjuntivite, pigmentação, neovascularização e úlcera de córnea, provenientes da rotina de atendimento ambulatorial. Os sinais oculares foram avaliados com lâmpada de fenda portátil. O diagnóstico de CCS foi confirmado por meio do Teste Lacrimal de Schirmer (Teste de Schirmer® - Ophthalmos, São Paulo, Brasil), em mm/min, sem colírio anestésico para avaliar a porção quantitativa da lágrima. Após introduzir 0,5 cm da tira no saco conjuntival durante um minuto foram considerados positivos animais com leituras correspondentes a ≤ 10 mm/min. Complementarmente, procedeu-se o Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL), em segundos, para avaliar a porção qualitativa da lágrima. Após instilar uma gota de colírio de fluoresceína® 1 % (Allergan, São Paulo, Brasil), com uma lâmpada de fenda (Kowa, Japan), foi observado o tempo entre o último piscar e o aparecimento de manchas ou pontos escuros no filme lacrimal, sendo considerados positivos para TRFL valores ≤ 15 segundos (Maggs, 2008). Para reduzir o erro individual no teste, foram realizadas duas medidas

consecutivas e calculada a média. Para verificação da presença de úlceras de córnea, procedeu-se o teste de fluoresceína, que consistiu em instilar uma gota de colírio de fluoresceína[®] 1 % (Allergan, São Paulo, Brasil), nos olhos, seguido da lavagem com solução fisiológica e avaliação de porções fluorescentes (Maggs, 2008).

O Teste da Lissamina Verde (TLV) foi utilizado para avaliar a presença de células desvitalizadas da córnea e conjuntiva. Uma fita de lissamina verde (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), foi mantida em contato com o menisco lacrimal do fundo do saco inferior. A leitura foi realizada após 2 minutos, considerando-se positivos, os animais que apresentaram impregnação pelo corante seja em conjuntiva ou córnea (Maggs, 2008).

Os exames oftálmicos foram complementados com citologia esfoliativa da conjuntiva (CEC), realizada após a limpeza ocular com solução fisiológica e instilação de colírio anestésico (Allergan[®], São Paulo, Brasil). Os resultados do exame oftalmológico foram expressos na forma de escores.

Previamente ao uso dos colírios empregados para o diagnóstico, amostras de secreção ocular de ambos olhos de cada cão foram colhidas da conjuntiva inferior com suabe estéril umedecido com solução fisiológica em duplicata. Um dos suabes foi empregado para elaboração de esfregaços corados pelo método do panótico rápido, nos quais foram mensurados por meio de escores, a quantidade de polimorfonucleares, mononucleares, células calciformes e células metaplásicas. O outro suabe foi utilizado para isolamento de microrganismos aeróbicos em ágar sangue e McConkey, visando respectivamente, o isolamento de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Após incubação por 24 horas, colônias bacterianas cremosas, acinzentadas, beta-hemolíticas e que se apresentaram como cocos Gram-positivos dispostos em grupos em esfregaços corados pelo método de Gram foram submetidas aos testes de produção das enzimas plasma-coagulase, DNAase, gelatinase, urease e catalase. A confirmação da espécie e a detecção do gene associado a expressão de biofilmes (icaA) foram realizados conforme técnicas previamente descritas (Vasudevan et al., 2003; Campbell et al., 2008; Sasaki et al., 2010).

Os 50 isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana pelo método clássico de disco-difusão (CLSI, 2017). Foram testadas 10 classes de antimicrobianos (Cefalosproinas = cefalexina, Clindamicinas = clindamicina, Anfernicóis= cloranfenicol, Macrolídeos= eritromicina, Aminoglicosídeos =

gentamicina, Carbapemênicos = imipenem, Quinolonas = ofloxacina, Penicilinas = penicilina, Tetraciclina = tetraciclina, Polipeptídicos = vancomicina). A partir dos dados foram calculados os índices de múltipla resistência a antimicrobianos (Krumperman, 1983).

Recorreu-se a análise de correlação não paramétrica de Spearman para verificar a relação entre os IMR, escores clínicos e achados citológicos. Os coeficientes foram estimados por intervalos de confiança 95% via bootstrapping e testados para hipótese de que diferem significativamente de zero. Resultados de escores foram comparados entre diferentes categorias pelo teste de Wicoxon. As análises foram conduzidas no Programa R, com auxílio do pacote “*RVAideMemoire*” considerando 5% de nível de significância (Hervé, 2018; R Development Core Team, 2018).

Resultados

Na Tab. 1 estão sumarizados os percentuais de cepas que expressaram fatores de virulência. Na Tab 2 estão sumarizados os resultados das análises de correlação de Spearman.

Tabela 1 – Percentual de linhagens com expressão fenotípica de enzimas associadas à virulência e positivas para o gene *icaA* em 50 isolados de *S. pseudintermedius* isolados de olhos secos de cães, Presidente Prudente, SP, 2017-2018.

| Fator | Percentual de isolados positivos |
|----------------|----------------------------------|
| Hemólise | 50/50 (100%) |
| Catalase | 50/50 (100%) |
| DNase | 50/50 (100%) |
| Gelatinase | 1/50 (2%) |
| Urease | 35/50 (70%) |
| <i>icaA</i> | 3/50 (6%) |
| IMR \geq 0.3 | 24/50 (48%) |

IMR: Índice de múltipla resistência

Tabela 2 – Medianas dos escores e intervalos interquartílicos de escores clínicos e citopatológicos e exames oftálmicos em cães com Ceratoconjuntivite Seca segundo fator de virulência expressados por *S. pseudintermedius* (N=50)

| Variável | Urease | | icaA | | |
|------------------------|--------------|---------------|-------------|--------------|-------------|
| | pos | neg | pos | neg | |
| Parâmetros clínicos | Opacidade | 2 ± 1.5 | 2 ± 1.5 | 3 ± 1 | 2 ± 2 |
| | Pigmentação | 2 ± 1 | 2 ± 1 | 2 ± 0.5 | 2 ± 2 |
| | Neov. | 2 ± 1 | 2 ± 1 | 2 ± 0.5 | 2 ± 1 |
| | Secreção* | 3 ± 1 | 2 ± 1 | 2 ± 1 | 2 ± 1 |
| | Conjuntivite | 2.5 ± 1 | 2 ± 0.5 | 3 ± 1 | 2 ± 1 |
| Exames oftálmicos | TF | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 0 |
| | TLS | 6 ± 3.5 | 5 ± 4 | 8 ± 2 | 6 ± 4 |
| | TRFL | 10 ± 3.5 | 10 ± 3.5 | 10 ± 3.5 | 10 ± 4 |
| Parâmetros citológicos | PLMN | 3633.5 ± 1265 | 2782 ± 1263 | 2437 ± 883.5 | 2829 ± 1172 |
| | MNC | 21.5 ± 11 | 20 ± 8 | 15 ± 2 | 21 ± 8.5 |
| | Metaplasia | 11.5 ± 6 | 9 ± 6 | 12 ± 1 | 9 ± 6 |
| | Escamas | 185 ± 58 | 218 ± 133 | 194 ± 45.5 | 203 ± 119.5 |
| | Cels cal. | 42 ± 12 | 42 ± 11 | 35 ± 14.5 | 42 ± 11.5 |

* Diferenças estatísticas significativas entre cepas urease positivas e negativas (p= 0,04706)

TF: Teste de Fluoresceína; TLS: Teste Lacrimal de Schirmer; TRFL: Teste de Ruptura do Filme Lacrimal; PLMN: Polimorfonucleares; MNC: Mononucleares;

Tabela 3 – Coeficientes de correlação não paramétrica de Spearman (rho) entre IMR e demais variáveis, intervalos de confiança a 95% para rho (IC95%) e nível de significância (p) para hipótese de que rho difere significativamente de zero.

| Variável | rho | IC95% | p | |
|---------------------|-------------------|--------|-----------------|--------|
| Parâmetros clínicos | Opacidade | -0.017 | -0.317 a 0.264 | 0.905 |
| | Pigmentação | -0.142 | -0.418 a 0.164 | 0.323 |
| | Neovascularização | 0.021 | -0.230 a 0.300 | 0.880 |
| | Secreção | 0.035 | -0.234 a 0.302 | 0.807 |
| | Conjuntivite | -0.198 | -0.460 a 0.100 | 0.168 |
| Exames oftálmicos | TF | -0.053 | -0.325 a 0.226 | 0.714 |
| | TLV | -0.191 | -0.441 a 0.1105 | 0.183 |
| | TLS | -0.311 | -0.556 a -0.038 | 0.027* |
| | TRFL | -0.414 | -0.604 a -0.170 | 0.002* |
| Parâmetros | PLMN | -0.153 | -0.441 a 0.145 | 0.288 |

| | | | | |
|-------------|----------------------|--------|----------------|-------|
| citológicos | MNC | -0.045 | -0.303 a 0.232 | 0.753 |
| | Metaplasia | 0.005 | -0.277 a 0.282 | 0.960 |
| | Escamas córneas | 0.188 | -0.214 a 0.405 | 0.503 |
| | Células caliciformes | 0.104 | -0.167 a 0.356 | 0.471 |

$p < 0.05$

TF: Teste de Fluoresceína; TLV: Teste de Lissamina verde; TLS: Teste Lacrimal de Schirmer; TRFL: Teste de Ruptura do Filme Lacrimal; PLMN: Polimorfonucleares; MNC: Mononucleares;

Discussão

S. pseudointermedius é o microrganismo mais comum da microbiota ocular canina e, desta forma, está envolvido na maior parte das infecções oculares de cães secundárias à condições que alteram o microambiente ocular dos cães (Murphy et al., 1978). Esta espécie microbiana, em geral expressa diversos fatores de virulência associados a infecções superficiais em cães, incluindo formação de biofilmes, hemolisinas, plasma-coagulase, DNase e lipases (Garbacz et al., 2013). Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre animais que expressaram as enzimas urease e coagulase e entre cepas *icaA* positivas e negativas.

Constatou-se diferenças significativas entre escores de secreção de animais com olhos colonizados por cepas urease-positivas e urease-negativas (Tab 2) Desta forma, animais com escores altos de secreção ocular apresentaram predominância de isolamentos de cepas urease-negativas. O significado destes resultados não está claro, contudo, estas enzimas são associadas a hidrólise de compostos nitrogenados que resultam em produtos com pH alcalino e que são capazes de proteger os microrganismos de ambientes com pH ácido (Mobley et al., 1995). Enquanto o pH fisiológico dos olhos dos cães é ligeiramente alcalino (Beckwith-Cohen et al., 2014), em cães com problemas oculares, o pH tende a ser ligeiramente ácido (Gussoni; Barros, 2003). Desta forma, as ureases produzidas por microrganismos presentes nos olhos podem gerar compostos alcalinos que elevam o pH ocular do olho inflamado, reduzindo a inflamação e consequentemente a secreção ocular.

A formação de biofilmes é uma estratégia comumente utilizada por linhagens de *Staphylococcus* para colonização de superfícies de estruturas como lentes de contato e implantes em humanos (Leid et al., 2002). Contudo, a formação destas estruturas em superfícies vivas tem sido pouco explorada na literatura médica. Postulou-se a hipótese de cães com CCS, em razão da redução da produção de lágrimas poderem apresentar

predisposição a colonização ocular por patógenos formadores de biofilmes. Esta hipótese não se confirmou, visto que apenas 3 (6%) das cepas apresentaram presença do gene *icaA*. Os genes desta família levam à biossíntese de moléculas de adesão intercelular polissacarídica (PIA) e podem estar envolvidos na fase de acumulação da formação de biofilme, sendo fatores de virulência decisivos nas infecções estafilocócicas (Namvar et al., 2013).

A sensibilidade microbiana avaliada por meio de testes baseados no teste de disco-difusão são os mais utilizados para direcionar o tratamento de infecções oculares em cães, visto que não existem métodos confiáveis para determinar a concentração de antimicrobianos nas estruturas oculares a partir do uso tópico. Logo, critérios baseados em pontos de corte para uso sistêmico ainda são indicados (Kaliyamurthy et al., 2005).

Verificou-se que 24 (48%) linhagens de *S. pseudintermedius* manifestaram IMR igual ou superior à 0,3, denotando possível envolvimento de cepas multirresistentes nas infecções oculares de cães secundárias ao olho seco. Em cinco animais (10%) foi observado IMR igual ou superior a 0,5. Estes resultados sugerem que em algumas situações, a resistência microbiana pode ser um obstáculo ao tratamento de infecções oculares secundárias ao olho seco, mesmo em situações em que as cepas presentes no olho apresentem sensibilidade somente a altas concentrações de antimicrobianos comumente presentes nas soluções oftálmicas.

Considera-se que as altas concentrações de antimicrobianos em solução indicadas para tratamento de infecções oculares são suficientes para o tratamento de cepas que toleram altas concentrações dos fármacos (Leigue et al., 2016). Contudo, isto não é um consenso entre os pesquisadores, visto que a difusão dos antimicrobianos no olho depende de inúmeros fatores para manter concentrações terapêuticas, incluindo, remoção dos fármacos quando o animal pisca e baixa difusão da medicação no estroma ocular (Prado et al., 2005; Yağci et al., 2007; Hindley et al., 2016).

Desta forma, parece não existir relação entre a gravidade das alterações oftálmicas visíveis clinicamente ou microscopicamente e a resistência das cepas envolvidas. Essas situações são prováveis nos casos em que as infecções por *S. pseudintermedius* se estabelecem em porções mais profundas das estruturas oculares, que requerem uso sistêmico ou aplicação subconjuntival do antimicrobiano (Eraslan et al., 2007; Yağci et al., 2007). Em alguns casos, a múltipla resistência pode estar

associada a situações de risco como cirurgias oftálmicas ou histórico do uso de antimicrobianos, principalmente quinolonas (Sandmeyer et al., 2017).

Não foi verificada a associação entre alterações nos exames clínicos e citopatológicos e os valores de IMR. Desta forma, parece não existir relação entre a gravidade das alterações oftálmicas visíveis clinicamente, ou microscopicamente, e a resistência das cepas envolvidas. Estes fenômeno foi observado em linhagens de *S. aureus* nas quais a resistência não apresentou correlação direta, ou apresentou correlação negativa, com alguns fatores de virulência expressados pelo microrganismo (Di Domenico et al., 2017; Seidl et al., 2017).

Verificou-se correlação negativa entre o resultado do teste lacrimal de Schimer e o teste de rompimento do filme lacrimal e o índice de múltipla resistência. Estes resultados sugerem que linhagens resistentes de *S. pseudintermedius* apresentam capacidade de colonizar os olhos com CCS com mais frequência do que cepas sensíveis. Alguns estudos revelam que 92% das linhagens de *Staphylococcus* meticilina-resistentes podem apresentar genes que facilitam a colonização de tecidos vivos, incluindo genes que expressam a produção de biofilmes (Bimanand et al., 2018). Contudo, considerando-se que não foram observadas cepas portadoras do gene *icaA*, os fatores associados a colonização facilitada dos olhos de cães com CCS por cepas multirresistentes ainda são obscuros.

Conclusão

Conclui-se que o *S. pseudintermedius* pode expressar fatores de virulência e resistência microbiana associados a alterações clínicas e laboratoriais nos olhos de cães com CCS, notadamente a produção de urease.

Referências

- BANNOEHR, J., GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet. Dermatol.* 23, 253–66, e51-2, 2012.
- BECKWITH-COHEN, B., ELAD, D., BDOLAH-ABRAM, T., OFRI, R. Comparison of tear pH in dogs, horses, and cattle. *Am. J. Vet. Res.* 75, 494–499, 2014

- BIMANAND, L., TAHERIKALANI, M., AZIZI JALILIAN, F. et al. Association between biofilm production, adhesion genes and drugs resistance in different SCCmec types of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from several major hospitals of Iran. *Mashhad Univ. Med. Sci.* 21, 400–403, 2018.
- CAMPBELL, S.J., DESHMUKH, H.S., NELSON, C.L. et al. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. *J. Clin. Microbiol.* 46, 678–684, 2008.
- DI DOMENICO, E., FARULLA, I., PRIGNANO, G. et al. Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1077, 2017.
- DODI, P.L. Immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs: current perspectives on management. *Vet. Med. (Auckland, N.Z.)* 6, 341–347, 2015.
- ERASLAN, G., KIBAR, M., ESSIZ, D. et al. Pharmacokinetic of sulfisoxazole in aqueous humor after topical and subconjunctival application in dogs. *Pakistan J. Biol. Sci. PJBS* 10, 4168–70, 2007.
- GARBACZ, K., ZARNOWSKA, S., PIECHOWICZ, L., HARAS, K. Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. *Virulence* 4, 255–9, 2013.
- GUSSONI, F.R.A., BARROS, P.S. DE M. Epífora no cão: mensuração do pH da lágrima. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 40, 2003.
- HERVÉ, M. RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics, 2018.
- HINDLEY, K.E., GROTH, A.D., KING, M. et al. Bacterial isolates, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics of bacterial keratitis in dogs presenting to referral practice in Australia. *Vet. Ophthalmol.* 19, 418–426, 2016.
- KALIAMURTHY, J., NELSON JESUDASAN, C.A., GERALDINE, P. et al. Comparison of in vitro Susceptibilities of Ocular Bacterial Isolates to Gatifloxacin and Other Topical Antibiotics. *Ophthalmic Res.* 37, 117–122, 2005.
- KANG, M.-H., CHAE, M.-J., YOON, J.-W. et al. Resistance to fluoroquinolones and methicillin in ophthalmic isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from companion animals. *Can. Vet. J.* 55, 678–82, 2014
- KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 165–70, 1983

- LEID, J.G., COSTERTON, J.W., SHIRTLIFF, M.E. et al. Immunology of Staphylococcal Biofilm Infections in the Eye: New Tools to Study Biofilm Endophthalmitis. *DNA Cell Biol.* 21, 405–413, 2002.
- LEIGUE, L., MONTIANI-FERREIRA, F., MOORE, B.A. Antimicrobial susceptibility and minimal inhibitory concentration of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from septic ocular surface disease in different animal species. *Open Vet. J.* 6, 215–222, 2016.
- MAGGS, D.J. Basic diagnostic techniques, in: Maggs, D.J., Miller, P.E., Ofri, R. (Eds.), *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 81–106, 2008.
- MOBLEY, H.L., ISLAND, M.D., HAUSINGER, R.P. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–80, 1995.
- MURPHY, J.M., LAVACH, J.D., SEVERIN, G.A. Survey of conjunctival flora in dogs with clinical signs of external eye disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172, 66–8, 1978.
- NAMVAR, A.E., ASGHARI, B., EZZATIFAR, F. et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg. Infect. Control* 8, Doc03, 2013.
- PRADO, M. R., ROCHA, M.F.G., BRITO, E.H.S. et al. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceara, Brazil. *Vet. Ophthalmol.* 8, 33–37, 2005.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K., LEONARD, F.C. et al. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 1st ed. Wiley-Blackwell, New Jersey, 2011.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R Software. R A Lang. *Environ. Stat. Comput.* 2018.
- SANDMEYER, L.S., BAUER, B.S., MOHAGHEGH POOR, S.M. et al. Alterations in conjunctival bacteria and antimicrobial susceptibility during topical administration of ofloxacin after cataract surgery in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 78, 207–214., 2017.
- SASAKI, T., TSUBAKISHITA, S., TANAKA, Y. et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 48, 765–9, 2010.
- SEIDL, K., LEEMANN, M., PALHEIROS MARQUES, M. et al. High level methicillin resistance correlates with reduced *Staphylococcus aureus* endothelial cell damage. *Int. J. Med. Microbiol.* 307, 11–20, 2017.
- TAJIMA, K., SINJYO, A., ITO, T. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis

in a dog. *Vet. Ophthalmol.* 16, 240–3, 2013.

VASUDEVAN, P., NAIR, M.K.M., ANNAMALAI, T., VENKITANARAYANAN, K.S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 92, 179–85, 2003.

WILKIE, D.A. Management of keratoconjunctivitis sicca in dogs, in: Glaze, M.B. (Ed.), *The Compendium Collection: Ophthalmology in Small Animal Practice*. Veterinary Learning Systems, New Jersey, pp. 234–238, 1996.

WILLIAMS, D.L. Immunopathogenesis of Keratoconjunctivitis Sicca in the Dog. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38, 251–268, 2008.

YAĞCI, R., OFLU, Y., DINÇEL, A. et al. Penetration of second-, third-, and fourth-generation topical fluoroquinolone into aqueous and vitreous humour in a rabbit endophthalmitis model. *Eye (Lond)*. 21, 990–4, 2007.

Índice de múltipla resistência agregado em cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* isolados de cães com ceratoconjuntivite seca

Multiple aggregate resistance index in *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from dogs with dry Keratoconjunctivitis sicca

Danielle Antonelli Motta Sgrignoli¹, Caio Ferreira de Oliveira², Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues³, Sueli Fumie Yamada Ogatta⁴, Aline Ferreira Repik⁵, Danielle Alves⁶, Luís Felipe Zulim⁷, Silvia Franco Andrade⁸, Rogerio Giuffrida⁸

¹Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Unoeste, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

²Doutorando do Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

³Prof. Dr. do Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional e Ciências da Saúde da UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil

⁴Prof. Dr. do Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

⁵ Acadêmica do curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

⁶Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Unoeste, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

⁷Docente do curso de Medicina veterinária da Unoeste, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

⁸Prof. Dr. do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Unoeste, (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

*Correspondence: rgiuffrida@unoeste.br

RESUMO

Esta pesquisa avaliou perfil de sensibilidade de 20 cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* isoladas de swabs de secreção ocular dos olhos de 60 cães com ceratoconjuntivite seca confirmada pelo teste lacrimal de Schirmer (TLS) e Teste de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL). Os testes de sensibilidade foram baseados no método de disco-difusão. Procedeu-se o D teste para avaliar o fenótipo de resistência induzida a clindamicina pela eritromicina e calculou-se o índice de múltipla resistência agregado (IMRA). Foram observadas proporções baixas de resistência para Cefalexina

(1/20 = 5%) e Imipenem (0/20 = 0%), intermediárias para Clindamicina (5/20 = 25%), Cloranfenicol (6/20 = 30%), Eritromicina (6/20 = 30%), Gentamicina (7/20 = 35%) e Vancomicina (3/20 = 15%) e altas para Ofloxacina (10/20 = 50%), Penicilina G (10/20 = 50%) e Tetraciclina (12/20 = 60%). Sete das 20 amostras (35%) foram positivas no D-teste. O IMRA foi de 0,325. Quatro cepas apresentaram padrão de resistência idêntico, caracterizado por sensibilidade somente frente a Imipenem, Cefalexina e Vancomicina. A resistência global frente aos antimicrobianos revelou predominância de cepas resistentes nos olhos de animais. Este resultado é reforçado pela detecção de três cepas resistentes a sete classes de antimicrobianos, sendo sensíveis somente a Imipenem, Cefalexina e Vancomicina, podendo caracterizar riscos de transmissão zoonótica de agentes multirresistentes dos cães para humanos. Os resultados indicam que portadores de CCS podem ser secundariamente colonizados por cepas resistentes à antimicrobianos comumente indicados para uso oftálmico, reforçando a necessidade de avaliar a sensibilidade *in vitro* de *S. pseudintermedius* para respaldar o regime terapêutico.

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*. Sensibilidade Microbiana. Oftalmopatias. Olho seco.

ABSTRACT

The present work aims to determine the sensitivity profile of *S. pseudintermedius* isolated from the eyes of dogs with KCS. This study evaluated the sensitivity profile of 20 strains of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from eye secretion swabs of 60 dogs with dry keratoconjunctivitis confirmed by the Schirmer tear test (STT) and Tear-Film Break Test (BUT). Sensitivity tests were based on the disc diffusion method. In addition, the D test was performed to evaluate the phenotype of clindamycin-induced resistance by erythromycin and the aggregate multiple resistance index (AMRI) was

calculated. Low resistance ratios for Cephalexin (1/20 = 5%) and Imipenem (0/20 = 0%), intermediate for Clindamycin (5/20 = 25%), Chloramphenicol (6/20 = 30%), Erythromycin, were observed. (6/20 = 30%), Gentamycin (7/20 = 35%) and Vancomycin (3/20 = 15%) and high for Ofloxacin (10/20 = 50%, Penicillin G (10/20 = 50%) Tetracycline (12/20 = 60%) Seven of the 20 samples (35%) were positive on the D-test IMRA was 0.325 Four strains showed identical resistance pattern, characterized by sensitivity only to Imipenem, Cephalexin and Vancomycin. Global resistance to antimicrobials revealed a predominance of resistant strains in animal eyes. This result is reinforced by the detection of three strains resistant to seven classes of antimicrobials, being sensitive only to Imipenem, Cephalexin and Vancomycin, and could characterize risks of zoonotic transmission of multiresistant agents from dogs to humans. Results indicate that eyes of dogs with KCS may be secondarily colonized by antimicrobial resistant strains commonly indicated for ophthalmic use, reinforcing the need to evaluate the in vitro sensitivity of *S. pseudintermedius* to support the therapeutic regimen.

Keywords: Staphylococcus pseudintermedius. Microbial Sensitivity. Ophthalmopathies. Dry eye

INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), conhecida comumente como doença do olho seco, é uma condição inflamatória da superfície ocular dos cães, associada a patologias que reduzem o componente aquoso do filme lacrimal (WILLIAMS, 2008). Com a disrupção da integridade do filme lacrimal e de seus componentes ocorrem prejuízos a manutenção da homeostase na mucosa ocular e a prevenção de infecções. Partículas

estranhas e bactérias outrora removidas pelas linhas aquosa e mucosa do filme lacrimal permanecem aderidas a superfície ocular. Substâncias com ação antibacteriana na mucosa ocular, que incluem lactoferrina, lisozima, imunoglobulinas da classe A e G, albumina, transferrina, ceruloplasmina e mucina, entre outras encontram-se em concentrações reduzidas no decurso desta afecção, quer por menor produção ou por perdas por evaporação (DAVIDSON e KUONEN, 2004).

A CCS pode estar associada à diversas condições orgânicas predisponentes, com destaque para desordens imunomediadas associadas a desequilíbrios na imunohomeostase ocular, infecções oculares pelo vírus da cinomose, ação direta de parasitos do gênero *Leishmania*, blefaroconjuntivite crônica, uso de medicações a base de sulfonamidas, lesões pós-cirúrgicas em vias nervosas oculares e alterações hormonais (RIBEIRO et al., 2008).

Dentre as possíveis complicações associadas a CCS, destacam-se as infecções oculares secundárias por agentes bacterianos endógenos que se multiplicam em razão das alterações do microambiente ocular (PRADO et al. 2006). As infecções normalmente resultam em hiperemia conjuntival e descargas mucopurulentas oculares, com progressão para lesões ulcerosas em casos mais graves (SANCHEZ et al, 2007). O uso de antimicrobianos associados a ciclosporina apresenta efeitos benéficos na remissão dos sinais clínicos desta afecção (PRADO et al. 2006).

S. pseudintermedius é um coco Gram-positivo produtor da enzima plasma-coagulase, pertencente ao denominado complexo *intermedius*, que agrega as espécies *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. pseudintermedius*. Similaridades bioquímicas e fisiológicas entre espécies que compõem o complexo têm resultado em classificações bioquímicas controversas para isolados clínicos de cães e outras espécies. Alguns autores sugerem

que a classificação definitiva deve ser baseada em testes moleculares capazes de diferenciar as espécies que compõe o complexo (BOND e LOEFFLER, 2012).

Atualmente *S. pseudintermedius* é reconhecido como a principal espécie saprofítica da pele e mucosa de cães, e dessa forma, um dos patógenos mais comuns em infecções piogênicas de cães (DIRIBE et al., 2015). O agente infeccioso expressa diversos fatores de virulência que incluem enzimas e toxinas similares ao observados em *S. aureus*, agente comum de infecções em humanos. Dentre as enzimas produzidas, destacam-se plasma-coagulases, proteases, termonucleases e, entre as toxinas, hemolisinas, toxina esfoliativa e enterotoxinas. Na pele dos cães, estes fatores determinam sinais de eritema, dermatite esfoliativa, e formação de crostas (VAN DUIJKEREN et al, 2011). Além destes fatores, *S. pseudintermedius* produz uma leucotoxina similar a Leucocidina Panton–Valentine leucocidin (PVL) de *S. aureus*, que exerce marcante efeito de leucotoxicidade sobre diversos polimorfonucleares (FUTUGAWA-SAITO et al., 2006).

A adesão a pele dos cães é favorecida por adesinas superficiais de *S. pseudintermedius* que ligam-se à constituintes da pele, incluindo fibrinogênio, fibronectina e citoqueratina. O agente produz também proteína A, uma molécula ligante de imunoglobulinas, de forma similar a *S. aureus* e é capaz de formar biofilmes (FUTUGAWA-SAITO et al., 2006).

Nos últimos anos, tem sido verificada a emergência de linhagens resistentes de *S. pseudintermedius* isoladas de cães, com destaque para o surgimento de estirpes meticilina-resistentes, conferidas pelos genes *MecA* e *MecB* (VAN DUIJKEREN et al., 2011; COUTO et al., 2015). Estas linhagens geralmente expressam fatores de virulência em frequências mais altas do que linhagens meticilina-sensíveis, com destaque para fatores de adesão aos tecidos dos hospedeiros (COUTO et al., 2015) . *S.*

pseudintermedius, similarmente a *S. aureus*, pode apresentar resistência induzida a clindamicina, apesar destes antimicrobianos raramente serem empregados para tratamento de afecções em cães (CHANCHAITHONG e PRAPASARAKUL, 2015).

Analogamente a *S. aureus*, *S. pseudintermedius* é relativamente comum em cães e humanos carreadores passivos e ambiente de hospitais veterinários (BEÇA et al, 2015). As infecções de feridas cirúrgicas de cães são relativamente comuns (DIRIBE et al, 2015). A colonização de humanos pelo agente e a indução de infecção é aparentemente subdiagnosticada, ou por vezes, confundida com *S. aureus*. As infecções em humanos podem apresentar natureza diversa, incluindo infecções superficiais, subcutâneas e sistêmicas, nem sempre com evidências da participação de cães como veiculadores das infecções (POMPILIO et al., 2015), a não ser em casos de agressões por cães com infecções das áreas de mordeduras (BORJESSON et al, 2015).

S. pseudintermedius é um dos principais agentes infecciosos oportunistas envolvidos em infecções oculares de cães, secundárias a CCS. A bactéria também é relativamente comum no saco conjuntival de cães saudáveis e coloniza frequentemente úlceras localizadas nas córneas (PRADO et al, 2006). Fatores associados à colonização ocular de cães por este agente são pouco conhecidos, mas possivelmente envolvem moléculas de adesão, formação de biofilmes e expressão de outros fatores de virulência conhecidos. A produção local de IgA parece ser essencial para prevenir a colonização ocular (LAN et al., 1997).

Os processos que modulam a infecção ocular em cães por *S. pseudintermedius* possivelmente são similares aos observados para infecções oculares experimentais por *S. aureus*, que incluem colonização ocular com subsequente produção de toxina alfa e recrutamento de polimorfos nucleares como neutrófilos, provindos principalmente do

tecido palpebral circundante e difusão de citocinas no filme lacrimal (KANG et al., 2014).

O presente trabalho tem como objetivo, determinar o perfil de sensibilidade de *S. pseudintermedius* isolados dos olhos de cães com ceratoconjuntivite seca.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídos na pesquisa, 60 cães atendidos no Hospital Veterinário, conforme consta no documento autorizado pelo CEUA Institucional (Cadastro 3050) e Comitê Assessor de Pesquisa Institucional (CAPI). Todos os tutores dos animais autorizaram a inclusão do seu cão na pesquisa mediante assinatura de Termo de Livre Consentido e Esclarecido.

Foram incluídos na pesquisa somente animais com ceratoconjuntivite seca confirmada pelo Teste Lacrimal de Schirmer e o Teste de Ruptura do Filme Lacrimal. De cada animal, foram colhidas amostras de secreção superficial com suabes estéreis do espaço entre a pálpebra inferior e o globo ocular. Os suabes atritados na conjuntiva foram colocados em tubos estéreis de vidro e remetidos ao laboratório de análises no menor tempo possível.

Os suabes foram semeados em placas contendo ágar sangue ovino desfibrinado a 5%. Após incubação a 37°C por 24-48 horas em aerobiose, colônias compatíveis morfologicamente com bactérias do gênero *Staphylococcus* foram caracterizadas fenotipicamente por testes de coloração de Gram para análise morfo-tintorial, produção de plasma-coagulase em soro de coelho, hemólise em ágar sangue, teste de Voges-Proskauer para determinação da produção de acetil-metil-carbinol (acetoína), acidificação dos açúcares manitol, trealose e lactose e produção de DNAAs (BOND e

LOEFFLER, 2012). As linhagens classificadas como *S. pseudintermedius* foram estocadas em ágar lignieris.

A sensibilidade dos isolados foi determinada pelo teste de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton, conforme normativas preconizadas (WAYNE, 2017). Inóculos bacterianos correspondentes a escala 0,5 de MacFarland foram semeados em placas de ágar Muller-Hinton. A seguir, foram depositados nas placas, discos comerciais impregnados com antimicrobianos. Foram testadas 10 classes: penicilinas (penicilina G), cefalosporinas (cefalexina), aminoglicosídeos (gentamicina), quinolonas (ofloxacina), macrolídeos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina), carbapemênicos (imipenem), polipeptídicos (vancomicina), tetraclicinas (tetraciclina) e anfenicóis (cloranfenicol). A partir dos resultados, foram calculados os índices de múltipla resistência individual e agregado (KRUMPERMAN, 1983).

O fenótipo de resistência induzida a clindamicina pela eritromicina foi avaliado pelo teste D, que consiste em depositar em uma placa inoculada de ágar Muller-Hinton um disco de eritromicina e outro de clindamicina, a uma distância de 20 mm, borda a borda, com posterior incubação a $35,0^{\circ} \text{C} \pm 2$ por 24 horas. Após a incubação, a presença de resistência induzida a clindamicina foi confirmada pela presença de um “achatamento” no halo de inibição de clindamicina localizado entre os dois discos (WAYNE, 2017).

Os microrganismos isolados foram estocados em ágar Lignieris estoque e mantidos em temperatura ambiente. Adicionalmente, foram inoculados em caldo-cérebro coração adicionado de glicerina, visando congelamento a temperatura de -20°C . Repiques periódicos foram realizados para verificação da viabilidade dos isolados.

RESULTADOS

Foram obtidas 20 linhagens de *S. pseudintermedius* dos olhos dos 60 cães com CCS. Os resultados dos perfis de sensibilidade estão descritos na tabela 1. Verificou-se que sete (35%) cepas apresentaram resistência induzida a clindamicina pela eritromicina. O índice de múltipla resistência agregado foi de 0,325. Quatro cepas apresentaram padrão de resistência idêntico, caracterizado por sensibilidade somente frente a Imipenem, Cefalexina e Vancomicina.

Tabela 1 – Sensibilidade dos *Staphylococcus pseudintermedius* isolados de cães com ceratoconjuntivite seca.

| Antimicrobiano | Número de cepas resistentes/total de cepas (%) |
|------------------|--|
| Cefalexina | 1/20 (5%) |
| Clindamicina | 5/20 (25%) |
| Cloranfenicol | 6/20 (30%) |
| Eritromicina | 6/20 (30%) |
| Gentamicina | 7/20 (35%) |
| Imipenem | 0/20 (0%) |
| Ofloxacina | 10/20 (50%) |
| Penicilina G | 10/20 (50%) |
| Tetraciclina | 12/20 (60%) |
| Vancomicina | 3/20 (15%) |
| Teste D positivo | 7/20 (35%) |

DISCUSSÃO

Cepas resistentes de *Staphylococcus* possivelmente atuam como oportunistas nas infecções oculares de cães decorrentes de CCS. Desta forma, avaliar a resistência microbiana destes microrganismos antes de instituir a terapia, quer seja preventiva ou curativa, pode ser crucial para o sucesso terapêutico (PRADO et al. 2006).

De modo geral, a resolução da infecção oftálmica não é garantida pelas altas concentrações dos antimicrobianos presentes nos colírios. Os principais fatores relacionados às falhas terapêuticas incluem a remoção do colírio pela lágrima ou pela ação mecânica das pálpebras, dificuldade de penetração do fármaco no saco conjuntival (SHELL, 1982). Contudo, há dificuldade técnicas de determinar a concentração de antibióticos nos tecidos oculares durante a terapia tópica. Desta forma, muitos pesquisadores concordam que a suscetibilidade de isolados bacterianos dos olhos deve ser avaliada usando procedimentos de disco-difusão baseados em pontos de corte sistêmicos (KALIAMURTHY et al, 2005).

Verificou-se que 30% ou mais das cepas isoladas demonstraram resistência frente à princípios farmacológicos comumente empregados para o tratamento de infecções oculares de cães (cloranfenicol, gentamicina ofloxacina e tetraciclina). Estes resultados são condizentes com outros estudos similares (KANG et al., 2014). Contudo, a resistência observada pode não corroborar com a eficácia clínica destes fármacos, quando usados topicamente para infecções oftálmicas. Esta observação decorre da natureza dos testes de sensibilidade baseados no método de disco-difusão, concebidos para predizer a eficiência de concentrações terapêuticas sistêmicas dos fármacos testados, ao invés de tópicos. No caso das preparações oftálmicas, as concentrações dos fármacos nas preparações à base de colírios excedem em muitas vezes a concentração sistêmica (BERTINO, 2009). Dessa forma, o antibiograma, apesar de constituir método recomendado pelos comitês internacionais (WAYNE, 2017), pode subestimar a eficácia terapêutica dos princípios testados. Uma possível alternativa é interpretar a sensibilidade microbiana via determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para verificar se as cepas isoladas são capazes de tolerar concentrações de

antimicrobianos superiores as encontradas nos colírios antibacterianos (SALLAM et al., 2018). Esta técnica, contudo, é onerosa e não está disponível em todos os laboratórios.

Dentre os antimicrobianos testados, a ofloxacina, um antimicrobiano comumente empregado para tratamento de infecções oftálmicas em cães, apresentou resistência em 50% dos isolados. Estes resultados são preocupantes em razão destes antimicrobianos serem comumente indicados para tratamento empírico de infecções oculares em cães. Os resultados, porém, são condizentes com outros estudos que reportam percentuais altos de resistência à fluorquinolonas em cepas de *Staphylococcus* (BOOTHE et al., 2006). Este antimicrobiano pertence a classe das fluorquinolonas, que agem inibindo a síntese de ácidos nucleicos ao bloquear a DNA girase codificada por *gyrA* e *gyrB* e topoisomerase IV, codificada respectivamente por *grlA* e *grlB* (RUIZ, 2003). Por outro lado, a resistência bacteriana às fluoroquinolonas está associada à alterações nas enzimas alvo (mutações cromossômicas que causam redução da afinidade da DNA girase e topoisomerase IV) ou alterações na permeação do fármaco (superexpressão das bombas de efluxo de drogas) (HOOPER, 2001). No caso de *S. pseudintermedius*, a resistência é conferida por uma mutação pontual na topoisomerase II e IV (RUIZ, 2003). Como estes mecanismos tendem a conferir resistência cruzada frente a diversas classes de fluorquinolonas (KANG et al., 2014) é recomendável a realização de testes de sensibilidade antes da indicação de fluoroquinolonas para cães.

Comparativamente aos outros, os antimicrobianos mais efetivos foram a cefalexina e o Imipenem, aos quais as cepas apresentaram baixos percentuais de resistência. A cefalexina é uma das principais cefalosporinas de primeira geração utilizadas para tratamento de infecções estafilocócicas em cães (HINDLEY et al., 2016). Contudo, este antimicrobiano não costuma ser empregado em formulações oftálmicas comerciais, sendo restrito às preparações aviadas. Neste caso, tem sido mais

comumente empregada a cefalotina, quimicamente similar a cefalexina. O uso tópico é recomendado em associação com aminoglicosídeos para o tratamento de infecções oculares em humanos (WASTSON; CABRERA-AGUAS e KHOO, 2018).

Durante alguns anos, a cefalotina foi utilizada para prever a resistência a cefalexina frente a *Staphylococcus aureus* (WAYNE, 2017). Desta forma, alguns clínicos utilizavam a cefalotina para o tratamento de cepas de *Staphylococcus*, respaldados nos testes de sensibilidade à cefalexina, e, vice-versa. Contudo, estudo recente revelou que a sensibilidade destes antimicrobianos não é cruzada para cepas de *S. pseudintermedius* (PAPICH e LINDEMAN, 2018). Dessa forma, recomenda-se que a escolha de cefalosporinas de primeira geração para tratamento de oftalmopatias apresente respaldo em testes de sensibilidade para ambos os princípios terapêuticos.

O Imipenem foi o antimicrobiano mais eficaz, não observando-se resistência frente às cepas isoladas. Este antimicrobiano, porém, é de uso reservado à infecções multirresistentes e não formulações para uso tópico (PAPICH e LINDEMAN, 2018). Desta forma, no universo estudado, o uso deve ser recomendado para infecções oculares graves por cepas multirresistentes, incluindo *Staphylococcus* meticilina-resistente.

A Penicilina G, apesar não ser rotineiramente empregada para tratamento de infecções oculares em cães, principalmente por que o uso tópico favorece o desenvolvimento de hipersensibilidades apresentou efetividade contra 50% dos isolados. Apesar disso, este antimicrobiano é testado em rotinas laboratoriais para verificar-se a evolução da resistência global frente à classe das penicilinas. Os resultados observados são similares aos observados para cepas de *S. aureus* de origem humana (BHATTACHARYA, 2010), denotando que estes microrganismos tendem a apresentar resistências pareadas e paralelas aos longo dos anos.

De acordo com os resultados, cloranfenicol apresentou resistência de 30% nos entre todos os isolados de *Staphylococcus*. Estes resultados divergem dos percentuais de resistência observados em outros estudos nos quais este fármaco apresentou boa efetividade (EKAPOPPHAN et al, 2018). Esta medicação apresenta boa penetração no tecido ocular, fundamentalmente em razão da boa lipossolubilidade (GIUFFRIDA e ANDRADE, 2008). Contudo, apresenta certa toxicidade que deve ser considerada, não sendo, desta forma, uma medicação de primeira escolha (TAJIMA et al., 2013).

Gentamicina e tetraciclina são medicações de uso mais antigo em medicina veterinária. A primeira apresentou efetividade sobre cerca de dois terços das cepas. O uso, porém, têm sido indicado mais para o tratamento de infecções oculares por germes Gram-negativos como a *Pseudomonas aeruginosa* do que *Staphylococcus* (LEDBETTER et al., 2009). A tetraciclina, em contraste, foi a menos efetiva, com mais de 50% das cepas resistentes. Este alto percentual pode ser atribuído ao uso massivo e disseminado deste antimicrobiano em medicina veterinária, o que possivelmente está associada ao aumento de pressão de seleção sobre patógenos animais. Dessa maneira, a tetraciclina deve ser reservada a infecções oculares por germes reconhecidamente sensíveis como micoplasmas e clamídeas (GIUFFRIDA e ANDRADE, 2008).

A resistência global frente aos antimicrobianos revelou predominância de cepas resistentes nos olhos dos animais, posto que valores de IMR > 0,3 denotam múltipla resistência (KRUMPERMAN, 1983). Este resultado é reforçado pela detecção de três cepas resistentes a sete classes de antimicrobianos, sendo sensíveis somente ao Imipenem Cefalexina e Vancomicina. Este cenário pode caracterizar potenciais riscos de transmissão zoonótica de agentes multirresistentes dos cães para humanos (PAUL et al., 2011) e deve ser cuidadosamente avaliado pelo clínico para reduzir o risco de veiculação de cepas de *Staphylococcus* de cães para humanos. Contudo, não está claro

se os cães são carreadores permanentes destes agentes ou apenas transitórios e mais pesquisas devem ser realizadas para explorar esta possibilidade.

Cerca de um terço das cepas manifestou fenótipo de resistência induzível a clindamicina. Este teste é baseado na difusão de disco simples que oferece resultados precisos acerca da resistência à uma lincosamida induzida por uma macrolídeo, em cepas de *Staphylococcus aureus* (SHRESTHA e RANA, 2014). Geralmente são utilizados no teste a clindamicina e a eritromicina, consideradas medicações alternativas para cepas de *S. aureus* meticilina-resistentes. Dessa forma, os resultados reforçam a possível emergência de cepas resistentes de *S. pseudintermedius* nos olhos dos cães e a crescente preocupação frente a presença de cepas potencialmente zoonóticas nos animais (FERREIRA et al., 2011).

CONCLUSÃO

Conclui-se que dentre os antibióticos testados, os que apresentaram melhor efetividade contra o *S. pseudintermedius*, foram o Imipenem, Cefalexina e Vancomicina e os menos efetivos, a Ofloxacina, Penicilina G e Tetraciclina. Já a gentamicina, clindamicina, eritromicina e cloranfenicol apresentaram média efetividade. Observou-se resistência importante dos isolados frente a diversos antimicrobianos, reforçando a necessidade de avaliar a sensibilidade de microrganismos associada a *S. pseudintermedius* em infecções oculares secundárias à olho seco.

REFERÊNCIAS

BEÇA N. et al. Coagulase-Positive Staphylococcus: Prevalence and Antimicrobial

- Resistance. **Journal of the American Animal Hospital Association** 51:365–371, 2015.
- BERTINO J.S. Impact of antibiotic resistance in the management of ocular infections: the role of current and future antibiotics. **Clinical Ophthalmology** 3:507–521, 2009.
- BHATTACHARYA S. The facts about penicillin allergy: a review. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Technol & Reseach.** 1:11–17, 2010.
- BOND R.; LOEFFLER A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small Animal Practice.** 53:147–154, 2012.
- BOOTHE D.M. et al. Comparison of pharmacodynamic and pharmacokinetic indices of efficacy for 5 fluoroquinolones toward pathogens of dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** 20:1297–306, 2006.
- BÖRJESSON S. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** 34:839–844, 2015.
- CHANCHAITHONG P.; PRAPASARAKUL N. Occurrence and characterization of inducible clindamycin resistance in canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Veterinary Journal**, 2015. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.08.018.
- COUTO N. et al. Comparative analysis of the virulence characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* isolates isolated from small animals: a RNA-Seq-based transcriptome analysis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 2015. doi: 10.1128/AAC.01907-15.
- DAVIDSON H.J.; KUONEN V.J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology.** 7:71–77, 2004.
- DIRIBE O. et al. Genotypic relatedness and characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with post-operative surgical infections in dogs. **Journal of Medical Microbiology** 64:1074–1081, 2015.
- EKAPOPPHAN D. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from severe corneal ulcers of dogs in Thailand. **Journal of Veterinary Medicine Science.** 80:1259–1265, 2018.
- FERREIRA J.P. et al. Transmission of MRSA between companion animals and infected human patients presenting to outpatient medical care facilities. **PLoS One** 6:e26978, 2011.

- FUTAGAWA-SAITO K. et al. Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. **BMC Veterinary Research** 2:4, 2006.
- GIUFFRIDA R.; ANDRADE S.F. Quimioterápicos antimicrobianos e antibióticos. In: Andrade S.F. (ed) **Manual Terapêutico Veterinária**, 3rd ed. Roca, São Paulo, pp 26–69, 2008.
- HINDLEY K.E. et al. Bacterial isolates, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics of bacterial keratitis in dogs presenting to referral practice in Australia. **Veterinary Ophthalmology**. 19:418–426, 2016.
- HOOVER D.C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerging Infectious Disease Journal**. 7:337–41, 2001.
- KALIAMURTHY J. et al. Comparison of in vitro Susceptibilities of Ocular Bacterial Isolates to Gatifloxacin and Other Topical Antibiotics. **Ophthalmic Research**. 37:117–122, 2005.
- KANG M.-H. et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. **Journal of Veterinary Science** 15:409–415, 2014.
- KRUMPERMAN P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**. 46:165–170, 1983
- LAN J. et al. Detection and specificity of anti-*Staphylococcus intermedius* secretory IgA in human tears. **Australian and New Zealand Journal Ophthalmology**. 25:17–19, 1997.
- LEDBETTER E.C. et al. Pathogenic phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spontaneous canine ocular infections. **Investigative Ophthalmology Visual Science**. 50:729–736, 2009.
- PAPICH M.G.; LINDEMAN C. Cephalexin susceptibility breakpoint for veterinary isolates: Clinical Laboratory Standards Institute revision. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 30:113–120, 2018.
- PAUL N.C. et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. **Zoonoses Public Health** 58:533–539, 2011.
- POMPILIO A. et al. New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. **BMC**

Microbiology 15:109, 2015.

PRADO M.R. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from corneal ulcers of dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 58:1024–1029, 2006.

RIBEIRO A.P. et al. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. **Ciência Rural**. 38:568–575, 2008.

RUIZ J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 51:1109–1117, 2003.

SALLAM A.B. et al. A Review of Antimicrobial Therapy for Infectious Uveitis of the Posterior Segment. **Medical hypothesis**, C 7:140–155, 2018.

SANCHEZ R.F. et al. Canine keratoconjunctivitis sicca: disease trends in a review of 229 cases. **Journal of Small Animal Practice**. 48:211–217, 2007.

SHELL J.W. Pharmacokinetics of topically applied ophthalmic drugs. **Survey of Ophthalmology** 26:207–218, 1982.

SHRESTHA B.; RANA S.S. D test: a simple test with big implication for *Staphylococcus aureus* macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance pattern. **Nepal Medicine College Journal** 16:88–94, 2014.

TAJIMA K et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in a dog. **Vet Ophthalmol** 16:240–243, 2013.

VAN DUIJKEREN E. et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 66:2705–2714, 2011.

WATSON S., et al. Common eye infections. **Australian Prescriber**. 41:67, 2018.

WAYNE C.L.S.I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th edition- M100, 27th ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2017.

WILLIAMS D.L. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. 38:251–268,

ANEXO 1- ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (ARTIGO 1)



ISSN 1678-4162 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientações Gerais](#)
- [Comitê de Ética](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

Política Editorial

O periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

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

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é

permitido o uso comercial dos resultados.

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

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

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Leia "[PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE](#)"
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 2).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O **ABMVZ** comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no

Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em "Ethics Committee" (Step 2). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

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

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 2), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

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

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

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

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 2), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

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

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

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

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 2). Deve ser

compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

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

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

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

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 2), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

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

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

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

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

* na submissão usar somente o Keyword (Step 3) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

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

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

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

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

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG

com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

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

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

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

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

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

Como referenciar:

1. Citações no texto

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

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido

para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar

todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market.
Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em:
<<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

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

Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.
Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.
OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$ 50.00 (fifty dollars) per page, and US\$ 50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item "Justification" (Step 2), e também enviado por e-mail, aos cuidados do

Comitê Editorial,
para abmvz.artigo@abmvz.org.br.

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

[[Home](#)] [[Sobre esta revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

© 2001-2007 Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567
30123-970 Belo Horizonte MG Brasil
Tel: +55 31 3409-2042
Tel: +55 31 3409-2041



abmvz.artigo@abmvz.org.br

ANEXO 2 - CIÊNCIA RURAL (ARTIGO 2)



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Objetivo e política editorial](#)
- [Preparação de originais](#)

ISSN 1678-4596 versão online

Objetivo e política editorial

1. O objetivo da **CIÊNCIA RURAL** é publicar artigos originais (artigos completos), notas curtas e resenhas. Os manuscritos devem ser submetidos exclusivamente à **CIÊNCIA RURAL** .

Preparação de originais

2. O artigo completo não deve conter mais de **15 páginas digitadas** , as **revisões 20 páginas** , **as notas curtas devem conter no máximo oito páginas** . Use espaçamento duplo em todo o texto, incluindo o resumo e as referências. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, começando na página de título. O tamanho do papel de impressão deve ser A4 210 x 297 mm, contendo no máximo 25 linhas por página. A fonte Times New Roman 12 deve ser usada.

Em vista da **publicação eletrônica** , consideraremos **manuscritos com páginas adicionais** além dos limites acima. No entanto, os **aprovados os trabalhos com páginas além do número estipulado terão um custo adicional para publicação** ([consulte as taxas](#)).

3. Os trabalhos completos devem conter as seguintes seções ([exemplo do artigo](#)): Título, Resumo e Palavras-chave em inglês e português; A revista fornecerá o resumo em português para trabalhos que não envolvam autores de língua portuguesa. Introdução (contendo a respectiva revisão de literatura); Materiais e métodos; Resultados, Discussão e Conclusões; Reconhecimentos; Apresentação de artigos; Fontes e manufaturas. Os resultados das seções e discussão; ou Resultados, Discussão e Conclusões podem ser combinados, Declaração de interesses conflitantes. A aprovação do Comitê de Bioética e Biossegurança é necessária quando seres humanos ou animais estão envolvidos. Quando organismos geneticamente modificados estão envolvidos, a aprovação também é necessária ([exemplo do modelo 1](#) , [Exemplo de modelo 2](#)). Deve ser indicado antes da seção de

referência.

4. Os artigos de revisão devem conter as seções ([exemplo em papel](#)): título, resumo e palavras-chave em inglês e português; A revista fornecerá o resumo em português para trabalhos que não envolvam autores de língua portuguesa. Introdução; Texto; Conclusão; Reconhecimentos; Fontes e manufaturas, quando necessário, Declaração de interesses conflitantes. A aprovação do Comitê de Bioética e Biossegurança é necessária quando seres humanos ou animais estão envolvidos. Quando organismos geneticamente modificados estão envolvidos, a aprovação também é necessária ([exemplo 1 do modelo](#) , [exemplo 2 do modelo](#)). Deve ser escrito antes da seção de referência.

5. Notas curtas devem conter ([exemplo em papel](#)): Título, Resumo e Palavras-chave em inglês e português; A revista fornecerá o resumo em português para trabalhos que não envolvam autores de língua portuguesa. Texto (sem subdivisão nas seções, mas ordenado de acordo com a introdução, metodologia, resultados, discussão; conclusão) Agradecimentos; Declaração de interesses conflitantes; Fontes e manufaturas quando necessário. A aprovação do Comitê de Bioética e Biossegurança é necessária quando seres humanos ou animais estão envolvidos. Quando organismos geneticamente modificados estão envolvidos, a aprovação também é necessária ([exemplo de modelo 1](#) , [exemplo de modelo 2](#)) Deve ser escrito antes da seção de referência. O texto também pode incluir tabelas e figuras.

6. Nenhuma reimpressão será fornecida **6.** A carta de apresentação **deve conter** as seguintes informações

- a) Qual é a principal realização científica do seu estudo?
- b) A pergunta que sua pesquisa responde?
- c) Seus principais resultados experimentais e descobertas gerais?
- d) As conclusões mais importantes que podem ser extraídas de sua pesquisa?
- e) Quaisquer outros detalhes que incentivem o editor a enviar seu manuscrito para revisão?

aos autores. Os artigos são gratuitos em www.scielo.br/cr .

7. Nenhuma reimpressão será fornecida aos autores. Os artigos são gratuitos em www.scielo.br/cr .

8. Descreva o título em inglês e português. Somente a primeira letra do título deve estar em letras maiúsculas, exceto os nomes oficiais. Não use abreviações no título. Os nomes científicos devem ser usados no título somente quando estritamente necessário. Por favor, use-os como palavras-chave e nas demais seções do artigo. Os nomes completos dos autores devem ser escritos abaixo do título, lado a lado, seguidos do número (números romanos em sobrescrito). Esses números indicam, quando repetidos na parte inferior da página, a afiliação e o endereço correspondente, etc. O autor correspondente deve ser indicado e deve ser acompanhado pelo endereço completo, incluindo o e-mail, quando disponível.

9 Dentro do texto, as referências devem ser citadas da seguinte forma: a. MASON (1964) observou ... b. A média citada por ZONTINI & UNO (1986) foi semelhante ... c. PRESNEL et al. (1973) indicaram ... d. ... a malformação congênita (MOULTON, 1978).

10. A Ciência Rural fornece o [arquivo de estilo](#) para uso com o software **EndNote** (é um pacote de software de gerenciamento de referência comercial, usado para gerenciar bibliografias e referências ao escrever ensaios e artigos). Também está disponível nesse [link](#) o arquivo de estilo para uso com o software **Mendeley**.

A lista de referência deve ser colocada no final do manuscrito; as referências devem ser ordenadas alfabeticamente.

Por favor, siga os seguintes exemplos:

10.1. Referências de livros:

BARHAM, JN Kinesiology mecânico. Saint Louis: Mosby, 1978. 509p.

MENGEL, K.; KIRBY, EA **Princípios de nutrição de plantas**. 4 ed. Berna: International Potash Institut, 1987. 687p.

10.2 Capítulo em um livro:

GORBAMAN, A. Uma patologia comparativa da tireóide. In: PERIGO, JB; SMITH, DE **A tireóide**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1964. Cap. 2. p.32-48.

10.3 Capítulo sem autoria em um livro:

COCHRAN, WG A estimulação do tamanho da amostra. No: _____. **Técnicas de amostragem**. 3.ed. Nova York: John Willey, 1977. Cap. 4, p.72-90.

TURNER, AS; McILWRAITH, CW Fluidoterapia. No: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Roca, 1985. p.29-40.

10.4 O

autor do artigo padrão da revista deve adicionar o URL à referência e ao número de identificação DOI (Digital Object Identifier) como o exemplo abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Ação da terra diatomácea amorfa contra diferentes estágios das pragas do produto armazenado **Tribolium confusum** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Tenebrio molitor** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Sitophilus granarius** (Coleoptera: Curculionidae) e **Plodia interpunctella** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdã (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3) >. Acesso em: nov. 20, 2008. doi: 10.1016 / S0022-474X (00) 00016-3.

PINTO JUNIOR, AR et al (Dois autores ou mais). Resposta de **Sitophilus oryzae** (L.), **Cryptolestes ferrugineus** (Stephens) e **Oryzaephilus surinamensis** (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomáceas no trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em:

< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 12 nov 2008. doi: 10.1590 / S0103-84782008000800002.

SENA, DA et al. Testes de vigor para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de milho cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 18/03/2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590 / 0103-8478cr20150705. (Publicação eletrônica).

10.5 Teses, dissertações ...

MOSCARDI, G. **Controle de Anticarsia gemmatalis Hübner em soja com baculovírus e inseticidas selecionados e seu efeito na epizootia natural do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) samson**. 1977.

68f. Dissertação / Tese (Mestrado / Doutorado em Controle Biológico e Manejo Integrado de Pragas) - Curso de Entomologia, Universidade da Flórida. (Evite esta citação).

10.6 Boletins:

ROGIK, FA **Indústria da lactose** . São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. Boletim Técnico, 20. (Evite esta citação).

10.7 Artigo não publicado (deve ser evitado quando possível): Leia após o texto, por exemplo: Estudo comparativo sobre o efeito de diferentes suturas na anastomose da traqueia de cães. Autoria de Sheila Canevese Rahal (em preparação).

10.8 Comunicação pessoal (deve ser evitada quando possível): As informações no texto são identificadas por (Comunicação pessoal) após a declaração: por exemplo ... descrita por Johnston (1980) (Comunicação pessoal).

10.9 Documentos eletrônicos:

MATERA, JM **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades de tratamento cirúrgico** . São Paulo: Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. CD-Rom. (Evite esta citação).

GRIFON, DM Diagnóstico artroscópico de displasia do cotovelo. In: CONGRESSO MUNDIAL DE PEQUENAS ANIMAIS VETERINÁRIOS, 31., 2006, Praga, República Tcheca. **Processos...** Praga: WSAVA, 2006. p.630-636. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Acesso em: 18 mar. 2007 (Evite esta citação).

UFRGS. **Transgênicos** . Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Disponível em: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Acesso em: 18 mar. 2001. (Evite esta citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevenção da perda óssea pós-menopausa por doses baixas e convencionais de calcitriol ou estrogênio equino conjugado. **Maturitas** , (Irlanda), v.34, n.2, p.179-184, 15 de fevereiro de 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Disponível em: <<http://www.medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>>. Acesso em: 18 de março de 2007.

MARCHIONATTI, A .; PIPPI, NL Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada no nível de aroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRUGIA VETERINARIA, 3, 1997. Corrientes, Argentina. **Anais ...** Corrientes: Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

11. Ilustrações, gráficos, fotografias serão nomeadas Figuras; identificados por algarismos arábicos (Figura 1, Figura 2, etc ...). Cada figura será considerada como uma página inteira. Gráficos e ilustrações devem medir 7,5 ou 16 cm de largura. As figuras também podem ser enviadas digitalizadas em .tiff com pelo menos 300 dpi. As tabelas devem ser identificadas com a palavra Tabela, ordenada por algarismos romanos, e não pode exceder uma página após a seção de referência. No entanto separado.

12. Os autores são responsáveis por todas as declarações e conceitos contidos no artigo.

13) O envio requer metadados para todos os autores. Os trabalhos não

procederão à avaliação antes que os dados não sejam fornecidos. Excepcionalmente outros formulários podem ser usados. Entre em contato com a Ciência Rural para obter informações adicionais.

14. Os artigos serão publicados de acordo com a ordem de aprovação.

15. Os artigos não recomendados para publicação serão arquivados. No entanto, será enviada uma mensagem para os autores explicando por que o artigo não foi aprovado.

16. Dúvidas podem ser resolvidas examinando uma edição anterior da Ciência Rural antes de entrar em contato com o Comitê Editorial.

17. Todos os artigos serão submetidos a um processo de verificação de plágio usando o Programa de Verificação Cruzada.

Critérios de avaliação

Todos os trabalhos submetidos são examinados inicialmente pela equipe de CR e pela área do conselho editorial e depois enviados a pelo menos dois revisores ad hoc. As revisões são geralmente sujeitas a três consultores ad hoc.

[[Página inicial](#)] [[Sobre esta revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]



Todo o conteúdo da revista, exceto onde indicado de outra forma, está licenciado sob uma Licença Creative Commons

© 2002-2007 ***Ciência Rural***

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
97105-900 Santa Maria RS Brasil
Tel.: +55 55 3220-8698
Fax: +55 55 3220-8695**



cienciarural@mail.ufsm.br