

UNIVERSIDADE DE UBERABA
MESTRADO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS TRÓPICOS

MARCELO BERNARDI MANZANO

PERFIL MICROBIOLÓGICO E CITOLÓGICO DA PELE E DA SUPERFÍCIE OCULAR
DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS

UBERABA, MG

2024

MARCELO BERNARDI MANZANO

PERFIL MICROBIOLÓGICO E CITOLÓGICO DA PELE E DA SUPERFÍCIE OCULAR
DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientador Prof. Dr. Rodrigo Supranzetti de Rezende.

Coorientador: Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio.

UBERABA, MG

2024

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

M319p Manzano, Marcelo Bernardi.
Perfil microbiológico e citológico da pele e da superfície ocular de cães da raça Shih-Tzu saudáveis / Marcelo Bernardi Manzano. – Uberaba, 2024.
43 f. : il., color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Supranzetti de Rezende.
Coorientador: Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio.

1. Cães. 2. Morfologia. 3. Citopatologia. 4. Dermatologia veterinária. I. Rezende, Rodrigo Supranzetti de. II. Sampaio, Renato Linhares. III. Universidade de Uberaba. Programa de Pós -Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. IV. Título.

CDD 636.089

MARCELO BERNARDI MAMNZANO

PERFIL MICROBIOLÓGICO E CITOLÓGICO DA PELE E DA SUPERFÍCIE OCULAR DE
CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 15/03/2024

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
gov.br RODRIGO SUPRANZETTI DE REZENDE
Data: 18/03/2024 12:04:05-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Supranzetti de Rezende - Orientador
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio
Universidade de Uberaba

Documento assinado digitalmente
gov.br ANNA MONTEIRO CORREIA LIMA
Data: 18/03/2024 10:55:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Anna Monteiro Correia Lima
Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos, em primeiro lugar a minha esposa Fabiana, minha filha Maria Vitória e aos meus pais Valquíria e Edson, pelo apoio e compreensão ao longo da minha jornada.

Aos meus professores orientadores, Dr. Rodrigo Supranzetti de Rezende e Dr. Renato Linhares Sampaio, pela confiança depositada e pelos ensinamentos até o momento.

Aos colaboradores do Laboratório de Análises Clínicas do HVU, agradeço pela ajuda e compreensão, assim como à Lanamara Batista, e o Dr. Ian Martin pelo apoio e pelas explicações fornecidas.

Agradeço também aos tutores dos animais que gentilmente concordaram em participar da pesquisa.

À UNIPAM, manifesto minha gratidão pelo apoio e compreensão durante esta jornada.

Aos professores do programa, expresso minha gratidão por tudo que me ensinaram e pela amizade compartilhada.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pela bolsa concedida.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. MICROGRAFIA CITOLÓGICA CONJUNTIVAL DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS COM COLORAÇÃO PANÓTICO NA OBJETIVA DE 100X.25
- FIGURA 2. MICROGRAFIA CITOLÓGICA DOS COXINS PALMARES (A) E PREGA NASAL (B) DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS COM COLORAÇÃO PANÓTICO NA OBJETIVA DE 100X.25

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL INDICANDO PREDOMINÂNCIA, ENTRE LEUCÓCITOS E CÉLULAS DESCAMATIVAS ENCONTRADAS NA CITOLOGIA CONJUNTIVAL POR ESFOLIAÇÃO DA PELE E CONJUNTIVA EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS.	20
TABELA 2. COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS DE LEUCÓCITOS E CÉLULAS DESCAMATIVAS, ENCONTRADAS NAS CITOLOGIAS POR ESFOLIAÇÃO OCULAR, ENTRE OS GRUPOS DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.	22
TABELA 3. COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS DE LEUCÓCITOS E CÉLULAS DESCAMATIVAS, ENCONTRADAS NAS CITOLOGIAS CUTÂNEAS POR ESFOLIAÇÃO DA REGIÃO DOS COXINS PALMARES, ENTRE OS GRUPOS DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.	23
TABELA 4. COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS DE LEUCÓCITOS E CÉLULAS DESCAMATIVAS, ENCONTRADAS NAS CITOLOGIAS CUTÂNEAS POR ESFOLIAÇÃO DA REGIÃO DA PREGA NASAL, ENTRE OS GRUPOS DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS. .	23
TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE MALASSEZIA SPP ENCONTRADAS NAS CITOLOGIAS CONJUNTIVAS POR ESFOLIAÇÃO DOS OLHOS DIREITO (OD) E ESQUERDO (OE), E DERMATOLÓGICA (COXINS E PREGA NASAL) EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS.	24

CAPÍTULO 3

TABELA 1. COMPARAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS EM CULTURAS CONJUNTIVAS, COXINS PALMARES E PREGA NASAL EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.	34
TABELA 2. COMPARAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS NAS CULTURAS CONJUNTIVAS ENTRE AS FAIXAS ETÁRIAS EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS.	37
TABELA 3. COMPARAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS NAS CULTURAS DE COXINS PALMARES ENTRE AS FAIXAS ETÁRIAS EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS.	38
TABELA 4. COMPARAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS NAS CULTURAS DA PREGA NASAL ENTRE AS FAIXAS ETÁRIAS EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS.	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
1.1. ANATOMOFISIOLOGIA DA SUPERFÍCIE OCULAR	9
1.2. MICROBIOLOGIA	10
1.3. CITOLOGIA CONJUNTIVAL	10
1.4. DERMATOPATOLOGIA VETERINÁRIA	11
3. RAÇA SHIH-TZU.....	12
4. REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2- PERFIL CITOLÓGICO DA PELE E SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS.	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
5. INTRODUÇÃO.....	17
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
8. CONCLUSÃO.....	26
9. REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 3- PERFIL MICROBIOLÓGICO DA PELE E SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU.....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
10. INTRODUÇÃO.....	31
11. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
13. CONCLUSÃO.....	39
14. REFERÊNCIAS	39
15.ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	42
16.ANEXO 2: COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	43

1. INTRODUÇÃO

O olho canino é uma estrutura de certo modo simples em termos de estrutura, pois ele, anatomicamente não possui uma órbita óssea completa pois possui uma abertura na frente para passagem de luz, assim sendo mais propenso a sofrer traumas e propenso a vários tipos de doença que o afete mais especificamente, como doenças congênicas ou algumas mais graves (Antonia *et al.*, 2014).

A superfície ocular é rica em nutrientes e suporta uma grande quantidade de microrganismos, que constituem uma microbiota ocular normal. A superfície ocular possui uma carga de microrganismos próprios ou residentes, e eles podem atuar no desenvolvimento de doenças oculares em caso de alguma lesão, já que eles possuem esse hábito de coçar, lambem e se esfregar em todo e qualquer lugar compartilhando microrganismos (Oriá *et al.*, 2011).

A pele saudável dos cães possui uma abundância de microrganismos, atuando na saúde do animal, na proteção da pele e do organismo como um todo. Essas bactérias e fungos evitam o desenvolvimento de outros microrganismos patogênicos além de evitar problemas locais na pele que devido a um prurido simples, torna possível o compartilhamento da microbiota entre partes do corpo (Tang *et al.*, 2020).

A maior parte dos microrganismos encontrados na natureza não são prejudiciais à saúde dos animais, certas bactérias contribuem para a homeostasia do organismo animal, porém algumas espécies podem causar doenças sendo chamadas de patogênicas (Quinn *et al.*, 2018).

A microbiota da superfície ocular consiste em microrganismos que residem na superfície conjuntival, na córnea e no filme lacrimal. Os métodos de diagnósticos laboratoriais mediante infecções oculares apresentam mais desafios quando comparados com infecções em outros locais, como na pele (Mitra, Chandran e Fernandes, 2023).

A manutenção da microbiota comensal e a proteção da superfície ocular depende essencialmente de uma fina camada estável de lágrimas atuando como uma barreira protetora contra patógenos externos e mantendo a superfície umedecida (Singh *et al.*, 2022).

Com estudos específicos da microbiota cutânea e análises no desenvolvimento de doenças de pele nos cães pode-se chegar a tratamentos assertivos através de informações mais concretas sobre a causa da dermatopatia e entendendo o comportamento da microbiota em questão auxiliando os clínicos (Gasparetto *et al.*, 2013).

O presente trabalho buscou conhecer o perfil citológico e microbiológico do epitélio conjuntival, da região da prega nasal e coxins palmares, observando a variação por faixa etária

e visando disponibilizar para a sociedade uma ferramenta de auxílio em futuros diagnósticos para afecções oculares e/ou cutâneas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. ANATOMOFISIOLOGIA DA SUPERFÍCIE OCULAR

O olho canino tem como função primária captar e direcionar a luz sobre a retina fotossensível. Tem o formato esférico devido à pouca elasticidade da esclera, da córnea e à pressão exercida pelo humor aquoso. Está situado em uma cavidade do crânio em forma de cone denominado órbita, a qual é constituída pelos ossos frontal, lacrimal, esfenóide, zigomático, palatino e maxilar (Klein, 2021).

A córnea é a parte transparente da túnica fibrosa que associada à sua curvatura regular torna-se um elemento essencial para a focalização da luz na retina. É formada por um tecido avascular nutrido por vasos do limbo, pelo líquido da câmara anterior e a lágrima (König, 2021).

A superfície ocular é úmida, quente, com alta tensão de oxigênio e um amplo suprimento de nutrientes. Sem defesas adequadas, a colonização, invasão e infecção seriam frequentes. Os mecanismos de defesa incluem um epitélio intacto, cílios, que filtram o pó e partículas contaminadas, impedindo que atinjam o olho, reflexo de piscar, lacrimejamento, que lava bactérias e debris da conjuntiva e a descamação frequente e contínua das células epiteliais, prevenindo a invasão dos micróbios e retirando aqueles aderidos à superfície epitelial (Putz, 2017).

A superfície ocular contém defesas bioquímicas, como ácidos graxos produzidos pelas glândulas de Meibômio, lipídios, componentes da lágrima (lisozima, proteínas quelantes como a lactoferrina, que se ligam ao ferro e interferem no metabolismo bacteriano) e um sistema imunológico com imunoglobulinas na lágrima (Putz, 2017).

O sistema lacrimal é composto pela glândula lacrimal propriamente dita, pelas glândulas associadas à terceira pálpebra e diversas pequenas glândulas acessórias além de um sistema de ductos que transportam as lágrimas, em direção à cavidade nasal para evaporação. A glândula lacrimal é achatada e está situada entre o bulbo do olho e a parede dorsolateral da órbita (Singh, 2019).

O teste lacrimal de Schirmer é utilizado para quantificar a produção lacrimal. Valores normais do teste lacrimal com a fita de Schirmer apresentam, em cães, 15 – 20 mm/min sendo que valores abaixo podem indicar alguma doença (Williams 2017).

1.2. MICROBIOLOGIA

As espécies de bactérias como estafilococos coagulase-positiva, *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius*, juntamente com *Staphylococcus hyicus*, coagulase variável, são patógenos importantes para os cães pois podem residir na pele e em algumas mucosas e podem ser oportunistas atuando como patógenos causando infecções (Quinn *et al.*, 2018).

Os fungos são microrganismos eucariotos, heterotróficos, não fotossintéticos, produtores de exoenzimas que obtêm nutrientes através da absorção. Há em torno de 100 mil espécies catalogadas, somente algumas centenas são conhecidas por serem patogênicas para animais (Quinn *et al.*, 2018).

As culturas bacterianas e fúngicas são uma parte importante do diagnóstico em dermatologia. Quaisquer lesões devem ser submetidas à cultura para detecção de bactérias e fungos. Swabs e tubos de cultura são úteis à coleta de materiais para cultura e as culturas óticas devem ser obtidas antes da realização de quaisquer procedimentos de lavagem ou limpeza (Hlinica, 2018).

A realização de culturas bacterianas oftálmicas e tegumentares para caracterização da microbiota da pele e região ocular é importante para a compreensão da relação entre as doenças inflamatórias da pele e as doenças oculares secundárias. Alguns estudos têm demonstrado a presença de bactérias em cães com ceratoconjuntivite seca e dermatite atópica, sugerindo uma possível relação entre essas condições patológicas e a microbiota comensal (Wang *et al.*, 2022).

1.3. CITOLOGIA CONJUNTIVAL

A citologia é uma ferramenta diagnóstica válida em oftalmologia que pode fornecer respostas rápidas e benéficas para orientar os diagnósticos das alterações da superfície ocular. O método de coleta com escova citológica em qualquer tipo de mucosa, incluindo a conjuntiva, proporciona uma boa distribuição celular, porém produz uma contagem menor de células comparadas a outros métodos de coleta (Liga *et al.*, 2023).

A citologia de impressão corneconjuntival é um importante exame não invasivo que auxilia no diagnóstico e estadiamento de várias patologias, sendo as mais importantes as alterações da superfície ocular decorrentes da deficiência do filme lacrimal (Putz, 2017).

Existem vários tipos de corantes para a realização do exame de citologia. As técnicas padronizadas são as colorações do tipo Romanowsky, que incluem os corantes de Panótico rápido e a de Papanicolau com suas variações. A primeira é geralmente mais utilizada pelo seu baixo custo, praticidade e facilidade de execução com resultados de qualidade aceitável. A segunda, destaca-se por exibir maior riqueza de detalhes no núcleo da célula, tornando-se superior para o diagnóstico citológico de neoplasia (Cowell, 2009).

A citologia é uma ferramenta diagnóstica válida em oftalmologia que pode fornecer respostas rápidas e benéficas além orientar diagnósticos adicionais. A coleta de amostras com espátula é um método caracterizado como método não recomendado, comprovando amostras de baixa qualidade. O uso da mini escova é o melhor método pois não causa nenhum ou mínimo desconforto (Kovalcuka, Sarpio e Nikolajenko, 2023).

1.4. DERMATOPATOLOGIA VETERINÁRIA

A derme dos cães possui uma variedade de microrganismos que auxiliam na saúde do animal e atuam na proteção da pele e do organismo como um todo. Além de proteção, eles inibem o desenvolvimento de outros microrganismos patogênicos oportunistas que se aproveitam de problemas no local ou, devido a um prurido, ocorre uma lesão e o compartilhamento da microbiota com outras partes do corpo (Tang *et al.*, 2020).

A citologia cutânea é uma técnica diagnóstica dermatológica muito utilizada. Seu objetivo é ajudar o clínico a identificar bactérias ou fungos (levedura) e avaliar os tipos celulares infiltrantes, células neoplásicas ou células acantolíticas (Hlinica, 2018).

Os leucócitos e mastócitos são recrutados para a produção de peptídeos antimicrobianos, que são responsáveis por combater bactéria Gram-positivas e negativas até mesmo do próprio organismo, assim uma alteração na produção desses peptídeos antimicrobianos devido a inflamação ou traumas na pele, faz com que a afecção se instale com ajuda das bactérias comensais da microbiota (Afshar e Gallo, 2013).

A dermatopatologia permite a caracterização histológica dos tecidos e seus resultados acrescentam informações importantes sobre a condição dermatológica do paciente onde o estudo específico de doenças dermatológicas pode ajudar a entender o comportamento da microbiota da pele dos cães (Gasparetto *et al.*, 2013).

Estudos apontam para a necessidade de conhecer as comunidades microbianas distintas de acordo com a localização e não existem valores de referências para a contagem de células em citologias.

3. RAÇA SHIH-TZU

O Shih-Tzu é uma raça braquicefálica popular no Japão e difundida no mundo inteiro na qual doenças da superfície ocular são relativamente comuns (Kitamura *et al.*, 2019).

Algumas raças braquicefálicas, como os Shih-Tzus, podem estar predispostas a certas anormalidades oculares. A percentagem de problemas secundários, como úlceras de córnea, é elevada nessas raças, o que alerta para a importância do check-up oftalmológico regular, para que se possa conseguir um diagnóstico precoce das doenças primárias (Costa *et al.*, 2021).

Os distúrbios mais comuns dos cães da raça Shih-Tzus incluem doença periodontal, impactação do saco anal, distúrbios do ouvido e otite externa, distúrbios dermatológicos, o que implica que o Shih Tzu pode ser considerado uma raça razoavelmente típica em termos de problemas de saúde (Dale *et al.*, 2024).

4. REFERÊNCIAS

AFSHAR, M.; GALLO, R. L.; Innate immune defense system of the skin. **Advances in Veterinary Dermatology** – The Authors. Journal compilation, ESVD and ACVD, 2013.

ANTONIA, N. A.; NARAYANAN, M. K.; ANOOP, S.; DEVANAND, C. B.; MARTIN, J.; VENUGOPAL, K. D. and S. K.; Occurrence of ophthalmic disorders in dogs. **Department of Veterinary Surgery and Radiology, College of Veterinary and Animal Sciences, Mannuthy, Kerala Veterinary and Animal Sciences University** – Pookode - Indian J.Vet. Res. Vol. 23 No. 2 2014.

COSTA J, STEINMETZ A, DELGADO E. Clinical signs of brachycephalic ocular syndrome in 93 dogs. **Ir Vet J.** 2021 Jan 25;74(1):3. doi: 10.1186/s13620-021-00183-5. PMID: 33494828; PMCID: PMC7836154.

COWELL, R. L., Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos. [tradução Adriana de Siqueira Rosinelli...; revisão científica Alexander Welker Biondo, Rafael Felipe da Costa Vieira]. **MedVet**, 3.ed. p36, 2009.

DALE F, BRODBELT DC, WEST G, CHURCH DB, LEE YH, O'NEILL DG. Demography, common disorders and mortality of Shih Tzu dogs under primary veterinary care in the UK. **Canine Med Genet.** 2024 Jan 24;11(1):2. doi: 10.1186/s40575-023-00135-y. PMID: 38263229; PMCID: PMC10807147.

GASPARETTO, N. D.; TREVISAN, Y. P. A.; ALMEIDA, N. B.; NEVES, R. C. S. M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; DUTRA, V.; COLODEL, E. M.; SOUSA, V. R. F., Prevalência das doenças de pele não neoplásicas em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(3), 2013, 359–362.

HLINICA, K., A. Dermatologia De Pequenos Animais. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 4ed 2018. p32.

KITAMURA Y, MAEHARA S, NAKADE T, MIWA Y, ARITA R, IWASHITA H, SAITO A. Assessment of meibomian gland morphology by noncontact infrared meibography in Shih Tzu dogs with or without keratoconjunctivitis sicca. **Vet Ophthalmol.** 2019 Nov;22(6):744-750. doi: 10.1111/vop.12645. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30715776; PMCID: PMC6899988.

KLEIN, B., G. Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 6 ed. 2021. p148

KÖNIG, H., E.; LIEBICH, H. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. Porto Alegre: **Artmed, Grupo A**, 2021. p597.

KOVALCUKA L, SARPIO L, NIKOLAJENKO M. Comparison of five conjunctival cytology sampling methods in normal cat eyes. **Vet World.** 2023 Apr;16(4):779-785. doi: 10.14202/vetworld.2023.779-785.

LIGA K, LIGA S, MADARA N. Comparison of five conjunctival cytology sampling methods in normal cat eyes. **Veterinary World**, EISSN: 2231-0916, 2023.

MITRA S, CHANDRAN K, FERNANDES M. Dicas práticas e erros comuns na amostragem e processamento de microbiologia ocular. **Indiano J Oftalmol**; 71:1698-1705 2023.

ORIÁ, A.P.; PINHEIRO, A.C.O.; ALMEIDA, D.S.; FURTADO, M.A.; PINNA, M.H.; Microbiota normal bacteriana da conjuntiva ocular – Revisão de literatura. **Medicina Veterinária - Recife**, v.5, n.3, p.16-21, jul-set, 2011.

PUTZ, Carla. Oftalmologia - Ciências Básicas. Grupo GEN, 2017. E-book. ISBN 9788595152199. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595152199/>. Acesso em: 12 fev. 2024.

QUINN, P., J., MARKEY, B. K., LEONARD, F. C., FITZPATRICK E. S., FANNING, S.. Microbiologia Veterinária: essencial. 2. Ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2018.

SINGH, BALJIT. Tratado de Anatomia Veterinária. **GEN Guanabara Koogan**; 5ª edição, 2019.

SINGH V. K.; SHARMA P.; VAKSH U. K. S.; CHANDRA R. Abordagens atuais para a regeneração e reconstrução da superfície ocular no olho seco. **Frente. Med.** 9:885780.2022. doi: 10.3389/fmed.2022.885780

TANG, S.; PREM, A.; TJOKROSURJO, J.; SARY, M.; VAN BEL, M.A.; RODRIGUES-HOFFMANN, A.; KAVANAGH, M.; WU, G.; VAN EDEN, M.E.; KRUMBECK, J.A.; The canine skin and ear microbiome: A comprehensive survey of pathogens implicated in canine skin and ear infections using a novel next-generation-sequencing-based assay. **Vet Microbiol.** 2020. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108764.

WANG Z, GUO L, LI J, LI J, CUI L, DONG J, MENG X, QIAN C, WANG H. Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence factors of isolates of *staphylococcus pseudintermedius* from healthy dogs and dogs with keratitis. **Front Vet Sci.** 2022 Aug. doi: 10.3389/fvets.2022.903633.

WILLIAMS, D. Ceratoconjuntivite seca canina: Conceitos atuais em diagnóstico e tratamento. **J. Clin. Oftalmol.** Opção, 2(1): 101, 2017.

CAPÍTULO 2- PERFIL CITOLÓGICO DA PELE E SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS.

PERFIL CITOLÓGICO DA PELE E SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU SAUDÁVEIS.

CELLULAR PROFILE OF THE SKIN AND OCULAR SURFACE IN HEALTHY SHIH-TZU DOGS.

RESUMO

A citologia consiste na análise individualizada de células, sendo útil no diagnóstico de doenças da pele e da superfície ocular. A pele possui mecanismos de defesa compostos por dois processos básicos sendo uma barreira física, química e biológica, onde estão presentes receptores que captam informações e passam para o sistema imunológico inato. A conjuntiva confere proteção mecânica e imunológica à superfície ocular. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi descrever o perfil citológico da pele e superfície ocular de cães da raça Shih-Tzu saudáveis, assim como a influência da idade nesses perfis. Para tal foi realizado teste de Schirmer e o material para análise citológica foi coletado com auxílio de *microbrush* de *nylon* em movimentos circulares e rolando o mesmo na lâmina de microscopia coradas pelo método panótico rápido e posteriormente foi realizado um teste de fluoresceína. Realizou-se a contagem diferencial de células até alcançar 100 células. As células encontradas foram linfócitos com predominância na citologia ocular (OD – 47% e OE – 41,93%), polimorfonucleares com predominância nas citologias da prega nasal (62%) e coxins palmares (100%), na contagem para as células descamativas destacaram-se as superficiais em todas as regiões (OD 83,11%, OE 90,52%, coxins palmares 100% e prega nasal 96,91%). Pode-se concluir que na citologia conjuntival, para a contagem de leucócitos, houve uma predominância de linfócitos, polimorfonucleares na região de coxins palmares e prega nasal e para células descamativas uma predominância das células superficiais em todas as regiões analisadas. A *Malassezia spp* esteve presente em todas as regiões.

Palavras-chave: Canídeos; Citopatologia; Dermatologia; Morfologia; Saúde ocular.

ABSTRACT

Cytology consists of the individualized analysis of cells, being useful in diagnosing skin and ocular surface diseases. The skin has defense mechanisms composed of two basic processes: a physical, chemical, and biological barrier, where receptors are present to capture information and relay it to the innate immune system. The conjunctiva provides mechanical and immunological protection to the ocular surface. Therefore, the objective of this study was to describe the cytological profile of the skin and ocular surface of healthy Shih-Tzu dogs, as well as the influence of age on these profiles. For this purpose, a Schirmer test was performed, and the material for cytological analysis was collected using a nylon microbrush in circular movements, rolling it on a microscopy slide stained by the rapid panoptic method, followed by a fluorescein test. A differential cell count was performed until reaching 100 cells. The cells found were lymphocytes with predominance in ocular cytology (OD - 47% and OS - 41.93%), polymorphonuclear cells with predominance in cytologies of the nasal fold (62%) and palmar pads (100%), and in the count for desquamative cells, superficial cells stood out in all regions (OD 83.11%, OS 90.52%, palmar pads 100%, and nasal fold 96.91%). It can be concluded that in conjunctival cytology, for leukocyte counting, there was a predominance of lymphocytes, polymorphonuclear cells in the palmar pad and nasal fold region, and for desquamative cells, a predominance of superficial cells in all analyzed regions. *Malassezia* spp was present in all regions.

Keywords: Canids; Cytopathology; Dermatology; Morphology; Ocular health.

5. INTRODUÇÃO

A citologia de impressão córneo conjuntival é um importante exame não invasivo que auxilia no diagnóstico e estadiamento de várias doenças, sendo as mais importantes as alterações da superfície ocular decorrentes da deficiência do filme lacrimal (Putz, 2017).

A pele possui mecanismos de defesa compostos por dois processos básicos representados pelas barreiras física e química, onde estão presentes receptores que captam informações sobre o agente patogênico e passam para o sistema imunológico inato. Deste modo serão recrutados leucócitos e mastócitos para a produção de peptídeos (Afshar e Gallo, 2013).

A região conjuntival é formada por uma membrana mucosa e úmida que recobre a porção anterior do bulbo adjacente ao limbo, a superfície interna das pálpebras e toda a terceira pálpebra. Seu epitélio é estratificado cúbico e sua lâmina própria é constituída de tecido conjuntivo frouxo (Junqueira e Carneiro, 2023).

A citologia ocular por impressão é considerada uma ferramenta diagnóstica válida em oftalmologia. A colheita com espátula é um método não recomendado por produzir amostras de baixa qualidade contendo poucas células íntegras, já o método com mini escovas é considerado o melhor método, não causando nenhum desconforto e produzindo uma amostra de qualidade com uma boa quantidade de células para analisar (Kovalcuka, Sarpio e Nikolajenko, 2023).

Bron *et al.* (2017) relataram que, em humanos, as células caliciformes da conjuntiva apresentam uma função importante na produção da mucina, que em contato com a água forma um muco formando a parte mais interna do filme lacrimal, que constitui uma interface funcional entre o olho e o ambiente externo além de contribuir de forma importante para a resposta adaptativa do sistema imunológico da superfície ocular ao olho seco.

A citologia da pele permite a caracterização histológica dos tecidos e seus resultados acrescentam informações importantes sobre a condição dermatológica do paciente, ajudando a decifrar o comportamento da microbiota residente na pele dos cães e consequentemente auxiliando os clínicos a chegarem em um diagnóstico (Gasparetto *et al.*, 2013).

A *Malassezia spp* é um fungo muito difundido no nosso planeta e espera-se que novas espécies sejam descobertas. Apesar de algumas espécies de *Malassezia spp* serem adaptadas ao hospedeiro, muitas são compartilhadas entre animais e humanos. Já existem relatos de transmissão zoonótica, especialmente para *M. pachydermatis*. As espécies de *Malassezia spp*

estão associadas a doenças de pele em animais de companhia, de produção, aves e animais exóticos, bem como em humanos (Hobi *et al.*, 2022).

Sendo assim o objetivo do presente trabalho foi propor um perfil citológico da pele e superfície ocular de cães da raça Shih-Tzu saudáveis, assim como a existência ou não de alterações destes perfis com relação à idade.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) com protocolo nº01/2023.

Os critérios de inclusão dos animais no experimento foram baseados na ausência de lesões oculares e cutâneas, as quais foram determinadas por meio de avaliações clínicas da pele e da superfície ocular. Adicionalmente, foram considerados resultados normais no teste de Schirmer, com valores dentro do intervalo estabelecido por Martin (2010) entre 15 e 25mm/min, e a ausência de úlcera de córnea, determinada pela utilização de fluoresceína.

As amostras foram coletadas, pelo mesmo profissional, de 45 cães da raça Shih-Tzu, todos saudáveis, distribuídos em três grupos de 15 animais cada, sendo separados por faixas etárias. O Grupo 1 (G1) consistiu em animais de 1 a 4 anos, o Grupo 2 (G2) incluiu animais de 5 a 8 anos, e o Grupo 3 (G3) abrangeu animais de 9 a 12 anos. Antes da coleta das amostras, realizou-se um teste de Schirmer para quantificar a produção lacrimal e descartar casos de olho seco, para não interferir na citologia. Realizou-se o teste de fluoresceína para excluir a presença de úlcera de córnea.

O teste de Schirmer envolveu a dobra da extremidade da fita dosadora, a qual foi inserida no saco conjuntival inferior, próximo ao canto medial do olho. Após um minuto, a fita foi removida, e a leitura da porção umedecida foi realizada em milímetros.

O teste de fluoresceína consistiu na aplicação de uma gota do corante em cada olho. Após alguns segundos, realizou-se a lavagem do excesso de corante com solução fisiológica e algodão. A presença ou ausência de úlcera de córnea foi observada, sendo que animais com úlcera foram excluídos do experimento.

Para as citologias, foram coletadas amostras de materiais nas regiões do epitélio conjuntival, prega nasal e região interdigital dos coxins palmares. As amostras foram coletadas com *microbrush* fino de *nylon*, previamente umedecido com água de injeção estéril, realizando 10 movimentos de rotação em cada região. Posteriormente, os esfregaços foram preparados em lâminas para microscopia. Após aproximadamente 30 minutos da coleta, as lâminas foram

coradas pelo método de coloração Panótico Rápido e lidas em microscópio óptico nos aumentos de 10x, 40x e 100x, com óleo de imersão, por um único examinador.

Para padronização na leitura das lâminas, foi empregado o método de contagem diferencial de células até alcançar 100 células. Em cada lâmina, foram realizadas contagens separadas para leucócitos e células descamativas por região (Conjuntiva, prega nasal e região dos coxins palmares). Na citologia, também foi observada a presença ou ausência de *Malassezia spp* nas amostras analisadas.

A avaliação da correlação estatística entre os grupos foi realizada utilizando a mediana, devido à ausência de uma distribuição normal dos dados. O Teste U de Mann Whitney foi empregado ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) através do programa estatístico R (R Core Team, 2022).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia empregada para avaliar o perfil citológico conjuntival, da prega nasal e região interdigital dos coxins palmares, permitiu a identificação satisfatória das células nas lâminas.

Na citologia conjuntival os linfócitos estavam presentes em 73% das lâminas do olho direito com predominância em 42,3% e presente em 60% das lâminas do olho esquerdo com predominância em 42,3% das amostras. Os polimorfonucleares estavam presentes em 57,7% das lâminas em olho direito com predominância em 26,7% e presente em 44,4% das lâminas do olho esquerdo com predominância em 24,4%, conforme evidenciado na tabela 1.

Nas citologias da região de coxins palmares houve uma predominância absoluta de polimorfonucleares não sendo encontrado outros tipos de leucócitos. Para região da prega nasal os linfócitos estavam predominantes em 17,7% das citologias e os polimorfonucleares 31,2% de predominância.

Os Macrófagos não apresentaram predominância em nenhuma citologia da conjuntiva, porém estavam presentes em 15,5% das citologias em olho direito e 11,11% no olho esquerdo. Não foram encontrados nas amostras dos coxins palmares e estavam predominantes em 2,2% das amostras da prega nasal.

Com os resultados das citologias para a contagem de células descamativas observamos uma predominância das células superficiais em todas as regiões. As células Caliciformes foram observadas somente em duas citologias (4,4%) da região conjuntival do olho direito não estando predominante em nenhuma citologia.

Para a pesquisa de *Malassezia spp* observamos que ela estava presente em 4,4% das citologias oculares, em 2,22% das citologias dos coxins palmares e em 20% das citologias da prega nasal, como evidenciado na tabela 5.

Tabela 1. Distribuição Percentual indicando predominância, entre Leucócitos e Células Descamativas encontradas na Citologia Conjuntival por esfoliação da pele e conjuntiva em cães da raça Shih-Tzu Saudáveis.

Leucócitos	Citologia			
	OD%	OE%	Coxins%	Prega nasal%
Linfócitos	42,3	42,3	0	17,7
Polimorfonucleares	26,7	24,4	100	31,2
Macrófagos	0	0	0	2,2
Distribuição homogênea	31	33,3	0	48,8
Células descamativas				
Superficiais	84,5	95,6	100	97,8
Intermediárias	11,1	2,2	0	2,2
Caliciformes	0	0	0	0
Distribuição homogênea	4,4	2,2	0	0

Estatística descritiva

Utilizando o mesmo método de coleta, Kovalcuka, Sarpio e Nikolajenko (2023) relataram que este tipo de obtenção do material é seguro causando o mínimo de desconforto ao paciente além de não necessitar de contenção química para sua realização. No presente estudo foi observado não haver qualquer tipo de lesão ou irritação sobre a conjuntiva ou na pele dos animais com a utilização do *microbrush* fino de *nylon*.

Kovalcuka, Sarpio e Nikolajenko (2023) destacaram que a citologia por impressão pelo método de coleta com mini escova é um método viável que produz uma amostra de alta qualidade com uma boa monocamada de células. Perazzi *et al.* (2017) afirmaram que escovas citológicas com cerdas de *nylon*, utilizadas para coletar amostras de citologia conjuntival formam monocamadas uniformes, resultando em boa qualidade com rendimento celular satisfatório para avaliação microscópica das lâminas.

O método de coloração Panótico Rápido foi eficaz na coloração dos tipos celulares investigados. Borges *et al.* (2012) afirmaram que a técnica de coloração Papanicolau, na espécie humana, é a que permite uma melhor acurácia no exame para a identificação das células, porém o método empregado nesse estudo é o mais difundido na Medicina Veterinária por ser mais rápido, fácil e de menor custo.

A literatura pertinente à citologia conjuntival não padroniza os tipos celulares para a região nem as quantifica, porém relata a identificação de leucócitos, como neutrófilos, eosinófilos e monócitos, em pequenas quantidades nas citologias de cães clinicamente saudáveis (Bolzan *et al.*, 2005; Venâncio *et al.*, 2012).

Bolzan *et al.* (2005) em sua pesquisa realizaram citologias por impressão aplicando tiras assimétricas de Millipore na conjuntiva e relataram a visualização de células descamativas superficiais em 33% das lâminas de cães clinicamente saudáveis. O presente estudo, utilizando um método de coleta diferente, observou a presença desse tipo celular em 95,55% OD e 97,7% OE das citologias conjuntivais sendo que elas estavam predominantes em 84,5% das lâminas em OD e 95,6% OE (tabela 1).

O presente estudo corrobora com os achados de Azevedo *et al.* (2009) onde identificaram que as células mais encontradas na citologia esfoliativa da conjuntiva de cães saudáveis foram células descamativas das camadas superficiais e intermediárias, onde encontraram 50% das lâminas com predominância de células descamativas intermediárias e outros 50% com predominância de células descamativas superficiais.

Borges *et al.* (2012), utilizando método de abrasão com escova citológica na conjuntiva de 13 cães saudáveis, apesar da visualização de todos tipos celulares descamativos, obtiveram predominância de células intermediárias (87,06% e 73,10%), no presente estudo o resultado foi uma predominância de células descamativas superficiais (tabela 1), vale ressaltar que de acordo com o método de colheita empregado nas duas pesquisas a força aplicada pode interferir na profundidade das camadas atingidas.

Hashitomo (2013) enfatizam que os macrófagos são considerados células de primeira linha na defesa imunológica, destacando sua multifuncionalidade como componentes do sistema mononuclear fagocítico. Venâncio *et al.* (2012) afirmam que a presença de células inflamatórias como leucócitos, desde que em quantidade reduzida, em animais sem afecções oftálmicas, não é significativa e deve ser desconsiderada.

Os leucócitos polimorfonucleares normalmente, em animais saudáveis são numerosos na conjuntiva e, quando presentes, encontram-se migrando por meio do epitélio em direção ao saco conjuntival, para combater algum agente infeccioso (McGavin e Zachary, 2018).

Borges *et al.* (2012) em seu estudo utilizando escova citológica como forma de coleta apresentaram um percentual de 0,12% de células caliciformes em citologia conjuntival de 13 cães saudáveis. No presente estudo o percentual fica em 0,022% (2/90) das citologias conjuntivais.

Lima *et al.* (2014) não encontraram células caliciformes em citologias esfoliativas com escova interdental da conjuntiva palpebral de 10 cães hípidos e Venâncio *et al.* (2012) descreveram a ausência deste tipo de células na conjuntiva palpebral de 50 felinos saudáveis. Morais (2016) em seu estudo com 38 bovinos da raça Gir relatou um percentual de 0,34% de células caliciformes em citologia conjuntival.

Tabela 2. Comparação das medianas de leucócitos e células descamativas, encontradas nas citologias por esfoliação ocular, entre os grupos de cães da raça Shih-Tzu saudáveis de diferentes faixas etárias.

Parâmetros	Mediana			p-valor
	G1	G2	G3	
Linfócitos	0,00 ^C	75,00 ^A	17,00 ^B	0,0169
Polimorfonucleares	0,00 ^C	1,50 ^B	49,00 ^A	0,0487
Macrófagos	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	0,2339
Superficial	99,00 ^A	91,00 ^A	96,00 ^A	0,1152
Intermediária	1,00 ^B	9,00 ^A	4,00 ^{AB}	0,0464
Caliciforme	0,00	0,00	0,00	0,2005

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os grupos pelo teste de Mann Whitney U test ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Na comparação entre os grupos, de acordo com a faixa etária, observou-se significância estatística nos percentuais de linfócitos (figura 3) ($p = 0,0169$), polimorfonucleares ($p = 0,0487$) e células descamativas intermediárias ($p = 0,0464$), conforme evidenciado na Tabela 2. Notavelmente, os animais dos grupos G2 e G3 demonstraram percentuais mais elevados de células polimorfonucleares e células descamativas intermediárias em comparação com o grupo G1. Esses resultados destacam diferenças distintas nas respostas citológicas entre as faixas etárias investigadas.

Segundo Raskin (2003) quando temos a predominância de neutrófilos em amostras citológicas, devemos classificá-las como inflamatória, porém não foi o caso do estudo, pois apesar de um percentual mais elevado de polimorfonucleares, nesses grupos, eles não estavam predominantes.

Na análise citológica por esfoliação dos coxins palmares, como evidenciado na Tabela 3, observou-se uma predominância de células descamativas (figura 4) superficiais e leucócitos polimorfonucleares (figura 1), sem diferença ($p > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 3. Comparação das medianas de leucócitos e células descamativas, encontradas nas citologias cutâneas por esfoliação da região dos coxins palmares, entre os grupos de cães da raça Shih-Tzu saudáveis de diferentes faixas etárias.

Parâmetros	Mediana			p-valor
	G1	G2	G3	
Leucócitos	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	1,0000
Polimorfonucleares	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A	0,2703
Macrófagos	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	1,0000
Superficial	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A	1,0000
Intermediária	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	1,000
Caliciforme	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	1.000

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não houve diferença para o teste U de Mann Whitney ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Os resultados indicam uma uniformidade nas características citológicas cutâneas obtidas por esfoliação da região dos coxins palmares em cães Shih-Tzu saudáveis, independentemente das faixas etárias investigadas. Segundo Cowell (2009), células epiteliais descamativas estão presentes, com frequência em citologias cutâneas por swabs/escarificação, células do tipo superficiais estão presentes na grande maioria das amostras cutâneas colhidas com escarificação, sendo consideradas um achado esperado em cães saudáveis ou com dermatopatias.

Com a análise citológica por esfoliação da prega nasal, como evidenciado na Tabela 4, observou-se uma predominância de células descamativas superficiais (figura 4) e leucócitos polimorfonucleares (figura 1), sem significância estatística ($p > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 4. Comparação das medianas de leucócitos e células descamativas, encontradas nas citologias cutâneas por esfoliação da região da prega nasal, entre os grupos de cães da raça Shih-Tzu saudáveis de diferentes faixas etárias.

Parâmetros	Mediana			p-valor
	G1	G2	G3	
Leucócitos	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	0.9383
Polimorfonucleares	40,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	0.7590
Macrófagos	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	0.2752
Superficial	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A	0.7769
Intermediária	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	0.7769
Caliciforme	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	1.0000

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não houve diferença para o teste de Mann Whitney U test ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Esses resultados indicam uma uniformidade nas características citológicas da região de prega nasal em cães Shih-Tzu saudáveis, independentemente das faixas etárias investigadas.

Cowell (2009) afirma que células epiteliais descamativas estão presentes, em citologias cutâneas por *swabs*/escarificação e as células do tipo superficiais estão presentes na grande maioria das amostras cutâneas colhidas com escarificação sendo consideradas um achado esperado em cães saudáveis.

Tabela 5. Distribuição percentual de *Malassezia spp* encontradas nas citologias conjuntivais por esfoliação dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE), e dermatológica (Coxins e Prega Nasal) em cães da raça Shih-Tzu saudáveis.

	Citologia – <i>Malassezia spp</i>							
	OD	%	OE	%	Coxins	%	Prega nasal	%
Presente	1	2,22	3	6,66	1	2,22	9	20
Ausente	44	97,77	42	93,33	44	97,77	36	80

Estatística descritiva.

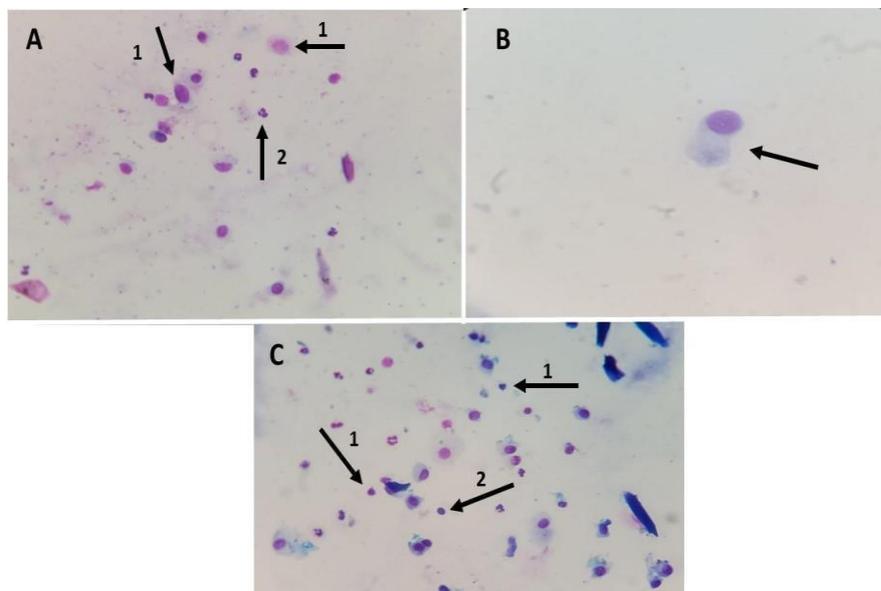
Diaz *et al.* (2023) relataram que métodos com técnicas citológicas e técnicas moleculares apresentaram boa relação entre os métodos de colheita e demonstraram seu valor como ferramenta diagnóstica para *Malassezia spp* na prega interdigital de cães com pododermatite.

Rosa *et al.* (2019) relataram que a *Malassezia spp* é um microrganismo da microbiota comensal dos cães, causando alguma doença quando associada a outras enfermidades, e sua prevalência é relacionada com baixa imunidade do hospedeiro aliado ao aumento da temperatura e umidade, criando um ambiente propício para seu desenvolvimento.

Santos *et al.* (2020) destacaram a presença de *Malassezia spp* em 2,6% dos exames realizados na pele de 39 cães e Chiurco (2016), em seu estudo com 33 cães saudáveis, observou uma positividade mais acentuada para *Malassezia spp* em amostras do conduto auditivo do que na pele, onde encontrou 72% das amostras positivas para conduto auditivo, e 12% de positividade nas amostras da pele.

Santos *et al.* (2009) isolaram *Malassezia spp*, na microbiota conjuntival, em 1,84% de cães. Divergindo do presente estudo, Diaz *et al.* (2023) concluíram que a *Malassezia spp* é predominante em amostras da prega interdigital de animais saudáveis e presente no pós-tratamento para pododermatite.

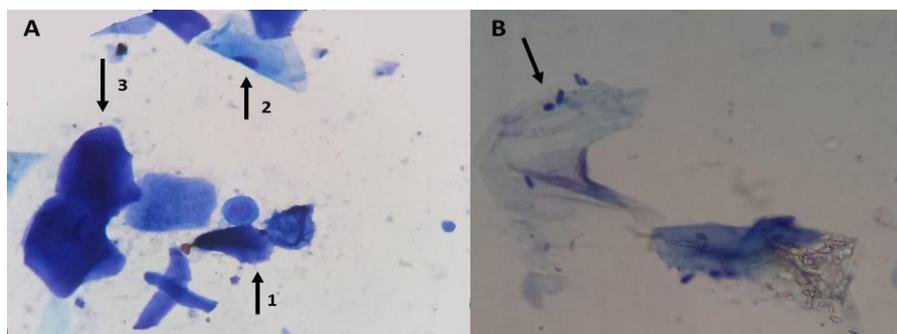
Figura 1. Micrografia citológica conjuntival de cães da raça Shih-Tzu saudáveis com coloração panótico na objetiva de 100x.



Observar em A células descamativas em setas 1 e leucócito polimorfonuclear em 2. Observar em B seta célula descamativas. Observar C setas 1 linfócitos e em 2 célula descamativa intermediária.

Fonte: acervo do autor.

Figura 2. Micrografia citológica dos coxins palmares (A) e prega nasal (B) de cães da raça Shih-Tzu saudáveis com coloração panótico na objetiva de 100x.



Observar em A seta 1 indicando célula descamativa intermediária, em 2 célula descamativa superficial, em 3 célula descamativa superficial anucleada. Observar em B seta *Malassezia spp.*

Fonte: acervo do autor.

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos inferir que a citologia se revelou um método eficaz na caracterização do perfil citológico da pele e da superfície ocular em cães da raça Shih-Tzu saudáveis. Ao analisar a citologia conjuntival em cães Shih-Tzu, observou-se uma significativa predominância estatística de linfócitos na contagem total de leucócitos, com variações notáveis entre diferentes faixas etárias. A presença proeminente de leucócitos polimorfonucleares foi destacada nas regiões dos coxins palmares e prega nasal. Na análise das células descamativas, evidenciou-se uma prevalência significativa de células descamativas superficiais em todas as áreas examinadas.

Adicionalmente, identificou-se a presença de *Malassezia spp* nas amostras analisadas. Esses achados contribuem para uma compreensão mais abrangente da citologia como ferramenta diagnóstica em cães Shih-Tzu, fornecendo insights valiosos sobre as características citológicas normais e potenciais marcadores de variação relacionados à idade.

9. REFERÊNCIAS

AFSHAR, M.; GALLO, R. L.; **Innate immune defense system of the skin**. Advances in Veterinary Dermatology – The Authors. Journal compilation, ESVD and ACVD, 2013.

AZEVEDO G. M., SOUZA, A. P. PORTELA R. A., DANTAS, E.S., SILVA R. M. N., NETO J. E. AVALIAÇÃO CITOLÓGICA DA CONJUNTIVA DE CÃES CLINICAMENTE SADIO PELO MÉTODO PANÓTICO. **MedVep**, Revista Científica de Medicina Veterinária Pequenos Animais e Animais de estimação 7(3); 473-477, 2009.

BOLZAN, A. A., BRUNELLI, A. T. J., CASTRO, M. B., SOUZA, M. A., SOUZA, J. L., LAUS, J. L. Conjunctival impression cytology in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 401-405, 2005.

BORGES, R.F.; CARDOSO, K.C.F.; BOLZAN, A.A.; MOMO, C.; HONSHO, C.S. **Estudo comparativo de métodos de coleta e coloração para citologia conjuntival em cães normais**. Vet e Zootec.19,(3):381-391, 2012.

BRON AJ, DE PAIVA CS, CHAUHAN SK, BONINI S, GABISON EE, JAIN S, KNOP E, MARKOULLIM, OGAWA Y, PEREZ V, UCHINO Y, YOKOIN, ZOUKHRI D, SULLIVAN DA. TFOS DEWS II pathophysiology report. **Ocul Surf**. 2017 Jul;15(3):438-510. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.011. Epub 2017 Jul 20. Erratum in: Ocul Surf. 2019 Oct;17(4):842. PMID: 28736340.

CHIURCO, E. C. **Isolamento e produção de enzimas por *Malassezia pachydermatis* provenientes de cães com otite ou dermatite e cães sadios**. Tese de Mestrado. - 2016. 54 f. : il. color.

COWELL, R. L. Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos. [tradução Adriana de Siqueira Rosinelli...; revisão científica Alexander Welker Biondo, Rafael Felipe da Costa Vieira]. **MedVet**, 3.ed. p36, 2009.

DIAZ, L., CASTELLA, G., BRAGULAT, M. R. GALLART, A. P., SANSEVERINO, W., CABANES, F.J., Estudo da variação da carga de *Malassezia* na prega interdigital de cães com pododermatite. **Comunicações de Pesquisa Veterinária** (2023) 47:385–396 <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09951-2>.

GASPARETTO, N. D.; TREVISAN, Y. P. A.; ALMEIDA, N. B.; NEVES, R. C. S. M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; DUTRA, V.; COLODEL, E. M. SOUSA, V. R. F., Prevalência das doenças de pele não neoplásicas em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso - **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, 2013 33(3)), p359–362.

HASHITOMO, D. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v.38,n4 p.792-804,2013.

HOBBI, S.; CAFARCHIA, C.; ROMANO, V.; BARRS, VR *Malassezia*: Zoonotic Implications, Parallels and Differences in Colonization and Disease in Humans and Animals. . **Fungi** 2022, 8(7), 708; <https://doi.org/10.3390/jof8070708>.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 14. ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2023. p. 99.

KOVALCUKA L, SARPIO L, NIKOLAJENKO M. Comparison of five conjunctival cytology sampling methods in normal cat eyes. **Vet World**. 2023 Apr;16(4):779-785. doi: 10.14202/vetworld.2023.779-785.

LIMA, F. B. ORIÁ A. P. MENEZES I. D. S. RAPOSO, A. C. S. JUNIOR, D. C. G. Citologia esfoliativa em cães com ceratoconjuntivite seca, **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; 2014.

MARTIN, C. L. **Anamnesis and the Ophthalmic Examination**. London: Manson Publishing Ltd, p. 15, 2010.

MCGAVIN, M.D; ZACHARY J.F **Bases da Patologia em Veterinária**, 6ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2018, p134.

MORAIS, T.L. **Avaliação oftalmológica de bovinos hípidos das raças Gir e Nelore**. Mestrado (Dissertação). Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária e Zootecnia. Programa de pós-graduação em ciência animal. 2016.

PERAZZI A, BONSEMBIANTE F, GELAIN ME, PATRUNO M, DI IORIO E, MIGLIORATI A, IACOPETTI I. Citologia da superfície ocular canina e felina saudáveis: comparação entre cytobrush e técnica de impressão. **Vet Clin Pathol** “no prelo” 2017.

PUTZ, Carla. **Oftalmologia - Ciências Básicas**. Grupo GEN, 2017. E-book. ISBN 9788595152199. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595152199/>. Acesso em: 12 fev. 2024.

RASKIN, R. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, p. 365-369, 2003.

ROSA, L. D.; GOMES, F. T.; BARROS, T. A.; CARVALHO, A. V.. Presença de *Malassezia* sp. em cães da Unidade de Controle de Zoonoses de Guaraí (TO) e sua relação com humanos. **Health of Humans**, v.1, n.1, p.1-8, 2019. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPCxxxx-xxxx.2019.001.00xx>

SANTOS, L. G. F., ALMEIDA, A. B. P. F., SILVA, M. C., OLIVEIRA, J. T., DUTRA, V., SOUSA, V.,R. F. Microbiota conjuntival de cães hípidos e com afecções oftálmicas. **Acta Scientiae Veterinariae**. 37(2): 165-169, 2009.

SANTOS, A. J., VIEIRA, M. C. G., LIMA P. P. A. OLIVEIRA L. R. C.; CARDINOT, C. B.; ROCHA, T. V. P.; LANNA, L. L. FRANCISCATO, C. Prevalência de microrganismos e ácaros encontrados em amostras dermatológicas e otológicas de cães e gatos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 14, n. 3, p. 1-11, jul./set. 2020.

VENÂNCIO, S. A. S. VIEIRA, A. B., ALENCAR, N. X., SOARES, A. M. B. Avaliação da técnica de esfoliação com escova citológica para coleta de células conjuntivais em gatos sadio: comparação entre a face palpebral da membrana nictitante e conjuntiva palpebral. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 11, p. 1199-1204, 2012.

CAPÍTULO 3- PERFIL MICROBIOLÓGICO DA PELE E SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU

PERFIL MICROBIOLÓGICO DA PELE E SUPERFÍCIE OCULAR DE CÃES DA RAÇA SHIH-TZU MICROBIOLOGICAL PROFILE OF THE SKIN AND EYE SURFACE OF SHIH-TZU DOGS

RESUMO

Na pele dos cães reside uma grande variedade de microrganismos entre bactérias e fungos, atuando na proteção da pele e do organismo como um todo. O conhecimento da microbiota comensal ajuda a entender o comportamento da microbiota da pele dos cães. As comunidades microbianas da conjuntiva e do nariz distal podem ser significativamente diferentes umas das outras. Sendo assim o objetivo do presente trabalho foi propor um perfil microbiológico da pele e superfície ocular de cães da raça Shih-Tzu saudáveis, e a existência ou não de alterações destes perfis com relação à idade. Para tal foi realizado teste de Schirmer, a coleta do material para análise microbiológica, foi coletado com auxílio de swab plástico estéril com meio Stuart e encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Uniube para cultura dos microrganismos presentes e identificação, depois realizado o teste de fluoresceína. Os resultados provenientes das 180 culturas realizadas revelaram a identificação de 10 tipos distintos de bactérias, sendo, no grupo Gram-positivo a *Staphylococcus spp.* predominantes em todas as regiões analisadas (OD 36,96%, OE 34,78%), Coxins palmares 28,26% e prega nasal 30,43%) seguido pelo gram-negativo *Enterobacter spp* também presente em todas as regiões (OD 10,87%, OE 34,78%, coxins palmares 17,39% e prega nasal 32,61%). Pode-se concluir que no perfil microbiológico houve predominância do microrganismo Gram-positivo *Staphylococcus spp* não apresentando diferença entre as regiões e o Gram-negativo *Enterobacter spp* presente em todas as regiões apresentando diferença entre as regiões e entre as faixas etárias para região dos coxins palmares.

Palavras-chave: Microbiota, Canídeos, Microbiota cutânea, Microbiota ocular canina.

ABSTRACT

Dogs' skin harbors a wide variety of microorganisms including bacteria and fungi, acting in the protection of the skin and the organism as a whole. Understanding the commensal microbiota helps in comprehending the behavior of dogs' skin microbiota. Microbial communities of the conjunctiva and distal nose may significantly differ from each other. Thus, the objective of this study was to propose a microbiological profile of the skin and ocular surface of healthy Shih-Tzu dogs, and to investigate the presence or absence of alterations in these profiles concerning age. For this purpose, a Schirmer test was performed, and the material for microbiological analysis was collected using a sterile plastic swab with Stuart medium, then forwarded to the Clinical Pathology Laboratory of the Uniube Veterinary Hospital for culture of the present microorganisms and identification, followed by a fluorescein test. The results from the 180 cultures performed revealed the identification of 10 distinct types of bacteria, with Gram-positive *Staphylococcus* spp. being predominant in all analyzed regions (OD 36.96%, OS 34.78%, palmar pads 28.26%, and nasal fold 30.43%), followed by the Gram-negative *Enterobacter* spp. also present in all regions (OD 10.87%, OS 34.78%, palmar pads 17.39%, and nasal fold 32.61%). It can be concluded that in the microbiological profile, there was predominance of the Gram-positive microorganism *Staphylococcus* spp., showing no difference between regions, and the Gram-negative *Enterobacter* spp., present in all regions, exhibiting differences between regions and age groups for the palmar pad region.

Keywords: Microbiota, Canids, Cutaneous microbiota, Canine ocular microbiota.

10. INTRODUÇÃO

Microbiota é um termo coletivo para comunidades poli microbianas, incluindo bactérias, vírus e fungos. Estes podem habitar um local específico, moldar o microambiente e desempenhar um papel no desenvolvimento de doenças (Sordi *et al.*, 2019).

O diagnóstico laboratorial de infecções oculares apresenta desafios adicionais quando comparado a infecções em outras regiões do corpo (Mitra, Chandran e Fernandes, 2023). A microbiota da superfície ocular está ganhando grande importância à medida que novas metodologias para sequenciamento de DNA de bactérias têm sido publicadas (Chiang e Chern, 2022).

A região da conjuntiva canina possui uma microbiota bacteriana e fúngica mais rica e diversificada do que se reconhecia anteriormente. Embora houvesse algum grau de continuidade local, as comunidades microbianas da conjuntiva, da pele periocular e do nariz distal em estudos passados, eram significativamente diferentes umas das outras quando comparado com estudos recentes (Bancos *et al.*, 2020).

Na pele dos cães reside uma grande variedade de microrganismos entre bactérias e fungos, que se auxiliam no meio em que vivem, atuando na saúde do animal, na proteção da pele e do organismo como um todo. Esses microrganismos residentes evitam o desenvolvimento de outros microrganismos oportunistas evitando problemas no local (Tang *et al.*, 2020).

Microrganismos isolados da pele de cães saudáveis seguem um padrão com uma variedade de bactérias e fungos, já cães que frequentemente desenvolvem dermatopatias apresentam uma redução desses microrganismos comensais estando mais susceptíveis a desenvolver alguma doença de pele (Zamarian *et al.*, 2020).

A partir do desenvolvimento de dermatopatias nos cães e com a análise delas, identificando os microrganismos presentes, pode-se chegar a informações mais concretas sobre a doença e o conhecimento da microbiota comensal ajuda a entender o comportamento da microbiota da pele dos cães (Gasparetto *et al.*, 2013).

As espécies de *Malassezia spp* estão entre os fungos mais difundidos no nosso planeta e espera-se que novas espécies e hospedeiros sejam descobertos. Embora algumas espécies de *Malassezia spp* sejam adaptadas ao hospedeiro, muitas são compartilhadas entre animais e humanos. Existem evidências de transmissão zoonótica, especialmente para *M. pachydermatis*, mas são necessários mais dados longitudinais para maior elucidação (Hobi *et al.*, 2022).

Sendo assim o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o perfil microbiológico da pele e superfície ocular de cães da raça Shih-Tzu saudáveis, assim como a existência de alterações destes perfis com relação à idade.

11. MATERIAL E MÉTODOS

Aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) com protocolo nº01/2023.

Os critérios de inclusão dos animais no experimento foram baseados na ausência de lesões oculares e dermatológicas, determinadas por avaliações clínicas da pele e da superfície ocular. Adicionalmente, foram considerados resultados normais no teste de Schirmer, com valores dentro do intervalo estabelecido por Martin (2010) entre 15 e 25mm/min, e a ausência de úlcera de córnea, determinada pela utilização de fluoresceína.

As amostras para cultura e identificação microbiológica foram coletadas de 45 cães da raça Shih-Tzu saudáveis, incluindo ambos os sexos, castrados e não castrados, com idades entre 1 a 12 anos. Os animais foram divididos em três grupos (G1, G2 e G3), cada um composto por 15 animais, distribuídos por faixas etárias: G1 (1 a 4 anos), G2 (5 a 8 anos) e G3 (9 a 12 anos).

Para o teste de Schirmer, foi efetuada a dobra na extremidade da fita dosadora, especificamente desenvolvida para o teste, e inserida no saco conjuntival inferior, em canto medial, de cada olho (uma fita por olho). Após um minuto, a fita foi retirada, e a leitura da porção umedecida foi realizada em mm/min.

O teste de fluoresceína consistiu na aplicação de uma gota do corante em colírio em cada olho, seguido pela lavagem do excesso de corante com solução fisiológica 0,9% estéril e algodão. Posteriormente, a presença ou ausência de úlcera de córnea foi observada, sendo que animais com lesões oculares foram excluídos.

A coleta de material para cultura bacteriana e identificação microbiológica foi realizada em três regiões (conjuntiva, prega nasal e coxins palmares), utilizando *Swab* Plástico Estéril com meio Stuart. Foram realizados 10 movimentos circulares padronizados em cada região, utilizando um *swab* por região. Os materiais foram armazenados em meio Stuart e encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Uniube para cultura, em meio Ágar Sangue e *MacConkey* e identificação dos microrganismos presentes.

A avaliação da correlação estatística entre os grupos foi conduzida utilizando a mediana, dada a não normalidade dos dados, e o Teste de Mann-Whitney U ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) por meio do programa estatístico R (R Core Team, 2022).

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados provenientes das culturas bacterianas de 180 amostras revelaram a identificação de 10 gêneros bacterianos, sendo *Staphylococcus spp.* predominante em todas as regiões analisadas.

Notavelmente, os microrganismos preponderantes se distribuem em dois grupos distintos. O primeiro grupo, predominantemente Gram-positivo, é liderado pelo *Staphylococcus spp.*, destacando-se como o mais representativo. Enquanto isso, o segundo grupo, de natureza Gram-negativa, é liderado pelo *Enterobacter spp.*

O gênero *Staphylococcus spp.* foi identificado em 35,55% das culturas da conjuntiva direita e 33,33% da esquerda. Nas culturas cutâneas das regiões de coxins palmares e prega nasal ele cresceu em 26,26% e 31,11% respectivamente. O *Enterobacter spp.* foi isolado em 11,11% das culturas conjuntivais direita e esquerda, já nas cutâneas dos coxins palmares e prega nasal esteve presente em 17,77% e 33,33% (tabela 1).

Entre as faixas etárias o *Staphylococcus spp.* teve uma predominância no G1 na região de coxins palmares e região conjuntival direita, já no grupo G2 houve predominância do *Enterobacter spp.* na região de coxins palmares, prega nasal e na região conjuntival do olho esquerdo. No grupo G3 houve uma predominância do não crescimento em todas as regiões.

As amostras em que não houve crescimento bacteriano foi de 35,55% da região conjuntival do olho direito, 40% da região do olho esquerdo, 42,22% dos coxins palmares e 24,44% da região de prega nasal (tabela 1).

A *Malassezia spp.* foi identificada em uma amostra na cultura da região dos coxins palmares e ausente nas outras regiões. Vale ressaltar que na presente pesquisa não foram utilizados meios de culturas recomendados para o crescimento de fungos.

Rogers *et al.* (2020) isolaram 10 gêneros bacterianos na superfície ocular bilateral de 13 cães saudáveis sem distinção de raça, sexo e idade, sendo que 4 gêneros estavam presentes em todas as 26 amostras. Eles tiveram uma representatividade maior de microrganismos Gram-negativos onde a mais comum foi a *Pseudomonadaceae*. Entre os gram-positivos estavam presentes *Micrococcaceae* (12,0%), *Corynebacteriaceae* (3,3%), *Staphylococcaceae* (2,3%), *Bacillaceae* (1,5%) e *Streptococcaceae* (1,2%).

Tabela 1. Comparação dos microrganismos isolados em culturas conjuntivais, coxins palmares e prega nasal em cães da raça Shih-Tzu saudáveis de diferentes faixas etárias.

Bactérias	OD	OE	Coxins palmares	Prega nasal
<i>Staphylococcus spp</i>	35,55 ^A	33,33 ^A	26,26 ^A	31,11 ^A
<i>Enterobacter spp</i>	11,11 ^B	11,11 ^B	17,77 ^{AB}	33,33 ^A
<i>Enterococcus spp</i>	2,22 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Escherichia coli</i>	2,22 ^A	2,22 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Klebsiella spp</i>	2,22 ^A	4,44 ^A	2,22 ^A	0,00 ^A
<i>Proteus spp</i>	2,22 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	2,22 ^A
<i>Pseudomonas spp</i>	4,44 ^{AB}	6,66 ^{AB}	0,00 ^B	8,88 ^A
<i>Serratia spp</i>	4,44 ^A	2,22 ^A	4,44 ^A	0,00 ^A
<i>Hafnia spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	2,22 ^A	0,00 ^A
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	4,44 ^A	2,22 ^A
<i>Malassezia spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	2,22 ^A	0,00 ^A
Não houve crescimento	35,55 ^A	40,00 ^A	42,22 ^A	24,44 ^A

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística entre grupos para o teste Qui-quadrado.

Oriá *et al.* (2013) constataram que o crescimento bacteriano proveniente da conjuntiva de cães saudáveis, sem predileção por raça ou idade, foi evidente, sendo que as bactérias Gram-positivas apresentaram maior ocorrência dentre os microrganismos isolados. Com relação à microbiota conjuntival comensal dos cães, temos *Staphylococcus sp.*, *Enterobacter sp* e *Pseudomonas sp.* como os de maior ocorrência, assim a pesquisa mostra que esses gêneros tiveram um aparecimento significativo quando isolados de cães sem doença ocular e cutânea (Rogers *et al.*, 2020; Nadás *et al.*, 2021; Marcon e Sapin 2021).

Rogers *et al.* (2020) relataram que a composição da microbiota residente da superfície ocular canina, não é significativamente alterada ao longo do tempo. E qualquer alteração deve ser atribuída a fatores ambientais e à genética do hospedeiro, ou seja, microrganismos que foram isolados da microbiota ocular dos cães, são pertencentes da gama ocular, sendo alterada devido à comunicação com outras microbiotas através de contato físico do animal, traumas ou pelo ambiente onde vive.

Nadás *et al.* (2021) afirmaram que o gênero *Staphylococcus spp.* participa normalmente da microbiota bacteriana da conjuntiva, porém juntamente com o *Pseudomonas sp.*, em uma situação propícia como lesão local, provoca uma alteração na microbiota local favorecendo ao aparecimento de doenças.

Pereira *et al.* (2021) identificaram como microrganismo mais comum isolado na conjuntiva de cães saudáveis, sem predileção por sexo ou raça, o gênero *Staphylococcus spp.* e afirmaram que ele é considerado um agente comensal da conjuntiva e realiza uma função de

proteção. Além de residentes, esses microrganismos são oportunistas pois podem atuar em doenças devido sua multiplicação em infecções oriundas de traumas, condições alérgicas e metabólicas.

Marcon e Sapin (2021) afirmaram que o olho canino hígido resiste a infecções bacterianas devido à presença dos microrganismos residentes da conjuntiva e à barreira do epitélio principalmente, mas uma interação de bactérias provenientes de outra microbiota concomitante a uma lesão facilita o surgimento ou agravamento de doenças. Em casos de úlceras de córneas, em que o olho contém uma área lesada, a entrada dos microrganismos de maior prevalência que são o *Staphylococcus spp.* e *Pseudomonas sp.* acontece, por serem as principais responsáveis a desenvolver afecções oculares, com essa disseminação, irão se instalar no estroma da córnea e se desenvolver melhor.

Wang *et al.* (2022) em pesquisa com 35 cães saudáveis concluíram que a bactéria *Staphylococcus pseudintermedius* foi uma bactéria comum no saco conjuntival de cães saudáveis, no presente estudo não foi verificado a espécie, porém o gênero *Staphylococcus spp.* foi o predominante na região.

O grupo das *Pseudomonas spp.* tiveram uma representatividade menor na região da conjuntiva, ficando presente em 4,44% das amostras da direita e 6,66% das amostras da esquerda (tabela 1), não apresentando diferença significativa ($p>0,05$).

Nielsen *et al.* (2022) defendem que a *Pseudomonas spp.* não é um microrganismo de caráter evidente da microbiota conjuntival ocular normal dos cães. Essa bactéria se apresenta comumente em isolados, seja ocular ou de pele em cães saudáveis, deixando de ser considerada comensal da microbiota. Isso se deve por sua compatibilidade e variedade de diferentes combinações com patógenos já presentes em outras microbiotas, pois o autor a relata em cães com dermatopatias como otite e dermatites.

Nadās *et al.* (2021) observaram uma grande frequência de microbiota mista, entre microrganismos gram-negativas e gram-positivos, em cães com histórico de doença ocular como olho seco, porém os autores afirmaram não estar claro se as bactérias Gram-negativas agem mais frequentemente como oportunistas ou se a terapia local desequilibrou a microbiota.

Conforme observou-se (tabela 1) as bactérias *Staphylococcus spp.* e *Enterobacter spp.* estão presentes em amostras de todas as regiões analisadas, já os microrganismos *Proteus spp.* e *Pseudomonas spp.* foram isolados somente na região conjuntival e prega nasal. Bancos *et al.* (2020) afirmaram que maiores semelhanças são evidentes entre as microbiotas conjuntivais e nasais, o que pode sugerir que a imunidade da mucosa ou a conexão anatômica do sistema nasolacrimal impacte nas populações da microbiota conjuntival e nasal canina.

Varges *et al.* (2009) observaram que uma microbiota Gram-positiva, incluindo os gêneros *Staphylococcus spp.*, *Trueperella spp.* e *Micrococcus spp.* predominaram na microbiota conjuntival em cães saudáveis e no presente estudo houve uma predominância do *Staphylococcus spp.*

Nas amostras da conjuntiva, do olho direito e esquerdo, não houve crescimento bacteriano em 35,55% e 40%, percentual um pouco menor do encontrado por Oriá *et al.* (2013) onde foi constatado o não crescimento em 60% (36/60) das suas amostras oculares em cães sem relatar a idade.

Para o crescimento bacteriano Oriá *et al.* (2013) constataram um crescimento de espécies Gram-positivas em 85,37% das amostras oculares, e no presente estudo as Gram-positivas prevaleceram e tiveram um crescimento em 66% (39/60) das amostras.

Para as amostras dos coxins palmares e prega nasal, obtivemos também uma prevalência maior do microrganismo *Staphylococcus spp.* (tabela 1), assim como as das conjuntivas sendo definida como uma normalidade, pois faz parte da gama de microrganismo normais da microbiota da pele dos cães. Botoni *et al.* (2014) afirmaram que o *Staphylococcus spp.* é considerada uma bactéria de caráter residente, ou seja, essa bactéria é contribuinte da microbiota cutânea onde se torna eficaz na proteção.

González (2015) citou que dos grupos bacterianos isolados na pele de cães a maioria dos gêneros caracterizados foram pertencentes ao grupo dos bacilos Gram-negativos, porém ela cita que devido a fatores extrínsecos aos ambientes ou devido a fatores intrínsecos os indivíduos são propensos à expressão de diferentes microrganismos sendo necessário mais estudos para determinar essa diferenciação.

O patógeno *Pseudomonas spp.*, teve uma representatividade de 8,88% nas amostras da prega nasal e não foi identificada em amostras dos coxins palmares, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre as regiões (tabela 1). Porém este patógeno foi relatado por Possebon *et al.* (2015) em amostras isoladas da pele e apresenta um aspecto de normalidade, porém pode estar presente, juntamente com os microrganismos comensais, atuando em doenças de pele.

Os microrganismos *Serratia sp.* e *Proteus sp.* apresentaram uma baixa porcentagem em relação a outros microrganismos de todas as regiões analisadas. Nocera *et al.* (2021) isolaram as enterobactérias *Serratia sp.* e *Proteus sp.* em 27% de suas amostras da pele de cães (22/81) associadas a infecções de pele.

Segundo Zamarian *et al.* (2020) os isolados de pele de cães saudáveis seguem um padrão que apresentam diversos microrganismos comensais em relação a superfície acometida, ou seja, cães com dermatopatias irão apresentar uma variedade de bactérias comensais reduzidas no

local acometido quando comparado a pele sadia, e podem estar propícios a desenvolver uma dermatopatia.

Os microrganismos *Leclercia adecarboxylata* foram isolados em um percentual de 4,44% das amostras de coxins palmares e 2,22% em amostras de prega nasal (tabela 1). Adapa *et al.* (2019) citaram que a *Leclercia adecarboxylata* é um organismo raro, porém capaz de causar infecções graves e potencialmente fatais. Técnicas microbiológicas atuais têm conseguido identificar com maior frequência esse organismo em humanos.

O gênero *Hafnia* teve uma representatividade de 2,22% em amostras dos coxins palmares (tabela 1). Delbès *et al.* (2013) afirmaram que a *Hafnia* pode ser encontrada em mamíferos, aves, répteis, peixes, no solo, esgoto e em fontes alimentares. O trato intestinal dos animais, particularmente dos mamíferos, é um dos habitats mais comum para *Hafnia*, portanto a mesma não pode ser considerada um microrganismo residente da pele dos cães.

O fungo *Malassezia spp* teve um percentual de 2,22% das amostras em coxins palmares e ausente nas outras amostras. Hobi *et al.* (2022) relataram que as espécies de *Malassezia spp* necessitam de meios de cultura especiais para crescerem e um problema no diagnóstico de malasseziose está na quantificação, como ela é um microrganismo comensal, para chegar ao diagnóstico é necessário comprovar a presença de população elevada.

Tabela 2. Comparação dos microrganismos isolados nas culturas conjuntivais entre as faixas etárias em cães da raça Shih-Tzu saudáveis.

Bactérias	OD%			OE%		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
<i>Staphylococcus spp</i>	40,00 ^A	33,33 ^A	33,33 ^A	33,33 ^A	40,00 ^A	26,66 ^A
<i>Enterobacter spp</i>	13,33 ^A	13,33 ^A	0,00 ^A	20 ^A	6,66 ^A	6,66 ^A
<i>Enterococcus spp</i>	6,66 ^A	0,00 ^A				
<i>Escherichia coli</i>	0,00 ^A	6,66 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	6,66 ^A	0,00 ^A
<i>Klebsiella spp</i>	0,00 ^A	6,66 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	6,66 ^A	6,66 ^A
<i>Proteus spp</i>	6,66 ^A	0,00 ^A				
<i>Pseudomonas spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	13,33 ^A	6,66 ^A	6,66 ^A	6,66 ^A
<i>Serratia spp</i>	0,00 ^A	6,66 ^A	6,66 ^A	0,00 ^A	6,66 ^A	0,00 ^A
<i>Hafnia spp</i>	0,00 ^A					
<i>Leclercia</i>	0,00 ^A					
<i>Malassezia spp</i>	0,00 ^A					
Não houve crescimento	33,36 ^A	26,66 ^A	46,66 ^A	40,00 ^B	26,66 ^B	53,33 ^A

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística entre grupos para o teste Qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade.

Quando comparada a frequência dos microrganismos entre as faixas etárias não houve diferença para os resultados encontrados na conjuntiva (tabela 2). De acordo com Monteiro *et*

al. (2018), esses gêneros encontrados na pesquisa, constituem parte da microbiota comensal dos cães, porém em caso de lesão ou comprometimento dos mecanismos de defesa, esses mesmos microrganismos podem atuar no desenvolvimento de doenças oculares ou cutâneas.

Para as amostras dos coxins palmares houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando realizada a comparação entre os grupos, para o microrganismo *Enterobacter spp.*, onde ele teve uma representatividade maior no grupo G2 (tabela 3). González (2015) cita que devido a fatores extrínsecos aos ambientes os cães são propensos à expressão de diferentes bactérias sendo necessário mais estudos para determinar a influência do ambiente e idade.

Tabela 3. Comparação dos microrganismos isolados nas culturas de coxins palmares entre as faixas etárias em cães da raça Shih-Tzu saudáveis.

Bactérias	Coxins palmares		
	G1%	G2%	G3%
<i>Staphylococcus spp</i>	33,33 ^A	26,66 ^A	20,00 ^A
<i>Enterobacter spp</i>	13,33 ^B	33,33 ^A	6,66 ^B
<i>Enterococcus spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Escherichia coli</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Klebsiella spp</i>	0,00 ^A	16,66 ^A	0,00 ^A
<i>Proteus spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Pseudomonas spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Serratia spp</i>	6,66 ^A	6,66 ^A	0,00 ^A
<i>Hafnia spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	16,66 ^A
<i>Leclercia</i>	13,33 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Malassezia spp</i>	6,66 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
Não houve crescimento	33,33 ^B	26,66 ^B	66,66 ^A

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística entre grupos para o teste Qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade.

Os microrganismos isolados na região da prega nasal não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos, a comparação entre o não crescimento apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) sendo maior no grupo G3 que representa o grupo de maior idade (tabela 4). Na literatura atual faltam estudos abordando esses microrganismos correlacionando com a idade e região.

Tabela 4. Comparação dos microrganismos isolados nas culturas da prega nasal entre as faixas etárias em cães da raça Shih-Tzu saudáveis.

Bactérias	Prega nasal		
	G1%	G2%	G3%
<i>Staphylococcus spp</i>	33,33 ^A	40,00 ^A	20,00 ^A
<i>Enterobacter spp</i>	33,33 ^A	40,00 ^A	26,26 ^A
<i>Enterococcus spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Escherichia coli</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Klebsiella spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Proteus spp</i>	0,00 ^A	6,66 ^A	0,00 ^A
<i>Pseudomonas spp</i>	13,33 ^A	0,00 ^A	13,33 ^A
<i>Serratia spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Hafnia spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	6,66 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
<i>Malassezia spp</i>	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A
Não houve crescimento	13,33 ^B	20,00 ^B	40,00 ^A

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística entre grupos para o teste Qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade.

13. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar que o perfil microbiológico da pele e superfície ocular em cães da raça Shih-Tzu se revelou com uma predominância do microrganismo Gram-positivo *Staphylococcus spp*. Essa predominância não apresentou diferença estatística significativa entre as distintas regiões analisadas. Por outro lado, o Gram negativo *Enterobacter spp*. esteve presente em todas as regiões, revelando diferenças estatísticas marcantes entre as áreas estudadas e, também, entre as faixas etárias, notadamente para a região dos coxins palmares.

14. REFERÊNCIAS

ADAPA S, KONALA VM, NAWAZ F. **Peritonitis from Leclercia adecarboxylata: Anemerging pathogen.** Clin Case Rep.;7:829–831,2019 .

BANCOS KC, GIULIANO EA, BUSI SB, REINERO CR E ERICSSON AC. **Avaliação de Caninos Saudáveis Pele conjuntival, com pêlos perioculares e microbiota nasal em comparação com Cultura Conjuntival. Frente. Veterinário. Ciência.** 7:558. doi: 10.3389/fvets.2020.00558, 2020.

BOTONI, L.S.; FILHO, N.P.R. SCHERER, C.B.; BRAGA, L.; LEME, F.O.P. BICALHO, A.P.C.V. **Piodermite superficial canina por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à**

metecilina (MRSP). **Medvep Dermato** - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária; 2014; 3(10); 270-277.

CHIANG M. C., CHERN E. Ocular surface microbiota: Ophthalmic infectious disease and probiotics. **Front. Microbiol.** 13:952473. 2022 doi: 10.3389/fmicb.2022.952473.

DELBÈS C, MISZCZYCHA S, GANET S, HELINCK S, VEISSEIRE P, POCHET S, THÉVENOT D, MONTEL MC. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. **Int J Food Microbiol.** 2013 Jan 1;160(3):212-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.10.019. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23290227.

DE SORDI, L., LOURENÇO, M., DEBARBIEUX, L. **The battle within: interactions of bacteriophages and bacteria in the gastrointestinal tract.** *Cell Host Microbe.* 25, 210–218. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.018.

GASPARETTO, N. D.; TREVISAN, Y. P. A.; ALMEIDA, N. B.; NEVES, R. C. S. M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; DUTRA, V.; COLODEL, E. M. SOUSA, V. R. F., Prevalência das doenças de pele não neoplásicas em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(3), 2013, 359–362.

GONZÁLEZ, L., J. **Bacteriological characterization of pets in households in the city of Kennedy.** Universidade De La Salle, 2015.

HOBİ, S.; CAFARCHIA, C.; ROMANO, V.; BARRS, VR Malassezia: Zoonotic Implications, Parallels and Differences in Colonization and Disease in Humans and Animals.. **Fungi** 2022, 8(7), 708; <https://doi.org/10.3390/jof8070708>

MARCONI. I. L.; SAPIN, C. F. Causas e correções da úlcera de córnea em animais de companhia – Revisão de Literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, e57410716911, 2021.

MONTEIRO, G. B.; RUIZ, T.; SCHRODER, D. C.; SILVEIRA, M. M.; DOWER, N. M. B.; KAGUEYAMA, F.; DUTRA, V.; RIBEIRO, A. P.; Susceptibilidade antibiótica de isolados bacterianos em diferentes tipos de ceratites ulcerativas de cães na cidade de Cuiabá. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 726-733, 2018.

MITRA S, CHANDRAN K, FERNANDES M. Practical tips and common mistakes in ocular microbiology sampling and processing. **Indian J Ophthal mol**; 71:1698-1705, 2023.

NADÁS, G.C.; NOVAC, C.S. ; MATEI, I.A.; BOUARI, C.M.; GAL, Z.M.; TAMASKRUMPE, O.M.; MACRI, A.M. FIT, , N.I. Prevalence of Antimicrobial Resistant Bacteria from Conjunctival Flora in an Eye Infection Prone Breed (Saint Bernard). **Molecules**, 26, 2219, 2021.

NIELSEN, S. S.BICOUT, D. J. CALISTRI, P.; CANALI, E.; DREWE, J. A.; GARIN-BASTUJI, B.; ROJAS, J.; ROJAS, L. G.; GORT_AZAR, C.; HERSKIN, M.; MICHEL, V.CHUECA, M. A. M.; PADALINO, B.; PASQUALI, P.; ROBERTS, H. C.; SPOOLDER, H.; ST_AHL, K.VELARDE, A.; VILTROP, A.; WINCKLER, C.; BALDINELLI, F.; BROGLIA, A.; KOHNLE, L.; ALVAREZ, J.; Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429):

antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in dogs and cats. **SCIENTIFIC OPINION – EFSA Journal** 2022.

NOCERA F. P.; AMBROSIO M; FIORITO F; CORTESE L; DE MARTINO L; On Gram-Positive- and Gram-Negative-Bacteria-Associated Canine and Feline Skin Infections: A 4-Year Retrospective Study of the University Veterinary Microbiology Diagnostic Laboratory of Naples, Italy. **Animals (Basel)**. 2021 May 29;11(6):1603. doi: 10.3390/ani11061603.

ORIA, A. PPINNA, M. H. FURTADO, M. A, PINHEIRO, A. C. O. JUNIOR, D. C. G., NETO, J. M. C. Microbiota conjuntival em cães clinicamente sadios e cães com ceratoconjuntivite seca. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.14, n.4, p. 495-500, out./dez. 2013.

PEREIRA, E. R. O.; ALMEIDA, L. A.; FRIOLANI, M. Avaliação da microbiota bacteriana conjuntival de cães hígidos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Marília. **Revista MV&Z**, São Paulo, v. 19, n. 1, 2021.

POSSEBON, K. F.; KAISER, T. S.; MARTINS, L. R. V. Agentes **microbianos isolados de otite externa em cães**. Salão do Conhecimento, XXIII Seminário de iniciação científica - UNIJUI, 2015.

ROGERS, C. M.; SCOTT, E.M.; SARAWICHITR, B.; ARNOLD, C.; SUCHODOLSKI, J.S.; Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in ophthalmologically normal dogs prior to and following treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. **PLoS One** – 2020.

TANG, S.; PREM, A.; TJOKROSURJO, J.; SARY, M.; VAN BEL, M.A.; RODRIGUES-HOFFMANN, A.; KAVANAGH, M.; WU, G.; VAN EDEN, M.E.; KRUMBECK, J.A.; The canine skin and ear microbiome: A comprehensive survey of pathogens implicated in canine skin and ear infections using a novel next-generation-sequencing-based assay. **Vet Microbiol**. 2020, Aug;247:108764. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108764. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32768216.

VARGES, R.; PENNA, B.; MARTINS, G.; MARTINS, R.; LILENBAUM, W. Antimicrobial susceptibility of Staphylococci isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. **Vet. Ophthalmol.**, 12, 216–220 2009.

WANG Z, GUO L, LI J, LI J, CUI L, DONG J, MENG X, QIAN C, WANG H. Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence factors of isolates of *staphylococcus pseudintermedius* from healthy dogs and dogs with keratitis. **Front Vet Sci**. 2022 Aug. doi: 10.3389/fvets.2022.903633.

ZAMARIAN, V.; CATOZZI, C. CUSCÓ, A.; STEFANELLO, D.; FERRARI, R.; CECILIANI, F. FRANCINO, O.; SÁNCHEZ, A.; GRIECO, V.; ZANI, D.; TALENTI, A. CREPALDI, P.; ILECCHI, C. Characterization of skin surface and dermal microbiota in dogs with mast cell tumor. **Scientific Reports** – 2020.

15. ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu

_____RG_____
 _____, responsável pelo animal _____,
 espécie _____, raça _____, autorizo a participação do mesmo no experimento de mestrado, intitulado **“INFLUÊNCIA DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DA PELE SOBRE ALTERAÇÕES DA SUPERFÍCIE OCULAR EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU”**, sob coordenação do professor **Dr. Rodrigo Supranzetti de Rezende** do programa de mestrado em sanidade e produção animal nos trópicos da Universidade de Uberaba (que assina abaixo). Fui esclarecido sobre a necessidade de: avaliação semiológica e coleta de material biológico para exames laboratoriais (raspado cutâneo, cultura de bactéria, cultura fúngica e citologia ocular). Também fui esclarecido que estes procedimentos são necessários para a elaboração da pesquisa e que tais procedimentos a serem empregados podem gerar possíveis consequências sobre o animal, os quais serão: contenção física e escarificação na pele após realização do raspado. Após término da pesquisa os resultados dos exames clínicos e laboratoriais bem como as devidas orientações serão disponibilizadas ao tutor do animal.

Tenho conhecimento de que os resultados obtidos serão divulgados exclusiva e anonimamente em publicações científicas; e de que tenho o direito e a liberdade de suspender essa autorização a qualquer momento que julgue necessário.

Uberaba, _____ de _____ de _____.

 Assinatura do tutor do animal

Rodrigo Supranzetti de Rezende

 Prof. Dr. Rodrigo Supranzetti de Rezende
 Docente do curso de pós-graduação (mestrado) em sanidade e produção animal
 nos trópicos

16. ANEXO 2



Ofício CEEA-003/2023

Uberaba, 09 de maio de 2023.

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 001/2023 relativos ao projeto intitulado **“Influência das Doenças Inflamatórias da Pele sobre Alterações da Superfície Ocular em Cães Da Raça Shih-Tzu”** que tem como responsável o **Prof. Rodrigo Supranzetti de Rezende**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 001/2023 related to the project entitled **“Influence of Inflammatory Skin Diseases on Ocular Surface Changes in Shih-Tzu Breed Dogs”** under the supervision of **Prof. Rodrigo Supranzetti de Rezende**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,



Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Coordenadora do CEEA-UNIUBE