

ESTUDO DA MICROBIOTA OCULAR COMO MONITOR DA CICLOSPORINA "A" (2%) EM CÃES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÓRNEA DE SUÍNOS

The ocular microbial population as a monitor of 2% cyclosporin used in the treatment of swine cornea transplanted dogs

Nilo Sérgio Troncoso Chaves¹, Paulo Sérgio de Moraes Barros², Apóstolo Ferreira Martins³, Eugênio Gonçalves de Araújo⁴, Duvaldo Eurides⁵, Larissa Franco de Araújo⁶, Maria Auxiliadora Andrade⁷, Clausmir Zanetti Jacomin⁸

RESUMO

Dez cães, sem raça definida, com peso médio de 10kg, foram submetidos ao implante de córnea de suínos. Durante o pós-operatório, cada cão recebeu instilação de uma gota de colírio de sulfato de gentamicina e de ciclosporina A (2%), até o 28º dia. Foi coletado no dia anterior a cirurgia, denominado de "0", amostra no fórnice superior, com zaragatoa estéril e imediatamente embebida em água peptonada 0,1%, para os testes de bactérias aeróbicas e fungos. O teste foi repetido nas amostras colhidas no 7º; 14º; 21º e 28º dia, após o enxerto e comparados com o do dia 0. Das 50 amostras obtidas, foi encontrado *Bastonetes gram+* (16%), distribuídos em sete amostras no dia 0, uma no 7º dia e no 14º dia; *Stafhylococcus epidermidis* 16%, distribuídos em cinco amostras no dia 0, uma no 7º dia e duas no 14º dia; *Enterobacter ssp.* (18%), distribuídos em quatro amostras do 14º dia, duas no 21º dia e três no 28º dia. *Pseudomonas ssp.* (2%), limitada a uma amostra no 7º dia. Em 52% das amostras não ocorreu crescimento bacteriano. A prevalência da bactéria *Enterobacter ssp.* 18%, no 28º dia, sugere queda de resistência local e ineficiência do antibiótico. Já a prevalência dos *bastonetes gram+* nas amostras iniciais, não constituíram problema, porque não prevaleceram naquelas do 28º dia.

Palavras-chave: canino, suíno, microbiota, ciclosporin A, xenotransplante, córnea.

SUMMARY

Ten mixed breed dogs, with a 10 kg average weight, had swine corneas implanted in the left eye. During the post-operative period each animal was treated with one drop of gentamycin sulphate and one drop of 2% cyclosporin per day until day 28, when they were sacrificed. Each dog had a superior fornix sample collected from the left eye on day 0, before surgery, using sterile material. Immediately after collection, the sample was immersed in .1% peptonized water, so that tests for aerobic bacteria and fungus could be conducted. Each test was repeated with samples collected on days 7, 14, 21 and 28, after graft, and compared with those from day 0. From 50 samples obtained, the following results were found: 16% Gram-positive rods, were found among seven samples from day 0, one sample from day 7 and another from day 14; 16% *Staphylococcus epidermidis* was encountered in five samples from day 0, one from day 7 and two from day 14; 18% *Enterobacter ssp.*, was found distributed among four samples from day 14, two from day 21 and

¹ Médico Veterinário. Professor Adjunto. Doutor. Departamento de Clínica. Escola de Veterinária/EV. Universidade Federal de Goiás/UFG. Campus Samambaia, CP 131. 74001-970. Goiânia, GO

² Médico Veterinário. Professor Associado. Doutor. Departamento de Cirurgia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo

³ Médico Veterinário. Hospital Veterinário/EV/UFG.

⁴ Médico Veterinário. Professor Adjunto. Mestre/EV/UFG.

⁵ Médico Veterinário. Professor Titular. Doutor. Departamento de Medicina Animal. Universidade Federal de Uberlândia.

⁶ Acadêmica Bolsista de trabalho/EV/UFG.

⁷ Médica Veterinária. Professora Adjunto. Mestre/EV/UFG.

⁸ Médico. Professor Adjunto. Doutor. Departamento de Histologia. Instituto de Ciências Biológicas/UFG.

three from day 28; 2% *Pseudomonas* spp. was limited to one sample from day 7. There was no bacterial growth in 52% of the samples. The 18% *Enterobacter* spp. identified on day 28 suggests a drop in local resistance and inefficiency of the antibiotic. The presence of gram + rods in the initial samples did not constitute a problem, because it did not prevail on those from day 28.

Key words: canine, swine, microbial population, cyclosporin A, xenotransplant, cornea.

INTRODUÇÃO

O globo ocular dos animais domésticos está naturalmente protegido contra patógenos, devido a ação mecânica das pálpebras, do efeito da lavagem das secreções que contém a enzima bacteriostática lizosima e pela produção de inibidores da flora. Quando, o ecossistema do globo ocular é alterado devido a interveções cirúrgicas, uso de medicamentos e acidentes, pode ocorrer alteração da microbiota natural prevalecendo os processos infecciosos (BISTNER et al., 1969; GERDING et al., 1988).

BISTNER et al. (1969) estudaram 140 olhos de cães, cujas amostras foram colhidas das pálpebras e fórnix conjuntival, sem doença ocular e encontraram a seguinte prevalência: de 280 amostras, 76% desenvolveram bactérias, sendo *S. albus* (46%), *S. aureus* (24%), *Streptococcus alfa-hemolítico* (4%), *Streptococcus beta-hemolítico* (2%), *Bacillus* sp foram identificados em 12% das amostras. Organismos gram-negativos, incluindo *Neisseria*, *Mimae*, *Plymorphia*, *Moraxela noliuefacicus* e *Pseudomonas*, foram identificados em 7%. Normalmente o globo ocular conta com quatro mecanismos de proteção contra infecções: fluxo mecânico da lágrima, ação fagocitária, barreiras mecânicas e ação bacteriostáticas da lizosima. Qualquer desequilíbrio de um destes fatores é suficiente para predispor o mesmo à infecções com agentes patógenos exógenos e endógenos.

LOPES et al. (1973), isolaram *S. aureus*, como a bactéria mais comum na conjuntiva de 100 cães, seguida da *E. coli* e *Streptococcus beta-hemolítico*, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* muito rara. MURPHY et al. (1978), no entanto, isolaram bactérias em 68% de amostras de sacos conjuntivais de 120 cães com doença ocular, com prevalência de *S. aureus* (68%), *S. epidermidis* (27%), *S. Beta-hemolítico* (19%), *E. alfa-hemolítico* (17%), *E. coli* (10%), *Bacillus* spp. (11%) e *Proteus* spp. (7%).

Cães tratados com ciclosporina A sistemicamente podem desenvolver irritação gastrointestinal, hisurtismo, hiperplasia gengival, papilomatose e nefrotoxicidade (MILLER et al., 1982). Foi coletado por GERDING et al. (1988), material de 131 cães com doença ocular e encontraram bactérias em 66%, às quais, foram consideradas parcialmente patogênicas. Os microorganismos mais frequentes foram: *Staphylococcus* spp (22%), *S. intermedius* (17%), *Streptococcus canis* (16,5%), *Pseudomonas* spp (9,4%) e outros *Streptococcus* spp (8,7%). Foram isolados fungos em apenas 4,6% das amostras. Os autores afirmaram ainda que para os gram-negativos a gentamicina é o antibiótico de eleição, enquanto a associação de neomicina+bacitracina+ polimixina B deve ser preferida para os gram-positivos.

Foram isolado por COSTA et al. (1989), dezoito espécies de bactérias em culturas de conjuntiva de cães sadios, prevalecendo o *S. aureus*, *S. intermedius*, *E. coli* e *S. epidermidis*. ANDRADE et al. (1990), analisaram bacteriologicamente 200 amostras colhidas do ambiente do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás/EV/UFG, do pessoal envolvido no trabalho hospitalar e das feridas cirúrgicas de cães. A ordem percentual das frequências para as colônias de bactérias foram os *Sthapylococcus coag(-)* (32,32%), *Streptococcus* spp (16,36%), *Enterobacter* spp (12,72%), *Micrococcus Sthapylococcus coag(+)* (6,54%), *Pseudomonas* spp (6,18%), *E. coli* (4,36%), spp (9,81%), *Citrobacter* spp (4,0%), *Proteus* spp (2,90%), *Klebiella* spp (1,45%) e *Providencia* spp (0,36%).

Foram realizados por MESQUITA et al. (1991/1992), testes de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos para as mesmas amostras coletados por ANDRADE et al. (1991/1992). Concluíram que a gentamicina e o cloranfenicol demonstraram maior eficiência para os gram-negativos, porém, com resultados negativos para os gram-positivos. PISANI et al. (1994), submetem ratos ao tratamento com ciclosporina A, para avaliar a evolução da microbiota do saco conjuntival destes animais. Os pesquisadores concluíram que houve variação na microbiota independente do tempo de tratamento, predominando os *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium* spp. enterobactérias e leveduras.

BARON et al. (1994), afirmaram que os bastonetes aeróbicos gram-positivos são considerados habitantes naturais do meio ambiente e constituem uma grande porção da flora conjuntival normal de cães, sendo portanto, freqüentemente isolados em laboratório. Já

JOKLIK et al. (1994), isolaram com frequência *Staphylococcus epidermidis* e vários difteroides aeróbicos do saco conjuntival de cães, que presumivelmente se originam da flora palpebral.

Objetiva-se neste experimento analisar a variação da microbiota ocular de cães sem raça definida submetidos a xenotransplantes de córnea, tratados com colírio de ciclosporina A a 2% e sulfato de gentamicina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 10 cães adultos, machos e fêmeas, sem raça definida, com peso médio 10kg. Após terem sido examinados e considerados saudáveis, foram submetidos ao implante de córnea no globo ocular esquerdo de suínos abatidos em frigorífico. No pós-operatório foi instilado no globo ocular operado uma gota de colírio de gentamicina^a e de ciclosporina^b A (2%), quatro vezes ao dia, durante 28 dias.

No dia anterior ao implante (dia 0), realizou-se uma coleta no fórnix da pálpebra superior dos cães, com zaragatoa estéril, e imediatamente embebida em água peptonada 0,1%, para os testes das bactérias aeróbicas e fungos.

Para identificação dos gram-positivos, o material foi repicado em caldo de tioglicolato^c e agar sangue^d a 37°C/24 h, sendo os gram-positivos repicados novamente em caldo Casoye^e, e realizada a prova de catalase^f. As culturas catalase-negativas foram identificadas como *Streptococcus spp.*. Para as catalases-positivas foi feita a prova de oxidase^g. As culturas oxidase-

negativas foram identificadas como *Micrococcus spp.* Para as oxidase-positivas, foram feitas a prova coagulase (plasma de coelho^h), identificando as cepas de *S. coagulase-positivas* e *S. Coagulase-negativas*.

Para identificação dos gram-negativos, o material foi repicado em caldo selenitoⁱ e MacConkey^j e incubado a 37°C/24 h, sendo novamente incubado no meio MacConkey na mesma temperatura e tempo, e direto do MacConkey para o "Tríplice Sugar Iron" (TSI^k) a 37°C/24 h, através de 3 colônias lactose-positivas e 3 negativas. De acordo com o crescimento no TSI, foram selecionados os tubos para as provas bioquímicas de Uréia^l, Indol^m, Vermelho de metila (VMⁿ), Citrato de Simons^o, Agar fenilamine^p, Glicose^q, Lactose^r, Manitol^s e Malonato^t. A leitura e interpretação foram feitas com 24 h ou 48 h (EDWARDS & EWING, 1972). Cada teste foi repetido no sétimo, décimo quarto, vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dia após o enxerto e comparados com dia 0.

RESULTADOS

Das 50 amostras obtidas do saco conjuntival dos cães, para cultura bacteriana, foi encontrado a prevalência de *Bastonetes gram-positivos* (4%), *Staphylococcus epidermidis* (2%), *Enterobacter spp.* (16%), *Pseudomonas spp.* (2%), *Bastonetes gram-positivos* + *S. epidermidis* (12%), *Enterobacter spp.* + *S. epidermidis* (2%). Em 62% das amostras não ocorreram crescimento bacteriano. (Tabela.1).

Tabela 1. Distribuição das culturas de bactérias desenvolvidas nas amostras de fórnice conjuntival, colhidas nos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, de cães xenotransplantados com córneas de suínos e tratados com colírio de sulfato de gentamicina e ciclosporina A (2%).

CÃO	DIA 0	7º DIA	14º DIA	21º DIA	28º DIA
1	bast. gram (+)	-	-	-	-
2	bast. gram (+) <i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-
3	-	<i>Pseudomonas spp.</i>	-	-	-
4	bast. gram (+) <i>S. epidermidis</i>	-	-	-	<i>Enterobacter spp.</i>
5	bast. gram (+) <i>S. epidermidis</i>	-	bast. Gram (+) <i>Enterobacter spp.</i>	-	-
6	-	-	<i>Enterobacter spp.</i>	-	-
7	-	-	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
8	bast. gram (+) <i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-
9	-	-	<i>Enterobacter spp.</i> <i>S. epidermidis</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
10	bast. gram (+) <i>S. epidermidis</i>	Bast. Gram (+) <i>S. epidermidis</i>	-	-	-

bast - Bastonetes
(-) - Sem crescimento

DISCUSSÃO

Embora GERDING et al. (1988) e MURPHY et al. (1978), tenham isolado *S. epidermidis* de saco conjuntival de cães com doença ocular, este microorganismo também foi isolado de cães saudáveis por COSTA et al., (1989). O fato de ter sido isolado neste experimento, corrobora com estes pesquisadores, pois, além de fazer parte da microbiota ocular normal, a bactéria pode ser contaminante proveniente das pálpebras, como afirma JOKLIK et al. (1994). Por outro lado BARON et al. (1994), afirmaram que os bastonetes gram-positivos são habitantes naturais do meio ambiente e freqüentemente são isolados em laboratório. Tal fato também foi verificado neste trabalho, porém restringiram-se nas amostras do dia 0 e esporadicamente do sétimo dia e décimo quarto dia, provavelmente tenha ocorrido por contaminação ambiental durante a colheita.

A *Pseudomonas spp* foi isolada por BISTNER et al. (1969) e LOPES et al. (1973) em animais normais e por GERDING et al. (1988) e MURPHY et al. (1978), em animais com doença ocular. Embora prevalente no ambiente de trabalho do médico veterinário, fato comprovado por ANDRADE et al. (1991/1992), a bactéria foi identificada, neste experimento, apenas em uma amostra do sétimo dia.

As cepas de *Enterobacter spp.* fora do trato gastrointestinal são provenientes de autocontaminação ou contaminação ambiental, mesmo porque estávamos trabalhando num ambiente, no qual a bactéria era prevalente, como demonstraram ANDRADE et al. (1991/1992). Portanto, a ocorrência do microorganismo foi devido provavelmente a ineficiência do sulfato de gentamicina como antibiótico de escolha, contrariando a afirmação de GERDING et al. (1988) e MESQUITA et al. (1991/1992). Além disto, PISANI et al. (1994) demonstraram a variação da microbiota ocular em ratos tratados com colírio de ciclosporina A (2%), resultados coincidentes com os observados neste experimento para a prevalência do *Enterobacter spp.*

As alterações sistêmicas descritas por MILLER et al. (1982), no cão em decorrência do uso da ciclosporina A, não foram encontradas nos animais deste trabalho.

CONCLUSÕES

1. A prevalência da bactéria *Enterobacter spp* (16%) ou associada com o *S. epidermidis*

(2%), demonstrou a variação da microbiota ocular, provocada pelo uso do colírio de ciclosporina A (2%) e a ineficiência do sulfato de gentamicina como antibiótico de escolha.

2. A ocorrência dos bastonetes gram-positivos (4%) ou associados com *S. epidermidis* (12%) nas amostras iniciais, demonstrou a ocorrência de falhas nas colheitas por serem os primeiros contaminantes ambientais e os outros provenientes das pálpebras dos cães. O desaparecimento das bactérias nas amostras finais, demonstraram o acerto da técnica de colheita e a eficiência do sulfato de gentamicina como antibiótico de escolha.

MATERIAIS DA PESQUISA

- a. Gentamicina "oculum". Laboratório Fruntost. São Paulo, SP.
- b. Ciclosporina A (2%) colírio. Laboratório Drogana. Goiânia, GO.
- c. Tioglicolato. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- d. Agar sangue. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- e. Caldo Casoy. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- f. Agar simples inclinado. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- g. Bactidente oxidase. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- h. Plasma liofilizado de coelho. DIFCO. São Paulo, SP.
- i. Caldo selenito cistina. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- j. Meio MacConkey. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- k. TSI. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- l. Caldo Uréia. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- m. Caldo Triptofano. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- n. MRVP (VM). Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- o. Citrato de Simmons. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- p. Agar fenilalanine. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- q. Glicose. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- r. Lactose. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- s. Manitol. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.
- t. Malonato. Merck Sharp Dhome. São Paulo, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M.A., MESQUITA, A.J., SILVA, L.A.F., PAULO, N.M. Frequência de bactérias isoladas de ambiente hospitalar, feridas cirúrgicas, Médicos Veterinários, Enfermeiros e Auxiliares de Enfermagem - I. Infecção em Hospital Veterinário. **Anais Esc Agron Vet**, v. 21/22, n. 1, p. 101-111, 1991/1992.
- BARON, J.E., PETERSON, R.L., FINEGOLD, M.S. **Diagnostic Microbiology**. St. Louis: Morby, 1994. 958 p.
- BISTNER, I.S., ROBERTS, R.S., ANDERSON, P.R. Conjunctival bacteria: Cincal appearances can be deceiving. **Modern Vet Pract**, v. 12, p. 45-47, 1969.
- COSTA, M., CARDOSO, M.I., FERNANDES, J.C.T. Aerobic bacterial flora of the conjunctiva in clinically normal dogs. **Arq Fac Vet**, UFRG., v. 17, p. 53-57, 1989.
- EDWARDS, P. R., EWING, W. H. **Identification of Enterobacteriaceae**. 3. ed. Minneapolis: Binger Pub. Co, 1972.
- GERDING, P.A., MACLAUGHLIN, S.A., TROOP, M.V. Pathogenic bacteria and fungi associated with enfermal ocular diseases in dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 193, n. 2, p. 242-244, 1988.
- JOKLIK, W. K., WILLET, H. P., RAMOS, D. B. **Microbiologia**. 20. ed. Buenos Aires: Panamericana, 1994. 1696 p.
- LOPES, C.A.M., MORENO, G., CAMPOS, C.E.O.P., MICHELIN, L. Bacteriological study of canine conjunctival. **Arch Inst Biol**, v. 40, n. 3, p. 263-266, 1973.
- MESQUITA, A.J., SILVA, L.A.F., ANDRADE, M.A., BATISTA, M.A.C. Resistência de bactérias, isoladas no ambiente, em feridas cirúrgicas, em Médicos Veterinários, Enfermeiros e Auxiliares de Enfermagem -II-Infecção em Hospital Veterinário., **Anais Esc Agron Vet**, v. 21/22, n. 1, p. 1-8, 1991/1992.
- MILLER, O. **Farmacologia clínica e terapêutica**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 1982. 976 p.
- MURPHY, J.M., LAVACH, J.D., SEVERIN, G.A. Survey of conjunctival flora in the dogs with clinical signs of esternal eye diseases. **J Am Med Assoc**, v. 172, n. 1, p: 66-68, 1978.
- PISANI, E.H.R., ANDRADE, A.L., BARROS, P.S.M., LAUS, J.L., SAFATLE, A.V.M. Study of the 2% topical cyclosporine eye drops effects in the albino rats conjunctival microflora (*Ratus norvegicus*). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 1. **Anais...**, novembro, 1994.